



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 68 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2569 Vol. 68 No. 3 July - September 2026

ว 68 (3) น.ค. - ก.ย. 2569 Bull Dept Med Sci 68 (3) Jul - Sep 2026

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข	
ที่ปรึกษาด้านบริหาร	ดร.นพ.สราวุฒิ บุญสุข นพ.พิเชฐ บุญญ์ดี	นพ.วัชรพงษ์ คำหล้า ดร.นพ.สุรเดช ชวเดช
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ดร.ปนัดดา ชิลวา ภญ.ปราณี ชาลิตธำรง ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ ดร.ทนพญ.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท	สพ.ญ.ดร.เยาวภา พงษ์สุวรรณ ดร.เดือนถนนม พรหมชาติแก้ว นางहरษา ไชยวานิช
บรรณาธิการบริหาร	ดร.สุภาพร ภูมิอมร	
บรรณาธิการ	ดร.ปฐมภาพร ปรีษากร	
รองบรรณาธิการ	ทนพญ.สิริภากร แสงกิจพร ดร.สิริพรรณ แสงอรุณ ดร.น.สพ.เดชา แปงใจ	ดร.ปนัดดา เทพอัศกร ภญ.ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์ ดร.สุภาพร สุภารักษ์
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุฒินะ ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ดร.ดนัย ทิวาเวช ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์ รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช ศ.ดร.พญ.ชนิตรา ธวัชิตต์ รศ.ดร.ภญ.พิณทิพย์ พงษ์เพชร ภญ.สุวรรณา จารุสุข ดร.อุษาวดี ถาวรระ นางวิชชุดา จิตตางกูร ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร ดร.อรุณากร จันทรแสง ดร.อภิวิทย์ ธวัชสิน ดร.ประไพ วงศ์สินคงม่น ดร.นวจันทร์ วิจิษณ์จินดา	มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวภาวิณี สุขเจริญ นางสาวอภิสร่า ไคมเดือน นางสาวชไมพร ชุมจันทร์ นางสาวอภิมน จีรพงศ์ธร นายนาวิ ศรีธรรมย์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
สำนักงานวารสาร	สำนักผู้ทรงคุณวุฒิกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 ต่อ 99662, 98205, 98206 โทรสาร 0-2951-1297 E-mail : bull.dmsc@dmsc.mail.go.th	
พิมพ์ที่	บริษัท ธนอรุณการพิมพ์ จำกัด 457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2282-6033-4	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 68 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2569

Vol. 68 No. 3 July - September 2026

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อวัคซีนป้องกันโรคหัดเยอรมัน
โดยวิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay
พยอม เอกศิริ ญัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์ วิภาวี วงศ์ชนะ สกาลิน ไตรศิริวานิชย์ และ สุภาพร ภูมิอมร 485
- การเฝ้าระวังการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการผันแปรของน้ำหนักร่างกายของผลิตภัณฑ์
ยาสมุนไพรในจังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล (พ.ศ. 2566–2568)
มิตรารุณ ศรีเมือง ญดา บุญเจริญ อรรพรรณ หลงละเลิง และ ญัฐชา ดั่งรัก 507
- การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจการตั้งครรภ์แบบรวดเร็วเมื่อประยุกต์ใช้กับ
ตัวอย่างเลือด
สุพรรณษา ตรุษศาสตร์ 521
- การพัฒนาและประเมินผลระบบการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยใช้หลัก
Rational Laboratory Use และการมีส่วนร่วมของบุคลากร โรงพยาบาลหนองมะโมง
สุพัตรา สุวรรณศิริ และ วิทยา จันทโรจน์ 532
- การศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ที่ผลิตโดย
ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ
กานดา วีระเวชสุกิจ และ จิรวัดน์ ไชยงน้อย 549
- การพัฒนาวิธีสกัดดีเอ็นเอจากกระดากซ์เลือดแห้งเพื่อการตรวจทางพันธุกรรม
กรรณิการ์ ปุณณภูมิ ภาวิณี อินนาค รณนาพรณ ปันกาญจน์โต อรอนงค์ จาเรือน มะลิวัลย์ นุ่มนวล
รัชณิกร ใจเชื้อ วิโรจน์ พวงทับทิม ชรินทร์ทิพย์ เย็นยวดี ปุณทริกา ไพบุลย์ศิริ และ ھرรษา ไทยศรี 565
- การศึกษาประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของหน้ากาก N95 เพื่อการใช้ซ้ำ
กัญญารัตน์ นิธิ ปรียานุช สุดงาม และ พรเทพ จันทรคุณภาส 578

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อจากน้ำนํ้าลูกตาของผู้ป่วยที่สงสัยภาวะติดเชื้อ
ภายในลูกตาโดยใช้ชุดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็กกับวิธีการเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน
โรงพยาบาลเมตตาประชารักษ์ (วัดไร่ขิง)
วิรงค์รัตน์ บุญเรือง 595
- ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ Human Papilloma Virus จีโนไทป์เสี่ยงสูงชนิด
Non-16/18 กับรูปแบบความผิดปกติทางเซลล์วิทยา ในอำเภอพรหมพิราม จังหวัด
พิษณุโลก ปี พ.ศ. 2567
ดวงดาว บุญยอด บัณฑิต พรหมรักษา และ ชวิศา เพ็ชรอำไพ 608
- การสำรวจติดตามและประเมินความเสี่ยงการได้รับสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง
ในผลไม้เศรษฐกิจของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2568
วีรวิทย์ วิทยานันท์ พรรคพล ชะพลพรรค ขนิษฐา พุทธสุชา ศศิธร สุกรีทา และ กิ่งแก้ว กาญจนรัตน์ 621
- ความชุกและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Coxiella burnetii* ที่ตรวจพบ
ในรกเพาะ: นัยสำคัญต่อความเสี่ยงโรคไขข้อในคน
เดชา แสงใจ รัตนา ตาเจริญเมือง สิทธิพร ปานเม่น มาสเกียรติ บุญยฤทธิ์ ญัฐพล นุชนท
ดาร์รัตน์ แบ่งดี ชลลดา มีทรัพย์ กาญจนา สอนองบุญ สุมาลี บุญมา กำชัย กิจศิลป์
และ อาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์ 641
- การเปรียบเทียบค่า Sigma Metrics และ Quality Goal Index (QGI)
ของการทดสอบทางเคมีคลินิก โดยใช้ค่า Bias จาก Peer Group และโครงการประเมิน
คุณภาพภายนอก (EQA)
ไชยา ก่องดวง และ พิวัลย์ จิระวงศ์โรจน์ 661
- การตรวจ NAT2-diplotyping ด้วยวิธี Real-time PCR
ทิพย์รัตน์ โพธิพิทักษ์ นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา ปกติดา ประครองทรัพย์ วิมาลา อินอุ่นโชติ
สุรัคเมธ มหาศิริมงคล และ สุกัญญา วัฒนาโกคยกิจ 673
- การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารอีทีฟอนตกค้างในผลไม้ด้วยเทคนิค
Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry
จิระพงศ์ เหลืองชัยพร ธรณิศร์ ไชยมงคล และ วีรวิทย์ วิทยานันท์ 688
- การคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกจากอาหาร
ธัญญาพร สุวรรณรัตน์ นันธิดา ดาว พัสกุล และ นพพร แจ่มใส 710

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์ข้อบกพร่องและแนวทางการพัฒนาระบบงานหน่วยรับรองของ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 เสาวนีย์ อารมย์สุข ธนวัฒน์ ศรีดาพันธ์ และ สิริพรรณ แสงอรุณ	728
การวิเคราะห์การตรวจพบเชื้อไวรัสอาร์เอสวีจากตัวอย่างส่งตรวจ ในโรงพยาบาลรามธิบดี ประเทศไทย: การศึกษาย้อนหลังช่วงปี พ.ศ. 2555–2565 กิ่งกาญจน์ รักษัณณี ตริวัฒน์ วัฒนะโชคชัย มนัสนันท์ บุญญานุวัตร สิริพิชญา พลายแก้ว ประพันธ์ สุขสุเดช วอทันยู นครศรี วุฒิพงษ์ ใจหาญ ละออ ชัยลือกิจ และ พิเชฐ ยุทธนาการวิกรม	744
การศึกษาข้อมูลย้อนหลังของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่มีสาเหตุมาจาก ฮิวแมนเมตานิวโมไวรัส ในผู้ป่วยโรงพยาบาลรามธิบดี ระหว่างปี พ.ศ. 2555–2565 ตริวัฒน์ วัฒนะโชคชัย กิ่งกาญจน์ รักษัณณี พิเชฐ ยุทธนาการวิกรม มนัสนันท์ บุญญานุวัตร สิริพิชญา พลายแก้ว ประพันธ์ สุขสุเดช วอทันยู นครศรี วุฒิพงษ์ ใจหาญ และ ละออ ชัยลือกิจ	756
การศึกษาการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำในระบบเอกซเรย์ดิจิทัล ในโรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี ณัฐยา เหล่าศิริ	769
การประเมินประสิทธิภาพระบบบริหารคุณภาพ ISO/IEC 17025:2017 ห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา ปาณิสตา เชาวนะกิจ ปาริฉัตร ลักษณะ มงคล พัทธโน และ ศิริวรรณ สำอางค์	778

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 68 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2569

Vol. 68 No. 3 July - September 2026

CONTENTS

Page

Original Articles

- Analysis of Specific Neutralizing Antibody Titers Against
Cervical Cancer Vaccine Using the Pseudovirion-Based
Neutralization Assay** 485
*Payom Agsiri, Natthakarn Mingngamsup, Wipawee Wongchana,
Sakalin Trisiriwanich, and Supaporn Phumiamorn*
- Surveillance of Microbial Contamination and Weight Variation in
Herbal Medicine Products in Trang, Phatthalung and Satun Provinces
(2023–2025)** 507
*Mittrarun Srimuang, Yada Booncharoen, Orawan Hlonglaleung,
and Natthacha Duangrak*
- Evaluation of the Analytical Performance of a Rapid hCG
Pregnancy Test Applied to Blood Specimens** 521
Supansa Tutsat
- Development and Evaluation of a Laboratory Test Ordering
System Based on Rational Laboratory Use and Personnel Participation
at Nongmamong Hospital** 532
Supattra Suwansiri and Wittaya Juntaroje
- Study of Blood Coagulation Parameters in Mlac:WR Rat Produced
by the National Laboratory Animal Center** 549
Kanda Veeravechsukij and Jirawat Khanongnoi

Original Articles

- Development of DNA Extraction Method from Dried Blood Spots for Genetic Analysis** 565
Kannikar Punnapum, Pawinee Innark, Rotjanapan Pankanjanato, Onanong Jaruan, Maliwan Numnuan, Ratchaneekorn Jaisue, Wiroj Puangtabtim, Charintip Yenyuvadee, Pundharika Piboonsiri, and Hansa Thaisri
- A Study of Decontamination Efficacy on N95 Respirators for Reuse** 578
Kanyarat Nitee, Preeyanut Sutngam, and Pornthep Chancunapas
- Comparison of Vitreous Culture Results in Patients with Suspected Endophthalmitis Using Pediatric Blood Culture Bottles and Conventional Culture Method at Mettapracharak (Wat Rai Khing) Hospital** 595
Wirongrud Boonruang
- Association of High-Risk Human Papilloma Virus Type Non-16/18 Infection with Cytological Abnormalities in Phrom Phiram, Wang Thong, and Nakhonthai Districts, Phitsanulok Province, 2024** 608
Dujdao Boonyod, Bundit Promraksa, and Chawisa Phetumpai
- Monitoring Survey and Dietary Risk Assessment of Pesticide Residues in Thailand's Economically Important Fruits in 2025** 621
Weerawut Wittayanan, Pakphon Chaphonpak, Khanittha Phutthasukha, Sasithorn Sukreeta, and Kingkaew Kanchanaratana
- Prevalence and Genetic Heterogeneity of *Coxiella burnetii* Strains from Reservoir Goat Placentas: Implications for Human Q Fever Risk** 641
Decha Pangjai, Ratana Tacharoenmuang, Sittiporn Parnmen, Maskiet Boonyaretha, Nattapon Nukhunthod, Dararat Bangdee, Chonlada Meesub, Kanjana Sanongboon, Sumalee Boonmar, Kamchai Kidsin, and Archawin Rojanawiwat
- Comparison of Sigma Metrics and Quality Goal Index (QGI) of Clinical Chemistry Tests Using Bias from Peer Group and External Quality Assessment (EQA)** 661
Chaiya Kongduang and Piwan Jirawongviroj

Original Articles

- NAT2-diplotyping by Real-time PCR** 673
Tiparat Potipitak, Nuanjun Wichukchinda, Pathida Prakongsup, Wimala Inunchot, Surakameth Mahasirimongkol, and Sukanya Wattanapokayakit
- Development and Method Validation for the Analysis of Ethephon Residues in Fruits Using Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry** 688
Jirapong Luangchaiyaporn, Thoranit Chaimongkol, and Weerawut Wittayanan
- Selection of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Properties from Foods** 710
Ratchadaporn Suwannarat, Nunthidadao Phatsakul, and Nopporn Jamsai

Laboratory Finding

- Analysis of Non-conformities and Guidelines for Accreditation System Development of the Bureau of Laboratory Quality Standards Comply with ISO/IEC 17011:2017** 728
Saovanee Aromsook, Thanawat Sridapan, and Siriphan Saeng-aroon
- Analysis of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infections from Clinical Specimens in Ramathibodi Hospital, Thailand: A Retrospective Study from 2012–2022** 744
Kingkan Rakmanee, Treewat Watthanachockchai, Manutsanun Boonyanuwat, Sirapichaya Phlykaew, Praphan Suksudej, Vorthunju Nakhonsri, Wuttipong Jaihan, La-or Chailurkit, and Pichet Yutthanakarnwikom
- A Retrospective Study of Respiratory Tract Infections Caused by Human Metapneumovirus in Patients at Ramathibodi Hospital Between 2012–2022** 756
Treewat Watthanachockcha, Kingkan Rakmanee, Pichet Yutthanakarnwikom, Manutsanun Boonyanuwat, Sirapichaya Phlykaew, Praphan Suksudej, Vorthunju Nakhonsri, Wuttipong Jaihan, and La-or Chailurkit

Laboratory Finding

- A Study of Repeat Digital Chest X-ray Radiography
at Ubon Ratchathani Cancer Hospital** 769

Nattaya Laosiri

- Evaluation of the Effectiveness of the ISO/IEC 17025:2017
Quality Management System at the Laboratory of
Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla** 778

Parnisa Chaowanakit, Parichat Lakkhana, Mongkol Phatthano, and Siriwan Sam-ang

การวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ วัคซีนป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก โดยวิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay

พยอม เอกศิริ ญัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์ วิภาวี วงศ์ชนะ สกาสิน ไตรศิริวานิชย์ และ สุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ ปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูกจัดอยู่ในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศไทย การตรวจระดับภูมิคุ้มกันในคนที่ได้รับวัคซีนและการประเมินความแรงเพื่อการควบคุมคุณภาพวัคซีนจึงมีความสำคัญ การศึกษานี้ได้พัฒนาการวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีต่อ Human Papillomavirus (HPV) ด้วยวิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay (PBNA) โดยศึกษาความสามารถของซีรัมคนมาตรฐานที่จำเพาะต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 ในการยับยั้ง HPV pseudovirions ในการเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ($IC_{50}/100\mu L$) และนำวิธีดังกล่าวมาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ พบว่า HPV pseudovirions ที่ผลิตขึ้นมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีแต่ละสายพันธุ์และไม่ถูกยับยั้งด้วย negative serum มีความแม่นยำโดยมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 70-130% การทดสอบความเป็นเส้นตรง พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง log fluorospot และระดับความเจือจางของซีรัมมาตรฐาน มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีค่า correlation coefficient ≥ 0.98 และกราฟที่ได้เป็นเส้นตรงตลอดช่วง 20-80% ของ %inhibitory rate สำหรับขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีต่อสายพันธุ์ 16 และ 18 มีค่าเท่ากับ 1.49 $IC_{50}/100\mu L$ และ 1.56 $IC_{50}/100\mu L$ ตามลำดับ ค่าความเที่ยงของผลการทดสอบมีค่า % coefficient of variance ไม่เกิน 25% และเมื่อทดสอบความทนของวิธีโดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ต่างกัน และใช้ cell passage ที่แตกต่างกัน พบว่าค่า $IC_{50}/100\mu L$ ที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p -value > 0.05) โดยสรุปวิธี PBNA ที่พัฒนาขึ้นผ่านการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับ HPV16 และ HPV18 ทั้งในซีรัมคนมาตรฐานและซีรัมหนูจำเพาะต่อสายพันธุ์ จึงสามารถใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาสารมาตรฐานจากสัตว์ทดลองให้ครอบคลุม HPV-VLP สายพันธุ์อื่นที่ใช้ในการผลิตวัคซีนต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีนป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก, HPV, แอนติบอดี, Pseudovirion-based neutralization assay (PBNA), การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

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

Received: 10 September 2025

Revised: 7 April 2026

Accepted: 6 June 2026

บทนำ

การติดเชื้อไวรัส human papillomavirus (HPV) ยังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศรายได้ต่ำถึงปานกลาง สายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูง เช่น HPV สายพันธุ์ 16 และสายพันธุ์ 18 เป็นสาเหตุของมะเร็งปากมดลูกประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วยทั้งหมด^(1,2) องค์การอนามัยโลกระบุว่ามะเร็งปากมดลูกเป็นหนึ่งในโรคมะเร็งที่มีอัตราการตายสูงโดยมีผู้หญิงมากกว่า 500,000 คน ได้รับผลกระทบในแต่ละปี⁽³⁾ การฉีดวัคซีน HPV จึงเป็นมาตรการป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยช่วยลดอัตราการติดเชื้อและลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งก่อนมะเร็งและมะเร็งปากมดลูกได้อย่างมีนัยสำคัญ⁽¹⁾ ปัจจุบันวัคซีนที่ใช้แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ วัคซีนชนิด 2 สายพันธุ์ (bivalent) 4 สายพันธุ์ (quadrivalent) และ 9 สายพันธุ์ (nonavalent) ซึ่งแต่ละชนิดมีการป้องกันตามสายพันธุ์ที่ครอบคลุม⁽⁴⁾ ประสิทธิภาพของวัคซีนขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น อายุผู้รับวัคซีนและจำนวนโดส โดยเฉพาะการฉีดวัคซีนในช่วงวัยเด็กสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงและยาวนาน⁽⁵⁾ มีรายงานการให้วัคซีนเพียงหนึ่งโดสสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เป็นเวลาอย่างน้อย 5 ปี และให้ผลใกล้เคียงกับการให้สองโดส⁽⁶⁾ สอดคล้องกับข้อมูลจาก World Health Organization (WHO) และ Program for Appropriate Technology in Health (PATH) ที่ผลักดันแนวทางการให้วัคซีนแบบโดสเดียวเพื่อเพิ่มการเข้าถึงวัคซีน โดยเฉพาะวัคซีนชนิด 9 สายพันธุ์ สามารถป้องกันการติดเชื้อสายพันธุ์เสี่ยงสูงได้ถึงร้อยละ 90⁽⁷⁾ ประเทศไทยได้กำหนดกลยุทธ์ส่งเสริมการฉีดวัคซีนในกลุ่มเด็กหญิงชั้นประถมศึกษาปีที่ 5 และกลุ่มวัยรุ่นตามนโยบายของกระทรวงสาธารณสุข ควบคู่กับการดำเนินแผนยุทธศาสตร์ความมั่นคงด้านวัคซีนภายในประเทศตามนโยบายระดับชาติ⁽⁸⁻¹⁰⁾ การประเมินระดับภูมิคุ้มกันหลังการได้รับวัคซีนมีความสำคัญในการพิจารณาประสิทธิผลของวัคซีน โดยเฉพาะการตรวจวัด neutralizing antibodies ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สำคัญของ protective immunity ตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกและ United States Food and Drug Administration (U.S. FDA)^(4,11)

วิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay (PBNA) เป็นวิธีมาตรฐานสากลที่ใช้ประเมินภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ HPV เนื่องจากมีความจำเพาะสูงและสามารถผลิตไวรัสเทียม (pseudovirion) ได้หลายสายพันธุ์สำหรับการทดสอบ⁽¹²⁻¹⁵⁾ จากงานวิจัยของ Nie J และคณะ (2014) ได้พัฒนา high-throughput PBNA ซึ่งมีความเป็นเส้นตรงของ neutralization curve เหมาะสมต่อการคำนวณค่า IC_{50} และสามารถประเมินภูมิคุ้มกันจำเพาะต่อสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นหลักฐานเชิงประจักษ์ว่า PBNA สามารถตรวจวัดแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ในซีรัมหนูได้จริง จากผลการศึกษาใช้ pooled serum จากหนู Balb/c ที่ถูกกระตุ้นด้วยวัคซีน quadrivalent HPV virus-like particles (VLPs) ประกอบด้วย HPV6/11/16/18 ทดสอบกับ HPV pseudovirions ร่วมกับ bovine papillomavirus (BPV) pseudovirion ซึ่งใช้เป็น heterologous control พบว่าซีรัมหนูสามารถยับยั้ง HPV16 และ HPV18 ได้ในระดับสูง (ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 80-90% ในขณะที่ให้ค่าการยับยั้งต่อ BPV pseudovirion ในระดับต่ำอยู่ในช่วง 0-10% ใกล้เคียงกับซีรัมหนูก่อนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ให้ค่าใกล้ 0 ต่อ HPV ทุกสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งที่ตรวจพบเป็น type-specific neutralization ต่อ HPV16 และ HPV18⁽¹⁴⁾ ต่อมาในปี ค.ศ. 2016 Nie J และคณะ ได้พัฒนา triple-color PBNA ซึ่งใช้ซีรัมหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยวัคซีนหลายสายพันธุ์ (nonavalent HPV vaccine) และมีรายงานค่า neutralization titers ของ HPV16 และ HPV18 ที่ได้จากการทดสอบแบบหลายสีมีค่าใกล้เคียงกับการทดสอบแบบ single-color โดยมีความแตกต่างไม่เกิน 2 เท่า และไม่พบสัญญาณการยับยั้งในช่องสัญญาณของสายพันธุ์ที่ไม่ตรงกับแอนติบอดี รวมทั้งให้ค่าการยับยั้งต่อ BPV pseudovirion ในระดับต่ำใกล้เคียงค่าพื้นฐาน⁽¹⁶⁾ การพัฒนาวิธีดังกล่าวเพื่อรองรับการตรวจหลายสายพันธุ์ในกลุ่มเดียวกันเพิ่มความไวและความแม่นยำ จึงเหมาะต่อการประเมินวัคซีนหลายสายพันธุ์ เช่น วัคซีน 9 สายพันธุ์ ที่อยู่ระหว่างการพัฒนาใน

หลายประเทศ นอกจากใช้ในการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน ในซีรัมคนแล้ว PBNA ยังถูกนำมาใช้กับซีรัมจาก สัตว์ทดลอง เช่น หนูที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย HPV-VLP ทั้งชนิด monovalent และ multivalent ซึ่งให้ผลการทดสอบที่มีความสอดคล้องกับวิธีอื่น เช่น Luminox immunoassay และ ELISA^(13,14,17,18) โดยเฉพาะงานของ Bei L และคณะ (2025) ซึ่งประเมิน ภูมิคุ้มกันจากวัคซีน 14-valent ในหนู และพบว่าซีรัม สัตว์ทดลองสามารถใช้ประเมิน neutralizing antibodies ได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽¹⁸⁾ และสอดคล้อง กับหลักการของ PBNA สนับสนุนแนวคิดที่ว่าซีรัม สัตว์ทดลองสามารถใช้แทนซีรัมคนในการประเมินวัคซีน ระยะ pre-clinical⁽¹⁹⁾

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำวิธี PBNA มาพัฒนาใช้ในห้องปฏิบัติการในการตรวจวัดระดับ neutralization antibodies ที่จำเพาะต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 โดยเบื้องต้นใช้สารมาตรฐานอ้างอิง ที่มาจากคน เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ ได้แก่ anti-HPV16 human serum (NIBSC code 05/134) และ anti-HPV18 human serum (NIBSC code 10/140) เมื่อวิธีทดสอบผ่านการตรวจสอบ ความถูกต้องของวิธี จะนำมาใช้เป็นต้นแบบสำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจหาระดับแอนติบอดีที่จำเพาะ ต่อวัคซีนป้องกันโรคหัดเรื้อรังปากมดลูก โดยใช้ซีรัม จากหนูทดแทนสารมาตรฐานอ้างอิงที่มาจากคน ซึ่ง ซีรัมหนูได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย HPV-VLP สายพันธุ์เดี่ยว (monovalent HPV VLP) ใน หนูถีบจักรแทนสารมาตรฐานอ้างอิงจากคน เพื่อพัฒนา เป็นต้นแบบของสารมาตรฐานที่มีความจำเพาะต่อแต่ละ สายพันธุ์ และใช้เป็นแนวทางสำหรับห้องปฏิบัติการ ในการพัฒนาสารมาตรฐานจากซีรัมสัตว์ทดลองชนิด ต่างๆ เช่น กระต่าย หนูถีบจักร หนูแรท และลิงในกลุ่ม macaques ให้สามารถครอบคลุมทุกสายพันธุ์ของ HPV-VLP ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน และรองรับ การควบคุมคุณภาพรวมถึงการพัฒนาวัคซีนภายใน ประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT

เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เป็นอนุพันธ์ของเซลล์ 293 cell line ที่แยกได้จาก human embryonic kidney cells มีการแสดงออกของ SV40 large T antigen จากพลาสมิด the pCMVSPORT6TA_g.neo โดย การแสดงออกของ SV40 large T antigen ดังกล่าว ถูกควบคุมโดย human cytomegalovirus (CMV) promoter (Thermo Fisher Scientific, USA) โดย ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ใช้ในการทดสอบ นำมา เพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 175 ตารางเซนติเมตร เพื่อนำไปใช้ทดสอบ กำหนดเซลล์ มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง $0.8-2.0 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเพาะเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (CO_2 incubator model NU-5510E, NUAIRE, UK) นาน 2-3 วัน สังเกตเซลล์เพิ่มจำนวนเต็มพื้นที่ ผิวขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (ความหนาแน่นประมาณ 80%) ไม่มีเซลล์ล่อยหลุดจากพื้นผิวและเป็น monolayer จำนวน cell passage ที่ใช้ในการทดสอบนับตั้งแต่เปิด ใช้งานไม่ควรเกิน 20 passages ซึ่งเป็นช่วง cell passage ที่เหมาะสมต่อการนำมาทดสอบ PBNA โดยเซลล์ จะถูกย่อยด้วย 0.05% trypsin-EDTA (Gibco, USA) และ phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, USA)

อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์

ในการทดสอบใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose 1X (Invitrogen, USA) ที่มี 10% inactivated FBS (Invitrogen, USA), 1% non-essential amino acids (Invitrogen, USA), 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen, USA) และ 2% 1M HEPES buffer solution (Invitrogen, USA) สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

ซีรัมมาตรฐาน

สารมาตรฐาน Anti-HPV16 human serum 10 IU/mL (NIBSC code no. 05/134, National Institute of Biological Products (NIBSC), UK) และ Anti-HPV18 human serum 16 IU/mL (NIBSC code no. 10/140, National Institute of Biological Products (NIBSC), UK)

Pseudovirion และ monovalent HPV-VLP

HPV pseudovirion สำหรับ HPV16 รุ่นการผลิตที่ PsHPV16-08032019 และสำหรับ HPV 18 รุ่นการผลิตที่ PsHPV18-28022019 ผลิตโดยสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽²⁰⁾ และ monovalent HPV-VLP สายพันธุ์ 16 และ 18 ได้รับจากบริษัท Xiamen Inovax Biotech Co., Ltd. สาธารณรัฐประชาชนจีน

การเตรียมหนูถีบจักร

ดำเนินการสุ่มหนูถีบจักร Outbred Balb/c เพศเมีย 120 ตัว น้ำหนัก 15–20 กรัม หรืออายุ 4–5 สัปดาห์ ด้วยวิธีทางสถิติในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Bioassay assist หัวข้อ RANDAMIAZE จากนั้นชั่งน้ำหนักหนูที่ได้รับในแต่ละตัว จัดแบ่งหนูตามการสุ่มหนูกรงละ 10 ตัว เพื่อให้แต่ละกรงมีน้ำหนักของหนูใกล้เคียงกัน และพักหนู 1 วัน ก่อนฉีดสัตว์ทดลอง

การเตรียมซีรัมควบคุม

การเตรียม positive serum สำหรับ HPV type 16 antibody และ HPV type 18 antibody โดยฉีดกระตุ้นหนูที่พัก 1 วันแล้ว ด้วย monovalent HPV-VLP type 16 และ 18 monovalent HPV-VLP ที่เจือจางในสารละลาย aluminium hydroxide gel (InvivoGen, USA) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน phosphate buffer saline (PBS) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ monovalent HPV-VLP type 16 และ monovalent HPV-VLP type 18 อยู่ที่ 13 และ 7.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal) ของหนูถีบจักร 10 ตัวต่อ

สายพันธุ์ HPV แอนติเจน ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อเป็น positive serum หลังจากนั้น 25–28 วัน⁽²¹⁾ เจาะเลือดหนูจากหัวใจและปั่นแยกซีรัมด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge model Multi RF, Thermo IEC, USA) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath model SW22, Julabo, Germany) ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเก็บซีรัมในตู้แช่แข็ง (deep freezer model 8417, Forma Scientific, USA) ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -70 องศาเซลเซียส

การเตรียม negative serum โดยการฉีดกระตุ้นหนูที่พัก 1 วันแล้ว ด้วยสารละลาย aluminium hydroxide gel ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน PBS จำนวน 10 ตัว ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 25–28 วัน เจาะเลือดหนูจากหัวใจ และปั่นแยกซีรัมด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเก็บซีรัมในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -70 องศาเซลเซียส

ไวรัสควบคุม (Virus control, VC)

ใช้ HPV pseudovirion สายพันธุ์ 16 รุ่นการผลิต PsHPV16-08032019 และสายพันธุ์ 18 รุ่นการผลิต PsHPV18-28022019 ได้จากสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อนำมาพัฒนาวิธี PBNA จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี ได้เลือกระดับความเจือจางของ pseudovirion สำหรับใช้เป็น virus control (VC) ที่ 1/8,000 สำหรับ HPV16 และ 1/2,500 สำหรับ HPV18 ซึ่งเป็นระดับที่ให้สัญญาณอยู่ในช่วง 250–1,000 fluorospots/100 μ L ทั้งนี้ VC เป็นกลุ่มอ้างอิงที่เดิมเฉพาะ pseudovirion โดยไม่เติมซีรัม เพื่อแทนสภาวะการติดเชื้อไวรัสสูงสุดของการทดสอบหรือการยับยั้ง 0% และใช้เป็นค่าอ้างอิงในการคำนวณอัตราการยับยั้ง (% inhibition rate) และ IC₅₀ ด้วยวิธี Reed–Muench^(14,16)

เซลล์ควบคุม (Cell Control, CC)

เซลล์ควบคุม คือ กลุ่มทดสอบที่มีเพียงเซลล์เพาะเลี้ยงโดยไม่มี pseudovirion ไม่มีซีรัม ซึ่งแสดงถึงสถานะเซลล์มีชีวิต 100% (0% infection) ใช้เป็นจุดอ้างอิงสูงสุดสำหรับการคำนวณ %viability

การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อ HPV Pseudo-virion โดยวิธี PBNA

เติมเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ความเข้มข้น 1.5×10^5 เซลล์ต่อ 100 ไมโครลิตร ลงในเพลทปลอดเชื้อชนิด 96 หลุม (96-wells flat tissue culture plate, Corning®, USA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส ในสถานะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 3–6 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเพลท 96 หลุม (96-well round bottom cell culture plate, Corning®, USA) เพื่อทำการเจือจางซีรัมมาตรฐานที่ได้มาจากคน ได้แก่ Anti-HPV16 human serum (NIBSC code no. 05/134) 10 IU/mL และ Anti-HPV18 human serum (NIBSC code no. 10/140) 16 IU/mL ถูกเตรียมเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/20 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 และ 1/1,280 โดยปริมาตรของซีรัมหลังจากเจือจางแล้วในแต่ละหลุมต้องมีปริมาตร 60 ไมโครลิตร และทำการเจือจางซีรัมที่ได้จากหนูถีบจักร (positive serum) ต่อ HPV16 ที่ความเจือจางเริ่มต้น (pre-dilution) 1:2,000 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1/4,000, 1/8,000, 1/16,000, 1/32,000, 1/64,000 และ 1/128,000 และสำหรับ positive serum-HPV18 เตรียมเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/2,500 และเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1/5,000, 1/10,000, 1/20,000, 1/40,000, 1/80,000 และ 1/160,000 โดยปริมาตรของซีรัมหลังจากเจือจางแล้วในแต่ละหลุมต้องมีปริมาตร 60 ไมโครลิตร เมื่อเตรียมซีรัมเสร็จเติม HPV pseudovirions ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 250 ถึง 1,000 Fluorospot ต่อ 50 ไมโครลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ทุกหลุม เขย่าเพลทเบาๆ

และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาย้ายสารจากหลุมแต่ละหลุมไปยังเพลทที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงที่บ่ม นาน 3–6 ชั่วโมง โดยทุกเพลทที่ทำการทดสอบจะต้องมีกลุ่มไวรัสควบคุม (virus control, VC) ไม่น้อยกว่า 6 ข้ำ (หลุม) เซลล์ควบคุม (cell control, CC) ไม่น้อยกว่า 6 ข้ำ (หลุม) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 72 ± 12 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการอ่านผลการทดสอบ⁽¹⁴⁾ เมื่อครบกำหนดนับจำนวนเซลล์เรืองแสง (fluorospot) ในแต่ละระดับความเจือจางด้วยโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 ที่ติดตั้งในเครื่องนับจุดของปฏิกิริยาบนไมโครเพลตและอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลตแบบมัลติดีเทคชัน (ELISPOT) (CTL ImmunoSpot®, OH, USA) จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณค่าระดับแอนติบอดีที่จำเพาะและจับ pseudovirions ไม่ให้เข้าเซลล์เพาะเลี้ยงได้ 50% (The 50% maximal inhibitory concentration, IC₅₀) ด้วยสูตรคำนวณ Reed-Muench^(14,16)

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์^(22,23)

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (specificity)

การทดสอบความจำเพาะของวิธี PBNA ดำเนินการตามแนวทาง ICH guideline หัวข้อความจำเพาะของวิธี⁽²²⁾ โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเจือจางของซีรัมมาตรฐานและการเกิด fluorospots แยกตามสายพันธุ์ HPV ได้แก่ HPV16 และ HPV18 โดยใช้ HPV pseudovirion⁽²⁰⁾ เปรียบเทียบการเกิด fluorospots ในกลุ่มควบคุม ประกอบด้วย หลุมที่เติม negative serum กับหลุม virus control ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 6 หลุมต่อเพลท และเปรียบเทียบรูปแบบ dose response ในหลุมที่มี pseudovirion และซีรัม โดยใช้ซีรัมมาตรฐานความเจือจางเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/20 ส่วน negative serum และ positive serum-HPV16 เตรียมเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/2,000 และ positive serum-HPV18 เตรียมเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/2,500

จากนั้นซีรัมทั้งหมดจะถูกเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ก่อนนำไปทดสอบในระบบ PBNA และผลการทดสอบถูกนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ dose response โดยสร้างกราฟระหว่าง log dilution และ log fluorospot เกณฑ์การพิจารณา กำหนดให้กลุ่มควบคุมต้องมีจำนวน fluorospots ไม่แตกต่างกันตลอดช่วงความเจือจางและไม่แสดงลักษณะ dose response เพื่อยืนยันว่าไม่เกิดการรบกวนจากองค์ประกอบต่างๆ ในระบบทดสอบ ขณะที่กลุ่มทดสอบต้องแสดงการยับยั้งแบบ dose response อย่างชัดเจน การวิเคราะห์ใช้ผลจากการทดสอบ 3 ครั้ง ทดสอบต่างวันกัน จากนั้นตรวจสอบการแจกแจงแบบปกติของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk test ก่อนวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง log fluorospot ของ negative serum และ virus control ด้วยสถิติ independent *t*-test ซึ่งผลการทดสอบต้องไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (*p*-value > 0.05)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range)

เตรียมซีรัมมาตรฐานทั้ง 2 สายพันธุ์ เริ่มต้นที่อัตราส่วน 1/20 (pre-dilution) ทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 และ 1/1,280 และ positive serum-HPV16 เตรียมเริ่มต้นที่อัตราส่วน 1/2,000 (pre-dilution) และ positive serum-HPV18 เตรียมเริ่มต้นที่อัตราส่วน 1/2,500 (pre-dilution) จากนั้นซีรัมทั้งหมดจะถูกเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี PBNA เมื่ออ่านผลด้วยเครื่อง ELISPOT ปริมาณ fluorospots จะแปรผันกับระดับความเจือจางของซีรัม ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง log fluorospot ที่นับได้กับ log ความเจือจางของซีรัม โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, *r*) ต้องมีค่ามากกว่า 0.98 และค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination, *r*²) ต้องมีค่ามากกว่า 0.96 กราฟที่ได้เป็นเส้นตรงตลอดช่วง 20–80% ของ %inhibition rate

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

ทำการประเมินความแม่นยำของวิธี PBNA โดยใช้ซีรัมมาตรฐานจาก NIBSC เป็นตัวแทนในการตรวจสอบความถูกต้องเชิงระบบ ซีรัมมาตรฐานถูกเตรียมเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/20 จากนั้นทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 และ 1/1,280 แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี PBNA เพื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ (%inhibition rate) ในแต่ละระดับความเจือจาง ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่สามารถยับยั้ง pseudovirion ไม่ให้เข้าภายในเซลล์ได้ครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) ถูกคำนวณจากข้อมูล %inhibition rate ตามวิธี Reed-Muench และรายงานเป็นค่า IC₅₀/100μL นำค่า IC₅₀/100μL ที่ได้จากการทดสอบแต่ละครั้งมาหาค่า IC₅₀ target ของซีรัมมาตรฐาน โดยคำนวณจากค่าเฉลี่ย (mean) ของค่า IC₅₀/100μL จากการทดสอบในแต่ละครั้ง ต่อจำนวนครั้งที่ทำการทดสอบของมาตรฐาน NIBSC ภายใต้เงื่อนไขการทดสอบเดียวกัน ดังสมการ

$$IC_{50, target} = \frac{\sum_{i=1}^n IC_{50, run, i}}{n}$$

คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ใช้ *n*-1) รวมทั้งหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เพื่อแสดงความแปรปรวนของซีรัมมาตรฐาน ดังสมการ

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (IC_{50, run, i} - IC_{50, target})^2}{n-1}}$$

$$\%CV = \frac{SD}{IC_{50, target}} \times 100$$

จากนั้นคำนวณร้อยละการคืนกลับ (%recovery) โดยเทียบค่า IC₅₀/100μL ที่ทำการทดสอบแต่ละครั้งกับค่า IC₅₀ target ดังสมการ

$$\%Recovery = \left(\frac{IC_{50, run}}{IC_{50, target}} \right) \times 100$$

กำหนดให้ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ควรอยู่ในช่วง 70–130%⁽²⁴⁾

การประเมินความถูกต้องของ positive serum ตรวจสอบด้วยวิธี spiked sample โดยการผสม positive serum กับ negative serum ในอัตราส่วน 1:1 ทำการเจือจางเริ่มต้นที่อัตราส่วน 1/2,000 และ 1/2,500 สำหรับซีรัมที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 ตามลำดับ จากนั้นทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธี PBNA ภายใต้อุณหภูมิเดียวกันทั้งหมด นำมาหาค่า %recovery ของแต่ละสายพันธุ์ควรอยู่ในช่วง 70–130%

การทดสอบความเที่ยง (precision)

repeatability ทำการทดสอบหาค่าระดับแอนติบอดีต่อ HPV โดยสายพันธุ์ 16 และ 18 ใช้ Anti-HPV human serum ทำปฏิกิริยากับ pseudo-virions สายพันธุ์ที่จำเพาะ ด้วยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน ทำการทดสอบซ้ำภายในวันเดียวกัน 3 ครั้ง นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ต้องไม่เกิน 25%

intermediate precision ทำการทดสอบหาค่าแอนติบอดีต่อ HPV โดยสายพันธุ์ 16 และ 18 ใช้ Anti-HPV human serum ทำปฏิกิริยากับ pseudo-virions ด้วยนักวิเคราะห์คนเดียวกันทำการทดสอบต่างวันกัน 3 ครั้ง นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า %CV ต้องไม่เกิน 25% และทดสอบหาค่าระดับแอนติบอดีต่อ HPV ด้วยนักวิเคราะห์ 2 คน ทำการวิเคราะห์คนละ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า %CV ต้องไม่เกิน 25% และค่าความต่างของผลการตรวจวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ด้วยสถิติ independent *t*-test ต้องไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า *p*-value < 0.05

การทดสอบช่วงรายงานผลของค่า IC_{50} (reportable IC_{50} range)⁽²²⁾

การศึกษานี้เพื่อประเมินช่วงรายงานผลของค่า IC_{50} ของวิธี PBNA ยึดหลักการตรวจสอบความใช้ได้

ของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทาง ICH guideline หัวข้อ 2.3 โดยพิจารณาจากความจำเพาะ ความแม่นยำ ความเที่ยง และความเป็นเส้นตรงของวิธี กำหนดให้ reportable IC_{50} range คือ ช่วงของค่า $IC_{50}/100\mu L$ ที่คำนวณได้จริงจากช่วงความเจือจางที่ทดสอบ และให้ผลผ่านเกณฑ์ยอมรับของวิธี ซีรัมที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ซีรัมมาตรฐาน Anti-HPV16 human serum และ Anti-HPV18 human serum เตรียม pre-dilution ที่อัตราส่วน 1/20 จากนั้นทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ และ positive serum ที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 ซึ่งเตรียม pre-dilution ที่ 1/2,000 และ 1/2,500 ตามลำดับ และเจือจางต่อแบบเดียวกัน ภายใต้อุณหภูมิการทดสอบ PBNA เดียวกัน ทั้งหมด การกำหนด reportable IC_{50} range คือ ช่วงของค่า $IC_{50}/100\mu L$ ที่คำนวณได้จากข้อมูลการทดสอบภายในช่วงความเจือจางที่ครอบคลุมจุด 50% inhibition โดยอาศัยค่า upper 0.5 และ lower 0.5 ตามวิธี Reed–Muench และให้ผลอยู่ในช่วงเชิงเส้นของกราฟ

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ทดสอบค่าแอนติบอดีต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยทำการทดสอบ 3 ครั้งต่อสายพันธุ์ ทำการทดสอบต่างวันกันและนำผลที่ได้มาคำนวณค่า LOQ จากค่า $IC_{50}/100\mu L$ และค่าระดับความเจือจางที่สามารถจับกับ pseudovirions ไม่ให้เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้ที่ 50% (The 50% maximal inhibitory concentration, IC_{50}) โดยใช้สูตร

$$LOQ = A/B$$

A = The 50% maximal inhibitory concentration ($IC_{50}/100\mu L$)

B = ระดับค่าความเจือจางของแอนติบอดีที่ยับยั้ง pseudovirions ไม่ให้เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้ที่ 50% ตัวอย่างการคำนวณ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การหาค่า LOQ ของแอนติบอดีที่ยับยั้ง pseudovirions ไม่ให้เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้ที่ 50%

HPV	Dilution of Ab reduce PsV at 50% relative VC (B)	IC ₅₀ /100μL (A)	LOQ (IC ₅₀ /100μL)
16	160	204.92	204.92/160 = 1.28

การทดสอบความทน (robustness)

การใช้ความเข้มข้นเซลล์เพาะเลี้ยง ทำการทดสอบหาการระดับแอนติบอดีต่อ HPV โดยสายพันธุ์ 16 และ 18 ใช้ Anti-HPV human serum ทำปฏิกิริยากับ pseudovirions โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ความเข้มข้น 1.5×10^5 , 1.7×10^5 และ 2.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน ทำต่างวันกัน นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า %CV ซึ่งต้องไม่เกิน 25% และค่าความต่างของผลการตรวจวิเคราะห์เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เพาะเลี้ยงต่างกัน ด้วยสถิติ one-way ANOVA ซึ่งต้องไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p -value > 0.05

การเปลี่ยน cell passage ของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT วิเคราะห์โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่มี passage number ที่แตกต่างกัน กำหนดเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบต้องไม่เกิน passage number ที่ 20 โดยทำการทดสอบสำหรับ HPV สายพันธุ์ 16 ใช้ #5, #12, #14 และ #16 และ HPV สายพันธุ์ 18 ใช้ #7, #10, #16 และ #18 ทำการทดสอบซ้ำ duplicate ในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบ โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า %CV ซึ่งต้องไม่เกิน 25% และค่าความต่างของผลการตรวจวิเคราะห์เมื่อใช้ passage number ที่แตกต่างกัน ด้วยสถิติ one-way ANOVA ซึ่งต้องไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.05)

จริยธรรมการวิจัยในสัตว์

ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

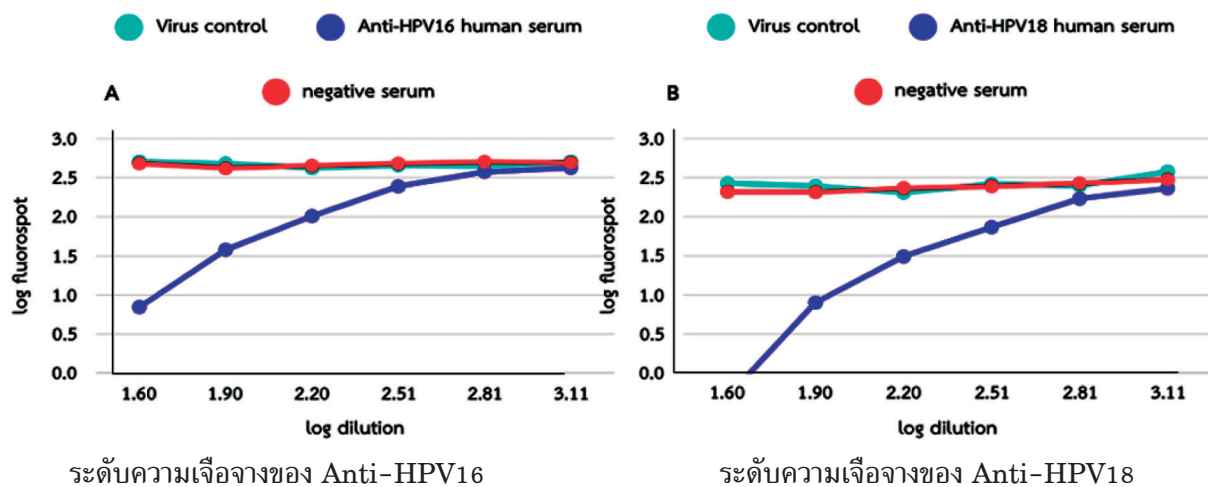
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 61/038 เมื่อวันที่ 27 สิงหาคม 2561 และขอขยายการรับรองได้รับอนุมัติเมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562

ผล**การทดสอบ specificity**

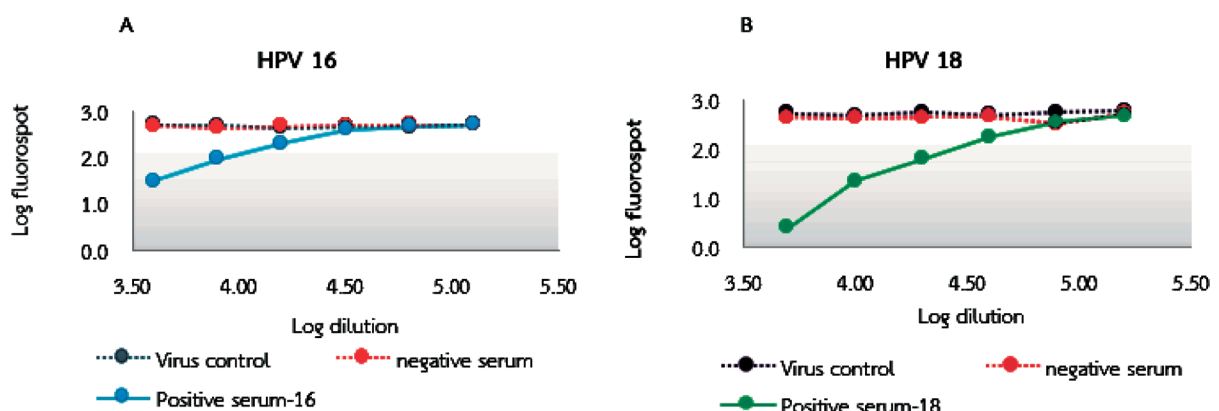
จากการทดสอบเพื่อหาระดับแอนติบอดีต่อ HPV 16 และ 18 สายพันธุ์ละ 3 ครั้ง ต่างวันกัน ค่าความเงาของ negative serum ทั้ง 6 ระดับ ไม่สามารถยับยั้งการติดเชื้อของ HPV pseudovirion สายพันธุ์ 16 และ 18 โดยพบว่าจำนวน HPV pseudovirion ที่ได้มีจำนวน log fluorospot ระหว่าง log 2.0–3.0 ซึ่งไม่แตกต่างจากไวรัสควบคุม (VC) และจากการทดสอบ normal distribution ด้วย Shapiro-Wilk ผล log fluorospot ของกลุ่มควบคุมจาก negative serum จำนวน 18 ค่าต่อสายพันธุ์ และ virus control จำนวน 18 ค่าต่อสายพันธุ์ พบว่าผลการทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการแจกแจงแบบปกติ ซึ่งค่านัยสำคัญของกลุ่ม negative serum และ virus control สำหรับ HPV สายพันธุ์ 16 ได้ระดับค่านัยสำคัญ เท่ากับ 0.776 และ 0.948 ตามลำดับ สำหรับสายพันธุ์ 18 ระดับค่านัยสำคัญ เท่ากับ 0.874 และ 0.396 ตามลำดับ ผลการทดสอบไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อค่า p -value มากกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 2 ขณะที่ซีรัมมาตรฐาน (Anti-HPV16 human serum และ Anti-HPV18 human serum) ดังแสดงในภาพที่ 1 และ positive serum ดังแสดงในภาพที่ 2 แสดงการเกิด dose-response จากการเติมซีรัม ซึ่งเกิดการยับยั้ง pseudovirion ได้ตามระดับความเงาจากซีรัม ลักษณะการเกิด fluorospot ดังแสดงในภาพที่ 3

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบ log fluorosopt ของ negative serum และ log fluorosopt ของ virus control ของ การทดสอบ PBNA สำหรับ HPV สายพันธุ์ 16 และ HPV สายพันธุ์ 18

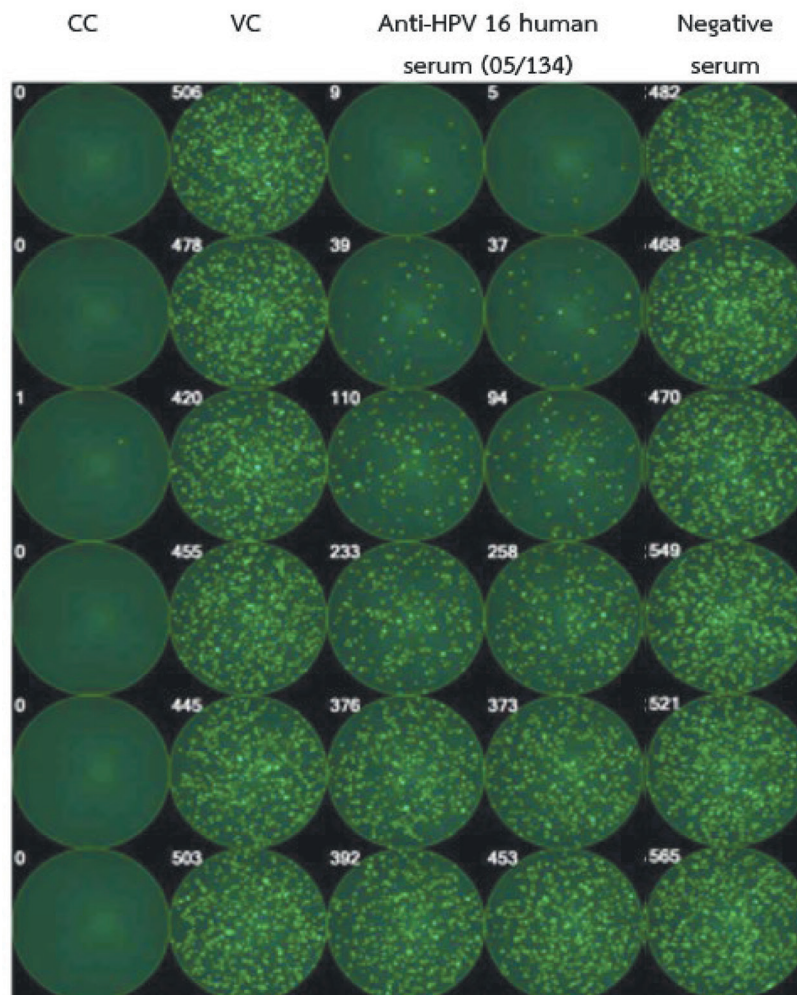
สายพันธุ์ HPV	Negative serum log (mean fluorosopt)	Virus control log (mean fluorosopt)	SD	%CV	p-value (independent t-test)
16	2.67	2.67	0.07	2.69	0.873
	2.74	2.77			
	2.83	2.82			
18	2.39	2.40	0.05	2.13	0.259
	2.43	2.44			
	2.38	2.42			



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า log ระดับความเจือจาง (log dilution) ของ Anti-HPV human serum กับค่า log ของจำนวนเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorosopt) (A) HPV สายพันธุ์ 16 และ (B) HPV สายพันธุ์ 18



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorosopt) กับค่า log ระดับความเจือจาง (log dilution) ของ positive serum ของ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 กับ (A) HPV สายพันธุ์ 16 และ (B) HPV สายพันธุ์ 18



ภาพที่ 3 การเกิด fluorospot จากการทดสอบค่าความแรงของ HPV vaccine ด้วยวิธี pseudovirion-based neutralization assay

การทดสอบ linearity and range

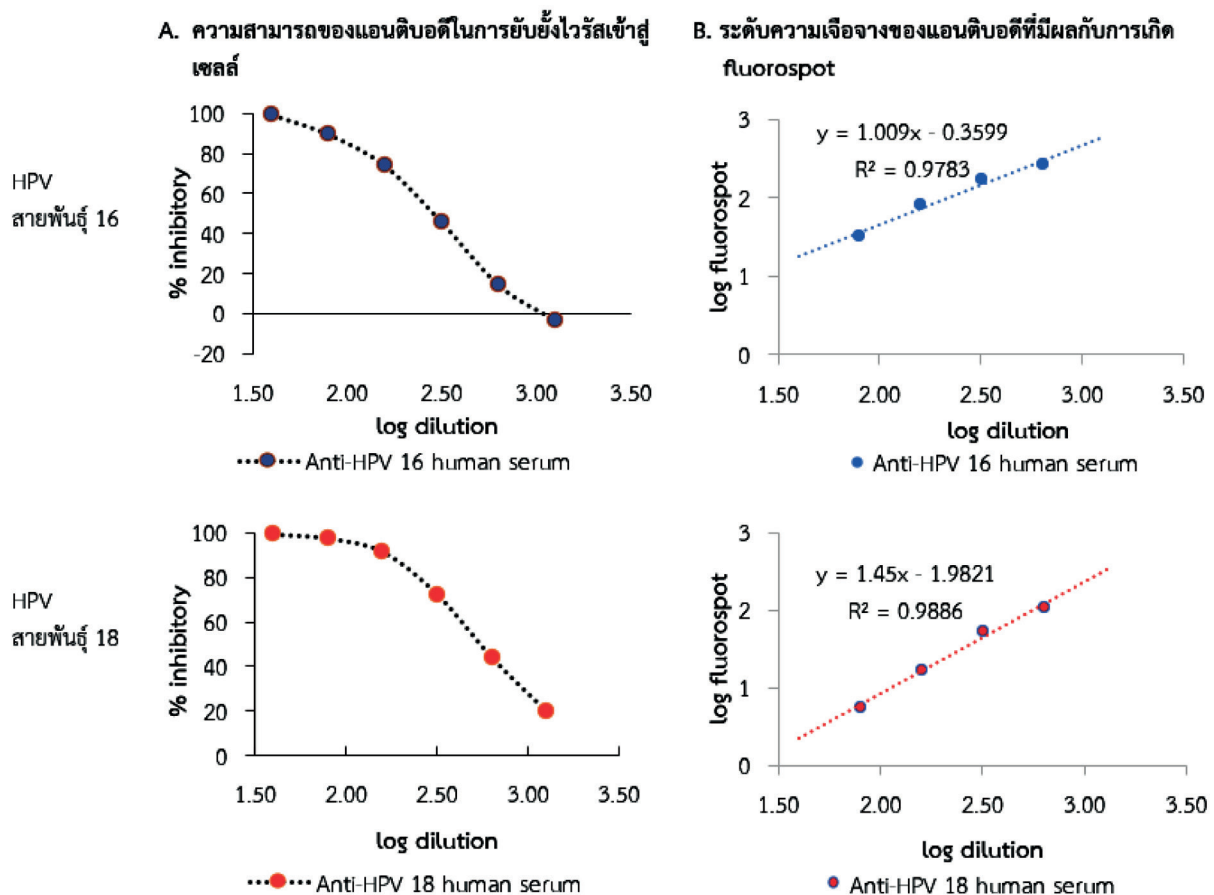
วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorospot) กับค่า log ระดับความเจือจางของซีรัมมาตรฐานของ HPV ทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งทำการทดสอบที่ระดับความเจือจางของซีรัม จำนวน 6 ระดับ ที่ถูกเจือจางแบบ 2-fold dilution เริ่มต้นที่ 1/40 (log 1.60), 1/80 (log 1.90), 1/160 (log 2.20), 1/320 (log 2.51), 1/640 (log 2.81) และ 1/1,280 (log 3.11) พบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorospot) กับค่า log ระดับความเจือจางของซีรัมมาตรฐานของ HPV ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความเป็นเส้นตรงโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ≥ 0.98 และ

ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดลิไน (r^2) ≥ 0.96 จากการทดสอบ 3 ครั้งต่อสายพันธุ์ โดยช่วงการทดสอบข้อมูลที่ใช้คำนวณอยู่ในช่วงร้อยละ 20–80 ของ %inhibition rate สอดคล้องกับช่วงความเจือจาง log 1.90–2.81 ซึ่งเป็นช่วงที่กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงอย่างเหมาะสมสำหรับการคำนวณผลการทดสอบ จึงกำหนดให้ช่วงดังกล่าวเป็นช่วงการทดสอบที่เหมาะสมของวิธีสำหรับการวิเคราะห์ซีรัมมาตรฐาน HPV16 และ HPV18 ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 4

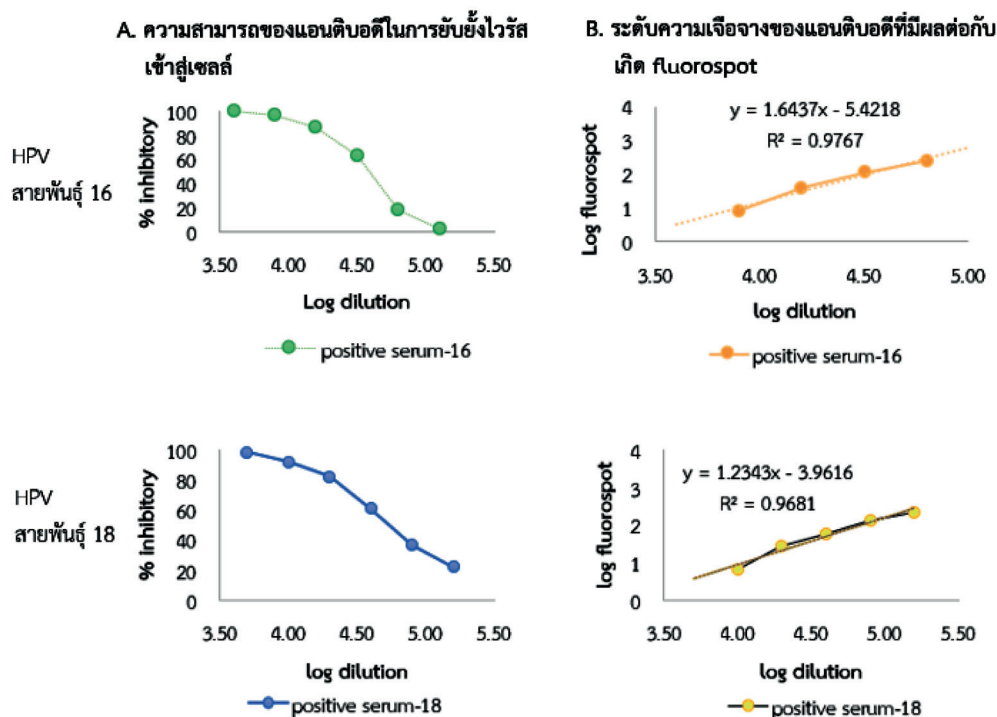
เมื่อทดสอบด้วย positive serum ที่จำเพาะต่อ HPV ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง log fluorospot กับ log dilution ยังคงมีลักษณะเชิงเส้นโดยมีค่า $r^2 \geq 0.96$ ดังแสดงในภาพที่ 5

ตารางที่ 3 แสดงค่า correlation coefficient (r) และ coefficient of determination (r^2) จาก Dose response ใน HPV แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์ HPV	Test no.	Linearity	
		r (≥ 0.98)	r^2 (≥ 0.96)
16	1	0.99	0.98
	2	0.99	0.99
	3	0.98	0.96
18	1	0.98	0.96
	2	0.99	0.99
	3	0.99	0.99



ภาพที่ 4 การทดสอบความสามารถของซีรัมมาตรฐานที่สามารถยับยั้ง pseudovirion เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงจากการนับจำนวน fluorospot ที่แสดงออกโดยค่า r^2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใน linear regression model (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งเซลล์ (% inhibitory) กับ log ระดับความเจือจางของ Anti-HPV human serum สายพันธุ์ 16 และ 18 (log dilution) และ (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorospot) กับ log ระดับความเจือจางของ Anti-HPV human serum สายพันธุ์ 16 และ 18 (log dilution)



ภาพที่ 5 ทดสอบความสามารถของ positive serum ที่สามารถยับยั้ง pseudovirion เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงจากการนับจำนวน fluorospot ที่แสดงออกโดยค่า r^2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใน linear regression model (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งเซลล์ (% inhibitory) กับ log ระดับความเจือจางของ positive serum ที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 และ (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorospot) กับ log ระดับความเจือจางของ positive serum ที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 (log dilution)

การทดสอบ accuracy

ผลการทดสอบ accuracy ของวิธีเมื่อนำผลการทดสอบค่า $IC_{50}/100\mu L$ ของซีรัมมาตรฐานทั้ง 2 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 12 ค่า มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อกำหนดค่า IC_{50} Target ของซีรัมมาตรฐานในแต่ละสายพันธุ์ เมื่อนำมาหาค่า %recovery ของการทดสอบในแต่ละครั้ง ของสายพันธุ์ HPV16 ได้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 75.63–118.95% และสำหรับสายพันธุ์ HPV18 ได้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 76.62–121.58% ดังแสดงในตารางที่ 4

จากการวิเคราะห์ค่า $IC_{50}/100\mu L$ ของ positive serum ทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อ spiked sample โดยผสม positive serum กับ negative serum ในอัตราส่วน 1:1 และทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold dilution เช่นเดียวกับการทดสอบ positive serum โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ต่างวันกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของระดับแอนติบอดีต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 มีค่า %recovery อยู่ที่ 73.88% ถึง 115.69% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด คือ 70–130% โดยมีค่า %CV น้อยกว่า 25% ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 การทดสอบความถูกต้องของวิธี PBNA ต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 เมื่อใช้ซีรัมมาตรฐาน

สายพันธุ์ HPV	จำนวน ครั้งการทดสอบ	$IC_{50}/100\mu L$	IC_{50} Target (Mean)	SD	%CV	%Recovery	Acceptance criteria
	1	251.82				117.10	
	2	240.93				112.04	
	3	200.44				93.21	
	4	162.64				75.63	
	5	204.92				95.29	

ตารางที่ 4 การทดสอบความถูกต้องของวิธี PBNA ต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 เมื่อใช้ซีรัมมาตรฐาน (ต่อ)

สายพันธุ์ HPV	จำนวน ครั้งการทดสอบ	IC ₅₀ /100μL	IC ₅₀ Target (Mean)	SD	%CV	%Recovery	Acceptance criteria
16	6	200.40	215.04	30.18	14.03	93.19	70-130%
	7	164.45				76.47	
	8	255.79				118.95	
	9	211.14				98.19	
	10	214.71				99.85	
	11	247.33				115.02	
18	12	225.89	560.06	31.18	5.57	105.05	70-130%
	1	475.91				108.17	
	2	488.70				111.97	
	3	522.01				114.67	
	4	588.55				84.98	
	5	529.47				87.26	
	6	563.51				93.21	
	7	567.31				105.09	
	8	429.13				94.54	
	9	680.93				100.62	
	10	475.91				101.29	
	11	488.70				76.62	
	12	522.01				121.58	

ตารางที่ 5 การทดสอบความถูกต้องของวิธี PBNA ต่อ HPV สายพันธุ์ 16 เมื่อใช้ positive serum-HPV16 และ positive serum-HPV18 ในการทดสอบ

สายพันธุ์ HPV	Positive serum (IC ₅₀ /100μL)	Spike	%Recovery	Mean	SD	%CV
16	38866.19	35250.29	90.70	104.87	12.83	12.24
	30637.69	33158.76	108.23			
	36619.57	42366.53	115.69			
18	87296.45	64495.68	73.88	98.01	21.018	21.44
	67263.28	75518.66	112.27			
	67869.17	73208.94	107.87			

การทดสอบ precision

จากการทดสอบหาค่า IC₅₀ ของซีรัมมาตรฐาน Anti-HPV16 human serum และ Anti-HPV18 human serum โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน นักวิเคราะห์คนเดียวกัน พบว่าค่า %CV อยู่ที่ 11.68% และ 10.79% ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์

ที่กำหนด (%CV ≤ 25%) และเมื่อทำการวิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์คนเดียว 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน พบว่าความแปรปรวนและการกระจายของข้อมูลเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (%CV ≤ 25%) คือ มีค่า %CV อยู่ที่ 15.37% และ 13.60% ของผลการทดสอบค่า IC₅₀ ของแอนติบอดีต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 ตามลำดับ

และจากการทดสอบหาค่า IC_{50} ของ positive serum-HPV16 และ HPV18 โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน นักวิเคราะห์คนเดียวกัน พบว่าค่า %CV ของผลการทดสอบค่า IC_{50} ของแอนติบอดีต่อ HPV แต่ละสายพันธุ์มีค่า %CV $\leq 25\%$ และเมื่อทำการวิเคราะห์

โดยนักวิเคราะห์คนเดียว 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน พบว่าความแปรปรวนและการกระจายของข้อมูลเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (%CV $\leq 25\%$) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ repeatability และ intermediate precision เมื่อใช้ซีรัมมาตรฐาน และ positive serum

สายพันธุ์ HPV	Repeatability				Intermediate precision			
	$IC_{50}/100\mu L$	Mean	SD	%CV	$IC_{50}/100\mu L$	Mean	SD	%CV
ซีรัมมาตรฐาน anti-HPV human serum								
16	204.92				164.16			
	200.40	189.92	22.18	11.68	162.67	179.32	27.56	15.37
	164.45				211.14			
18	529.47				461.18			
	563.51	515.89	55.67	10.79	529.47	532.16	72.36	13.60
	454.69				605.82			
positive serum จากหนูไม่ซี								
16	49,458.37				23,705.05			
	31,142.24	39,928.46	9,180.68	22.99	33,387.21	31,277.43	6,768.75	21.64
	39,184.78				36,740.02			
18	54,578.11				50,241.88			
	87,296.45	68,790.08	16,776.6	24.39	62,590.06	60,031.74	8,794.36	14.65
	64,495.68				67,263.28			

ผลการทดสอบหาระดับของแอนติบอดี โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ทำการวิเคราะห์คนละ 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน (independent *t*-test) พบว่าผลการทดสอบค่า IC_{50} ของแอนติบอดีต่อ HPV สายพันธุ์ 16

และ 18 มีความแปรปรวนและการกระจายของข้อมูลเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (%CV $\leq 25\%$) คือ มีค่า %CV อยู่ในช่วง 11.86–19.47% และแสดงผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบในพารามิเตอร์ intermediate precision เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์ 2 คน

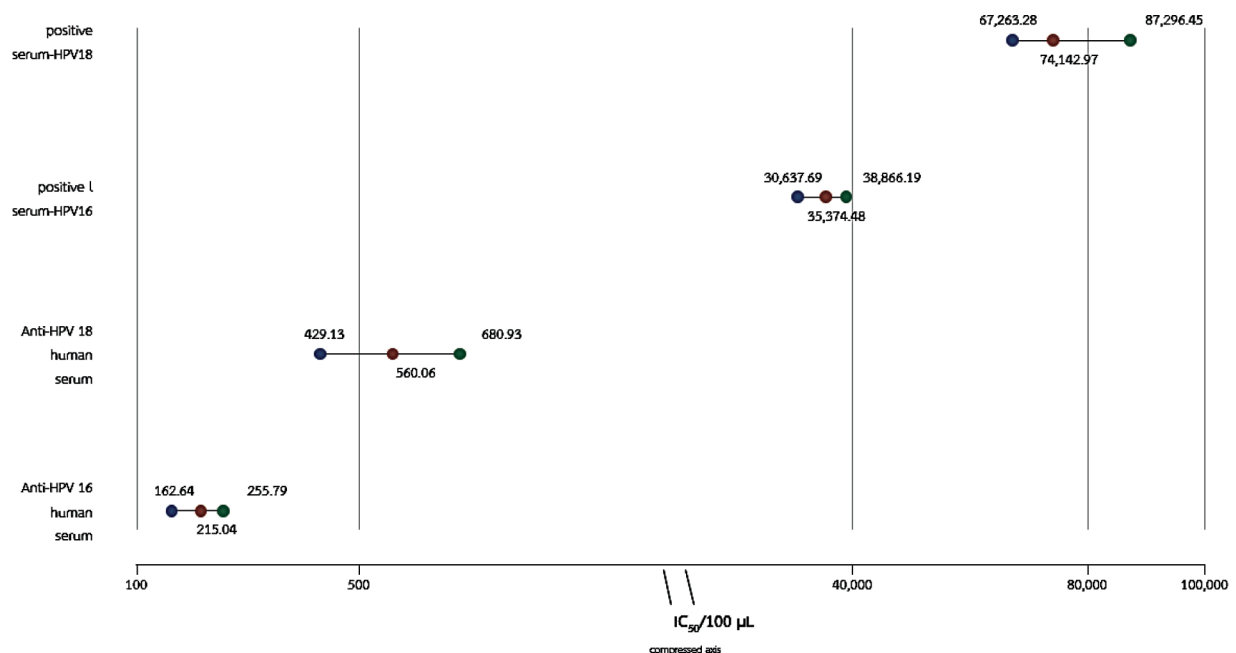
สายพันธุ์ HPV	Antibodies titer (IC ₅₀ /100μL)						Mean	%CV	p-value (t-test)
	Analyst 1 (n = 3)			Analyst 2 (n = 3)					
	1	2	3	1	2	3			
16	229.31	231.06	213.11	180.58	307.78	284.44	241.05	19.47	0.487
18	515.89	624.73	461.18	703.39	627.88	579.52	585.43	14.81	0.162

การทดสอบ reportable IC_{50} range ของค่า IC_{50}

การทดสอบ reportable IC_{50} range ของค่า IC_{50} ด้วยวิธี PBNA พิจารณาจากช่วงการยับยั้งที่เหมาะสมร้อยละ 20–80 ของ %inhibition rate ร่วมกับความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี ในการทดสอบ 12 ครั้งของซีรัมมาตรฐาน Anti-HPV16 human serum พบว่าค่าความเจือจางที่ใช้คำนวณจุดยับยั้งร้อยละ 50 มีค่า upper 0.5 อยู่ที่ 1/160 และ lower 0.5 อยู่ที่ 1/320 ส่งผลให้ reportable IC_{50} range อยู่ในช่วง 162.64–255.79 และในการทดสอบ 12 ครั้งของ Anti-HPV18 human serum พบว่าค่า upper 0.5 อยู่ที่ 1/640 และ lower 0.5

อยู่ที่ระดับความเจือจางถัดไป ส่งผลให้ reportable IC_{50} range อยู่ในช่วง 429.13–680.93

ในส่วนของ positive serum การทดสอบ 3 ครั้งของ positive serum-HPV16 พบว่าค่า upper 0.5 อยู่ที่ 1/32,000 และ lower 0.5 อยู่ที่ 1/64,000 ทุกรายการจึงได้ reportable IC_{50} range อยู่ในช่วง 30,637.69–38,866.19 และการทดสอบ 3 ครั้งของ positive serum-HPV18 พบว่าค่า upper 0.5 อยู่ที่ 1/40,000, 1/40,000 และ 1/80,000 ตามลำดับ ขณะที่ค่า lower 0.5 อยู่ที่ 1/80,000, 1/80,000 และ 1/160,000 ตามลำดับ ส่งผลให้ reportable IC_{50} range อยู่ในช่วง 67,263.28–87,296.45 ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดง reportable IC_{50} range ของ Anti-HPV human serum และ positive serum ที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 แสดงค่าต่ำสุด ค่าเฉลี่ย และค่าสูงสุดของ IC_{50} /100µL ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

การทดสอบ LOQ

ค่า LOQ ของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 ในซีรัมมาตรฐานมีค่า IC_{50} /100µL อยู่ที่ 1.49 และ 1.56 ตามลำดับ และ positive serum-16

และ 18 มีค่า IC_{50} /100µL อยู่ที่ 1.69 และ 1.49 ที่สามารถจับกับ pseudovirions ไม่ให้เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้ที่ 50% (The 50% maximal inhibitory concentration, IC_{50}) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่า LOQ ของ Anti-HPV 16 และ 18 ผลิตจาก mouse serum และ human serum ที่สามารถอ่านผลการทดสอบได้

No. of test	LOQ ($IC_{50}/100\mu L$)			
	Positive serum -16	Positive serum -18	Anti-HPV human serum	
			05/134 (NIBSC/16)	10/140 (NIBSC/18)
1	1.5571	1.0912	1.4706	1.6121
2	1.8310	1.6967	1.4422	1.6183
3	1.6916	1.6816	1.5600	1.4412
Mean	1.6932	1.4898	1.4909	1.5572

การทดสอบ robustness

ผลการทดสอบ robustness ของวิธีที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบที่อาจส่งผลต่อการทดสอบหาระดับของแอนติบอดี Anti-HPV human serum สายพันธุ์ 16 และ 18 ที่ทำปฏิกิริยากับ pseudo-virions โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ความเข้มข้น 1.5×10^5 , 1.7×10^5 และ 2.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน ทำต่างวันกัน นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ พบว่ามีความแปรปรวนและการกระจายของข้อมูลเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ($\%CV \leq 25\%$) คือ มีค่า $\%CV$ อยู่ในช่วง 4.41–18.83% และแสดงผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า p -value มากกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีไต่เตอร์เมื่อทำการทดสอบที่ความเข้มข้นของเซลล์แตกต่างกัน

สายพันธุ์ HPV	ความเข้มข้นของเซลล์ (cells/mL)	Mean $IC_{50}/100\mu L$	SD	$\%CV$	p -value (One-Way Anova)
16	1.5×10^5	224.496	9.895	4.41	0.212
	1.7×10^5	178.473	31.685	17.75	
	2.0×10^5	219.022	41.248	18.83	
18	1.5×10^5	554.209	61.146	11.03	0.973
	1.7×10^5	548.185	52.596	9.59	
	2.0×10^5	542.406	70.564	13.01	

การทดสอบความคงทนของวิธี โดยการเปลี่ยน cell passage ของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT จำนวน 4 passage number ต่อ HPV แต่ละสายพันธุ์ โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน ทำต่างวันกัน นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ พบว่ามีความแปรปรวนและการกระจายของ

ข้อมูลเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ($\%CV \leq 25\%$) คือ มีค่า $\%CV$ อยู่ในช่วง 8.29–20.54 และแสดงผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า p -value มากกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีไโตเตอร์เมื่อทำการทดสอบที่ passage number ของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT แตกต่างกัน

สายพันธุ์ HPV	Passage no.	Anti-HPV human serum (IC ₅₀ /100μL)(n = 2)		Positive serum (IC ₅₀ /100μL)(n = 2)	
		1	2	1	2
16	#5	255.79	164.00	36,740.02	38,866.19
	#12	162.67	214.71	30,637.69	33,808.04
	#14	251.82	146.80	33,831.55	31,142.24
	#16	211.14	229.31	33,387.21	36,619.57
	Mean	204.53		34,379.06	
	SD	42.01		2,848.88	
	%CV	20.54		8.29	
	p-value	0.937		0.138	
	(one-way ANOVA)				
18	#7	522.01	588.55	87,296.45	64,495.68
	#10	605.82	529.47	67,263.28	75,518.66
	#16	482.03	407.41	87,296.45	64,495.68
	#18	461.18	488.70	60,532.40	69,258.00
	Mean	510.65		70,680.32	
	SD	65.48		8,183.01	
	%CV	12.82		11.58	
	p-value	0.129		0.719	
	(one-way ANOVA)				

วิจารณ์

การศึกษานี้ได้ดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี PBNA สำหรับการตรวจวัดระดับ neutralizing antibodies ที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 โดยอาศัยหลักการและเงื่อนไขการทดสอบที่ประยุกต์ตามแนวทางของ Nie J และคณะ⁽¹⁴⁾ เพื่อประเมินความเหมาะสมของวิธีทั้ง specificity, linearity และ precision & robustness ผลการศึกษาความเหมาะสมของวิธี PBNA ที่พัฒนาขึ้นมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Nie J และคณะ⁽¹⁴⁾ และ Bei L และคณะ⁽¹⁸⁾ ซึ่งต่างยืนยันถึงความไว ความจำเพาะ และความสามารถของ PBNA ที่แสดงถึงความสามารถยับยั้งของแอนติบอดีโดยมีความแม่นยำ สนับสนุนการนำไปใช้ประเมินภูมิคุ้มกันจากวัคซีน HPV ทั้งในงานวิจัยและการควบคุมคุณภาพ

วัคซีนในห้องปฏิบัติการ จากผลการศึกษา specificity ของวิธี PBNA แสดงการยับยั้งของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ HPV16 และ HPV18 ได้อย่างชัดเจนทั้งจากการใช้ซีรัมมาตรฐานจากคนและซีรัมอ้างอิง (positive serum) ที่ผลิตจากหนูไมซ์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย monovalent HPV-VLP การศึกษานี้กำหนดให้ Anti-HPV human serum ของ NIBSC (05/134 สำหรับ HPV16 และ 10/140 สำหรับ HPV18) เป็นซีรัมมาตรฐานและพัฒนาซีรัมอ้างอิง (positive serum) เพื่อรองรับสายพันธุ์อื่นที่การผลิตซีรัมมาตรฐานยังไม่ครอบคลุม^(13,16,18) จากข้อมูลที่ได้จากซีรัมหนูไมซ์แสดงรูปแบบการยับยั้งที่สอดคล้องกับซีรัมมาตรฐาน เป็นการยืนยันว่าโครงสร้าง capsid และ epitope สำคัญของ pseudovirion มีความสมบูรณ์เพียงพอในการ

กระตุ้นและสะท้อนการเกิด neutralizing antibodies ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nie J และคณะ^(14,16) ที่แสดงให้เห็นการตอบสนองของ monoclonal antibodies และซีรัมจากสัตว์ทดลองต่อ pseudovirion ได้อย่างจำเพาะต่อสายพันธุ์⁽¹⁴⁾

การศึกษา linearity and range โดยควบคุมจำนวนไวรัสในหลุมควบคุม (virus control) ให้อยู่ในช่วงประมาณ 250–1,000 fluorospots และใช้การถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ในการคำนวณค่า IC_{50} ผลที่ได้ชี้ว่าค่า IC_{50} มีความเสถียรและไม่ถูกรบกวนจากปริมาณไวรัสเกินสมมูล จึงสอดคล้องกับแนวโน้มที่ Nie J และคณะ⁽¹⁴⁾ รายงานและสนับสนุนเกณฑ์การกำหนดช่วง virus control ที่เหมาะสม^(13,14,16) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการกำหนด reportable IC_{50} range ในการศึกษาจะเห็นได้ว่าค่าที่รายงานได้จริงเป็นผลของการบูรณาการข้อมูลจากความจำเพาะ ความแม่นยำ ความเที่ยง และความเป็นเส้นตรงของวิธี ไม่ได้ใช้เพียงค่า LOQ ที่คำนวณจากสูตรเท่านั้น กล่าวอีกนัยหนึ่งช่วง reportable IC_{50} range ช่วยอธิบายสมรรถนะเชิงปฏิบัติของวิธี PBNA ในฐานะ cell-based neutralization assay ได้ชัดเจนกว่า เนื่องจากค่า IC_{50} ต้องอยู่ภายในช่วงความเจือจางที่ครอบคลุมตั้งแต่ร้อยละ 50 และยังคงอยู่ในช่วงเชิงเส้นของกราฟตามเกณฑ์ของวิธี^(22,23) เกณฑ์การควบคุมไวรัสในงานวิจัยของ Wu X และคณะ⁽¹³⁾ กำหนดให้มีค่า virus control ≥ 300 fluorospot และการประยุกต์การอ่านสัญญาณแบบหลายสีเพื่อลดสัญญาณรบกวน^(13,16) ช่วยยืนยันว่าช่วงการอ่านสัญญาณในงานวิจัยนี้รองรับความเป็นเส้นตรงได้อย่างเหมาะสม

การศึกษาความเที่ยงและความทนของวิธี (precision & robustness) ผลการทดสอบซ้ำในวันเดียวกันและต่างวันกัน พบว่าค่า %CV อยู่ภายใต้เกณฑ์ยอมรับ (< 25%) และเมื่อเปลี่ยน passage number ของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้เซลล์ที่มี passage ไม่เกิน 20 passage ผลดังกล่าวมีนัยสำคัญเชิงปฏิบัติ เนื่องจากยืนยันว่าภายใต้กรอบการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการ วิธี PBNA ที่พัฒนาขึ้นยังคงให้ผล

สม่ำเสมอแม้มีความแปรผันในช่วงการใช้งานของเซลล์ที่เกิดขึ้นจริง^(4,11) การศึกษานี้ใช้ cell-based assay จึงมีหลายปัจจัยที่ทำให้เกิดการแปรผัน เช่น ความเข้มข้นของเซลล์เพาะเลี้ยงหรือความแตกต่างระหว่างนักวิเคราะห์ ดังนั้นการทดสอบนี้ยังอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ สอดคล้องกับหลักการของการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี PBNA ในรายงานการตรวจสอบ Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าวิธี neutralization assay ที่อาศัยระบบเซลล์สามารถมีความแปรปรวนระดับหนึ่งได้ตามธรรมชาติของระบบชีวภาพ แต่ยังคงถือว่าน่าเชื่อถือได้เมื่อมีการกำหนดเกณฑ์ความแม่นยำและความเที่ยงที่เหมาะสม รวมถึงการควบคุมสถานะการทดสอบอย่างเป็นระบบ⁽²⁴⁾ ค่า %CV ที่ได้ยังอยู่ในเกณฑ์สอดคล้องกับรายงานของ Nie J และคณะที่พบค่า CV เฉลี่ยประมาณ 14% ในหลายสายพันธุ์เมื่อทดสอบซ้ำหลายรอบ⁽¹⁴⁾ แสดงว่าเมื่อมีการควบคุมสภาพการทดสอบอย่างเหมาะสม ผลการทดสอบที่ได้มีความเชื่อถือ^(4,11) การประเมินขีดจำกัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) พบว่าค่า LOQ ที่ได้จากซีรัมมาตรฐานมีความใกล้เคียงกับค่า LOQ จากซีรัมหนู แสดงศักยภาพของการใช้ซีรัมสัตว์ทดลองเป็น in-house reference เพื่อเสริมหรือทดแทนซีรัมมาตรฐานคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่สารมาตรฐานที่ผลิตจากคนยังไม่ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ตามองค์ประกอบของวัคซีนที่เป็น HPV-VLP หลายสายพันธุ์⁽¹⁸⁾ แนวทางนี้ช่วยให้สามารถติดตามแนวโน้มการตอบสนองของวัคซีนในระยะ pre-clinical ได้อย่างต่อเนื่อง และสอดคล้องกับข้อเสนอของ Nie J และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่มองว่าสารอ้างอิงจากสัตว์ทดลองเป็นองค์ประกอบสำคัญในการขยายขีดความสามารถของงานวิเคราะห์ด้าน HPV สู่ระบบที่รองรับหลายสายพันธุ์^(13,14,16,18)

การศึกษานี้มีข้อจำกัดด้าน throughput จากการใช้เพลท 96 หลุม ซึ่งอาจไม่เพียงพอเมื่อจำนวนตัวอย่างมากขึ้น การยกระดับไปใช้เพลท 384 หลุมเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดเวลาและต้นทุน ในขณะที่ยังคงอยู่ภายในกรอบการควบคุมคุณภาพและการควบคุมกำกับด้านวัคซีน^(4,11) อีกข้อจำกัด คือ ซีรัมมาตรฐานที่ปัจจุบันครอบคลุมเพียงสายพันธุ์ HPV16

และ HPV18 ทำให้การประเมินวัคซีนที่มีส่วนผสมหลายสายพันธุ์จำเป็นต้องใช้วิธีจากสัตว์ทดลองควบคู่ไปก่อน ข้อจำกัดเหล่านี้สอดคล้องกับประเด็นที่ Nie J และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่ระบุถึงความยุ่งยากและปริมาณงานของ PBNA แบบ manual ซึ่งแม้จะมีความแม่นยำสูงกว่าวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) หรือ competitive Luminex immunoassay (cLIA) แต่ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อการขยายไปสู่การใช้งานระดับอุตสาหกรรมหรือระดับประเทศ^(13,14,16,17) โดยสรุปผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นความใช้ได้ของวิธี PBNA ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อ HPV16 และ HPV18 ที่มีความจำเพาะ ความเป็นเส้นตรง ความเที่ยง ความแม่นยำ และความทนต่อความแปรปรวนภายใต้การควบคุมสภาวะการทดสอบที่เหมาะสม การใช้วิธีมาตรฐานจาก NIBSC ร่วมกับวัสดุอ้างอิงจากสัตว์ทดลองยังสามารถใช้ได้ในการติดตามความต่อเนื่องและความเที่ยงเคียงของการประเมินมาตรฐานจากวิธีอื่นที่ยังไม่ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ ผลการศึกษานี้จึงสนับสนุนการนำวิธี PBNA ไปใช้ทั้งในด้านงานวิจัย การติดตามภูมิคุ้มกันหลังการฉีดวัคซีน และการควบคุมคุณภาพวัคซีนก่อนการจำหน่าย โดยเฉพาะในระบบที่ต้องประเมินหลายสายพันธุ์ให้เทียบเคียงกันได้ระหว่างห้องปฏิบัติการ^(4,11,13,14, 16-18) นอกจากนี้ผลลัพธ์ที่ได้จากการศึกษาชี้ให้เห็นความสำคัญของการเพิ่มบทบาทวัสดุอ้างอิงจากสัตว์ทดลองและการพัฒนาไปสู่ระบบ high-throughput ซึ่งเป็นพื้นฐานสำคัญในการยกระดับ PBNA ให้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการประเมินวัคซีน HPV ในระดับสากลในอนาคต

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี PBNA ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 โดยสามารถตรวจปริมาณแอนติบอดีในซีรัมของหนูได้แสดงให้เห็นว่าวิธี PBNA รวมถึงแอนติบอดีที่ผลิตจากหนูไม่มีความเหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อ HPV สายพันธุ์

ต่าง ๆ เพื่อให้ครอบคลุม HPV ทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่มีอยู่ในวัคซีนปัจจุบัน

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ Claude (Anthropic, USA) ช่วยในการปรับปรุงการใช้ภาษา การแก้ไขไวยากรณ์ภาษาอังกฤษเพื่อให้ความถูกต้องมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวัคซีนแห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ได้สนับสนุนทุนเพื่อการพัฒนาภายใต้โครงการเสริมสร้างศักยภาพของห้องปฏิบัติการในการศึกษาวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีต่อ HPV โดย Pseudovirion-Based Neutralization Assay ณ Division of HIV/AIDS and Sex-transmitted Virus Vaccines, NIFDC สาธารณรัฐประชาชนจีน รวมทั้ง Dr. Jianhui Nie ที่ถ่ายทอดองค์ความรู้วิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay และบริษัท Xiamen Innovax Biotech Co., Ltd. สาธารณรัฐประชาชนจีน ผู้สนับสนุน monovalent HPV-VLP antigen และ pseudovirions เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีเบื้องต้น และขอขอบคุณ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนการดำเนินงานในทุกด้าน

เอกสารอ้างอิง

1. De Vincenzo R, Conte C, Ricci C, Scambia G, Capelli G. Long-term efficacy and safety of human papillomavirus vaccination. Int J Womens Health. [serial online]. 2014; [cited 2025 Nov 5]; 6: 999-1009. [12 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4262378>.
2. TREAT Asia. Cervical cancer, human papillomavirus (HPV), and HPV vaccines in Southeast Asia. [online]. 2016; [cited 2025 Nov 5]; [20 screens]. Available from: URL: <https://www.amfar.org/wp-content/uploads/2022/06/hpva4-TA-8-5x11-1.pdf>.

3. World Health Organization. WHO guidelines for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2021.
4. World Health Organization. Annex 2: WHO good manufacturing practices for biological products Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 822. [online]. 2016; [cited 2025 Nov 11]; [38 screens]. Available from: URL: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/gmp/annex-2-who-good-manufacturing-practices-for-biological-products.pdf>.
5. Centers for Disease Control and Prevention. HPV vaccine recommendations. [online]. 2016; [cited 2025 Nov 11]; Available from: URL: <https://www.cdc.gov/hpv/hcp/vaccination-considerations/index.html>.
6. Watson-Jones D, Chantalucha J, Maxwell C, Whitworth H, Mutani P, Kemp TJ, et al. Durability of immunogenicity at 5 years after a single dose of human papillomavirus vaccine compared with two doses in Tanzanian girls aged 9–14 years: results of the long-term extension of the DoRIS randomised trial. *Lancet Glob Health* 2025; 13(2): e319–28.
7. Single-Dose HPV Vaccine Evaluation Consortium. Evidence to inform decision-making on single-dose HPV vaccination policy. [online]. 2024; [cited 2025 Nov 5]; [5 screens]. Available from: URL: https://media.path.org/documents/HPV_Cnsrt_EvidenceBrief2024_ENGLISH.pdf.
8. Ratanasiripong NT, Sri-Umporn S, Kathalae D, Hanklang S, Ratanasiripong P. Human papillomavirus (HPV) vaccination and factors related to intention to obtain the vaccine among young college women in Thailand. *J Health Res* 2018; 32(2): 142–51.
9. World Health Organization. Eradicating cervical cancer in Thailand: a journey of hope and progress. [online]. 2025; [cited 2025 Nov 11]; [44 screens]. Available from: URL: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/thailand/reports/eradicating-cervical-cancer-in-thailand.pdf>.
10. สถาบันวัคซีนแห่งชาติ. นโยบายและแผนยุทธศาสตร์ความมั่นคงด้านวัคซีนแห่งชาติ พ.ศ. 2566–2570. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 11 พ.ย. 2568]. Available from: URL: https://nvi.go.th/Information/DataGov/StrategicPlan/NationalVaccineStrategicPlan/NationalVaccineStrategicPlan_2566-2570.pdf.
11. U.S. Department of health and human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry clinical considerations for therapeutic cancer vaccines [excerpts]. *Biotechnol Law Rep* 2012; 31(3): 303–9.
12. Pinto LA, Dillner J, Beddows S, Unger ER. Immunogenicity of HPV prophylactic vaccines: serology assays and their use in HPV vaccine evaluation and development. *Vaccine* 2018; 36(32 Pt A): 4792–9.
13. Wu X, Zhang C, Feng S, Liu C, Li Y, Yang Y, et al. Detection of HPV types and neutralizing antibodies in Gansu province, China. *J Med Virol* 2009; 81(4): 693–702.
14. Nie J, Huang W, Wu X, Wang Y. Optimization and validation of a high throughput method for detecting neutralizing antibodies against human papillomavirus (HPV) based on pseudovirions. *J Med Virol* 2014; 86(9): 1542–55.
15. Kemp TJ, García-Piñeres A, Falk RT, Poncelet S, Dessy F, Giannini SL, et al. Evaluation of systemic and mucosal anti-HPV16 and anti-HPV18 antibody responses from vaccinated women. *Vaccine* 2008; 26(29–30): 3608–16.

16. Nie J, Liu Y, Huang W, Wang Y. Development of a triple-color pseudovirion-based assay to detect neutralizing antibodies against human papillomavirus. *Viruses* 2016; 8(4): 107. (12 pages).
17. Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA, Jansen KU, Smith JF, Chirmule N, et al. Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(1): 108-15.
18. Bei L, Gao S, Zhao D, Kou Y, Liang S, Wu Y, et al. Immunogenicity assessment of a 14-valent human papillomavirus vaccine candidate in mice. *Vaccines*. [serial online]. 2024; [cited 2025 May 28]; 12(11): 1262. [19 screens]. Available from: URL: <https://www.mdpi.com/2076-393X/12/11/1262>.
19. Xu D, Li JD, An J, Ma XX, Wang XL, Zhou Z, et al. A preclinical immunogenicity study of the recombinant human papillomavirus nine-valent virus-like particle vaccine. *Vaccines*. [serial online]. 2024; [cited 2025 Jun 8]; 12(12): 1356. [17 screens]. Available from: URL: <https://www.mdpi.com/2076-393X/12/12/1356>.
20. Wongchana W, Trisiriwanic S, Phumiamorn S. Production of HPV type 16 pseudovirion for the development of pseudovirion-based neutralization assay (PBNA). *Bull Dept Med Sci* 2024; 66(2): 272-84.
21. World Health Organization. Recombinant human papillomavirus virus-like particle vaccines: WHO Expert Committee on Biological Standardization, Annex 4. WHO Technical Report Series, No. 999. [online]. 2016; [cited 2025 Nov 11]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-hpv-like-particle-vaccines-annex-4-trs-no-999>.
22. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2(R2) guideline on validation of analytical procedures. [online]. 2023; [cited 2025 Nov 5]; [33 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-2_en.pdf.
23. Association of Southeast Asian Nations (ASEAN). ASEAN guidelines for validation of analytical procedures for vaccines. [online]. 2018; [cited 2025 Nov 5]; [19 screens]. Available from: URL: <https://asean.org/wp-content/uploads/2018/01/25PPWG-ANNEX-7-iii-Final-revision-of-analytical-method-validation-for-vaccinesdocx.pdf>.
24. Kostense S, Moore S, Companjen A, Bakker AB, Marissen WE, von Eyben R, et al. Validation of the rapid fluorescent focus inhibition test for rabies virus-neutralizing antibodies in clinical samples. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(7): 3524-30.

Analysis of Specific Neutralizing Antibody Titers Against Cervical Cancer Vaccine Using the Pseudovirion-Based Neutralization Assay

Payom Agsiri, Natthakarn Mingngamsup, Wipawee Wongchana, Sakalin Trisiriwanich, and Supaporn Phumiamorn

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

ABSTRACT Currently, the cervical cancer vaccines have been included in Thailand Expanded Program on Immunization. Therefore, measuring immune responses in vaccinated individuals, as well as assessing vaccine potency for quality control, is important. This study aimed to develop and validate a pseudovirion-based neutralization assay (PBNA) for quantifying antibodies against human papillomavirus (HPV). This study aimed to develop and validate a PBNA for quantifying antibodies against HPV. The ability of human standard sera specific to HPV types 16 and 18 to inhibit the entry of the corresponding HPV pseudovirions into cultured 293FT cells was examined and expressed as $IC_{50}/100\mu L$. The developed method was subsequently verified. The produced HPV pseudovirions were found to be specific to the corresponding antibodies of each HPV type and were not inhibited by negative serum. The accuracy showed a %recovery in the range of 70–130%. A linear relationship was observed between log fluorospot and the dilution level of the standard serum for both types, with a correlation coefficient, > 0.98 . The resulting graph was linear over the range of 20–80% inhibitory rate. The limits of quantitation for antibodies against types 16 and 18 were $1.49 IC_{50}/100\mu L$ and $1.56 IC_{50}/100\mu L$, respectively. The assay also showed good precision, with the % coefficient of variance of no more than 25%. In the ruggedness test, using different cell concentrations and cell passage, the $IC_{50}/100\mu L$ values were not significantly different at 95% confidence level (p -value > 0.05). In conclusion, the developed PBNA was validated for HPV16 and HPV18 in both standard human sera and type-specific mouse sera. This assay can serve as a platform for the development of animal-derived reference standards for other HPV-VLP types used in vaccine production.

Keywords: Human papillomavirus vaccine, HPV, Antibody, Pseudovirion-based neutralization assay (PBNA), Method validation

การเฝ้าระวังการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และ การผันแปรของน้ำหนักรวมของผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร ในจังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล (พ.ศ. 2566-2568)

มิตรรารุณ ศรีเมือง ญดา บุญเจริญ อรรพรรณ หลงละเลิง และ ณัฐชา ตวังรัก
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตรัง 92000

บทคัดย่อ ผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรมีบทบาทสำคัญต่อระบบบริการสาธารณสุขของประเทศไทย การควบคุมคุณภาพจึงเป็นปัจจัยหลักในการสร้างความเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยและประสิทธิผลของการใช้ยา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเฝ้าระวังความปลอดภัยด้านการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการผันแปรของน้ำหนักรวมของผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ผลิตโดยโรงพยาบาลในพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ในช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2566-2568 โดยเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรจำนวน 55 ตัวอย่าง จากสมุนไพรจำนวน 10 รายการ เพื่อตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการผันแปรของน้ำหนักรวมตามเกณฑ์มาตรฐานประกาศคณะกรรมการผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2564 และฉบับเพิ่มเติม ผลการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้งหมดผ่านเกณฑ์มาตรฐานทุกรายการทดสอบ ผลการศึกษานี้สะท้อนถึงความสำคัญของการเฝ้าระวังความปลอดภัยของยาจากสมุนไพร การคัดเลือกวัตถุดิบ และการควบคุมกระบวนการผลิตตามหลักเกณฑ์มาตรฐานที่ดีของโรงพยาบาลแหล่งผลิต ดังนั้นการควบคุมคุณภาพอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วัตถุดิบจนถึงผลิตภัณฑ์สมุนไพรจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สมุนไพรอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: ยาจากสมุนไพร, ผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร, การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์, การผันแปรของน้ำหนักรวม, เขตสุขภาพที่ 12

Corresponding author E-mail: mittrarun.k@dmssc.mail.go.th

Received: 23 December 2025

Revised: 5 May 2026

Accepted: 5 May 2026

บทนำ

รัฐบาลและกระทรวงสาธารณสุขส่งเสริมให้มีการใช้และเพิ่มรายการยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร⁽¹⁾ ด้วยบริบทของประเทศไทยที่เข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ⁽²⁾ และความนิยมในการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติของผู้บริโภคสูงขึ้น คุณภาพของยาจากสมุนไพรจึงมีความสำคัญ คณะกรรมการผลิตภัณฑ์สมุนไพรกำหนดให้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ขึ้นทะเบียนตำรับต้องมีวิธีควบคุมคุณภาพและข้อกำหนดเฉพาะของผลิตภัณฑ์สมุนไพร ได้แก่ การทดสอบ วิธีการทดสอบ และเกณฑ์มาตรฐาน พร้อมทั้งหนังสือรับรองผลการวิเคราะห์ตามเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์สมุนไพรอย่างน้อย 1 รุ่นการผลิต⁽³⁾

ห้องปฏิบัติการยาและวัตถุเสพติด ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง มีภารกิจในการตรวจวิเคราะห์และประกันคุณภาพผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคเขตสุขภาพที่ 12 พื้นที่รับผิดชอบ 3 จังหวัด คือ จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ให้มีความปลอดภัยในคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยดำเนินการเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากโรงพยาบาลแหล่งผลิตในเขตพื้นที่รับผิดชอบมาอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562–2565⁽⁴⁾ ยาจากสมุนไพรและวัตถุดิบสมุนไพรจากโรงพยาบาลแหล่งผลิตในพื้นที่ได้รับการตรวจคุณภาพ จำนวน 47 ตัวอย่าง เป็นยาจากสมุนไพร จำนวน 33 ตัวอย่าง วัตถุดิบสมุนไพร จำนวน 14 ตัวอย่าง ในรายการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการผันแปรของน้ำหนัก โดยใช้วิธีทดสอบและเกณฑ์มาตรฐานตามตำราของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2554 (TP2011) และตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ปี พ.ศ. 2561 (THP2018) ตามลำดับ พบว่ายาจากสมุนไพรและวัตถุดิบสมุนไพรบางส่วนยังไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน จำนวน 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.9) โดยไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานรายการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ขมิ้นชัน แคปซูล จำนวน 2 ตัวอย่าง เกลวาล์ยเปรียงแคปซูล จำนวน 1 ตัวอย่าง และวัตถุดิบขมิ้นชัน จำนวน 1 ตัวอย่าง และการผันแปรของน้ำหนัก จำนวน 3 ตัวอย่าง สาเหตุไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานเกิดจากสิ่งแวดล้อม

ในกระบวนการผลิตวัตถุดิบก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตหลังจากโรงพยาบาลแหล่งผลิตได้รับผลการตรวจวิเคราะห์ จึงมีการปรับสถานที่ผลิตร่วมกับแจ้งไปยังแหล่งวัตถุดิบเพื่อปรับและพัฒนาคุณภาพของวัตถุดิบถึงแม้ผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรที่ผลิตในโรงพยาบาลของรัฐดำเนินการตามพระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2562⁽⁵⁾ จะได้รับการยกเว้นไม่ต้องขึ้นทะเบียนตำรับตามพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510⁽⁶⁾ แต่ด้วยพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ยังไม่มีข้อมูลการเฝ้าระวังความปลอดภัยผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรหลังจากมีประกาศคณะกรรมการผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2564⁽³⁾ และฉบับเพิ่มเติม^(7,8) ดังนั้นศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง จึงดำเนินการเฝ้าระวังความปลอดภัยผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรอย่างต่อเนื่อง โดยประเมินการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการผันแปรของน้ำหนัก รวมทั้งวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สมุนไพรในพื้นที่ทั้งสามจังหวัด ภายใต้ความร่วมมือกับสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดและโรงพยาบาลแหล่งผลิต โดยมีการประชุมกำหนดแผนการดำเนินงานและรอบการเก็บตัวอย่างก่อนเริ่มโครงการของปีงบประมาณ และรายงานผลการทดสอบโรงพยาบาลแหล่งผลิตเพื่อใช้ทบทวนปรับปรุงกระบวนการผลิต และมีการวิเคราะห์ผลการดำเนินงานผ่านการประชุมร่วมกับเจ้าหน้าที่งานคุ้มครองผู้บริโภคเขตสุขภาพที่ 12 เพื่อกำหนดแนวทางสำหรับยกระดับมาตรฐานและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรในพื้นที่

การศึกษานี้เป็นงานวิจัยเชิงปฏิบัติการ ดำเนินการโดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ร่วมกับสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด โรงพยาบาลแหล่งผลิตสมุนไพรของจังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล เพื่อเฝ้าระวังความปลอดภัยผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรที่ผลิตในโรงพยาบาลแหล่งผลิตจังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล โดยตรวจวิเคราะห์และประเมินผลตามประกาศคณะกรรมการผลิตภัณฑ์สมุนไพร เรื่อง วิธีควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2564⁽³⁾ และฉบับเพิ่มเติม^(7,8) ประกอบด้วย การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในข้อกำหนดจำนวนรวมของจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตโดยใช้อากาศ (Total

Aerobic Microbial Count; TAMC) จำนวนรวมของยีสต์และรา (Total Yeast and Mould Count; TYMC) แบคทีเรียแกรมลบที่ทนน้ำดี (Bile-tolerant Gram-negative bacteria), *Salmonella* spp., *Escherichia coli* (*E. coli*) และ *Clostridium* spp. ทดสอบตามวิธี British Pharmacopoeia ฉบับ 2022^(9,10) และการผันแปรของน้ำหนัก โดยทดสอบตามตำรายามาตรฐานสมุนไพรไทย⁽¹¹⁾

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างจากโรงพยาบาลแหล่งผลิตจังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล จำนวน 55 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ยาจากสมุนไพร จำนวน 38 ตัวอย่าง วัตถุดิบสมุนไพร จำนวน 17 ตัวอย่าง (แบ่งเป็นสมุนไพร จำนวน 10 รายการ คือ เถวัลย์เปรียง ขมิ้นชัน ฟ้าทะลายโจร เพชรสังฆาต มะขามแขก สหิศาธา ยาหอมเทพจิตร ชิง มะระขี้นก และหญ้าดอกขาว) ดำเนินการเก็บตัวอย่างในช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2568 ทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 55 ตัวอย่าง และทดสอบการผันแปรของน้ำหนัก จำนวน 38 ตัวอย่าง

เครื่องมือและอุปกรณ์

ตู้ปราศจากเชื้อแบบคลาส II (รุ่น BSC-1604IIA2, Airtech, China), Water bath (รุ่น WNB10, Memmert, Germany), ตู้อบเพาะเชื้อ (รุ่น IF260, Memmert, Germany), ตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิต่ำ (รุ่น 2020, Shel lab, USA), เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.1 ถึง 0.01 มิลลิกรัม (รุ่น XPE205, Mettler toledo, Germany), เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 กรัม (รุ่น Fx-2000i, AND, Japan), เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (รุ่น CL-40SDP, ALP, Japan), ตะเกียงบุนเสน (รุ่น Schuett phoenix II, Schuett-biotec, Germany), เครื่องผสมสำหรับหลอดทดลอง

(รุ่น Genie-2, Scientific Industries, USA) และ ไมโครปิเปต พร้อม Tip ขนาด 20–200, 100–1,000 ไมโครลิตร (รุ่น Research plus, Eppendorf, Switzerland)

สารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Dey/Engley Neutralizing Broth (D/E Broth), Tryptic Soy Agar (TSA), Tryptic Soy Broth (TSB), Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol (SDA+C), Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG), Enterobacteria Enrichment Broth (EE Broth), MacConkey Broth (MCB), MacConkey Agar (MAC), Eosin Methylene Blue Agar (EMB), Rappaport Vassiliadis Salmonella enrichment broth (RVS), Tetrathionate Brilliant Green Bile Broth (TBG), Brilliant Green Agar (BGA), Bismuth Sulfite Agar (BSA), Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD), Reinforced Clostridial Medium (RCM), Columbia Agar with Gentamicin (CBA+G) (Becton, Dickinson and Company, USA) และ Liquid paraffin (Kemaus, Australia)

เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

Staphylococcus aureus DMST 8840 (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* DMST 4739 (ATCC 9027), *Bacillus subtilis* DMST 15896 (ATCC 6633), *Candida albicans* DMST 5815 (ATCC 10231), *Aspergillus brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404), *Escherichia coli* DMST 4212 (ATCC 8739), *Salmonella* Abony DMST 21863 (NCTC 6017) และ *Clostridium sporogenes* DMST 15536 (ATCC 19404) (National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Thailand)

การหาปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์^(9,10)

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างยาสมุนไพร 10 กรัม เติม D/E Broth 90 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ระดับการเจือจาง 1:10 และเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องเขย่า สารละลายที่ได้ใช้เป็นสารเจือจางเริ่มต้นในการตรวจนับและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบจำนวนรวมของจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตโดยใช้อากาศ (TAMC)

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ทำการเจือจางลำดับขั้น (Ten-fold dilution) แล้วเพาะเลี้ยงบน TSA ด้วยวิธีเทเพลท (Pour plate) บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้ในจานที่มีเชื้อชั้นมากที่สุด แต่มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยไม่เกิน 250 โคโลนี เฉลี่ยจาก 2 จาน ที่เจือจางระดับเดียวกัน แล้วคำนวณผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง (Colony forming units per gram; CFU/g)

การทดสอบจำนวนรวมของยีสต์และรา (TYMC)

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ทำการเจือจางลำดับขั้น แล้วเพาะเลี้ยงบน SDA+C ด้วยวิธีเทเพลท บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 20–25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีของยีสต์และราที่มีเชื้อชั้นมากที่สุด แต่มีจำนวนโคโลนีไม่เกิน 50 โคโลนี โดยเฉลี่ยจาก 2 จาน ที่ระดับเจือจางเดียวกัน และรายงานผลเป็น CFU/g

การทดสอบ Bile-tolerant Gram-negative bacteria

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ลงใน TSB 90 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้อัตราเจือจาง 1:10 แล้วบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 20–25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–5 ชั่วโมง แล้วปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ลงใน EE Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง จากนั้น Subculture ลงบน VRBG และบ่มต่อที่อุณหภูมิเดียวกัน เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโคโลนี บน VRBG และเปรียบเทียบกับ Positive control หากตรวจพบดำเนินการรายงานผลตามการทดสอบเชิงปริมาณ

สำหรับการทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative test) นำตัวอย่างมาเจือจางต่อแบบลำดับขั้นให้ได้ปริมาณตัวอย่าง 0.01 และ 0.001 กรัม ใน EE Broth บ่มที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง แล้วใช้ Loop ถ่ายเชื้อจาก EE Broth มา Streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBG บ่มที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง ตรวจหา Gram-negative bacteria ที่เจริญบน VRBG และอ่านค่าเปรียบเทียบกับตาราง Probable number of bacteria⁽¹⁰⁾ เพื่อรายงานเป็นช่วงปริมาณเชื้อดังนี้ กรณีพบการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะที่ปริมาณตัวอย่าง 0.1 กรัม รายงานผลมากกว่า 10^2 แต่ไม่น้อยกว่า 10^3 กรณีพบที่ 0.1 และ 0.01 กรัม รายงานผลมากกว่า 10^2 แต่ไม่น้อยกว่า 10^3 กรณีพบที่ 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม รายงานผลมากกว่า 10^3 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า Probable number ของการทดสอบ Bile-tolerant Gram-negative bacteria

ผลการทดสอบที่ปริมาณตัวอย่าง (กรัม)			การรายงาน Probable number ต่อตัวอย่าง 1 กรัม
0.1	0.01	0.001	
+	+	+	มากกว่า 10^3
+	+	–	น้อยกว่า 10^3 และมากกว่า 10^2
+	–	–	น้อยกว่า 10^2 และมากกว่า 10
–	–	–	น้อยกว่า 10

หมายเหตุ : + หมายถึง พบการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ – หมายถึง ไม่พบการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบ *Salmonella* spp.

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติม D/E Broth ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้อัตราเจือจาง 1:10 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน บ่มในตู้บเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร ลงใน RVS และ 1 มิลลิลิตร ลงใน TBG บ่มที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจาก RVS และ TBG subculture ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BGA, BSA และ XLD บ่มที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–48 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *Salmonella* spp. ได้แก่ BGA โคโลนีสีใสหรือขาวอมชมพู ล้อมรอบด้วยโซนสีชมพูถึงแดง BSA โคโลนีสีดำหรือเขียว XLD โคโลนีสีแดง มีหรือไม่มีจุดดำตรงกลาง ยืนยันผลด้วยการย้อมแกรมเป็น Gram-negative rods และการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ Triple Sugar Iron agar (TSI), Motility-Indole-Lysine (MIL) และ IMViC tests (Methyl Red, Voges-Proskauer และ Simmons citrate) เพื่อยืนยันลักษณะจำเพาะของเชื้อ โดยรายงานผล คือ พบหรือไม่พบ *Salmonella* spp. ในตัวอย่าง 25 กรัม

การทดสอบ *E. coli*

นำสารละลายตัวอย่างเจือจาง 1:10 จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ใน D/E Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้บเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตรลงใน MCB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42–44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง แล้ว Subculture ลงบน MAC บ่มที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–72 ชั่วโมง แล้วใช้ Loop ถ่ายเชื้อจาก MAC มา Streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB บ่มที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดโคโลนีลักษณะเฉพาะ ได้แก่ บน MAC โคโลนีสีแดงอิฐ (Brick-red) บน EMB โคโลนีมีเงาโลหะ (Metallic sheen) หากพบโคโลนีดังกล่าวให้ยืนยันด้วยการย้อมแกรม หากเป็น

E. coli ผลต้องเป็น Gram-negative rods และยืนยันผลด้วยการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ IMViC tests (Indole, Methyl Red, Voges-Proskauer และ Simmons citrate) โดยลักษณะจำเพาะของ *E. coli* ให้ผล Indole, Methyl Red เป็นบวก และ Voges-Proskauer, Citrate เป็นลบ โดยรายงานผลพบหรือไม่พบ *E. coli* ในตัวอย่าง 1 กรัม

การทดสอบ *Clostridium* spp.

นำสารละลายตัวอย่างเจือจาง 1:10 แบ่งใส่หลอดทดลอง 2 หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร โดยหลอดที่ 1 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที ส่วนหลอดที่ 2 ไม่ต้องให้ความร้อน จากนั้นเติม RCM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด เติม Sterile liquid paraffin ปิดทับหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เป็นสภาวะไร้อากาศ แล้วบ่มในตู้บเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อจาก RCM ที่บ่มไว้ Subculture ลงบน CBA+G และบ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48–72 ชั่วโมง ถ้าไม่มีเชื้อบน CBA+G แสดงว่าไม่มีเชื้อ *Clostridium* spp. หากพบโคโลนีบน CBA+G ให้ตรวจสอบด้วยการย้อมแกรม ผลต้องเป็น Gram-positive bacilli และทดสอบ Catalase reaction โดยนำโคโลนีที่สงสัยแตะบนสไลด์แก้วแล้วหยดสารละลาย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หากไม่เกิดฟองแก๊สคือ ผลลบ แล้วเพาะเชื้อจากโคโลนีเดียวกันต่อบน CBA ในสภาวะไร้อากาศ หากมีเชื้อขึ้นในสภาวะไร้อากาศ แต่ไม่พบในสภาวะมีอากาศ แสดงว่ามีเชื้อ *Clostridium* spp. โดยรายงานผลพบหรือไม่พบ *Clostridium* spp. ในตัวอย่าง 1 กรัม

การประเมินผล

เกณฑ์มาตรฐานประกาศคณะกรรมการผลิตภัณฑ์สมุนไพร ประเภทผลิตภัณฑ์สมุนไพรชนิดรับประทาน ที่ประกอบด้วยสารสกัดพืชสมุนไพร ดังแสดงในตารางที่ 2^(3,7,8)

ตารางที่ 2 การประเมินผลตามเกณฑ์มาตรฐานประกาศคณะกรรมการผลิตภัณฑ์สมุนไพรประเภทผลิตภัณฑ์สมุนไพร
ชนิดรับประทานที่ประกอบด้วยสารสกัดพืชสมุนไพร

รายการทดสอบ	เกณฑ์มาตรฐาน
Total Aerobic Microbial Count (TAMC)	ไม่มากกว่า 5×10^4 CFU/g
Total Yeast and Mould Count (TYMC)	ไม่มากกว่า 5×10^2 CFU/g
Bile-tolerant Gram-negative bacteria	ไม่มากกว่า 10^2 CFU/g
<i>Salmonella</i> spp.	ไม่พบใน 25 กรัม
<i>E. coli</i>	ไม่พบใน 1 กรัม
<i>Clostridium</i> spp.	ไม่พบใน 1 กรัม

การทดสอบการปนเปื้อนของน้ำหนักรวม

การตรวจวิเคราะห์

สุ่มตัวอย่าง จำนวน 10 หน่วย สำหรับตัวอย่างที่เป็นแคปซูล ซึ่งน้ำหนักรวมทั้งแคปซูล จากนั้นนำผงยาภายในออกและชั่งน้ำหนักเปลือกแคปซูล หาน้ำหนักผงยาภายในแต่ละแคปซูลจากผลต่างระหว่างน้ำหนักรวมและน้ำหนักเฉพาะเปลือกแคปซูล บันทึกค่าน้ำหนักผงยาของทั้ง 10 หน่วย สำหรับตัวอย่างที่เป็นเม็ดลูกกลอน ซึ่งน้ำหนักรวมทั้งหน่วยและประเมินผลตามเกณฑ์เดียวกัน^(3,7,8)

การคำนวณ

คำนวณน้ำหนักผงยาเฉลี่ยจากทั้ง 10 หน่วย และเปรียบเทียบน้ำหนักผงยาของแต่ละหน่วยกับน้ำหนักรวมเฉลี่ย จากนั้นคำนวณร้อยละความเบี่ยงเบนของน้ำหนักรวมผงยาแต่ละหน่วย

การประเมินผล

ผลการทดสอบต้องไม่เกิน 2 หน่วย ที่น้ำหนักเบี่ยงเบนจากน้ำหนักรวมเฉลี่ยเกินกว่าร้อยละ 10 และต้องไม่มีหน่วยใดเบี่ยงเบนเกินกว่าร้อยละ 20 หากเป็นไปตามเกณฑ์ถือว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อนของน้ำหนักรวม⁽¹¹⁾

ผล

จำนวนตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรและวัตถุดิบจำแนกตามจังหวัดและปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2568 โดยในปี พ.ศ. 2566 เก็บตัวอย่างเฉพาะผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรจากแหล่งผลิตทั้ง 3 จังหวัด และปี พ.ศ. 2567–2568 เก็บตัวอย่างทั้งผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรและวัตถุดิบ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรและวัตถุดิบที่ตรวจวิเคราะห์ จำแนกตามจังหวัดและปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2568

จังหวัด	ปี	ผลิตภัณฑ์ (ตัวอย่าง)	วัตถุดิบ (ตัวอย่าง)	รวม
ตรัง	2566	7	0	7
	2567	5	3	8
	2568	2	3	5
พัทลุง	2566	4	0	4
	2567	4	3	7
	2568	2	2	4
สตูล	2566	7	0	7
	2567	5	4	9
	2568	2	2	4
รวม	2566–2568	38	17	55

ผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการผันแปรของน้ำหนักรสชาติรสขมสมุนไพรพบว่าปริมาณ TAMC อยู่ในช่วง $< 10-1.2 \times 10^3$ CFU/g ปริมาณ TYMC อยู่ในช่วง $< 10-1.0 \times 10^2$ CFU/g สำหรับ Bile-tolerant Gram-negative bacteria

อยู่ในช่วง $< 10- \leq 10^2$ CFU/g โดยไม่พบ *Salmonella* spp., *E. coli* และ *Clostridium* spp. ผลการทดสอบการผันแปรของน้ำหนักในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรสำหรับตัวอย่างที่เป็นแคปซูลมีค่าร้อยละความแตกต่างจากฉลากอยู่ในช่วง -7.9 ถึง 17.3% ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการผันแปรของน้ำหนักรสชาติรสขมสมุนไพร

สมุนไพร	จังหวัด	ปี	ประเภท	รูปแบบ	การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์				การผันแปรของน้ำหนัก				
					TAMC (CFU/g)	TYMC (CFU/g)	Bile-tolerant Gram-negative bacteria (CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i>	<i>Clostridium</i> spp.	ค่าเฉลี่ย (mg)	ฉลาก (mg)	ต่างจากฉลาก (%)
เถาวัลย์เปรียง (n = 15)	ตรัง	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	385.4	400	-3.7
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	391.8	400	-2.0
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	382.9	400	-4.3
			วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	20	10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	417.4	400	4.3
		2568	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	25	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	398.4	400	-0.4
			วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	3.4×10^2	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	414.2	400	3.6
		พัทลุง	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	40	10	$>10 - \leq 10^2$	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	429.0	400	7.3
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	$>10 - \leq 10^2$	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	410.1	400	2.5
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	15	10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	406.1	400	1.5
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	413.2	400	3.3
			วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
	สตูล	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	1×10^2	< 10	$>10 - \leq 10^2$	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	401.2	400	0.3
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	$>10 - \leq 10^2$	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	392.2	400	-2.0
ฟ้าทะลายโจร (n = 13)	ตรัง	2567	วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	453.2	400	13.3
		พัทลุง	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	438.5	400	9.6
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	25	10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	415.8	400	4.0
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	444.4	400	11.1
			วัตถุดิบ	ผง	75	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
			วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
		สตูล	วัตถุดิบ	ผง	< 10	50	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	10	10	$>10 - \leq 10^2$	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	411.0	400	2.8
			วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	428.0	400	7.0
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	404.4	400	1.1
			วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
ขมิ้นชัน (n = 13)	ตรัง	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	471.4	500	-5.7
			วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	498.1	500	-0.4
		พัทลุง	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	529.0	500	5.8
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	25	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	507.8	500	1.6
			วัตถุดิบ	ผง	20	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
		สตูล	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	504.6	500	0.9
			วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 4 ผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการผันแปรของน้ำหนักจำแนกตามรายการสมุนไพร (ต่อ)

สมุนไพร	จังหวัด	ปี	ประเภท	รูปแบบ	การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์					การผันแปรของน้ำหนัก			
					TAMC (CFU/g)	TYMC (CFU/g)	Bile-tolerant Gram-negative bacteria (CFU/g)	Salmonella spp.	E.coli	Clostridium spp.	ค่าเฉลี่ย (mg)	ผลาก (mg)	ต่างจากผลาก (%)
		2568	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	507.7	500	1.5
			วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	465.9	500	-6.8
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	502.1	500	0.4
			วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
เพชรสังฆาต (n = 4)	ตรัง	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	4.9 × 10 ²	< 10	>10 – ≤10 ²	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	390.9	400	-2.3
	พัทลุง	2568	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	1.1 × 10 ³	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	419.4	400	4.9
			วัตถุดิบ	ผง	1.2 × 10 ³	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
	สตูล	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	40	10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	420.1	400	5.0
มะขามแขก (n = 3)	ตรัง	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	469.3	400	17.3
		2568	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	460.6	500	-7.9
	สตูล	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	417.3	400	4.3
สัทิสรา (n = 2)	สตูล	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	25	1 × 10 ²	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	315.1	300	5.0
		2567	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	20	10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	319.2	300	6.4
ยาหอมเทพจิตร (n = 2)	ตรัง	2566	ผลิตภัณฑ์	เม็ด	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	73.2	N/A	N/A
				ลูกกลอน									
			ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	15	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	433.7	450	-3.6
ชิง (n = 1)	สตูล	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	407.1	400	1.8
มะระขี้นก (n = 1)	ตรัง	2568	วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A
หญ้าดอกขาว (n = 1)	ตรัง	2568	วัตถุดิบ	ผง	1 × 10 ²	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A	N/A	N/A

หมายเหตุ: n คือ จำนวนตัวอย่างของสมุนไพร N/A คือ ไม่มีข้อมูล/ไม่สามารถประเมินผล

ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบจำแนกตามแหล่งผลิต พบว่าปริมาณ TAMC ในสมุนไพรของจังหวัดตรัง พัทลุง สตูล มีค่าอยู่ในช่วง $<10-4.9 \times 10^2$, $<10-1.2 \times 10^3$, $<10-1.0 \times 10^2$ CFU/g ตามลำดับ ปริมาณ TYMC ในสมุนไพรของจังหวัดตรัง พัทลุง สตูล มีค่า $<10-10$, $<10-10$, $<10-1.0 \times 10^2$ CFU/g ตามลำดับ และ Bile-tolerant Gram-negative bacteria ทั้ง 3 จังหวัด อยู่ในช่วง $<10-\leq 10^2$ CFU/g และไม่พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp.,

E. coli และ *Clostridium* spp. ในตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจวิเคราะห์

สำหรับผลการทดสอบการผันแปรของน้ำหนักเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ระบุบนฉลาก พบว่าค่าความแตกต่างจากฉลากอยู่ในช่วง -7.9 ถึง 17.3% โดยตัวอย่างจากจังหวัดตรังมีค่าความแตกต่างอยู่ในช่วง -7.9 ถึง 17.3% จังหวัดพัทลุงอยู่ในช่วง 1.5 ถึง 11.1% และจังหวัดสตูลอยู่ในช่วง -6.8 ถึง 7.0% ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการผันแปรของน้ำหนักจำแนกตามโรงพยาบาลแหล่งผลิต

จังหวัด	ปี	ประเภท	รูปแบบ	การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์					การผันแปรของน้ำหนัก	
				TAMC (CFU/g)	TYMC (CFU/g)	Bile-tolerant Gram-negative bacteria (CFU/g)	Salmonella spp.	E. coli	Clostridium spp.	ต่างจากกลาง (%)
ตรัง (n = 20)	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	$< 10-4.9 \times 10^2$	< 10	$< 10, > 10- \leq 10^2$	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-5.7-17.3
	2567	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	$< 10-25$	$< 10-10$	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-4.3-13.3
		วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A
	2568	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	$< 10-3.4 \times 10^2$	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-7.9-3.6
		วัตถุดิบ	ผง	$< 10-1.0 \times 10^2$	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A
พัทลุง (n = 15)	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	$< 10-40$	$< 10-10$	$< 10, > 10- \leq 10^2$	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	2.5-9.6
	2567	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	$< 10-25$	$< 10-10$	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	1.5-11.1
		วัตถุดิบ	ผง	$< 10-75$	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A
	2568	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	$< 10-1.1 \times 10^3$	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	3.3-4.9
		วัตถุดิบ	ผง	$< 10-1.2 \times 10^3$	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A
สตูล (n = 20)	2566	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	$< 10-1.0 \times 10^2$	$< 10-1.0 \times 10^2$	$< 10, > 10- \leq 10^2$	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-2.0-5.0
	2567	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	$< 10-20$	$< 10-10$	$< 10, > 10- \leq 10^2$	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-6.8-7.0
		วัตถุดิบ	ผง	< 10	$< 10-50$	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A
	2568	ผลิตภัณฑ์	แคปซูล	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	0.4-1.1
		วัตถุดิบ	ผง	< 10	< 10	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	N/A

หมายเหตุ: ค่าที่รายงานเป็นช่วงค่าต่ำสุดถึงค่าสูงสุดของผลการตรวจวิเคราะห์ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

n คือ จำนวนตัวอย่างของโรงพยาบาลแหล่งผลิต N/A คือ ไม่มีข้อมูล/ไม่สามารถประเมินผล

ผลการตรวจวิเคราะห์จำแนกตามรายการทดสอบ พบว่าการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างทั้งหมด 55 ตัวอย่าง (ร้อยละ 100) เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน

การผันแปรของน้ำหนักในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ จำนวน 38 ตัวอย่าง เป็นไปตามเกณฑ์น้ำหนักเฉลี่ยของตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สรุปผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำแนกตามรายการทดสอบ

รายการทดสอบ	จำนวน (ตัวอย่าง)	ร้อยละที่ผ่าน เกณฑ์มาตรฐาน	ร้อยละที่ไม่ผ่าน เกณฑ์มาตรฐาน
การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ รายการ TAMC, TYMC, Bile-tolerant Gram-negative bacteria, <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Clostridium</i> spp.	55	100.0	0.0
การผันแปรของน้ำหนัก	38*	100.0	0.0

หมายเหตุ: * การผันแปรของน้ำหนักประเมินเทียบกับค่าน้ำหนักเฉลี่ยของตัวอย่างทั้งหมด 38 ตัวอย่าง โดยมี 1 ตัวอย่าง ไม่ระบุน้ำหนักบนฉลาก

วิจารณ์

การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ผลิตโดยโรงพยาบาลแหล่งผลิตในพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบตัวอย่างใดไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาปีงบประมาณ พ.ศ. 2562–2565 ที่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เกินเกณฑ์มาตรฐาน รายการ TAMC และ Bile-tolerant Gram-negative bacteria⁽⁴⁾ สำหรับการเฝ้าระวังช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2568 ผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ตามรายตัวอย่างแสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รายการ TAMC, TYMC และ Bile-tolerant Gram-negative bacteria ค่าปริมาณเชื้อมีแนวโน้มลดลงหรือคงที่ในหลายรายการสมุนไพร เช่น วัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ขมิ้นชัน ฟ้าทะลายโจรสล่าน้อยมีค่า TAMC น้อยกว่า 10 CFU/g อย่างต่อเนื่อง และไม่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อลักษณะก้าวกระโดด สะท้อนถึงความสำเร็จของระบบควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ กระบวนการผลิตที่มีแนวโน้มดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลย้อนหลัง และภาพรวมของประเทศ แต่การศึกษานี้มีข้อจำกัดด้านจำนวนของตัวอย่างโดยบางรายการสมุนไพรมีข้อมูลจากเพียงปีเดียวหรือแหล่งผลิตเดียว ทำให้ไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์แนวโน้มการเฝ้าระวังความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สมุนไพรและการเปรียบเทียบระหว่างแหล่งผลิตได้อย่างชัดเจน

จากรายงานความปลอดภัยของยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติของ จิตรา ชัยวัฒน์ และคณะ⁽¹²⁾ ระบุถึงการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ยังพบได้สูงในผลิตภัณฑ์หลายชนิด โดยเฉพาะในตำรับที่ใช้ส่วนของพืชที่สัมผัสดิน เช่น ราก เหง้า และลำต้นใต้ดิน ซึ่งเป็นแหล่งที่มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าส่วนอื่น นอกจากนี้ รายงานสถานการณ์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาแผนโบราณของ สิริดา ปงเมืองมูล และคณะ⁽¹³⁾ พบปัญหาทั้งในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปอย่างต่อเนื่องในภาพรวมของประเทศ แต่จากผลการเฝ้าระวังครั้งนี้ทุกตัวอย่างเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานและไม่พบเชื้อก่อโรคสำคัญ ได้แก่ *Salmonella* spp., *E. coli* และ *Clostridium* spp. ผลดังกล่าวสะท้อนถึงแนวโน้ม

การควบคุมความปลอดภัยของยาจากสมุนไพรภายในโรงพยาบาลแหล่งผลิตที่มีประสิทธิภาพและมีความสม่ำเสมอมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลการเฝ้าระวังในอดีต เมื่อโรงพยาบาลแหล่งผลิตทราบผลการวิเคราะห์ได้มีการปรับปรุงกระบวนการผลิตเพื่อป้องกันการเกิดซ้ำทั้งด้านวัตถุดิบและการปฏิบัติตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยา (GMP) ได้แก่ การทำความสะอาดวัตถุดิบอย่างเหมาะสม การควบคุมความชื้น การทำให้แห้ง การดูแลอุปกรณ์และพื้นที่ผลิตให้มีสุขลักษณะ ตลอดจนการลดปัจจัยเสี่ยงในขั้นตอนก่อนและระหว่างการผลิต ซึ่งเป็นแนวปฏิบัติที่ทุกแหล่งผลิตให้ความสำคัญมากขึ้นจากการเฝ้าระวังในช่วงที่ผ่านมา จากการสอบถามข้อมูลเพิ่มเติมจากโรงพยาบาลแหล่งผลิต พบว่ามีแนวทางในการคัดเลือกวัตถุดิบสมุนไพรเพื่อลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ เช่น การเลือกวัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการฉายรังสีแกมมา ซึ่งเป็นทางเลือกที่ได้รับการยอมรับจากมาตรฐานนานาชาติ เช่น WHO, US FDA และ Codex ที่สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี⁽¹⁴⁾ นอกจากนี้ อุ่นชู ได้ระบุอีกทางเลือกของการลดปริมาณเชื้อโดยการฉายรังสีในผลิตภัณฑ์สมุนไพร คือ เทคโนโลยีการฉายรังสีด้วยอิเล็กตรอนพลังงานสูง (Electron beam; E-beam) ที่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความรวดเร็วในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์เมื่อเปรียบเทียบกับรังสีแกมมาและไม่ใช้ความร้อนในกระบวนการ⁽¹⁴⁾ แต่ E-beam มีข้อจำกัดด้านข้อมูลผลกระทบต่ออัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์สมุนไพร เช่น กลิ่นและสี รวมทั้งการกำหนดปริมาณรังสีที่เหมาะสมกับชนิดของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้เก็บข้อมูลการใช้เทคโนโลยีการฉายรังสีในตัวอย่างแต่ละรายการสมุนไพรตั้งแต่เริ่มต้นโครงการ จึงไม่สามารถวิเคราะห์ขยายผลของการฉายรังสีต่อผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ กรณีมีข้อมูลการฉายรังสีหากผลิตภัณฑ์สมุนไพรไม่มีการฉายรังสีแล้วผลการทดสอบการปนเปื้อนผ่านเกณฑ์แสดงถึงโรงพยาบาลแหล่งผลิตนั้นมีการปฏิบัติตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีและคุณภาพวัตถุดิบที่ดีหากผลิตภัณฑ์สมุนไพรมีการฉายรังสีแล้วผลการทดสอบการปนเปื้อนผ่านเกณฑ์ อาจเป็นการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุ

เพื่อให้ผ่านมาตรฐาน ผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรจากแหล่งผลิตใดมีเชื้อจุลินทรีย์ต่ำกว่าเกณฑ์โดยไม่ต้องพึ่งพารังสีแสดงว่าต้นทุนดีและกระบวนการผลิตดี แหล่งผลิตจะเป็นต้นแบบของแนวปฏิบัติที่ดีในพื้นที่นั้น ๆ ซึ่งสามารถนำไปปรับใช้หรือขยายผลต่อได้ ดังนั้นการรักษาคุณภาพตามหลัก GMP ตลอดกระบวนการผลิตโดยเริ่มตั้งแต่การใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพ จึงยังคงเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีและเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์สำหรับทั้งโรงพยาบาลและผู้ประกอบการสมุนไพรรายย่อย

การผันแปรของน้ำหนักในตัวอย่าง จำนวน 38 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างเป็นไปตามเกณฑ์น้ำหนักเฉลี่ยของ THP ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสม่ำเสมอของกระบวนการบรรจุและการควบคุมคุณภาพการผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลการเฝ้าระวังย้อนหลังของปีงบประมาณ พ.ศ. 2562–2565 ที่พบตัวอย่างไม่ผ่านเกณฑ์จำนวน 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 28 ตัวอย่าง⁽⁴⁾ แนวโน้มการเฝ้าระวังความปลอดภัยการผันแปรของน้ำหนักปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2568 จึงสะท้อนถึงการควบคุมกระบวนการผลิตที่มีความเข้มงวดและมีประสิทธิภาพมากขึ้นทั้งด้านวัตถุดิบ ในส่วนของพืชที่นำมาใช้ควบคุมความชื้น และสภาวะแวดล้อมระหว่างกระบวนการผลิต การศึกษานี้ได้พิจารณาความแตกต่างจากน้ำหนักที่ระบุบนฉลากเพื่อประกอบการวิเคราะห์เพิ่มเติม โดยมี 1 จาก 38 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถคำนวณความแตกต่างจากฉลากได้เนื่องจากไม่ระบุข้อมูลบนฉลาก พบว่าค่าความแตกต่างอยู่ในช่วง -7.9 ถึง 17.3% โดยมีบางตัวอย่างที่มีค่าความแตกต่างจากฉลากมากกว่า 10% เช่น ผลิตภัณฑ์มะขามแขกและฟ้าทะลายโจร สะท้อนถึงความแตกต่างระหว่างปริมาณที่ระบุบนฉลากและปริมาณที่ตรวจพบส่งผลให้การใช้ยาตามคำแนะนำบนฉลากไม่ตรงกับขนาดยาที่ได้รับจริง ซึ่งอาจทำให้ขาดประสิทธิภาพในการรักษาหรือเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการได้รับยามากเกินไป เมื่อเปรียบเทียบกับข้อกำหนดของตำรายาสหรัฐอเมริกา (USP) สำหรับการทดสอบการผันแปรของน้ำหนักแคปซูลฟ้าทะลายโจร ซึ่งกำหนดให้ใช้ตัวอย่างในการทดสอบขั้นแรก จำนวน 20 หน่วย และไม่ต้องแกะฝอยออกจากแคปซูล⁽¹⁵⁾ วิธีการดังกล่าวมีความเข้มงวดและสามารถสะท้อนความสม่ำเสมอของกระบวนการ

บรรจุได้ตั้งแต่เริ่มต้นการทดสอบ หากพบค่าการผันแปรเกินเกณฑ์ยังมีขั้นตอนการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลทำให้สามารถตรวจพบความผิดปกติของกระบวนการผลิตได้รวดเร็ว แม้ผลจากการศึกษาจะผ่านเกณฑ์ของ THP แต่การพัฒนาให้การควบคุมคุณภาพใกล้เคียงกับเกณฑ์ยาแผนปัจจุบันย่อมเป็นข้อได้เปรียบด้านการแข่งขันของผลิตภัณฑ์สมุนไพร และเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคที่ได้รับยาปริมาณเท่ากันทุกครั้งที่ได้รับประทาน อีกทั้งเป็นการเตรียมความพร้อมสำหรับการเฝ้าระวังด้านปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์สมุนไพรต่อไป

สรุป

การเฝ้าระวังความปลอดภัยด้านการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการผันแปรของน้ำหนักผลิตภัณฑ์สมุนไพรในจังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2568 โดยสุ่มตรวจผลิตภัณฑ์สมุนไพร จำนวน 10 รายการ เพื่อตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 55 ตัวอย่าง และการผันแปรของน้ำหนัก จำนวน 38 ตัวอย่าง พบว่าผลิตภัณฑ์ทั้งหมดผ่านเกณฑ์มาตรฐานด้านการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการผันแปรของน้ำหนักแสดงถึงศักยภาพของโรงพยาบาลแหล่งผลิตในการปฏิบัติตาม GMP ทั้งการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและกระบวนการผลิต ข้อมูลจากการศึกษานี้เป็นการยกระดับความเชื่อมั่นของผู้บริโภคต่อความปลอดภัยของสมุนไพรจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และความสม่ำเสมอของน้ำหนักผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามเพื่อให้การคุ้มครองผู้บริโภคเป็นไปอย่างครอบคลุม ควรมีการขยายขอบเขตการเฝ้าระวังให้ครอบคลุมด้านโลหะหนักและปริมาณสารสำคัญ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนเชิงนโยบายในการยกระดับมาตรฐานการผลิตยาสมุนไพรและสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภค

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

บทความนี้ใช้ปัญญาประดิษฐ์ ChatGPT (OpenAI, USA) เพื่อช่วยปรับข้อความในส่วนข้อหวัข้อ บทคัดย่อภาษาอังกฤษ และการทบทวนวรรณกรรมโดยผู้นิพนธ์เป็นผู้รับผิดชอบเนื้อหาทั้งหมด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องของโรงพยาบาล
แหล่งผลิต สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดตรัง พัทลุง และ
สตูล ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างและข้อมูลในทุกขั้นตอน
ขอขอบคุณ ภญ.ลัดดา พูลสวัสดิ์ สำหรับการให้คำปรึกษา
ด้านจุลชีววิทยา ขอขอบคุณ นายวิชัย ปราสาททอง อดีต
ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง
สำหรับคำแนะนำในการเริ่มต้นโครงการ และขอขอบคุณ
นางสาวนิตยา เพียรทรัพย์ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์
การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์
การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ทุกท่าน ที่ให้ข้อเสนอแนะและ
อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและให้คำแนะนำ
ต่างๆ จนงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง
บัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร พ.ศ. 2566.
ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 140 ตอนพิเศษ 130 ง
(วันที่ 2 มิถุนายน 2566). หน้า 45-137.
2. สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงดิจิทัลเพื่อเศรษฐกิจ
และสังคม. การสำรวจประชากรสูงอายุในประเทศไทย
พ.ศ. 2567. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 3 พ.ย. 2568];
[188 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.nso.go.th/nsoweb/storage/survey_detail/2025/20241209145003_27188.pdf.
3. ประกาศคณะกรรมการผลิตภัณฑ์สมุนไพร เรื่อง
วิธีควบคุมคุณภาพและข้อกำหนดเฉพาะของผลิตภัณฑ์
สมุนไพร และหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขเกี่ยวกับ
หนังสือรับรองผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สมุนไพร
พ.ศ. 2564. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 290 ง
(วันที่ 25 พฤศจิกายน 2564). หน้า 23-25.
4. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์
การแพทย์. รายงานประจำปี 2566. [ออนไลน์]. 2566;
[สืบค้น 3 พ.ย. 2568]; [98 หน้า]. เข้าถึงได้จาก:
URL: <https://anyflip.com/cdumh/bgtu/basic>.
5. พระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2562.
ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนที่ 56 ก (วันที่ 30
เมษายน 2562). หน้า 122-152.
6. พระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510. ราชกิจจานุเบกษา
ฉบับพิเศษ เล่ม 84 ตอนที่ 101 (วันที่ 20 ตุลาคม
2510). หน้า 16-17.
7. ประกาศคณะกรรมการผลิตภัณฑ์สมุนไพร เรื่อง
วิธีควบคุมคุณภาพและข้อกำหนดเฉพาะของผลิตภัณฑ์
สมุนไพร และหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขเกี่ยวกับ
หนังสือรับรองผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สมุนไพร
(ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2566. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 140
ตอนพิเศษ 181 ง (วันที่ 26 กรกฎาคม 2566). หน้า 11.
8. ประกาศคณะกรรมการผลิตภัณฑ์สมุนไพร เรื่อง
วิธีควบคุมคุณภาพและข้อกำหนดเฉพาะของผลิตภัณฑ์
สมุนไพร และหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขเกี่ยวกับ
หนังสือรับรองผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สมุนไพร
(ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2567. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 141
ตอนพิเศษ 356 ง (วันที่ 26 ธันวาคม 2567).
หน้า 35-37.
9. British Pharmacopoeia Commission. Appendix
XVIB: microbiological examination of non-sterile
products. In: British pharmacopoeia 2022.
London: The Stationery Office; 2021.
p. A543-A559.
10. British Pharmacopoeia Commission. Appendix
XVI F: microbiological examination of herbal
medicinal products for oral use and extracts
used in their preparation. In: British pharma-
copoeia 2022. London: The Stationery Office;
2021. p. A564-A567.
11. Department of Medical Sciences, Ministry of
Public Health. 1.16H Dosage forms of herbal
drugs. In: Thai herbal pharmacopoeia. Vol. I.
Bangkok: Office of National Buddhism Press;
2021. p. 1-7.

12. จิตรา ชัยวัฒน์, จิราณูช แจ่มทวีกุล, สันติพงศ์ วงศ์เพ็ญทักษ์, ปรัชญาพร อินทองแก้ว. ความปลอดภัยของยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ. ว ุกรรมวิทย์ พ [วารสารออนไลน์]. 2557; [สืบค้น 6 ธ.ค. 2568]; 56(3): [11 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/dmsc/article/view/243338>.
13. ลีรดา ปงเมืองมูล, ชุตินา จิตตประสาทศีล, ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์, ลัดดา พูลสวัสดิ์. สถานการณ์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาสมุนไพรและยาแผนโบราณของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2564. ว ุกรรมวิทย์ พ [วารสารออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 1 พ.ย. 2568]; 65(2): [22 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/dmsc/article/view/261163>.
14. กมล อุ่นชู. การฉายรังสีในผลิตภัณฑ์สมุนไพร. ใน: เอกสารการประชุมการพัฒนาอุตสาหกรรมสมุนไพร เรื่อง การฉายรังสีในผลิตภัณฑ์สมุนไพร. 7 พฤศจิกายน 2568; สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน). นนทบุรี: กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข; 2568. หน้า 6-17.
15. United States Pharmacopeia. Weight variation of dietary supplements. In: The United States Pharmacopeia–National Formulary (USP43–NF38). Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2023. p. 8718–19.

Surveillance of Microbial Contamination and Weight Variation in Herbal Medicine Products in Trang, Phatthalung and Satun Provinces (2023–2025)

Mittrarun Srimuang, Yada Booncharoen, Orawan Hlonglaleung, and Natthacha Duangrak

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

ABSTRACT Herbal products are essential to Thailand's public health system. Quality control is the primary factor in establishing confidence regarding the safety and efficacy of their use. This study aimed to monitor the microbial contamination and weight variation of herbal products manufactured by hospitals in Trang, Phatthalung and Satun provinces during the fiscal years 2023–2025. A total of 55 samples from 10 herbal lists were collected and analyzed for microbial contamination and weight variation in accordance with the notification of the Herbal Products Committee B.E. 2564 (2021) and its supplement. The results showed that all samples complied with all quality requirements for every test item. These findings reflect the importance of safety surveillance, raw material selection, and production process control following good manufacturing practices (GMP) within hospital facilities. Therefore, continuous quality control from raw materials to finished products is essential for sustainably enhancing the quality and safety of herbal products.

Keywords: Herbal medicine, Herbal products, Microbial contamination, Weight variation, Health region 12

การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจการตั้งครรภ์แบบรวดเร็วเมื่อประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเลือด

สุพรรณษา ตรุษศาสตร์

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวชิรพยาบาล พิจิตร 66140

บทคัดย่อ ชุดตรวจการตั้งครรภ์แบบรวดเร็วที่ใช้กับปัสสาวะอาจให้ผลลบที่ผิดพลาดในระยะแรกของการตั้งครรภ์เนื่องจากระดับฮอร์โมน human chorionic gonadotropin (hCG) ยังไม่สูงพอ การวิจัยเชิงทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพและหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection: LOD) ของชุดตรวจ hCG สำหรับปัสสาวะเมื่อประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเลือด โดยทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง 155 ราย ณ โรงพยาบาลวชิรพยาบาล ประกอบด้วยหญิงตั้งครรภ์ (กลุ่มผลบวก) และเพศชาย (กลุ่มผลลบ) โดยใช้ชุดตรวจ hCG pregnancy (urine) ยี่ห้อ RightSign® ทดสอบกับตัวอย่างเลือด (เลือดครบส่วน ซีรัม และพลาสมา) เปรียบเทียบกับผลจากปัสสาวะ และทำการเจือจางซีรัมเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ ผลการศึกษาพบว่าชุดตรวจดังกล่าวเมื่อใช้กับเลือดให้ผลการทดสอบที่มีประสิทธิภาพสูง โดยมีความไว (sensitivity) 100% (95% CI: 94.0-100%) ความจำเพาะ (specificity) 100% (95% CI: 96.2-100%) และความแม่นยำ (accuracy) 100% (95% CI: 97.6-100%) ที่สำคัญ คือ สามารถตรวจวัดระดับ hCG ในเลือดได้ต่ำสุดถึง 10.9 mIU/mL ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำกว่าเกณฑ์ของชุดตรวจสำหรับปัสสาวะ (25 mIU/mL) อย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่าการประยุกต์ใช้ชุดตรวจการตั้งครรภ์สำหรับปัสสาวะกับตัวอย่างเลือดเป็นวิธีการที่น่าเชื่อถือ มีความไวสูง และช่วยให้สามารถตรวจพบการตั้งครรภ์ได้ในระยะเริ่มต้นเร็วกว่าการตรวจจากปัสสาวะ ทั้งยังเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สนับสนุนการเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพคุ้มค่าและมีประสิทธิภาพสำหรับการคัดกรองการตั้งครรภ์แบบเร่งด่วนในสถานการณ์ทางคลินิก

คำสำคัญ: hCG, การตรวจการตั้งครรภ์, ชุดตรวจแบบเร็ว

Corresponding author E-mail: supansatutsat65@gmail.com

Received: 20 December 2025

Revised: 21 April 2026

Accepted: 22 April 2026

บทนำ

ฮอร์โมนโคริโอนิกโกนาโดโทรปินของมนุษย์ (human chorionic gonadotropin: hCG) เป็นไกลโคโปรตีนฮอร์โมนที่สร้างจากเซลล์ซิงซิโอโทรโฟบลาสต์ (syncytiotrophoblast) ของรกภายหลังการฝังตัวของตัวอ่อน มีบทบาทสำคัญในการคงสภาพของคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) เพื่อให้สามารถผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเอสโตรเจนซึ่งจำเป็นต่อการตั้งครรภ์ในระยะแรก⁽¹⁾ ในช่วงต้นของการตั้งครรภ์ระดับ hCG ในเลือดและปัสสาวะจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ hCG ถูกใช้เป็นสารชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) หลักสำหรับการวินิจฉัยการตั้งครรภ์⁽²⁾ นอกจากการยืนยันการตั้งครรภ์ปกติแล้ว การตรวจวัดระดับและชนิดย่อย (isoforms) ของ hCG มีความสำคัญอย่างยิ่งในทางคลินิกเพื่อช่วยประเมินภาวะผิดปกติต่าง ๆ เช่น การตั้งครรภ์นอกมดลูก ภาวะแท้ง หรือโรคเนื้องอกของรก (gestational trophoblastic diseases)⁽³⁾ โดยเฉพาะในสถานการณ์ฉุกเฉิน ผู้ป่วยหญิงวัยเจริญพันธุ์ที่มาด้วยอาการปวดท้องหรือมีเลือดออกผิดปกติ การประเมินภาวะการตั้งครรภ์อย่างรวดเร็วถือเป็นข้อมูลสำคัญอย่างยิ่งต่อการวางแผนการรักษา⁽⁴⁾

ปัจจุบันการตรวจการตั้งครรภ์ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย คือ การใช้ชุดตรวจแบบรวดเร็ว (rapid pregnancy test) ซึ่งอาศัยหลักการ lateral flow immunoassay กับตัวอย่างปัสสาวะ เนื่องจากใช้งานง่าย และสะดวก อย่างไรก็ตามการตรวจจากปัสสาวะมีข้อจำกัดด้านความไว (sensitivity) โดยเฉพาะในช่วงแรกของการตั้งครรภ์ที่ระดับ hCG ยังคงต่ำ อาจนำไปสู่ผลลบที่ผิดพลาด (false negative) ได้⁽⁵⁾ โดยทั่วไประดับ hCG ในเลือดจะสูงขึ้นและสามารถตรวจพบได้เร็วกว่าในปัสสาวะประมาณ 2–3 วัน ทำให้การตรวจจากเลือดมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือมากกว่า⁽⁶⁾ แม้จะมีชุดตรวจแบบรวดเร็วที่ออกแบบมาสำหรับเลือดโดยเฉพาะ แต่ยังมีราคาสูงและยังไม่แพร่หลายในสถานพยาบาลระดับทุติยภูมิมากนัก

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการประยุกต์ใช้ชุดตรวจที่อาศัยหลักการ lateral flow กับตัวอย่างเลือดมีความเป็นไปได้สูง โดยการศึกษาของ Nerenz RD

และคณะ ได้ประเมินการใช้ชุดตรวจแบบรวดเร็วกับตัวอย่างเลือดครบส่วน (whole blood) และพบว่ามีความสอดคล้องกับผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการถึง 100%⁽⁷⁾ สอดคล้องกับการศึกษาของ Mishalani SH และคณะ ที่พบว่า การตรวจ hCG จากซีรัม (serum) มีความไวและประสิทธิภาพสูงกว่าการตรวจจากปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะในการวินิจฉัยภาวะตั้งครรภ์นอกมดลูก ซึ่งซีรัมสามารถตรวจพบได้ 100% ในขณะที่ปัสสาวะตรวจพบเพียง 60%⁽⁸⁾ จากข้อจำกัดของการตรวจด้วยปัสสาวะและความสำคัญทางคลินิกของการวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้ชุดตรวจการตั้งครรภ์แบบรวดเร็วที่ออกแบบมาสำหรับปัสสาวะกับตัวอย่างเลือด เพื่อเป็นทางเลือกในการเพิ่มความไวในการตรวจ ลดค่าใช้จ่าย และเพิ่มความรวดเร็วในการวินิจฉัยภาวะตั้งครรภ์ในระยะเริ่มต้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดูแลรักษาผู้ป่วยในสถานพยาบาลต่อไป

วัสดุและวิธีการ

รูปแบบการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental study) ในลักษณะของ analytical feasibility study หรือ proof-of-concept study เพื่อประเมินประสิทธิภาพเชิงวิเคราะห์ (analytical performance) ของชุดตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ (diagnostic test evaluation) เมื่อประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเลือด ซึ่งเป็นการใช้งานนอกข้อบ่งใช้ (off-label use) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำ และขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) ของชุดตรวจ hCG Pregnancy (urine) ยี่ห้อ RightSign[®] กับตัวอย่างเลือด

วัสดุและอุปกรณ์

ชุดตรวจการตั้งครรภ์แบบรวดเร็ว (rapid pregnancy test kit)

ชุดตรวจหลักที่ใช้ในการศึกษา คือ ชุดตรวจการตั้งครรภ์แบบรวดเร็วชนิดตลับ (cassette) ยี่ห้อ RightSign[®] hCG pregnancy rapid test (urine)

(Lot No. HCG24120051) ผลิตโดย Hangzhou Biotest Biotech สาธารณรัฐประชาชนจีน ซึ่งทำงานด้วยหลักการ lateral flow immunochromatographic assay และมีค่า cutoff สำหรับการตรวจในปัสสาวะที่ 25 mIU/mL

อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเตรียมตัวอย่างและการเจาะจาง

อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการ ประกอบด้วย ออโตปิเปต (auto pipette) ขนาด 100–1,000 ไมโครลิตร รุ่น Eppendorf Research® plus (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) และหลอดเก็บตัวอย่าง (sample cup) ชนิด sterile polypropylene (PP) sample cup (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria) ที่ปราศจากเชื้อ สำหรับการเจาะจางตัวอย่าง น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile water) และ molecular biology grade water, nuclease-free (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

ประชากรและการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดและปัสสาวะที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ประจำวันซึ่งเก็บรวบรวม ณ ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์โรงพยาบาลวชิรขรรค์ จังหวัดพิจิตร ระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึง กรกฎาคม พ.ศ. 2568 โดยใช้วิธีการเลือกตัวอย่างแบบตามสะดวก (convenience sampling) ตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ขนาดกลุ่มตัวอย่างถูกกำหนดตามแนวทางการศึกษาความแม่นยำของเครื่องมือวินิจฉัยโดยคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 155 ราย ประกอบด้วย

กลุ่มผลบวก (positive group) จำนวน 60 ราย เป็นตัวอย่างจากหญิงตั้งครรภ์ที่เข้ารับบริการฝากครรภ์ สถานะการตั้งครรภ์ในกลุ่มนี้ได้รับการยืนยันด้วยการตรวจวัดปริมาณ serum β -hCG เชิงปริมาณจากห้องปฏิบัติการภายนอกและการวินิจฉัยทางคลินิกโดยแพทย์ รวมถึงประวัติการฝากครรภ์

กลุ่มผลลบ (negative group) จำนวน 95 ราย เป็นตัวอย่างจากเพศชายที่เข้ารับบริการตรวจสุขภาพประจำปี เหตุผลในการเลือกกลุ่มควบคุมเป็นเพศชายทั้งหมดเพื่อให้มั่นใจว่าตัวอย่างกลุ่มควบคุมไม่มีฮอร์โมน hCG ที่เกิดจากการตั้งครรภ์ตามธรรมชาติ และเป็นตัวแทนของกลุ่มที่ไม่มีภาวะตั้งครรภ์อย่างชัดเจน

เกณฑ์การคัดออก ได้แก่ ผู้ที่มีประวัติโรคประจำตัว ภาวะแทรกซ้อนระหว่างตั้งครรภ์ (เช่น ภาวะแท้งคุกคาม) ประวัติการใช้ยาที่อาจส่งผลต่อระดับ hCG และกลุ่มเพศชายที่ให้ผลการตรวจ hCG เป็นบวก

การควบคุมคุณภาพตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

ตัวอย่างเลือดที่เก็บรวบรวมมาทั้งหมดได้รับการตรวจสอบคุณภาพเบื้องต้นก่อนนำไปทดสอบ โดยมีการคัดแยกตัวอย่างที่มีภาวะ hemolysis, lipemia หรือ icterus ออกจากการศึกษาเพื่อลดผลกระทบจากสารรบกวนเหล่านี้อต่อผลการทดสอบ นอกจากนี้ยังมีการบันทึกชนิดของ anticoagulant ที่ใช้สำหรับตัวอย่างเลือดครบส่วนและพลาสมา เพื่อพิจารณาผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อการไหลของตัวอย่างบนแถบทดสอบ

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดและปัสสาวะจากกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 155 ราย ประกอบด้วย กลุ่มหญิงตั้งครรภ์ (ผลบวก) และกลุ่มเพศชาย (ผลลบ) โดยขนาดกลุ่มตัวอย่างถูกกำหนดตามหลักการคำนวณสำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัย เพื่อให้มีความเพียงพอในการประเมินค่าความไวและความจำเพาะของชุดตรวจ⁽⁹⁾ เบื้องต้นได้ทำการหาปริมาณเลือดที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดสอบ พบว่าปริมาณ 30 ไมโครลิตร เพียงพอต่อการให้ผลที่ชัดเจน

จากนั้นจึงนำตัวอย่างซีรัมและปัสสาวะจากทุกรายมาทดสอบด้วยชุดตรวจ RightSign® เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการตรวจ สำหรับการหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection: LOD) ได้นำตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกมารวมและทำการเจาะจางแบบ

อนุกรมสองเท่า (two-fold serial dilution) ก่อนนำไปทดสอบด้วยชุดตรวจแบบรวดเร็ว เพื่อระบุค่าความเข้มข้นต่ำสุดของฮอร์โมน hCG ที่สามารถตรวจพบได้ ตัวอย่างซีรัมที่ผ่านการเจือจางถูกส่งไปตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ ณ ห้องปฏิบัติการภายนอกที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 15189 หรือ ISO 17025 โดยใช้เทคนิค chemiluminescence immunoassay (CLIA) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่มีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ได้ประเมินความสามารถในการให้ผลซ้ำ (repeatability) ตามแนวทางของ CLSI EP17-A2⁽¹⁰⁾ เพื่อยืนยันความน่าเชื่อถือของชุดตรวจ

การประเมินความสามารถในการให้ผลซ้ำ (repeatability assessment)

มีการประเมินความสามารถในการให้ผลซ้ำ (repeatability) ตามแนวทางของ CLSI EP17-A2⁽¹⁰⁾ เพื่อยืนยันความน่าเชื่อถือของชุดตรวจ

การควบคุมคุณภาพ (quality control)

มีการดำเนินการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control: IQC) และเข้าร่วมโครงการประเมินคุณภาพภายนอก (external quality assurance: EQA) อย่างสม่ำเสมอตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ เพื่อให้มั่นใจในความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบที่ได้จากการวิจัย

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ สถิติเชิงพรรณนาใช้ค่าร้อยละเพื่อบรรยายข้อมูลทั่วไป สถิติเชิงอนุมานใช้ chi-square test หรือ Fisher's

exact test เพื่อเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการตรวจระหว่างเลือดและปัสสาวะ ประสิทธิภาพของชุดตรวจประเมินโดยการคำนวณค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (PPV) ค่าทำนายผลลบ (NPV) และความแม่นยำ (accuracy) โดยแสดงผลพร้อมช่วงความเชื่อมั่น 95% (95% CI)

จริยธรรมการวิจัย

การดำเนินการวิจัยทั้งหมดเป็นไปตามหลักจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โดยได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร หมายเลขโครงการ: HEC-04-68-011 เมื่อวันที่ 21 เมษายน พ.ศ. 2568

ผล

ปริมาณและชนิดของเลือดที่เหมาะสมต่อการทดสอบและการแปลผล

จากการทดสอบปริมาณเลือดที่เหมาะสม พบว่าตัวอย่างเลือดชนิดซีรัม/พลาสมา และเลือดครบส่วน (whole blood) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร สามารถเคลื่อนที่บนแถบทดสอบได้อย่างสมบูรณ์และให้ผลการทดสอบที่ชัดเจนภายใน 2-3 นาทีแรก โดยสามารถอ่านผลได้ที่ 2 นาที สำหรับซีรัม/พลาสมา และ 3 นาที สำหรับเลือดครบส่วน สำหรับตัวอย่างเลือดจากปลายนิ้ว (capillary blood) พบว่าต้องใช้ปริมาณถึง 90 ไมโครลิตร และเริ่มอ่านผลได้ในนาทีที่ 5 ดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้นเพื่อความชัดเจนและแม่นยำในการแปลผล แนะนำให้อ่านผลการทดสอบที่นาทีที่ 5 สำหรับตัวอย่างเลือดทุกชนิด

ตารางที่ 1 ผลการอ่านในแต่ละปริมาตรของตัวอย่างเลือด 3 ชนิด

ชนิดตัวอย่างเลือด	ผลการอ่าน		
	1 หยด dropper (~30 µL)	2 หยด dropper (~60 µL)	3 หยด dropper (~90 µL)
serum/ plasma	ตัวอย่างตรวจเคลื่อนที่ได้ไว สามารถอ่านผลได้ที่ 2 นาทีแรก	ตัวอย่างตรวจเคลื่อนที่ได้ไว สามารถอ่านผลได้ที่ 2 นาทีแรก	ตัวอย่างตรวจเคลื่อนที่ได้ไว สามารถอ่านผลได้ที่ 2 นาทีแรก
whole blood	ตัวอย่างตรวจเคลื่อนที่ได้ไว สามารถอ่านผลได้ที่ 3 นาทีแรก	ตัวอย่างตรวจเคลื่อนที่ได้ไว สามารถอ่านผลได้ที่ 3 นาทีแรก	

ตารางที่ 1 ผลการอ่านในแต่ละปริมาตรของตัวอย่างเลือด 3 ชนิด (ต่อ)

ชนิด	ผลการอ่าน		
ตัวอย่างเลือด	1 หยด dropper (~30 μ L)	2 หยด dropper (~60 μ L)	3 หยด dropper (~90 μ L)
เลือดปลายนิ้ว	ตัวอย่างตรวจไม่สามารถไหลบนเมมเบรนได้	ตัวอย่างตรวจเคลื่อนที่ช้า เริ่มอ่านผลได้ในนาที่ที่ 5 หรือถ้าเลือดมีความเข้มข้นมาก จะไม่สามารถเคลื่อนที่บนเมมเบรนได้เลย	ตัวอย่างตรวจเคลื่อนที่ได้ไว สามารถอ่านผลได้ที่ 3 นาทีแรก

การแปลผลการทดสอบชุดตรวจ hCG Pregnancy (urine) เมื่อประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเลือด ดำเนินการโดยพิจารณาการปรากฏของแถบสีบนชุดตรวจ ดังแสดงในภาพที่ 1

การแปลผล

ผลบวก (positive result) ปรากฏแถบสีสองแถบ คือ แถบควบคุม (control line: C) และแถบทดสอบ (test line: T) แสดงว่ามีการตั้งครรภ์

ผลลบ (negative result) ปรากฏแถบสีเพียงหนึ่งแถบ คือ แถบควบคุม (control line: C) เท่านั้น โดยไม่มีแถบทดสอบ (test line: T) ปรากฏ แสดงว่าไม่มีการตั้งครรภ์

ผลไม่ถูกต้อง (invalid result) หากไม่ปรากฏแถบควบคุม (control line: C) หรือปรากฏแถบทดสอบ (test line: T) เพียงอย่างเดียว แสดงว่าการทดสอบไม่ถูกต้องและต้องทำการทดสอบซ้ำด้วยชุดตรวจใหม่ แถบควบคุม (C) ต้องปรากฏเสมอเพื่อยืนยันว่าชุดตรวจทำงานได้อย่างถูกต้องและมีปริมาณตัวอย่างที่เพียงพอ

(A)



(B)



(C)



ภาพที่ 1 แสดงผลการเคลื่อนที่ของตัวอย่างทดสอบในปริมาตรต่างๆ (A) ตัวอย่างเลือดจากปลายนิ้ว (B) ตัวอย่างซีรัม/พลาสมา และ (C) ตัวอย่างเลือดครบส่วน (whole blood) ในปริมาตรต่างๆ
(ที่มา/ผู้บันทึกภาพ: สุพรรณา ตรุษศาสตร์, ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวชิรбарมี)

ประสิทธิภาพของชุดตรวจเมื่อใช้กับตัวอย่างเลือด

เมื่อนำชุดตรวจ hCG สำหรับปัสสาวะมาทดสอบกับตัวอย่างซีรัมจากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 155 ราย ประกอบด้วย กลุ่มผลบวกที่ยืนยันการตั้งครรภ์ 60 ราย และกลุ่มผลลบ 95 ราย พบว่าผลการทดสอบจากเลือด

มีความสอดคล้องกับผลการทดสอบจากปัสสาวะ 100% กล่าวคือกลุ่มผลบวกให้ผลบวกทั้งในเลือดและปัสสาวะครบทั้ง 60 ราย และกลุ่มผลลบให้ผลลบทั้งในเลือดและปัสสาวะครบทั้ง 95 ราย ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Confusion Matrix แสดงผลการทดสอบของชุดตรวจ hCG กับตัวอย่างเลือดเปรียบเทียบกับ reference standard

	reference standard (positive)	reference standard (negative)	Total
rapid test (positive)	60 (true positive, TP)	0 (false positive, FP)	60
rapid test (negative)	0 (false negative, FN)	95 (true negative, TN)	95
Total	60	95	155

เมื่อนำผลการทดสอบมาคำนวณประสิทธิภาพของชุดตรวจในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา พบว่าการใช้ชุดตรวจนี้กับตัวอย่างเลือดให้ค่าความไว (sensitivity) 100% (95% CI: 94.0–100.0%) ค่าความจำเพาะ (specificity) 100% (95% CI: 96.2–100.0%) ค่าทำนายผลบวก

(PPV) 100% (95% CI: 94.04–100.0%) ค่าทำนายผลลบ (NPV) 100% (95% CI: 96.2–100.0%) และค่าความแม่นยำ (accuracy) 100% (95% CI: 97.6–100.0%) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือที่สูงมาก ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าทางสถิติของประสิทธิภาพชุดตรวจเมื่อใช้กับตัวอย่างเลือด

Parameter	Estimate (%)	95% CI
sensitivity	100	94.00–100.00
specificity	100	96.20–100.00
positive predictive value (PPV)	100	94.04–100.00
negative predictive value (NPV)	100	96.20–100.00
accuracy	100	97.60–100.00

ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection: LOD) และความสามารถในการให้ผลซ้ำ

จากการนำซีรัมรวม (pooled serum) ของหญิงตั้งครรภ์มาเจือจางแบบอนุกรมสองเท่า พบว่าระดับความเจือจางสุดท้ายที่ยังคงให้ผลบวกที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใน 30 นาที คือ อัตราส่วน 1:1024 ดังแสดงในภาพที่ 2 เมื่อนำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางนี้

ไปตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ พบว่ามีระดับความเข้มข้นของ β -hCG เท่ากับ 10.9 mIU/mL ดังนั้นจึงถือว่าค่า 10.9 mIU/mL เป็นขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) สำหรับการประยุกต์ใช้ชุดตรวจนี้กับตัวอย่างเลือด ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานของชุดตรวจสำหรับปัสสาวะ (25 mIU/mL) อย่างมีนัยสำคัญ รายละเอียดปริมาณฮอร์โมนในแต่ละระดับความเจือจาง ดังแสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 2 แสดงผลการตรวจจากตัวอย่างที่ถูกเจือจางตามอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งเห็นผลบวกสุดท้ายที่อัตราส่วน 1:1024 (ที่มา/ผู้บันทึกภาพ: สุพรรณา ตระกูลศาสตร์, ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวชิรพยาบาล)

ตารางที่ 4 ปริมาณฮอร์โมน β -hCG (mIU/mL) ในตัวอย่างต่างๆ

ตัวอย่างตรวจ	ปริมาณฮอร์โมน β -hCG (mIU/mL) Reference range < 5.0
Pool serum/plasma ของผู้รับบริการเพศชายที่ให้ผลลบ	< 1.2
Pool serum/plasma ของผู้รับบริการเพศชายที่ให้ผลบวก 5 ราย	1.3
Pool serum/plasma ของผู้เข้ารับบริการไตรมาสที่ 1	85,105.9
Pool serum/plasma ของผู้เข้ารับบริการไตรมาสที่ 2	37,038.0
Pool serum/plasma ของผู้เข้ารับบริการไตรมาสที่ 3	19,533.4
Pool serum/plasma ของไตรมาสที่ 1, 2 และ 3	222,349.4
ตัวอย่างตรวจของ dilution ที่ 1:1024	10.9
ตัวอย่างตรวจของ dilution ที่ 1:2048	4.2

ผลการทดสอบความสามารถในการให้ผลซ้ำ (repeatability) ณ ระดับความเข้มข้นใกล้เคียง LOD จำนวน 20 ครั้ง และการทดสอบตัวอย่างผลบวกและ

ผลลบอย่างละ 10 ครั้ง ให้ผลที่สอดคล้องตรงกัน 100% ดังแสดงในภาพที่ 3 ซึ่งเป็นการยืนยันความน่าเชื่อถือ และความแม่นยำของชุดตรวจในการให้ผลที่สม่ำเสมอ



ภาพที่ 3 แสดงผลการทดสอบซ้ำ 10 ครั้งของตัวอย่างที่ให้ผลบวก ซึ่งให้ผลตรงกันทั้งหมด (ที่มา/ผู้บันทึกภาพ: สุพรรณา ตรุษศาสตร์, ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวชิรбарมี)

วิจารณ์

ผลการวิจัยครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ชุดตรวจการตั้งครรภ์แบบรวดเร็วที่ออกแบบมาเพื่อใช้กับตัวอย่างปัสสาวะ สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือ โดยให้ค่าความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำสูงถึง 100% ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Nerenz RD และคณะ ที่พบว่าชุดตรวจ hCG แบบรวดเร็วเมื่อใช้กับเลือดครบส่วนให้ผลสอดคล้องกับการตรวจในห้องปฏิบัติการถึง 100% เช่นกัน⁽⁷⁾ การค้นพบนี้เป็นการยืนยันศักยภาพของหลักการ lateral flow immunoassay ที่สามารถทำงานได้ดีกับชีววัตถุหลายชนิด ไม่เพียงเฉพาะปัสสาวะเท่านั้น ประเด็นสำคัญที่สุดที่ค้นพบในการวิจัยนี้ คือ ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) เมื่อใช้ชุดตรวจนี้กับตัวอย่างเลือดอยู่ที่ 10.9 mIU/mL ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐานของชุดตรวจสำหรับปัสสาวะ (25 mIU/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางคลินิก การที่ชุดตรวจมีความไวสูงขึ้นนี้ หมายความว่าสามารถตรวจพบการตั้งครรภ์ได้ในระยะที่เร็วกว่าการใช้ปัสสาวะ ซึ่งสอดคล้องกับหลักการทางสรีรวิทยาที่ระดับ human chorionic gonadotropin (hCG) ในเลือดจะเพิ่มขึ้นและสามารถตรวจพบได้เร็วกว่าปัสสาวะ

ตามรายงานของ Cole LA และคณะ⁽⁵⁾ รวมถึง Braunstein GD และคณะ⁽⁶⁾ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Stenman UH และคณะ ที่รายงานว่า การตรวจ hCG จากซีรัมมีประสิทธิภาพสูงกว่าการตรวจจากปัสสาวะ โดยเฉพาะในระยะเริ่มต้นของการตั้งครรภ์หรือในภาวะตั้งครรภ์นอกมดลูก ซึ่งสอดคล้องกับข้อสังเกตทางคลินิกของ Murray H และคณะ^(8,4)

ในเชิงปฏิบัติผลการวิจัยนี้มีนัยสำคัญอย่างยิ่งต่อสถานพยาบาล โดยเฉพาะในห้องฉุกเฉินหรือคลินิกที่มีทรัพยากรจำกัด การประยุกต์ใช้ชุดตรวจปัสสาวะที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายมาตรวจกับตัวอย่างเลือด ถือเป็นทางเลือกที่คุ้มค่าและมีประสิทธิภาพ สามารถให้ผลการวินิจฉัยเบื้องต้นได้อย่างรวดเร็วในผู้ป่วยหญิงวัยเจริญพันธุ์ที่มีอาการทางคลินิก ซึ่งจำเป็นต้องแยกภาวะการตั้งครรภ์ออกไปก่อน เช่น อาการปวดท้องเฉียบพลัน ซึ่งจะช่วยให้แพทย์สามารถวางแผนการรักษาหรือการส่งตรวจเพิ่มเติมได้อย่างทันท่วงที โดยไม่จำเป็นต้องรอผลการตรวจปัสสาวะซึ่งอาจให้ผลลบที่ผิดพลาดได้ในระยะแรก หรือรอผลการตรวจเลือดจากห้องปฏิบัติการกลางซึ่งใช้เวลานานกว่า สอดคล้องกับแนวคิดของ point-of-care testing ในเวชปฏิบัติฉุกเฉิน⁽⁴⁾

อย่างไรก็ตามการวิจัยครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการที่ควรพิจารณา เช่น กลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลลบเป็นเพศชายทั้งหมด แม้จะมั่นใจได้ว่าไม่มีฮอร์โมน hCG จากการตั้งครรภ์ แต่ไม่ได้จำลองสภาวะของหญิงไม่ตั้งครรภ์อาจมีสารรบกวนอื่นๆ ในร่างกาย รวมถึงปัจจัยที่อาจส่งผลต่อความถูกต้องของการตรวจ lateral flow immunoassay (LFIA) เมื่อใช้กับตัวอย่างเลือด ได้แก่ สารรบกวนในเลือด เช่น ฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริต ซึ่งมีรายงานว่าสามารถรบกวนการไหลของตัวอย่างและความแรงของสัญญาณบนแถบทดสอบได้ ตามรายงานของ Luppia BP และคณะ⁽¹¹⁾ รวมถึง Wong RC และ Tse M⁽¹²⁾ นอกจากนี้ในกรณีที่มีความเข้มข้นของ hCG สูงมาก อาจเกิดปรากฏการณ์ high-dose hook effect ซึ่งเป็นภาวะที่ความเข้มข้นของ analyte สูงเกินไปจนรบกวนการสร้าง immune complex และอาจนำไปสู่ผลลบปลอมได้ตามที่ Tate J และ Ward G⁽¹³⁾ อธิบายไว้ โดยสรุปการศึกษานี้ได้นำเสนอองค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญว่าการประยุกต์ใช้ชุดตรวจ hCG สำหรับปัสสาวะกับตัวอย่างเลือดเป็นวิธีการที่มีความไวสูงกว่า แม่นยำ และน่าเชื่อถือสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางคลินิกเพื่อการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ในระยะเริ่มต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นการเพิ่มคุณค่าและขยายขอบเขตการใช้งานของเครื่องมือที่มีอยู่แล้วให้เกิดประโยชน์สูงสุด อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้ดำเนินการในสถานพยาบาลแห่งเดียวจึงควรศึกษาเพิ่มเติมในประชากรกลุ่มใหญ่และหลากหลายขึ้นจะช่วยยืนยันผลการวิจัยให้มีความน่าเชื่อถือในวงกว้างมากยิ่งขึ้น

สรุป

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองเพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจการตั้งครรภ์แบบรวดเร็วชนิดตรวจปัสสาวะเมื่อประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเลือด โดยทดสอบในกลุ่มตัวอย่าง 155 ราย เปรียบเทียบผลกับการตรวจมาตรฐาน และศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดด้วยการเจือจางซีรัมแบบอนุกรม ผลการศึกษพบว่าชุดตรวจเมื่อใช้กับตัวอย่างเลือดมีความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำ ร้อยละ 100 และสามารถตรวจพบระดับ hCG ได้ต่ำสุด 10.9 mIU/mL ซึ่งต่ำกว่า

ค่ากำหนดของชุดตรวจสำหรับปัสสาวะ จึงแสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้เพื่อช่วยคัดกรองการตั้งครรภ์ระยะแรกและสนับสนุนการตัดสินใจทางคลินิกอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในสถานพยาบาลที่มีทรัพยากรจำกัด อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ดำเนินการในสถานพยาบาลแห่งเดียวและมีกลุ่มตัวอย่างผลลบเป็นเพศชายทั้งหมด จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประชากรที่หลากหลายมากขึ้น เพื่อยืนยันความเหมาะสมของการนำไปใช้ในวงกว้าง

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ในการจัดเตรียมต้นฉบับบทความนี้ ผู้นิพนธ์ได้ใช้ ChatGPT (OpenAI, USA) เป็นเครื่องมือปัญญาประดิษฐ์เชิงสร้างสรรค์ (Generative AI) เพื่อช่วยในการปรับแก้ภาษาให้มีความสอดคล้องกับรูปแบบทางวิชาการ การจัดโครงสร้างบทความตามข้อกำหนดของวารสาร และการตรวจสอบความสอดคล้องของรูปแบบการอ้างอิงเท่านั้น ทั้งนี้ปัญญาประดิษฐ์ดังกล่าวมิได้มีส่วนร่วมในการเขียนเนื้อหาทางวิทยาศาสตร์ การวิเคราะห์และตีความผลการวิจัย หรือการสร้างรายการเอกสารอ้างอิงขึ้นใหม่แต่อย่างใด ผู้นิพนธ์ได้ทบทวนและตรวจสอบความถูกต้องของเนื้อหาทั้งหมดที่ผ่านการช่วยเหลือจากปัญญาประดิษฐ์ และรับผิดชอบต่อความถูกต้องและความคิดริเริ่มของบทความฉบับนี้แต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทนพ.อนุกุล บุญคง นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำแก้ไขและให้ข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในทุกขั้นตอน ขอขอบคุณ พญ.ผกามาศ เพชรพงศ์ ผู้อำนวยการโรงพยาบาลวชิรбарมี และ ทนพ.พัชรินทร์ นพณัฐธนากุล หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ ที่ได้อนุญาตให้ดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านในความช่วยเหลือและผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่านที่ได้สละเวลาและให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี จนทำให้การวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

1. Cole LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8(1): 102. (14 pages).
2. Stenman UH, Tiitinen A, Alfthan H, Valmu L. The classification, functions and clinical use of different isoforms of hCG. *Hum Reprod Update* 2006; 12(6): 769-84.
3. Cole LA. hCG, five independent molecules. *Clin Chim Acta* 2012; 413(1-2): 48-65.
4. Murray H, Baakdah H, Bardell T, Tulandi T. Diagnosis and treatment of ectopic pregnancy. *CMAJ* 2005; 173(8): 905-12.
5. Cole LA, Khanlian SA, Sutton JM, Davies S, Rayburn WF. Accuracy of home pregnancy tests at the time of missed menses. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190(1): 100-5.
6. Braunstein GD, Rasor J, Danzer H, Adler D, Wade ME. Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126(6): 678-81.
7. Nerenz RD, Bell JR, Montes de Oca N, Short J, Mims T, Cleeton PA, et al. Analytical and clinical evaluation of the NOWDiagnostics ADEXUSDx human chorionic gonadotropin test using whole blood. *J Appl Lab Med* 2016; 1(1): 67-76.
8. Mishalani SH, Seliktar J, Braunstein GD. Four rapid serum-urine combination assays of choriogonadotropin (hCG) compared and assessed for their utility in quantitative determinations of hCG. *Clin Chem* 1994; 40(10): 1944-9.
9. Hajian-Tilaki K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. *J Biomed Inform* 2014; 48: 193-204.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. EP17-A2: evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures. 2nd ed. Wayne, PA: CLSI; 2012.
11. Lippa PB, Müller C, Schlichtiger A, Schlebusch H. Point-of-care testing (POCT): current techniques and future perspectives. *TrAC Trends Anal Chem* 2011; 30(6): 887-98.
12. Wong RC, Tse M. Lateral flow immunoassay. New York: Humana Press; 2009.
13. Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev* 2004; 25(2): 105-20.

Evaluation of the Analytical Performance of a Rapid hCG Pregnancy Test Applied to Blood Specimens

Supansa Tutsat

Medical Technology Laboratory, Wachirabaramee Hospital, Phichit 66140, Thailand

ABSTRACT Rapid urine-based pregnancy tests may yield false-negative results in very early pregnancy due to insufficient levels of human chorionic gonadotropin (hCG). This experimental study aimed to evaluate the diagnostic performance and determine the limit of detection (LOD) of a urine hCG pregnancy test when applied to blood specimens. A total of 155 participants were enrolled at Wachirabarami Hospital, including pregnant women (positive group) and male participants (negative group). The RightSign® hCG Pregnancy (urine) test was used to analyze blood samples (whole blood, serum, and plasma), and the results were compared with urine test outcomes. Serial dilution of serum samples was performed to identify the lowest detectable hCG concentration. The results demonstrated excellent diagnostic performance when the urine pregnancy test was applied to blood samples, with a sensitivity of 100% (95% CI: 94.0–100%), specificity of 100% (95% CI: 96.2–100%), and overall accuracy of 100% (95% CI: 97.6–100%). Notably, the test was able to detect hCG levels in blood as low as 10.9 mIU/mL, which is lower than the standard detection threshold of urine-based pregnancy tests (25 mIU/mL). In conclusion, applying urine pregnancy test kits to blood samples is a reliable and highly sensitive approach that allows earlier detection of pregnancy than urine testing and provides novel evidence supporting a cost-effective and efficient alternative for rapid pregnancy screening in clinical settings.

Keywords: hCG, Pregnancy testing, Rapid test kit

การพัฒนาและประเมินผลระบบการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยใช้หลัก Rational Laboratory Use และการมีส่วนร่วมของบุคลากรโรงพยาบาลหนองมะโมง

สุพัตรา สุวรรณศิริ และ วิทยา จันทโรจน์

โรงพยาบาลหนองมะโมง ชัยนาท 17120

บทคัดย่อ การส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ไม่เหมาะสม ทั้งในรูปแบบการใช้เกินความจำเป็นหรือการใช้น้อยเกินไป เมื่อเปรียบเทียบกับข้อบ่งชี้ทางคลินิก เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพการดูแลผู้ป่วย ค่าใช้จ่ายด้านสาธารณสุข และภาระงานของบุคลากรทางการแพทย์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและประเมินผลระบบการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างสมเหตุสมผล โดยประยุกต์หลัก rational laboratory use (RLU) ร่วมกับการมีส่วนร่วมของบุคลากรและการใช้เทคโนโลยีดิจิทัล โดยมีคำถามวิจัยว่าระบบดังกล่าวสามารถลดการส่งตรวจที่ไม่เหมาะสม และสนับสนุนความต่อเนื่องในการดูแลผู้ป่วยได้หรือไม่ การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงปฏิบัติการแบบมีส่วนร่วมตามวงจร PAOR ได้แก่ การวางแผน (plan) การดำเนินการ (action) การสังเกตและเก็บข้อมูล (observation) และการสะท้อนผลเพื่อปรับปรุง (reflection) จำนวน 2 วงจร โดยเปรียบเทียบข้อมูลก่อนและหลังการดำเนินระบบ RLU ช่วงละ 12 เดือน ร่วมกับการประเมินคุณภาพการดูแลผู้ป่วยเบาหวาน และการยอมรับการใช้งานระบบของบุคลากร ผลการศึกษาพบว่า การส่งตรวจ blood urea nitrogen (BUN), activated partial thromboplastin time (APTT) และ free triiodothyronine (FT3) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะเดียวกันพบว่าการตรวจ hemoglobin A1c (HbA1c) อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง และการติดตามผู้ป่วยที่มีค่า HbA1c $\geq 7.0\%$ มีความครอบคลุมและต่อเนื่องมากขึ้นภายหลังการดำเนินระบบ นอกจากนี้บุคลากรผู้ใช้งานมีระดับการยอมรับระบบอยู่ในระดับดี ถึง ดีมาก โดยเฉพาะด้านความสอดคล้องกับกระบวนการทำงานและความยั่งยืนของระบบ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าระบบสามารถช่วยปรับปรุงความเหมาะสมของการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการและสนับสนุนการติดตามผู้ป่วยในบริบทโรงพยาบาลชุมชนได้

คำสำคัญ: การตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างสมเหตุสมผล, ระบบสนับสนุนการตัดสินใจทางคลินิก, เทคโนโลยีดิจิทัล, การมีส่วนร่วมของบุคลากร

Corresponding author E-mail: supattrabow@gmail.com

Received: 21 January 2026

Revised: 28 April 2026

Accepted: 30 April 2026

บทนำ

ในระบบบริการสุขภาพทุกระดับ การใช้ทรัพยากรด้านการตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างเหมาะสมถือเป็นองค์ประกอบสำคัญในการสนับสนุนการดูแลรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยโรค การประเมินความรุนแรงของโรค การเฝ้าระวังภาวะสุขภาพ และการติดตามประสิทธิผลการรักษา ข้อมูลจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการถือเป็นองค์ประกอบสำคัญของการตัดสินใจทางคลินิก เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อแนวทางการรักษาและการพยากรณ์โรค อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติกลับพบปัญหาที่สำคัญ คือ การใช้บริการตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างไม่เหมาะสม ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งด้านการส่งตรวจเกินความจำเป็น (overutilization) และการส่งตรวจน้อยเกินไปเมื่อเปรียบเทียบกับข้อบ่งชี้ (underutilization) ปัญหาเหล่านี้ไม่เพียงแต่สร้างภาระด้านต้นทุนและงบประมาณ แต่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพการดูแลผู้ป่วย เช่น การส่งตรวจเกินจำเป็นอาจนำไปสู่การวินิจฉัยที่ซ้ำซ้อน การตรวจเพิ่มเติมที่ไม่จำเป็น และการค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น โดยไม่ได้ก่อให้เกิดประโยชน์เชิงคลินิก ขณะที่การไม่ส่งตรวจตามข้อบ่งชี้กลับเพิ่มความเสี่ยงที่โรคจะไม่ได้รับการวินิจฉัยหรือเฝ้าระวังอย่างทันทั่วถึง ทำให้การรักษาล่าช้าและอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพผู้ป่วยโดยตรง จากหลักฐานเชิงประจักษ์ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา สะท้อนให้เห็นว่ากว่า 20% ของการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งหมดเป็นการตรวจที่เกินความจำเป็น และพบอัตราการส่งตรวจน้อยเกินไปสูงถึง 45% โดยเฉพาะในการดูแลผู้ป่วยโรคเรื้อรัง เช่น เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และโรคหัวใจ ซึ่งต้องการการติดตามผลตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างสม่ำเสมอ เพื่อควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ การขาดการตรวจที่เหมาะสมทำให้การดูแลผู้ป่วยมีความเสี่ยงที่จะไม่บรรลุผลตามเป้าหมายที่วางไว้⁽¹⁻⁵⁾ โดยองค์การอนามัยโลก (world health organization: WHO) ระบุว่าเกือบทุกประเทศเผชิญปัญหาการส่งตรวจเกินความจำเป็นและไม่ส่งตรวจในรายการที่จำเป็นตามข้อบ่งชี้⁽⁶⁾ โดยมีรายงานการพบการส่งตรวจบางรายการเกินความจำเป็น เช่น blood urea nitrogen

(BUN), activated partial thromboplastin time (APTT) และ free triiodothyronine (FT3) ในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีข้อบ่งชี้ที่ชัดเจน⁽⁷⁻⁹⁾ ขณะเดียวกันพบว่า 40%–60% ของผู้ป่วยเบาหวานไม่ได้รับการตรวจฮีโมโกลบินเอวันซี (hemoglobin A1c: HbA1c) ตามข้อบ่งชี้^(10,11) นอกจากนี้การส่งตรวจที่ไม่เหมาะสมเป็นการเพิ่มภาระงานของบุคลากรทั้งด้านการทบทวนผลการติดตามผล และงานเอกสาร ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพของระบบบริการโดยรวม⁽¹²⁻¹⁴⁾

เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว แนวคิด rational laboratory use (RLU) จึงถูกพัฒนาและนำมาใช้ในหลายประเทศ โดยมุ่งให้เกิดการตรวจที่เหมาะสม และตรงตามข้อบ่งชี้ทางคลินิก เพื่อเพิ่มความคุ้มค่าและคุณภาพบริการ โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการนำแนวคิด RLU ไปใช้สามารถลดค่าใช้จ่ายและลดการตรวจที่ไม่จำเป็นได้อย่างมีนัยสำคัญ เช่น การปรับแบบฟอร์มสั่งตรวจและลดการตรวจซ้ำซ้อนสามารถลดค่าใช้จ่ายของห้องปฏิบัติการได้⁽¹⁵⁾ รวมถึงการใช้มาตรการแบบผสมผสาน เช่น การให้ความรู้การควบคุมการสั่งตรวจและการปรับชุดคำสั่งตรวจ ซึ่งเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืน^(16,17) นอกจากนี้เทคโนโลยีดิจิทัล เช่น ระบบแจ้งเตือนอัตโนมัติและระบบติดตามข้อมูลแบบ real-time มีบทบาทสำคัญในการสนับสนุนการตัดสินใจและลดความผิดพลาดในการสั่งตรวจและลดต้นทุนรวมลงอย่างมีนัยสำคัญ⁽¹⁸⁻²⁰⁾ รวมทั้งกระบวนการมีส่วนร่วมของบุคลากรโดยให้บุคลากรมีส่วนร่วมทั้งในขั้นตอนกำหนดปัญหา การออกแบบการนำไปปฏิบัติ และการประเมินผล ยังช่วยเพิ่มการยอมรับและสร้างความยั่งยืนของระบบในหน่วยบริการ ดังนั้นการบูรณาการเทคโนโลยีเข้ากับการทำงานประจำวันของบุคลากรจึงเป็นอีกแนวทางที่ช่วยแก้ปัญหการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ไม่เหมาะสมได้ในการเพิ่มการยอมรับและสร้างความยั่งยืนของระบบ⁽²¹⁻²³⁾ อย่างไรก็ตามงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นมาตรการเฉพาะด้าน เช่น การควบคุมการสั่งตรวจหรือการใช้เทคโนโลยี ในขณะที่การบูรณาการแนวคิด RLU ร่วมกับเทคโนโลยีดิจิทัลและการมีส่วนร่วมของบุคลากรในบริบทโรงพยาบาลชุมชนยังมีการศึกษาที่ครอบคลุมในประเด็นดังกล่าวค่อนข้างจำกัด

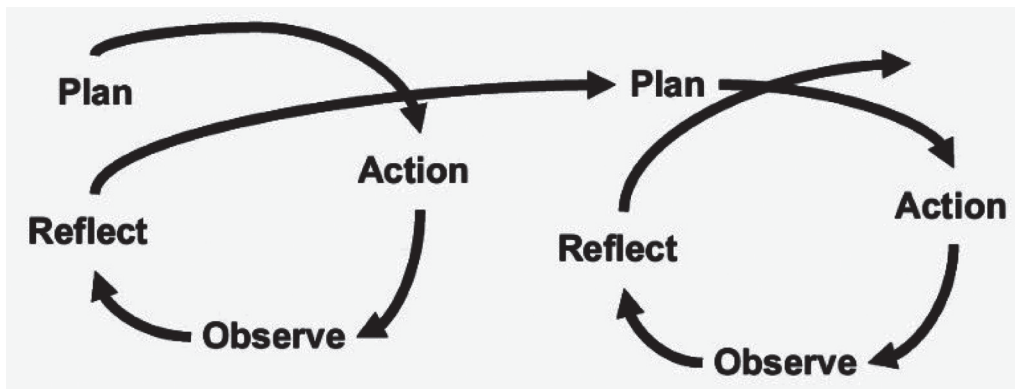
ดังนั้นจึงเป็นประเด็นสำคัญที่ควรได้รับการศึกษาอย่างเป็นระบบว่า การพัฒนาระบบการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการที่พัฒนาขึ้นโดยประยุกต์หลัก RLU ร่วมกับการมีส่วนร่วมของบุคลากรและการใช้เทคโนโลยีดิจิทัล จะสามารถช่วยลดการส่งตรวจที่ไม่เหมาะสมและเพิ่มความเหมาะสมของการส่งตรวจในบริบทของโรงพยาบาลชุมชนได้หรือไม่ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและประเมินผลระบบการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการตามแนวคิดดังกล่าว เพื่อส่งเสริมความเหมาะสมของการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลหนองมะโมง

วัสดุและวิธีการ

รูปแบบการศึกษา

งานวิจัยนี้ ประกอบด้วย การวางแผน (plan) การดำเนินการ (action) การสังเกตและเก็บข้อมูล

(observation) และการสะท้อนผลเพื่อปรับปรุง (reflection) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของการวิจัยเชิงปฏิบัติการแบบมีส่วนร่วม (participatory action research: PAR) ตามแนวคิดวงจร plan-action-observe-reflect (PAOR)^(24,25) โดยเป็นกระบวนการพัฒนาเชิงวนซ้ำที่ขับเคลื่อนด้วยการวางแผนร่วม การลงมือทำ และการสะท้อนผลอย่างต่อเนื่องและสอดคล้องกับกรอบแนวคิด PAR ของ Cornish F และคณะ⁽²⁶⁾ ที่เน้นการเรียนรู้ร่วมกันของผู้มีส่วนเกี่ยวข้องในทุกขั้นตอนของการวิจัย ทั้งนี้การพัฒนาและประเมินผลระบบ RLU ถูกออกแบบให้เป็นกระบวนการวนรอบจำนวน 2 วนรอบ (cycle) ดังแสดงในภาพที่ 1 เพื่อให้สามารถทดสอบ ปรับปรุง และประเมินประสิทธิผลของระบบและนวัตกรรมได้ในสถานการณ์จริงของโรงพยาบาลหนองมะโมง ซึ่งเป็นโรงพยาบาลชุมชน ขนาด 10 เตียง ที่มีความสามารถในการให้บริการ 30 เตียง



ภาพที่ 1 วนรอบการวิจัยเชิงปฏิบัติการ (PAOR) ตามแนวคิดของ Kemmis และ Mc Taggart 1988

(ที่มา: การวิจัยปฏิบัติการ action research รศ.ดร.ชูศักดิ์ เอกเพชร คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี)⁽²⁷⁾

กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้ข้อมูลทุติยภูมิจากโรงพยาบาลหนองมะโมง จังหวัดชัยนาท โดยรวบรวมข้อมูลการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ BUN, APTT และ FT3 ในช่วงระยะเวลา 12 เดือนก่อนการดำเนินระบบ RLU (1 เมษายน พ.ศ. 2566 ถึง 31 มีนาคม พ.ศ. 2567) และช่วง 12 เดือนหลังการดำเนินระบบ RLU (1 เมษายน พ.ศ. 2567 ถึง 31 มีนาคม พ.ศ. 2568) เพื่อเปรียบเทียบ

การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการภายหลังการนำระบบไปใช้ นอกจากนี้ได้วิเคราะห์ข้อมูลตัวชี้วัดคุณภาพการดูแลผู้ป่วยเบาหวาน ได้แก่ ร้อยละของผู้ป่วยเบาหวาน ที่ได้รับการตรวจ HbA1c อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง ร้อยละของการตรวจ HbA1c ซ้ำ ภายในระยะเวลา 90 วัน และร้อยละของการตรวจติดตามในผู้ป่วยเบาหวานที่มีค่า HbA1c $\geq 7.0\%$ โดยเปรียบเทียบระหว่างปีงบประมาณ

พ.ศ. 2567 (1 ตุลาคม พ.ศ. 2566 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2567) ซึ่งยังไม่มี การดำเนินระบบ RLU อย่างครอบคลุมกับปีงบประมาณ พ.ศ. 2568 (1 ตุลาคม พ.ศ. 2567 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2568) ซึ่งมีการนำระบบ RLU มาใช้ตลอดทั้งปี เพื่อสะท้อนผลลัพธ์ด้านคุณภาพ บริการและการปฏิบัติตามแนวทางคลินิกอย่างเป็นระบบ นอกจากนี้มีการเก็บรวบรวมข้อมูลเชิงคุณภาพจาก การประเมินความพึงพอใจและความคิดเห็นของบุคลากร ที่มีส่วนร่วมในกระบวนการพัฒนาระบบ ประกอบด้วย แพทย์ พยาบาล นักเทคนิคการแพทย์ และนักวิชาการ คอมพิวเตอร์รวมทั้งสิ้น 26 ราย เพื่อใช้ประกอบการ อธิบายผลลัพธ์และประเมินการยอมรับของผู้ใช้งาน ต่อระบบ RLU

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย ฐานข้อมูล การส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล หนองมะโมง HOSxP Version 4 (bangkok medical software, ประเทศไทย), โปรแกรม IBM SPSS statistics for windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA), health data center ของกระทรวงสาธารณสุข (กระทรวงสาธารณสุข, ประเทศไทย), โปรแกรม HbA1c alert (พัฒนาโดยทีมผู้วิจัย, ประเทศไทย), โปรแกรม HbA1c monitoring (พัฒนาโดยทีมผู้วิจัย, ประเทศไทย), โปรแกรม KPI monitoring (พัฒนา โดยทีมผู้วิจัย, ประเทศไทย) และแบบสอบถามความ คิดเห็นและความพึงพอใจของบุคลากรที่เกี่ยวข้องกับ การพัฒนาระบบ

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเชิงปริมาณจากการส่งตรวจ BUN, APTT และ FT3 รวมถึงตัวชี้วัดคุณภาพการดูแลผู้ป่วยเบาหวาน ถูกวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา (ความถี่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) และคำนวณอัตรา การส่งตรวจต่อ 100 OPD visit เพื่อควบคุมผลกระทบ จากความแปรปรวนของจำนวนผู้รับบริการระหว่างเดือน การเปรียบเทียบจำนวนการส่งตรวจรายเดือนระหว่าง

ช่วงก่อน-หลังพัฒนาระบบ RLU ใช้สถิติ t-test เมื่อ ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ หรือ Mann-Whitney U test เมื่อไม่เป็นปกติ ส่วนตัวแปรเชิงสัดส่วนของตัวชี้วัด HbA1c ได้แก่ ร้อยละการตรวจ HbA1c อย่างน้อย ปีละครั้ง ร้อยละการตรวจซ้ำก่อน 90 วัน และร้อยละ การตรวจติดตามเมื่อค่า HbA1c $\geq 7.0\%$ วิเคราะห์ด้วย Pearson's chi-square test เพื่อทดสอบความแตกต่าง ระหว่างช่วงเวลา ข้อมูลจากโปรแกรม HbA1c alert และ HbA1c monitoring ทำการวิเคราะห์จำนวน การแจ้งเตือนและอัตราการตอบสนองต่อการแจ้งเตือน รายเดือนเพื่อประเมินประสิทธิผลของระบบดิจิทัล ส่วนข้อมูลเชิงคุณภาพจากแบบสอบถามบุคลากร จำนวน 26 ราย วิเคราะห์ด้วยการวิเคราะห์เนื้อหา เพื่อสรุปความคิดเห็นและข้อเสนอแนะต่อระบบ RLU การวิเคราะห์ทั้งหมดดำเนินการด้วยโปรแกรมสถิติ ที่เหมาะสมและกำหนดระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ขั้นตอนการดำเนินงาน

วงรอบที่ 1 การพัฒนาระบบต้นแบบ (prototype development)

การวิเคราะห์ปัญหาและกำหนดแนวทางเบื้องต้น (plan)

ผู้อำนวยการโรงพยาบาลและทีมสหวิชาชีพ ได้แก่ แพทย์ พยาบาล นักเทคนิคการแพทย์ นักวิชาการคอมพิวเตอร์ และเจ้าหน้าที่ด้านประกันสุขภาพ ร่วมกันทบทวนข้อมูลการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ย้อนหลัง เพื่อประเมินรูปแบบการใช้การตรวจและระบุ รายการที่ไม่สอดคล้องกับข้อบ่งชี้ทางคลินิก ทั้งในมิติของ การส่งตรวจเกินความจำเป็นและการส่งตรวจที่น้อยเกินไป จากการวิเคราะห์ ทีมได้คัดเลือกรายการ BUN, APTT และ FT3 เป็นรายการเป้าหมายนำร่อง เนื่องจากมีแนวโน้ม การส่งตรวจเกินข้อบ่งชี้สูงและสามารถปรับลดได้โดย ไม่กระทบต่อความปลอดภัยของผู้ป่วย ขณะเดียวกัน ได้กำหนดการส่งตรวจ HbA1c เป็นตัวชี้วัดสำคัญเพื่อ ส่งเสริมการติดตามผู้ป่วยเบาหวานอย่างเหมาะสมและ ครอบคลุม ทีมแพทย์ได้จัดทำแนวทางการส่งตรวจ ตามข้อบ่งชี้ทางคลินิก โดยอาศัยการประชุมร่วมกับทีม

สหวิชาชีพ เพื่อทบทวนแนวทางเวชปฏิบัติและข้อมูลการใช้การตรวจย้อนหลัง จากนั้นร่วมกันกำหนดเป็นแนวทางในการสั่งตรวจที่เหมาะสมกับบริบทของโรงพยาบาล โดยใช้การเห็นชอบในที่ประชุมเป็นกลไก

ในการตัดสินใจ ทั้งนี้แนวทางดังกล่าวยังคงเปิดโอกาสให้แพทย์ใช้ดุลยพินิจทางคลินิกและถูกนำไปใช้เป็นเกณฑ์อ้างอิงในการพัฒนาเครื่องมือดิจิทัลและตัวชี้วัดในการศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 1

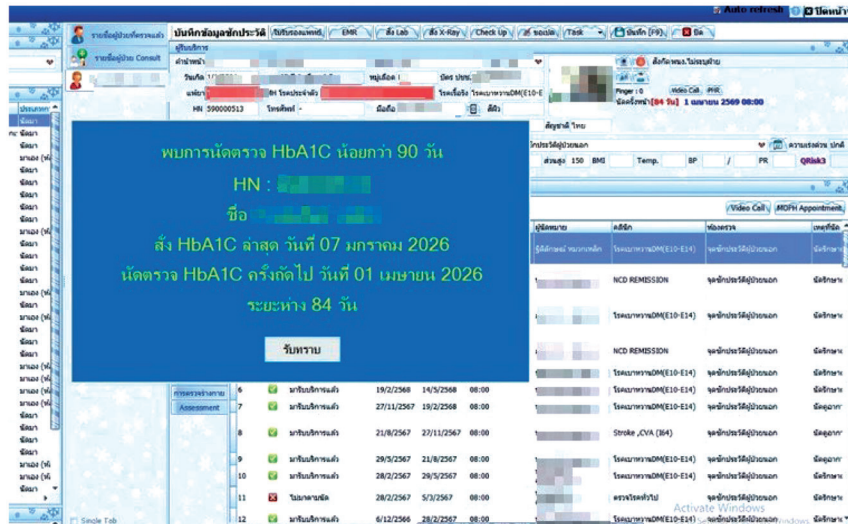
ตารางที่ 1 แนวทางทางการสั่งตรวจตามข้อบ่งชี้ทางคลินิก

ลำดับ	การส่งตรวจ	แนวทางการสั่งตรวจตามข้อบ่งชี้ทางคลินิก
1	blood urea nitrogen (BUN)	พิจารณาส่งเฉพาะ creatinine ในผู้ป่วย โรคไตเรื้อรัง (chronic kidney disease: CKD) ที่มาติดตามอาการ ส่วนในผู้ป่วยภาวะอื่น ๆ เช่น ภาวะอุจจาระร่วงเฉียบพลัน (acute gastroenteritis) หรือภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute kidney injury) หากพบความผิดปกติจะขอเพิ่ม BUN เพิ่มเติมในภายหลัง ส่วนผู้ป่วยในภาวะโรคหลอดเลือดสมอง (stroke) ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) กลุ่มอาการหลอดเลือดหัวใจเฉียบพลัน (acute coronary syndrome) ผู้ป่วยอุบัติเหตุในระบบดูแลเร่งด่วน (trauma fast track) และการตรวจทางห้องปฏิบัติการก่อนผ่าตัด (preoperative laboratory testing) ให้ส่งตรวจตามแนวทางเดิม
2	activated partial thromboplastin time (APTT)	ในผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านการแข็งตัวของเลือด (warfarin) เพื่อติดตามการรักษา ให้พิจารณาส่งตรวจเฉพาะค่า prothrombin time-international normalized ratio (PT-INR) สำหรับผู้ป่วยในภาวะอื่นให้ส่งตรวจตามแนวทางเดิม
3	free triiodothyronine (FT3)	ให้ยกเลิกการส่งตรวจ FT3 และพิจารณาส่งตรวจ free thyroxine (FT4) และ thyroid-stimulating hormone (TSH) เป็นหลักสำหรับการวินิจฉัยผู้ป่วย โดยจำกัดการส่งตรวจเหลือเพียง 2 รายการ ได้แก่ FT4 และ TSH ในกรณีติดตามผู้ป่วยภาวะไทรอยด์เป็นพิษ ในช่วง 3 เดือนแรก ให้พิจารณาส่งตรวจเฉพาะ FT4 โดยการกำหนดระยะเวลาการติดตามขึ้นอยู่กับความรุนแรงของอาการผู้ป่วย และดุลยพินิจทางคลินิกของแพทย์เป็นสำคัญ
4	hemoglobin A1c (HbA1c)	ผู้ป่วยโรคเบาหวานควรได้รับการตรวจ HbA1c อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง และเว้นระยะห่างระหว่างการตรวจไม่น้อยกว่า 90 วัน นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดไม่ได้ โดยมีค่า HbA1c ตั้งแต่ 7.0% ขึ้นไป ให้พิจารณาส่งตรวจซ้ำเพื่อติดตามผลอย่างน้อยปีละ 2 ครั้ง

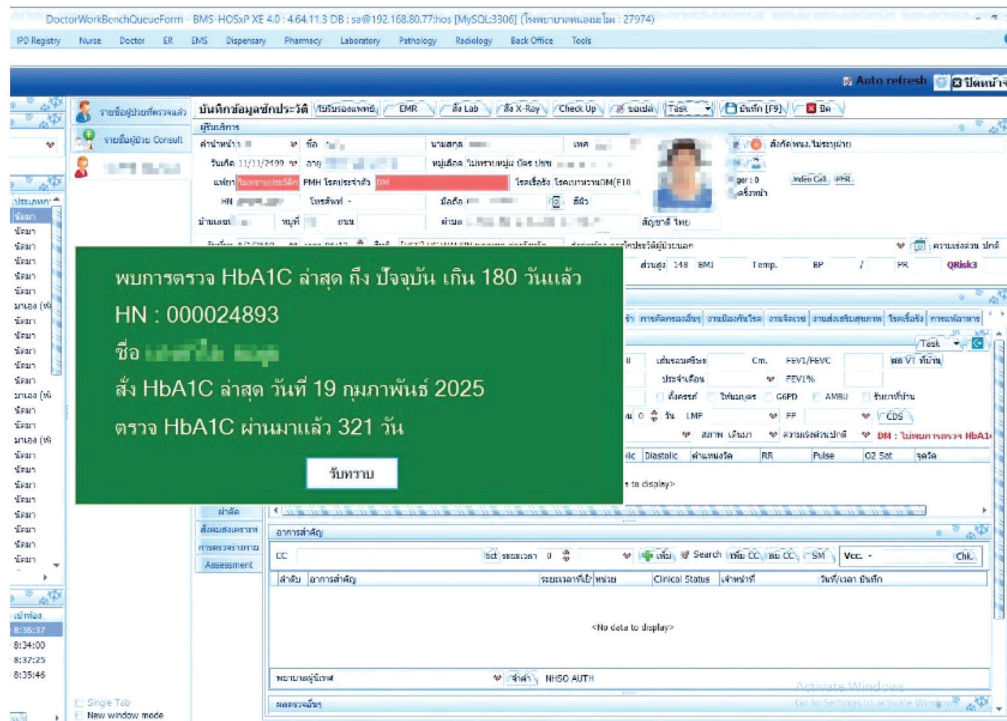
การนำแนวทางไปใช้จริงและพัฒนาโปรแกรมต้นแบบ (action)

ภายหลังจัดทำแนวทางการสั่งตรวจทางห้องปฏิบัติการได้สื่อสารไปยังผู้ปฏิบัติงานทุกจุดบริการผ่านการประชุมชี้แจงแนวทาง และการสื่อสารผ่านช่องทางภายในองค์กร เพื่อสร้างความเข้าใจและความสอดคล้องในการนำไปใช้จริง ควบคู่กับการพัฒนาโปรแกรมต้นแบบเพื่อสนับสนุนการปฏิบัติตามแนวทาง โดยพัฒนาระบบดิจิทัล ได้แก่ โปรแกรม HbA1c alert และโปรแกรม

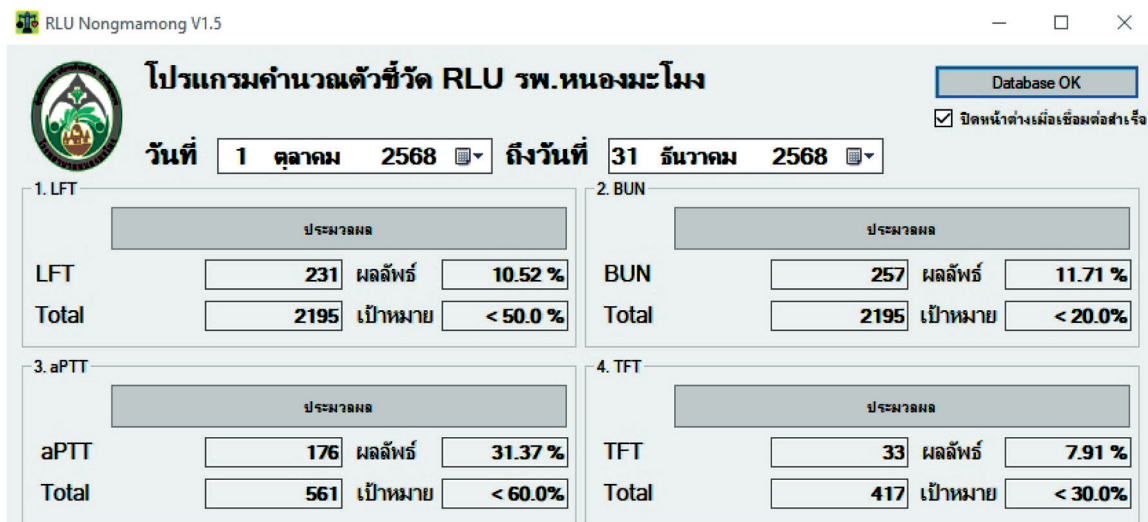
KPI monitoring โปรแกรม HbA1c alert เป็นโมดูลเสริมในระบบ HOSxP ทำหน้าที่ตรวจสอบข้อมูลย้อนหลังและแจ้งเตือนแบบ pop-up เมื่อเข้าเกณฑ์ เช่น การตรวจ HbA1c ซ้ำก่อน 90 วัน หรือไม่ได้ตรวจภายใน 180 วัน เพื่อสนับสนุนการตัดสินใจโดยไม่จำกัดดุลยพินิจทางคลินิก ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3 ขณะที่โปรแกรม KPI monitoring ใช้ติดตามจำนวนและแนวโน้มการส่งตรวจ BUN, APTT และ FT3 โดยแสดงผลแบบ real-time จากฐานข้อมูล HOSxP ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 2 สัญญาณแจ้งเตือนแบบ pop-up ในระบบ HOSxP จากโปรแกรม HbA1c alert เมื่อมีการส่งตรวจ hemoglobin A1c (HbA1c) ซ้ำก่อน 90 วัน โดยระบบจะตรวจสอบประวัติการตรวจล่าสุดโดยอัตโนมัติ และแสดงข้อมูลสำคัญประกอบการตัดสินใจ ได้แก่ เลขที่ HN ชื่อผู้ป่วย วันที่ตรวจล่าสุด วันที่นัดครั้งถัดไป และช่วงห่างระหว่างการตรวจ พร้อมข้อความแจ้งเตือน “พบการนัดตรวจ HbA1c น้อยกว่า 90 วัน” โดยผู้ส่งตรวจต้องยืนยันการรับทราบก่อนดำเนินการต่อ



ภาพที่ 3 สัญญาณแจ้งเตือนแบบ pop-up ในระบบ HOSxP จากโปรแกรม HbA1c alert เมื่อผู้ป่วยโรคเบาหวาน ไม่มีการตรวจ hemoglobin A1c (HbA1c) ภายใน 180 วัน โดยระบบตรวจสอบข้อมูลย้อนหลังโดยอัตโนมัติ และแสดงข้อมูลสำคัญ ได้แก่ เลขที่ HN ชื่อผู้ป่วย วันที่ตรวจล่าสุด และจำนวนวันนับจากการตรวจครั้งล่าสุด พร้อมข้อความแจ้งเตือน “พบการตรวจ HbA1c ล่าสุด ถึง ปัจจุบัน เกิน 180 วันแล้ว” โดยผู้ใช้งาน ต้องยืนยันการรับทราบก่อนดำเนินการต่อ



ภาพที่ 4 โปรแกรม KPI monitoring สำหรับติดตามจำนวนและแนวโน้มการส่งตรวจ blood urea nitrogen (BUN), activated partial thromboplastin time (APTT) และ free triiodothyronine (FT3) โดยประมวลผลข้อมูลจากระบบ HOSxP และแสดงผลแบบ real-time ในรูปแบบแดชบอร์ดตามช่วงวันที่ที่กำหนด พร้อมแสดงจำนวนการส่งตรวจทั้งหมดและร้อยละการใช้การตรวจเทียบกับเกณฑ์เป้าหมาย

การสังเกตและติดตามผลการใช้งานระบบต้นแบบ (observation)

ดำเนินการติดตามผลการใช้งานโปรแกรมต้นแบบ ทั้งสองระบบในหน่วยบริการเป็นระยะเวลา 6 เดือน ควบคู่กับการประเมินการปฏิบัติตามแนวทางการส่งตรวจ โดยประเมินความถูกต้องของการแจ้งเตือน ความสะดวกในการใช้งาน และผลต่อพฤติกรรมกรรมการส่งตรวจของบุคลากร พบว่าโปรแกรมสามารถตรวจจับเงื่อนไขผิดปกติของการตรวจ HbA1c ได้อย่างถูกต้องและช่วยเพิ่มความตระหนักในการส่งตรวจตามข้อบ่งชี้ อย่างไรก็ตามระบบยังไม่สามารถบันทึกและติดตามผลการดำเนินการภายหลังการแจ้งเตือนได้ ทำให้ไม่สามารถประเมินความครบถ้วนของการปฏิบัติตามแนวทางและประสิทธิผลของมาตรการได้อย่างเป็นระบบ และอาจเกิดความเสี่ยงต่อการตกหล่นของผู้ป่วยที่ต้องติดตาม

การทบทวนผลการดำเนินงานและกำหนดทิศทางการพัฒนาในวงรอบถัดไป (reflection)

ผลการทบทวนในวงรอบที่ 1 พบว่าแนวทางการส่งตรวจตามข้อบ่งชี้และการใช้โปรแกรม HbA1c alert และ KPI monitoring ช่วยเพิ่มความตระหนักและทำให้แนวโน้มการส่งตรวจสอดคล้องกับเกณฑ์มากขึ้น อย่างไรก็ตามพบข้อจำกัดสำคัญ คือ ไม่สามารถติดตามผล

การดำเนินการภายหลังการแจ้งเตือนได้อย่างเป็นระบบ ทำให้ไม่สามารถยืนยันความครบถ้วนและความเหมาะสมของการติดตามผู้ป่วยได้ จึงกำหนดทิศทางการพัฒนาในวงรอบที่ 2 โดยมุ่งปรับปรุงระบบให้สามารถบันทึกตรวจสอบและติดตามผลการดำเนินงานได้อย่างเป็นระบบและครอบคลุมมากขึ้น

วงรอบที่ 2 การปรับปรุงระบบต้นแบบ (refinement & implementation)

การวางแผนปรับปรุงระบบบนฐานข้อมูลจากวงรอบที่ 1 (re-plan)

จากผลการสังเกตและข้อเสนอแนะในวงรอบแรก ทีมสหสาขาวิชาชีพได้ประชุมทบทวนปัญหาเชิงระบบ โดยเฉพาะข้อจำกัดของโปรแกรมต้นแบบที่ยังไม่สามารถติดตามผลการดำเนินการภายหลังการแจ้งเตือนได้อย่างเป็นระบบ จึงกำหนดเป้าหมายการปรับปรุงให้ระบบสามารถติดตามการรายกรณี (case-based tracking) บันทึกและตรวจสอบการดำเนินการของผู้ใช้งานย้อนหลัง และประเมินความถูกต้องตามแนวทางคลินิกอย่างเป็นระบบเพื่อลดความคลาดเคลื่อนจากการปฏิบัติงาน อีกทั้งได้ทบทวนและยืนยันแนวทางส่งตรวจทางคลินิกที่กำหนดไว้ในวงรอบที่ 1 เพื่อใช้เป็นเกณฑ์กลางในการประเมินผลหลังการปรับปรุง

การติดตามผลการใช้งานระบบที่ปรับปรุงแล้ว (re-observation)

ดำเนินการติดตามผลการทำงานของระบบที่ได้รับการปรับปรุง โดยประเมินทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ได้แก่ ความถูกต้องของการแจ้งเตือน ความครบถ้วนของข้อมูลการติดตามผล อัตราการตอบสนองต่อการแจ้งเตือนของผู้ปฏิบัติ และการเปลี่ยนแปลงของแนวโน้มการสั่งตรวจภายหลังการใช้ระบบที่ปรับปรุงใหม่ รวมทั้งประเมินการใช้งานระบบ RLU โดยบุคลากรผู้ปฏิบัติงานเพื่อสะท้อนการยอมรับ ใช้แบบสอบถามมาตรฐานค่าแบบ Likert scale 5 ระดับ (1 = น้อยที่สุด ถึง 5 = มากที่สุด) จำนวน 15 ข้อคำถาม และคำถามปลายเปิดจำนวน 3 ข้อคำถาม แบบสอบถามดังกล่าวถูกจัดกลุ่มออกเป็น 6 มิติหลัก (domain) ตามลักษณะเนื้อหาและวัตถุประสงค์ของคำถาม ได้แก่ ความง่ายและความสะดวกในการใช้งานระบบ ประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานทางคลินิก

จริยธรรมการวิจัย

การวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดชัยนาท หมายเลขอนุมัติ REC No.023/2567E ลงวันที่ 27 ธันวาคม พ.ศ. 2567

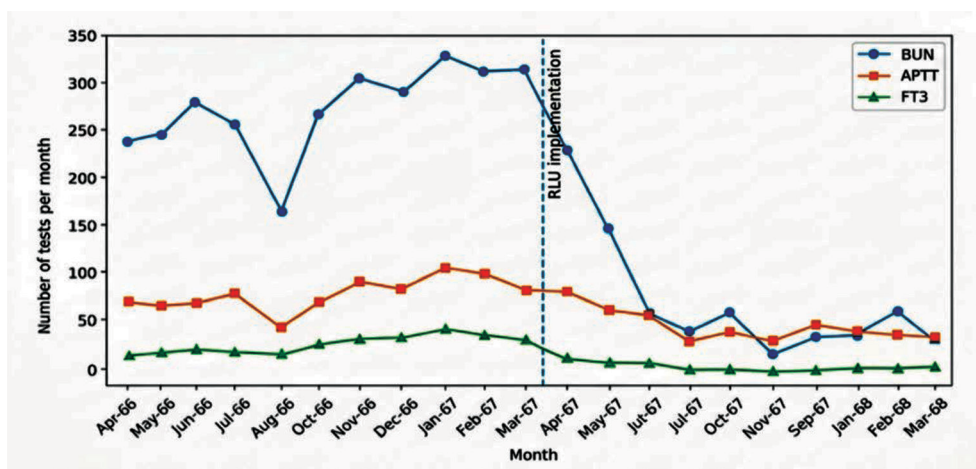
ผล

ภายหลังการดำเนินระบบ RLU พบว่าจำนวนการส่งตรวจ BUN, APTT และ FT3 ต่อเดือนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$ ทุกตัวแปร) โดยค่ามัธยฐานและช่วงควอไทล์ของจำนวนการส่งตรวจและอัตราการส่งตรวจต่อ 100 OPD visits ลดลงในทุกตัวแปร สะท้อนการลดการใช้การตรวจที่อยู่นอกข้อบ่งชี้ทางคลินิก ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 6

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบจำนวนการส่งตรวจ BUN, APTT และ FT3 ก่อนและหลังการดำเนินระบบ RLU

Test	Before RLU median (IQR)	After RLU median (IQR)	Rate/100 OPD	Rate/100 OPD	p-value
			median (IQR) Before	median (IQR) After	
BUN	285.5 (253.3–315.8)	73.0 (62.0–90.0)	5.7 (5.3–6.2)	1.4 (1.2–1.8)	< 0.001
APTT	94.0 (82.5–107.3)	77.0 (67.3–81.3)	1.9 (1.7–2.0)	1.4 (1.2–1.6)	0.008
FT3	39.5 (30.5–50.3)	14.5 (13.5–17.8)	0.7 (0.7–0.9)	0.2 (0.2–0.3)	< 0.001

หมายเหตุ: APTT คือ activated partial thromboplastin time, BUN คือ blood urea nitrogen, FT3 คือ free triiodothyronine, IQR คือ interquartile range และ RLU คือ rational laboratory use



ภาพที่ 6 แสดงแนวโน้มรายเดือนของการตรวจ blood urea nitrogen (BUN), activated partial thromboplastin time (APTT) และ free triiodothyronine (FT3) ก่อนและหลังการดำเนินระบบ rational laboratory use (RLU)

การประเมินมูลค่าการประหยัดค่าใช้จ่ายจากการลด
การตรวจ

ภายหลังการดำเนินระบบ RLU พบว่าค่าใช้จ่าย
ด้านการตรวจทางห้องปฏิบัติการลดลงรวม 105,180 บาท

โดยคำนวณจากต้นทุน (direct reagent cost) ต่อการ
ตรวจของแต่ละรายการ ซึ่ง BUN มีมูลค่าการประหยัด
สูงสุด (44,580 บาท) รองลงมา คือ FT3 (36,600 บาท)
และ APTT (24,000 บาท) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ประเมินมูลค่าการประหยัดจากการใช้ระบบ rational laboratory use (RLU)

Test	Cost before RLU (baht)	Cost after RLU (baht)	Cost saved (baht)
BUN	67,080	22,500	44,580
APTT	113,100	89,100	24,000
FT3	58,200	21,600	36,600

หมายเหตุ: APTT คือ activated partial thromboplastin time, BUN คือ blood urea nitrogen, FT3 คือ free triiodothyronine และ IQR คือ interquartile range

ผลการทำงานของระบบ HbA1c alert และ HbA1c
monitoring ต่อการตอบสนองต่อการแจ้งเตือน
ของหน่วยบริการ

โดยรวมระบบ HbA1c alert และ HbA1c
monitoring มีอัตราการตอบสนองร้อยละ 94.0 โดยการ

แจ้งเตือนกรณีไม่ได้รับการตรวจภายใน 180 วัน มีจำนวน
มากที่สุดและมีอัตราการตอบสนองสูง (94.7%) ขณะที่
กรณีตรวจช้าก่อน 90 วัน มีอัตราการตอบสนองต่ำกว่า
(78.1) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทำงานของระบบ HbA1c alert และ HbA1c monitoring ต่อการตอบสนองต่อการแจ้งเตือน
ของหน่วยบริการปีงบประมาณ พ.ศ. 2568 (ตุลาคม พ.ศ. 2567 ถึง กันยายน พ.ศ. 2568)

ประเภทการแจ้งเตือนจากระบบ HbA1c alert	จำนวนการ แจ้งเตือน (ครั้ง)	จำนวนที่มีการ ดำเนินการหลัง แจ้งเตือน (ครั้ง)	อัตราการตอบสนอง ต่อการแจ้งเตือน (%)
ไม่ได้รับการตรวจ HbA1c ภายใน 180 วัน	1,430	1,354	94.7
ตรวจ HbA1c ช้าก่อน 90 วัน	64	50	78.1
รวม	1,494	1,404	94.0

หมายเหตุ: HbA1c คือ hemoglobin A1c

การเปลี่ยนแปลงความครอบคลุมการตรวจ HbA1c
≥ 1 ครั้ง/ปี ในผู้ป่วยเบาหวาน

หลังการดำเนินระบบ RLU ความครอบคลุม
การตรวจ HbA1c อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง เพิ่มขึ้นจาก

ร้อยละ 79.95 เป็น 83.14 (เพิ่มขึ้น 3.19 percentage
points) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.028$) ดังแสดง
ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความครอบคลุมการตรวจ HbA1c ≥ 1 ครั้ง/ปี ในผู้ป่วยเบาหวานก่อนและหลังการดำเนินระบบ RLU

ปีงบประมาณ	จำนวนผู้ป่วย เบาหวาน* ทั้งหมด (ราย)	ได้รับการตรวจ HbA1c ≥ 1 ครั้ง/ปี (ราย)	ความครอบคลุม (%)	absolute difference (percentage points)	p-value
พ.ศ. 2567 (ก่อน RLU)	1,466	1,172	79.95	-	-
พ.ศ. 2568 (หลัง RLU)	1,483	1,233	83.14	+3.19	0.028

หมายเหตุ: *ผู้ป่วยเบาหวาน หมายถึง ผู้ที่มีรหัสวินิจฉัยตาม ICD-10 อย่างน้อย 1 ครั้งในปีงบประมาณ และเป็นประชากรในเขตพื้นที่รับผิดชอบประเภทที่ 1 และ 3 ข้อมูลดึงจากรายงานมาตรฐานของระบบคลังข้อมูลด้านการแพทย์และสุขภาพ (health data center) กระทรวงสาธารณสุข HbA1c คือ hemoglobin A1c และ RLU คือ rational laboratory use

การเปลี่ยนแปลงอัตราการตรวจ HbA1c ซ้ำก่อน 90 วัน 2.46 ภายหลังการดำเนินระบบ RLU เพิ่มขึ้น 1.25 เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตรวจ HbA1c ซ้ำก่อน 90 วัน พบว่าสัดส่วนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 1.21 เป็นร้อยละ (percentage points; $p = 0.011$) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 อัตราการตรวจ HbA1c ซ้ำก่อน 90 วัน ก่อนและหลังการดำเนินระบบ RLU

ปีงบประมาณ	จำนวน การตรวจ HbA1c ทั้งหมด (ครั้ง)	ตรวจซ้ำก่อน 90 วัน (ครั้ง)	สัดส่วน (%)	absolute difference (percentage points)	relative change (%)	p-value
พ.ศ. 2567 (ก่อน RLU)	1,239	15	1.21	-	-	-
พ.ศ. 2568 (หลัง RLU)	2,644	65	2.46	+1.25	+103.3	0.011

หมายเหตุ: HbA1c คือ hemoglobin A1c และ RLU คือ rational laboratory use

ความครอบคลุมและผลลัพธ์ของการตรวจ HbA1c ≥ 2 ครั้ง/ปี ในผู้ป่วยที่มีค่า HbA1c $\geq 7.0\%$ 7.0% พบว่าหลังการดำเนินระบบ RLU ความครอบคลุมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) สะท้อนถึงการปรับปรุงความต่อเนื่องในการติดตามผู้ป่วยในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบความครอบคลุมการตรวจ HbA1c ≥ 2 ครั้ง/ปี ในผู้ป่วย HbA1c $\geq 7.0\%$ ก่อนและหลังดำเนินระบบ RLU

ปีงบประมาณ	ผู้ป่วย HbA1c $\geq 7.0\%$ (ราย)	ตรวจ HbA1c ≥ 2 ครั้ง (ราย)	สัดส่วน (%)	p-value
พ.ศ. 2567 (ก่อน RLU)	615	86	13.98	-
พ.ศ. 2568 (หลัง RLU)	633	324	51.18	< 0.001

หมายเหตุ: HbA1c คือ hemoglobin A1c และ RLU คือ rational laboratory use

การประเมินการใช้งานระบบ RLU โดยบุคลากร ผู้ปฏิบัติงาน

การประเมินการใช้งานระบบ RLU ดำเนินการ
ในบุคลากรที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 28 ราย โดยมีผู้ตอบ
แบบสอบถาม จำนวน 26 ราย คิดเป็นอัตราการตอบกลับ
ร้อยละ 92.9 ประกอบด้วย แพทย์ 2 ราย จากทั้งหมด 3 ราย
พยาบาล 18 ราย จากทั้งหมด 20 ราย นักเทคนิคการแพทย์
2 ราย จากทั้งหมด 2 ราย ผู้บริหารโรงพยาบาล 1 ราย
นักวิชาการคอมพิวเตอร์ 1 ราย จากทั้งหมด 1 ราย และ
นักวิชาการสาธารณสุข 2 ราย จากทั้งหมด 2 ราย ผลการประเมิน
พบว่าการยอมรับและการใช้งานระบบอยู่ในระดับดี

ถึง ดีมาก โดยมีคะแนนเฉลี่ยรวม 4.47 จาก 5 คะแนน
ประเด็นที่ได้รับคะแนนสูง ได้แก่ ความสอดคล้องกับ
เป้าหมายองค์กร การสนับสนุนจากผู้บริหาร และความ
ยั่งยืนของระบบ ขณะที่บุคลากรรับรู้ว่าการช่วยลด
การส่งตรวจซ้ำซ้อนและสนับสนุนการตัดสินใจทาง
คลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ข้อเสนอแนะ
สำคัญ คือ การกำหนดผู้รับผิดชอบหลักและการพัฒนา
ฟังก์ชันติดตามผลเพิ่มเติม การแปลผลคะแนนเฉลี่ยใช้
เกณฑ์มาตราส่วน Likert 5 ระดับ อ้างอิงแนวทางของ
Best JW และ Jagb JV⁽²⁸⁾ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการประเมินการใช้งานระบบ rational laboratory use (RLU)
จำแนกตามมิติ (n = 26)

มิติการประเมิน (Domain)	ค่าเฉลี่ย (Mean)	SD	การแปลผล
D1 ความง่ายและความสะดวกในการใช้งานระบบ	4.52	0.12	ดีมาก
D2 ประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานทางคลินิก	4.44	0.10	ดี
D3 การสนับสนุนการตัดสินใจด้าน RLU	4.49	0.09	ดี
D4 การลดความซ้ำซ้อนและภาระงาน	4.44	0.08	ดี
D5 การบูรณาการระบบและความยั่งยืน	4.61	0.07	ดีมาก
D6 การสนับสนุนเชิงนโยบายและการบริหาร	4.56	0.11	ดีมาก
รวมทุกมิติ	4.47	0.10	ดี

วิจารณ์

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการพัฒนาระบบการ
ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างสมเหตุสมผล โดยประยุกต์
หลัก RLU ร่วมกับการมีส่วนร่วมของบุคลากรและการ
ใช้เทคโนโลยีดิจิทัล มีความสัมพันธ์กับการลดลงของ
การส่งตรวจที่อยู่นอกห้องชันสูตรทางคลินิกในบริบทของ
โรงพยาบาลชุมชน โดยพบว่าจำนวนการส่งตรวจ BUN,
APTT และ FT3 ต่อเดือน รวมทั้งอัตราการส่งตรวจ
ต่อ 100 OPD visits ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
(ตารางที่ 2) สะท้อนว่าการกำหนดแนวทางการส่งตรวจ
ที่มาจากการมีส่วนร่วมของบุคลากรที่เกี่ยวข้องในการ
กำหนดและออกแบบแนวทางร่วมกับระบบสนับสนุน
การตัดสินใจสามารถช่วยปรับพฤติกรรมกรรมการส่งตรวจ
ของผู้ปฏิบัติงานได้จริง สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่
รายงานว่าการใช้ clinical decision support tools

ร่วมกับมาตรการเชิงระบบสามารถลดการตรวจที่
ไม่จำเป็นได้อย่างมีประสิทธิภาพ^(29,30) รวมถึงบทบาทของ
การพัฒนาแนวทางร่วมและการให้ข้อมูลย้อนกลับในการ
เปลี่ยนแปลงพฤติกรรมอย่างยั่งยืน^(31,32) สอดคล้องกับ
การลดค่าใช้จ่ายด้านการตรวจทางห้องปฏิบัติการรวม
105,180 บาท โดยเฉพาะในรายการ BUN และ FT3
ที่มีมูลค่าการประหยัสูง (ตารางที่ 3) ซึ่งสะท้อนถึง
การใช้ทรัพยากรที่มีความเหมาะสมมากขึ้นในหน่วย
บริการ

ด้านการดูแลผู้ป่วยเบาหวาน อัตราการตอบสนอง
ต่อการแจ้งเตือนและการดำเนินการหลังแจ้งเตือน
(ตารางที่ 4) ซึ่งระบบ HbA1c alert และ HbA1c
monitoring มีส่วนสำคัญในการสนับสนุนการส่งตรวจ
และติดตามผู้ป่วยได้อย่างเหมาะสม โดยความครอบคลุม
ของการตรวจ HbA1c อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง ในผู้ป่วย

เบาหวานเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5) รวมถึงจำนวนผู้ป่วยที่มีค่า HbA1c $\geq 7.0\%$ ได้รับการตรวจติดตามอย่างน้อย 2 ครั้งต่อปี เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (ตารางที่ 7) สะท้อนถึงการเพิ่มขึ้นของความต่อเนื่องในการติดตามผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยง ผลลัพธ์เหล่านี้สอดคล้องกับหลักฐานที่ชี้ว่าระบบแจ้งเตือนและเครื่องมือดิจิทัลสามารถช่วยเพิ่มความเหมาะสมของการดูแลผู้ป่วยโรคเรื้อรังได้⁽³³⁻³⁷⁾ ทั้งนี้อัตราการตรวจ HbA1c ซ้ำก่อน 90 วัน มีสัดส่วนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) แต่การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นพร้อมกับจำนวนการตรวจ HbA1c โดยรวมที่เพิ่มขึ้นและความครอบคลุมในการติดตามผู้ป่วยที่ดีขึ้น จึงอาจสะท้อนทั้งการติดตามเชิงรุกในผู้ป่วยที่มีข้อบ่งชี้ทางคลินิก และยังชี้ให้เห็นโอกาสในการพัฒนาการควบคุมการตรวจซ้ำก่อนกำหนดในระยะต่อไป ผลการประเมินการใช้งานระบบโดยบุคลากร (ตารางที่ 8) สอดคล้องกับผลเชิงปริมาณของการศึกษา โดยมีอัตราการตอบแบบสอบถามในระดับสูงและคะแนนเฉลี่ยรวมอยู่ในระดับดี โดยเฉพาะมิติด้านการบูรณาการระบบ สะท้อนว่าความสำเร็จของระบบ RLU ไม่ได้ขึ้นอยู่กับเทคโนโลยีเพียงอย่างเดียว แต่เกี่ยวข้องกับการออกแบบระบบให้สอดคล้องกับการทำงานจริง สอดคล้องกับแนวคิดของ Carayon P และคณะ ที่เน้นการออกแบบระบบบริการโดยคำนึงถึงการทำงานของผู้ใช้ในบริบทจริง⁽³⁸⁾ รวมทั้งสอดคล้องกับ Peters S และคณะ และ Bayor AA และคณะ ที่ชี้ว่าการมีส่วนร่วมของผู้ใช้งานและการออกแบบที่เน้นผู้ใช้เป็นศูนย์กลาง (user-centered) มีความสำคัญต่อการยอมรับและการใช้งานระบบอย่างต่อเนื่อง^(39,40)

การศึกษานี้สะท้อนการประยุกต์ใช้แนวคิด RLU ในระดับโรงพยาบาลชุมชนอย่างเป็นระบบ โดยเฉพาะการบูรณาการแนวทางการสังตรวจร่วมกับเทคโนโลยีดิจิทัลและการมีส่วนร่วมของบุคลากร ซึ่งมีรายงานในบริบทดังกล่าวค่อนข้างจำกัดในประเทศไทย และชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ของการนำแนวคิดนี้ไปประยุกต์ใช้ในระดับโรงพยาบาลชุมชนแห่งอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาควรตีความภายใต้บริบทของการออกแบบการศึกษาแบบก่อนและหลังดำเนินระบบในหน่วย

บริการเดียว ซึ่งไม่มีกลุ่มควบคุม จึงอาจมีปัจจัยอื่นร่วมที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของผลลัพธ์ ขณะที่การนำผลไปประยุกต์ใช้ในบริบทอื่น อาจต้องพิจารณาความแตกต่างของทรัพยากร ระบบสารสนเทศ และศักยภาพของบุคลากรในแต่ละหน่วยบริการร่วมด้วย นอกจากนี้ การออกแบบระบบแจ้งเตือนในลักษณะของ clinical decision support tools อาจมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะ alert fatigue หากมีการแจ้งเตือนถี่หรือไม่สอดคล้องกับบริบทการใช้งาน ซึ่งอาจส่งผลต่อการตอบสนองของผู้ใช้งานและประสิทธิภาพของระบบในระยะยาว^(41,42)

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาระบบการสังตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างเหมาะสม โดยประยุกต์หลัก RLU ร่วมกับการมีส่วนร่วมของบุคลากรที่เกี่ยวข้องและการใช้เทคโนโลยีดิจิทัลในการสนับสนุนการตัดสินใจและกำกับติดตาม สามารถทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงรูปแบบการสังตรวจทางห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลชุมชนให้มีความเหมาะสมมากยิ่งขึ้น ในขณะที่ผลการประเมินจากบุคลากรผู้ใช้งานชี้ว่าระบบได้รับการยอมรับในระดับดี และมีความสอดคล้องกับการทำงานในบริบทหน่วยงาน ดังนั้นแนวทางที่พัฒนาขึ้นอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในบริบทที่ใกล้เคียงกัน โดยควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในหลายหน่วยบริการและติดตามผลในระยะยาวเพื่อยืนยันประสิทธิผลและความยั่งยืนของระบบ

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

บทความฉบับนี้มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ ได้แก่ ChatGPT (OpenAI, USA) เพื่อช่วยในการปรับปรุงสำนวนภาษา การตรวจแก้ไวยากรณ์ภาษาอังกฤษของต้นฉบับบทความที่ผู้เขียนได้เขียนขึ้นแล้ว และใช้เป็นเครื่องมือช่วยจัดทำกราฟและภาพประกอบตามข้อมูลจากการศึกษาวิจัย รวมทั้งสืบค้นวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องในเบื้องต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการโรงพยาบาลหนองมะโมง ที่ให้การสนับสนุนและเอื้อเฟื้อโอกาสในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ บุคลากรทุกหน่วยงานของโรงพยาบาลหนองมะโมง ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บรวบรวมข้อมูล ทดลองใช้ระบบ และให้ข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ และขอขอบคุณ นักวิชาการคอมพิวเตอร์ของโรงพยาบาล ที่มีบทบาทสำคัญในการออกแบบ พัฒนา และปรับปรุงระบบอย่างต่อเนื่องจนสามารถนำไปใช้ได้จริงและขยายผลในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Müskens JLM, Kool RB, van Dulmen SA, Westert GP. Overuse of diagnostic testing in healthcare: a systematic review. *BMJ Qual Saf* 2022; 31(1): 54–63.
2. Kroner GM, Richman S, Fletcher A, Dickerson J, Jackson BR. Current state of laboratory test utilization practices in the clinical laboratory. *Acad Pathol* 2022; 9(1): 100039. (4 pages).
3. Cadamuro J, Gaksch M, Wiedemann H, Lippi G, von Meyer A, Pertersmann A, et al. Are laboratory tests always needed? Frequency and causes of laboratory overuse in a hospital setting. *Clin Biochem* 2018; 54: 85–91.
4. Alshekhabobakr HM, AlSaqatri SO, Rizk NM. Laboratory test utilization practices in Hamad Medical Corporation; role of laboratory supervisors and clinicians in improper test utilization; a descriptive pilot study. *J Multidiscip Healthc* 2022; 15: 413–29.
5. Zayed AM, Delvaux N. Analyzing laboratory test utilization trends in Belgian primary care: a decade of insights with international perspectives. *BMC Prim Care* 2024; 25: 270. (9 pages).
6. World Health Organization. The selection and use of essential in vitro diagnostics: report of the fourth meeting of the WHO Strategic Advisory Group of Experts on In Vitro Diagnostics, 2022 (including the fourth WHO model list of essential in vitro diagnostics). Geneva: World Health Organization; 2023.
7. Gill J, Barakauskas VE, Thomas D, Rodriguez-Capote K, Higgins T, Zhang D, et al. Evaluation of thyroid test utilization through analysis of population-level data. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(12): 1898–1906.
8. Capoor MN, Stonemetz JL, Baird JC, Ahmed FS, Awan A, Birkenmaier C, et al. Prothrombin time and activated partial thromboplastin time testing: a comparative effectiveness study in a million-patient sample. *PLoS One* 2015; 10(8): e0133317. (13 pages).
9. Mathura P, Boettger C, Hagtvedt R, Sweeney C, Williams S, Suranyi Y, et al. Reduction of urea test ordering in the emergency department: multicomponent intervention including education, electronic ordering, and data feedback. *CJEM* 2022; 24(6): 636–40.
10. Adaji A, Schattner P, Jones KM, Beovich B, Piterman L. Care planning and adherence to diabetes process guidelines: Medicare data analysis. *Aust Health Rev* 2013; 37(1): 83–7.
11. Renard LM, Bocquet V, Vidal-Trecan G, Lair ML, Blum-Boisgard C. Adherence to international follow-up guidelines in type 2 diabetes: a longitudinal cohort study in Luxembourg. *PLoS One* 2013; 8(11): e80162. (9 pages).
12. Mikhaeil M, Day AG, Ilan R. Non-essential blood tests in the intensive care unit: a prospective observational study. *Can J Anaesth* 2017; 64(3): 290–5.
13. Zhi M, Ding EL, Theisen-Toupal J, Whelan J, Arnaout R. The landscape of inappropriate laboratory testing: a 15-year meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8(11): e78962. (8 pages).
14. O'Sullivan JW, Stevens S, Hobbs FDR, Salisbury C, Little P, Goldacre B, et al. Temporal trends in use of tests in UK primary

- care, 2000–15: retrospective analysis of 250 million tests. *BMJ* 2018; 363: k4666. (8 pages).
15. Aldiba MA, Jamali EM, Dighriri A, Abdulhaq AM, Ali MR, Otaif AM, et al. Rationalisation of laboratory tests ordering and consumption at Armed Forces Hospital, Jazan. *BMJ Open Qual* 2023; 12(2): e002114. (7 pages).
 16. Devis L, Catry E, Honore PM, Mansour A, Lippi G, Mullier F, et al. Interventions to improve appropriateness of laboratory testing in the intensive care unit: a narrative review. *Ann Intensive Care* 2024; 14(1): 9. (32 pages).
 17. Kanwar G, Rathore S, Khandelwal A, Khandelwal D, Khandelwal A, Meena R, et al. A study of rational use of investigations in a tertiary hospital. *Asian J Med Sci* 2022; 13(10): 121–5.
 18. Shirazi M, Masoudian Y, Feizabad E, Golshahi F, Ghaemi M. Creating a novel strategy to reduce unnecessary laboratory testing based on healthcare cost analysis in high-risk pregnancies and delivery ward. *J Clin Lab Anal* 2021; 35(5): e23759. (4 pages).
 19. Greenhalgh T, Wherton J, Papoutsis C, Lynch J, Hughes G, A'Court C, et al. Beyond adoption: a new framework for theorizing and evaluating nonadoption, abandonment, and challenges to the scale-up, spread, and sustainability of health and care technologies. *J Med Internet Res* 2017; 19(11): e367. (21 pages).
 20. World Health Organization. Global strategy on digital health 2020–2025. Geneva: WHO; 2021.
 21. Arnaudeau S, Nickum M, Fouquereau E, Chevalier S, Gillet N, Mokoukolo R, et al. The participatory approach in healthcare establishments as a specific French organizational model at hospital department level to prevent burnout among caregivers: what are the perceptions of its implementation and its potential contributions by these caregivers?. *Int J Environ Res Public Health* 2024; 21(7): 882. (16 pages).
 22. Seward N, Hanlon C, Hinrichs-Kraples S, Lund C, Murdoch J, Taylor Salisbury T, et al. A guide to systems-level, participatory, theory-informed implementation research in global health. *BMJ Glob Health* 2021; 6(12): e005365. (16 pages).
 23. Verweij L, Metsemakers SJJPM, Ector GICG, Rademaker P, Bekker CL, van Vlijmen B, et al. Improvement, implementation, and evaluation of the CMylife digital care platform: participatory action research approach. *J Med Internet Res* 2023; 25: e45259. (14 pages).
 24. Kemmis S, McTaggart R, editors. The action research planner. 3rd ed. Victoria: Deakin University Press; 1988.
 25. Vaughn LM, Jacquez F. Participatory research methods-choice points in the research process. *J Particip Res Methods* 2020; 1(1): 1–14.
 26. Cornish F, Breton N, Moreno-Tabarez U, Delgado J, Rua M, de-Graft Aikins A, et al. Participatory action research. *Nat Rev Methods Primers* 2023; 3: 34. (14 pages).
 27. ชูศักดิ์ เอกเพชร. การวิจัยปฏิบัติการ (Action Research). สุราษฎร์ธานี: คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี; 2561.
 28. Best JW, Kahn JV. Research in education. 10th ed. Boston: Pearson Allyn and Bacon; 2006.
 29. Rabbani N, Ma SP, Li RC, Winget M, Weber S, Boosi S, et al. Targeting repetitive laboratory testing with electronic health records-embedded predictive decision support: a pre-implementation study *Clin Biochem* 2023; 113: 70–7.
 30. Prokop LJ, Srinivasan V, Koeplinger ME, Groth SL, Cossack RL, et al. The effect of computerized clinical decision support systems on laboratory test ordering: a systematic review. *Arch Pathol Lab Med* 2017; 141(3): 367–75.
 31. Yeshoua B, Bowman C, Dullea J, Ditkowsky J, Shyu M, Lam H, et al. Interventions to

- reduce repetitive ordering of low-value inpatient laboratory tests: a systematic review. *BMJ Open Qual* 2023; 12(1): e002128. (7 pages).
32. Glauser E. Implementing an evidence-based protocol to reduce inappropriate laboratory test ordering. *J Nurse Pract* 2022; 18(10): 1078–80.
33. Gerwer JE, Bacani G, Juang PS, Kulasa K. Electronic health record-based decision-making support in inpatient diabetes management. *Curr Diab Rep* 2022; 22(9): 433–40.
34. O'Connor PJ, Sperl-Hillen JM, Rush WA, Johnson PE, Amundson GH, Asche SE. Impact of electronic health record clinical decision support on diabetes care: a randomized trial. *Ann Fam Med*. 2011;9(1):12–21.
35. Chen W, Howard K, Gorham G, O'Bryan CM, Coffey P, Balasubramanya B, et al. Design, effectiveness, and economic outcomes of contemporary chronic disease clinical decision support systems: a systematic review and meta-analysis. *J Am Med Inform Assoc* 2022; 29(10): 1757–72.
36. Sly B, Russell AW, Sullivan C. Digital interventions to improve safety and quality of inpatient diabetes management: a systematic review. *Int J Med Inform* 2022; 157: 104596.
37. Huang S, Liang Y, Li J, Li X. Applications of clinical decision support systems in diabetes care: scoping review. *J Med Internet Res* 2023; 25: e51024. (23 pages).
38. Carayon P, Wooldridge A, Hoonakker P, Hundt AS, Kelly MM. SEIPS 3.0: human-centered design of the patient journey for patient safety. *Appl Ergon* 2020; 84: 103033. (23 pages).
39. Peters S, Guccione L, Francis J, Best S, Tavender E, Curran J, et al. Evaluation of research co-design in health: a systematic overview of reviews and development of a framework. *Implement Sci* 2024; 19(1): 63. (16 pages).
40. Bayor AA, Li J, Yang IA, Varnfield M. Designing clinical decision support systems (CDSS)—a user-centered lens of the design characteristics, challenges, and implications: systematic review. *J Med Internet Res* 2025; 27: e63733. (19 pages).
41. Sutton RT, Pincock D, Baumgart DC, Sadowski DC, Fedorak RN, Kroeker KI. An overview of clinical decision support systems: benefits, risks, and strategies for success. *NPJ Digit Med* 2020; 3: 17. (10 pages).
42. Olakotan OO, Mohd Yusof M. The appropriateness of clinical decision support systems alerts in supporting clinical workflows: a systematic review. *Health Informatics J* 2021; 27(2): 14604582211007536. (22 pages).

Development and Evaluation of a Laboratory Test Ordering System Based on Rational Laboratory Use and Personnel Participation at Nongmamong Hospital

Supattra Suwansiri and Wittaya Juntaroje

Nongmamong Hospital, Chainat 17120, Thailand

ABSTRACT Inappropriate laboratory test utilization, including both overutilization and underutilization relative to clinical indications, is a significant problem affecting the quality of patient care, healthcare costs, and the workload of medical personnel. This study aimed to develop and evaluate a rational laboratory test ordering system by applying the principles of Rational Laboratory Use (RLU) in conjunction with personnel participation and digital technology. We asked whether the proposed system could reduce inappropriate test utilization and improve the continuity of patient care. This study employed a participatory action research design based on the PAOR cycle (Plan–Action–Observation–Reflection), conducted over two iterative cycles. Laboratory test utilization was compared between pre- and post-implementation periods, each spanning 12 months, along with the assessment of diabetes care quality and user acceptance among healthcare personnel. The results showed that the utilization of blood urea nitrogen (BUN), activated partial thromboplastin time (APTT), and free triiodothyronine (FT3) significantly decreased after implementation ($p < 0.05$). Meanwhile, the coverage of at least annual hemoglobin A1c (HbA1c) testing and the continuity of follow-up among patients with HbA1c $\geq 7.0\%$ improved. User acceptance was rated at a good to very good level, particularly in terms of alignment with routine workflows and system sustainability. The findings suggest that the system can improve the appropriateness of laboratory test utilization and support patient follow-up in a community hospital setting.

Keywords: Rational laboratory use, Clinical decision support system, Digital technology, Personnel participation

การศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ที่ผลิตโดยศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ

กานดา วีระเวชสุกิจ และ จิรวัดน์ โชนงน้อย

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

บทคัดย่อ หนูแรทสายพันธุ์ Wistar นิยมใช้เป็น animal model สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา การตรวจวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือดเป็นการทดสอบเพื่อหาความผิดปกติของกลไกการห้ามเลือด ซึ่งปัจจุบันศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติไม่เคยศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat ที่ผลิตได้มาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ ค่า prothrombin time (PT) และค่า activated partial thromboplastin time (APTT) ในหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือดแบบอัตโนมัติ SYSMEX CA-660 จากผลการศึกษาพบว่าทั้งเพศและอายุส่งผลต่อค่าเฉลี่ยของค่า PT และ APTT อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ในแง่ของความเสถียรของตัวอย่าง ตัวอย่าง plasma ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ มักส่งผลให้ค่า PT สั้นลง แต่ค่า APTT ยาวนานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) นอกจากนี้หนูแรท Mlac:WR กลุ่มที่ผ่านการรับ sterile water ด้วยวิธี oral gavage เป็นเวลา 90 วันติดต่อกัน ให้ค่าการแข็งตัวของเลือดไม่ต่างจากกลุ่ม non-oral gavage ยกเว้นค่า APTT ของเพศผู้ที่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม oral gavage ($p < 0.001$) การศึกษาชี้ให้เห็นว่าเพศ อายุ และกิจวัตรประจำวันที่แตกต่างกันของสัตว์ทดลอง รวมถึงวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์สามารถส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat ได้

คำสำคัญ: หนูแรท Mlac:WR, การแข็งตัวของเลือด, ค่า prothrombin time (PT), ค่า activated partial thromboplastin time (APTT), ปัจจัยการแข็งตัวของเลือด

Corresponding author E-mail: kanda.vee@mahidol.ac.th

Received: 2 February 2026

Revised: 5 June 2026

Accepted: 10 June 2026

บทนำ

การแข็งตัวของเลือด (blood coagulation หรือ blood clotting) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่ร่างกายใช้เพื่อหยุดการไหลของเลือดเมื่อมีการบาดเจ็บหรือมีบาดแผลเกิดขึ้นกับหลอดเลือด กระบวนการนี้ช่วยป้องกันไม่ให้ร่างกายเสียเลือดมากเกินไป องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องและมีบทบาทสำคัญต่อการห้ามเลือด ได้แก่ เกล็ดเลือด (platelets) และปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (coagulation factors) การสร้างลิ่มเลือดเกิดจากการทำงานของ coagulation factors จนได้ fibrin ที่จะตกตะกอนลงมากลายเป็นลิ่มเลือดที่มีความแข็งแรงและห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนโดยจะเปลี่ยน coagulation factors ที่อยู่ในรูป inactive form (zymogen) ให้เป็น active form ที่มีฤทธิ์เป็น protease ซึ่งจะไปกระตุ้น coagulation factors ตัวต่อๆ ไปใน pathway ของตัวเอง ตามลำดับ โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 pathways ดังนี้ 1) intrinsic pathway 2) extrinsic pathway และ 3) common pathway⁽¹⁻³⁾

International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ได้ระบุว่า prothrombin time (PT) และ activated partial thromboplastin time (APTT) เป็น routine parameters ร่วมกับการนับจำนวนเกล็ดเลือด การดู gross lesion และ histopathological slide เพื่อประเมินผลกระทบของสารเคมีหรือผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมต่อระบบการแข็งตัวของเลือด⁽⁴⁾ สอดคล้องกับ American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) ที่แนะนำว่าค่า PT และ APTT เป็นพารามิเตอร์ที่ควรบรรจุไว้ใน preclinical safety studies เพื่อใช้ประเมินผลกระทบต่อระบบการแข็งตัวของเลือด เมื่อได้รับ xenobiotics เข้าสู่ร่างกาย⁽⁵⁾ โดยค่า PT เป็น screening test สำหรับประเมินการทำงานของ coagulation factor ที่เกี่ยวข้องกับ extrinsic pathway และ common pathway ได้แก่ factor I, II, V, VII และ X ใช้ประเมินสถานะขาดวิตามิน K ในระยะแรก ใช้ติดตามผลการรักษาด้วย warfarin และภาวะที่ร่างกายได้รับยาฆ่าหนู ในขณะที่ APTT ถูกใช้ในการประเมิน

การทำงานของระบบ intrinsic pathway และ common pathway ได้แก่ coagulation factor I, II, V, VIII, IX, X, XI และ XII การเกิดภาวะ (Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) และใช้ติดตามผลการรักษาด้วย heparin หากค่า APTT สูงขึ้นผิดปกติ อาจบ่งบอกถึงสภาวะบกพร่องของ coagulation factor VIII, IX, XI และ XII หรือการได้รับ inhibitor อย่าง heparin เข้าสู่ร่างกาย^(3,6,7)

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ นอกจากเป็นหน่วยงานหลักของประเทศด้านการผลิตสัตว์ทดลอง เช่น หนูเมาส์ หนูแรท หนูตะเภา และกระต่าย ยังเป็นหน่วยงานแรกของประเทศไทยที่ได้รับการรับรองจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ให้เป็นหน่วยงานที่สามารถให้บริการทดสอบความปลอดภัยในด้านการพัฒนายาและผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพของประเทศไทย ตามหลักการของ The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Good Laboratory Practice (GLP): OECD GLP โดยเฉพาะอย่างยิ่ง test guideline no.408 ซึ่งเป็นหนึ่งใน test guideline ที่ได้รับความนิยมและมีลูกค้ามาใช้บริการกับศูนย์อย่างต่อเนื่อง การทดสอบใน test guideline no.408 เป็นการทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรังในสัตว์ฟันแทะที่ได้รับสารทดสอบผ่านทางปากอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 90 วัน⁽⁸⁾ ในบางกรณีของการให้บริการตาม test guideline no.408 จำเป็นต้องให้สารทดสอบผ่านทางท่อหรือเข็มให้อาหารสอดเข้าปากแล้วส่งสารทดสอบสู่หลอดอาหารหรือกระเพาะอาหารโดยตรง เรียกวิธีนี้ว่า oral gavage⁽⁹⁾ ซึ่งการให้สารน้ำหรืออาหารแก่สัตว์ทดลองอย่างต่อเนื่องติดต่อกันหลายวันผ่านวิธี oral gavage นอกจากจะทำให้ทางเดินอาหารของสัตว์ทดลองเสี่ยงต่อการระคายเคืองแล้ว อาจทำให้อัตราการเต้นของหัวใจและความดันโลหิตเปลี่ยนแปลง รวมไปถึงทำให้เกิดความเครียดสะสมในสัตว์ทดลองได้⁽¹⁰⁾

หนู Wistar rat เป็นสัตว์ฟันแทะที่นิยมใช้ในงานวิทยาศาสตร์ เนื่องจากมีขนาดตัวที่เหมาะสมสำหรับการทำหัตถการหรือปฏิบัติงานในขั้นตอนต่างๆ อีกทั้งมีสรีรวิทยาและพันธุกรรมที่มีลักษณะเฉพาะช่วยให้

สามารถสรุปผลการทดลองเทียบเคียงกับในมนุษย์ได้ นอกจากนี้ Wistar rat มีอัตราการรอดชีวิตที่ดี อัตราการเกิดเนื้องอกด้วยตัวเองต่ำ จึงนิยมใช้เป็นแบบจำลองสำหรับการทดสอบความเป็นพิษ⁽¹¹⁾ ปัจจุบันการศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat ยังมีไม่มากนักถึงหนู Wistar rat สายพันธุ์ Mlac:WR ที่ผลิตโดยศูนย์ฯ ยังไม่เคยมีการศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดมาก่อน ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงปัจจัยต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือด ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดสอบค่า PT และ APTT ของหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ทั้งเพศผู้และเพศเมียในช่วงอายุ 4-8 สัปดาห์, 10-12 สัปดาห์, 18-20 สัปดาห์ และมากกว่า 35 สัปดาห์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ถึงอิทธิพลของเพศและอายุที่มีต่อค่าการแข็งตัวของเลือด และเพื่อเป็นการพิสูจน์ข้อแนะนำของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI document H21-A5) ซึ่งระบุว่าหากไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดได้ทันทีภายใน 2-4 ชั่วโมง สามารถเก็บรักษาตัวอย่าง plasma ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์⁽¹²⁾ การศึกษานี้จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าการแข็งตัวของเลือดหากจำเป็นต้องแช่แข็งตัวอย่าง plasma ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ตามคำแนะนำของ CLSI guidelines และศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนูกลุ่มที่ได้รับ sterile water ผ่านการทำ oral gavage อย่างต่อเนื่องทุกวัน เป็นเวลา 90 วัน ซึ่งคล้ายคลึงกับหนูในกลุ่มควบคุมของงาน toxicity test study อีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

หนู Wistar rat สายพันธุ์ Mlac:WR ผลิตโดยศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 4 ช่วงอายุ ได้แก่ 4-8 สัปดาห์, 10-12 สัปดาห์, 18-20 สัปดาห์ และมากกว่า 35 สัปดาห์ ช่วงอายุละ 40 ตัว (แบ่งเป็น เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 20 ตัว) ถูกใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อนำมาศึกษาอิทธิพลของเพศและอายุ รวมถึงการทดสอบความเสถียรของตัวอย่างหลังผ่านการแช่แข็ง ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ค่าการ

แข็งตัวของเลือด ในขณะที่หนู Wistar rat สายพันธุ์ Mlac:WR อีกกลุ่มที่อายุ 6 สัปดาห์ เพศละ 22 ตัว จะถูกใช้สำหรับศึกษาผลกระทบของการทำ oral gavage ติดต่อกัน เป็นเวลา 90 วัน ที่มีต่อค่าการแข็งตัวของเลือด

วิธีการ

สัตว์ทดลองทั้งหมดถูกเลี้ยงภายใต้ระบบ HVAC (Heating, Ventilation, and Air Conditioning) ที่มีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 30-70% อัตราการระบายอากาศ 15-20 รอบต่อชั่วโมง ระยะเวลาการให้แสงสว่าง (light:dark) เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง และควบคุมเสียงภายในห้องเลี้ยงให้ไม่เกิน 85 เดซิเบล สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในกรงสแตนเลสพื้นต้นที่มีวัสดุรองนอนทำจากแกนข้าวโพด (corn cob) ผสมผักตบชวา (water hyacinth) ที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ (autoclave) (รุ่น Getinge GE6915AR-1, Getinge, Sweden) ก่อนนำมาใช้งาน และได้รับอาหารที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาให้กิน น้ำที่ใช้เลี้ยงเป็น reverse osmosis (RO) water ที่ผสมคลอรีนเข้มข้น 5-7 ppm โดยมีเครื่องเตรียมคลอรีน (รุ่น Beta/4, ProMinent GmbH Heidelberg, Germany)

ในการศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดของหนูในกลุ่มที่ผ่านการทำ oral gavage หนู Mlac:WR อายุ 6 สัปดาห์ เพศละ 22 ตัว จะถูกให้ sterile water (General Hospital Products, Thailand) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 100 กรัม ผ่านการสอดท่อ feeding needle (P.A.C.K. Trading, Thailand) เข้าทางปากผ่านไปยังหลอดอาหาร และฉีด sterile water เข้าสู่กระเพาะอาหารโดยตรงทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลา 90 วัน เมื่อ feeding จนครบ 90 วัน สัตว์ทดลองจะถูกนำไปเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือด และนำค่าที่ทดสอบได้ไปเปรียบเทียบกับหนูช่วงอายุ 18-20 สัปดาห์ กลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการทำ oral gavage (non-oral gavage)

การสลบสัตว์และการเก็บเลือด

คืนก่อนวันที่จะเก็บตัวอย่างสัตว์ทดลองทุกตัว จะถูกงดให้อาหาร (fasting) อย่างน้อย 8 ชั่วโมง ก่อนนำมาเก็บตัวอย่าง (แต่ยังให้น้ำตามปกติ) สัตว์ทดลอง

จะถูกทำให้สลบด้วยก๊าซ CO₂ (Charoennakhon Welding, Thailand) แล้วทำการผ่าเปิดช่องท้องเพื่อเก็บเลือดจากเส้นเลือด posterior vena cava เลือดจะถูกถ่ายไปยังหลอดเก็บเลือดที่บรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ชนิด 3.2% sodium citrate (รุ่น Minicollect, Greiner BIO-ONE, Austria) โดยอัตราส่วนระหว่างเลือดและ sodium citrate เท่ากับ 9:1 ทำการ mixed เลือดเบาๆ ทันทีเพื่อให้เลือดและ anticoagulant ผสมเข้ากันอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไปปั่นที่เครื่อง centrifuge (รุ่น Multifuge X1R Pro, Thermo Fisher Scientific, Germany) เพื่อแยก citrate-plasma ด้วยความเร็วรอบ 1,500 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C

ในการศึกษาความเปลี่ยนแปลงของค่าการแข็งตัวของเลือดเมื่อนำตัวอย่างไปแช่แข็งที่ตู้แช่แข็ง (รุ่น PLR 386, Thermo Fisher Scientific, Germany) ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ citrate-plasma ที่ได้จากสัตว์ทดลอง 1 ตัว จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 เรียกว่า fresh citrate-plasma เป็นชุดที่ citrate-plasma จะถูกนำไปตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดทันทีภายใน 4 ชั่วโมงหลังจากเก็บตัวอย่าง และชุดที่ 2 เรียกว่า freeze citrate-plasma เป็นชุดที่ citrate-plasma จะถูกนำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำมาทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือด

ตัวอย่าง citrate-plasma ที่มีลักษณะของ hemolysis หรือพบว่ามี partial clot เกิดขึ้นจะไม่ถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์

การตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือด

ค่าการแข็งตัวของเลือด PT และ APTT ถูกทดสอบโดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือดแบบอัตโนมัติ (automated coagulation analyzer) SYSMECA-660 (Sysmex Corporation, Japan) ก่อนตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างต้องทดสอบ standard control samples ก่อน เพื่อตรวจสอบคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์ ในการทดสอบค่า PT ตัวอย่าง citrate-plasma ปริมาตร 50 µL จะถูกผสมเข้ากับ PT reagent (ThromborelS; Sysmex

Corporation, Japan) การทดสอบค่า APTT ตัวอย่าง citrate-plasma ปริมาตร 50 µL จะถูกผสมเข้ากับ APTT reagents ที่ประกอบด้วย ActinFS และ CaCl₂ (Sysmex Corporation, Japan) เครื่องตรวจวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือดแบบอัตโนมัติจะวัดระยะเวลาตั้งแต่ตัวอย่าง citrate-plasma ผสมกับ reagent จนกระทั่งเกิดการ clot ที่สมบูรณ์ และรายงานเป็นค่าการแข็งตัวของเลือดในหน่วยวินาที

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดได้ใช้โปรแกรม GraphPad Prism Software (version 10.5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) เป็นเครื่องมือในการทดสอบ โดยการศึกษาอิทธิพลของเพศและการเปรียบเทียบค่าการแข็งตัวของเลือดระหว่างสัตว์ทดลองกลุ่ม non-oral gavage และ oral gavage ได้ใช้ Mann Whitney test ในการทดสอบ ส่วนการศึกษาผลกระทบของอายุต่อค่าการแข็งตัวของเลือดจะทดสอบโดยใช้ Kruskal-Wallis test และการเปรียบเทียบความเสถียรของตัวอย่างระหว่าง fresh citrate-plasma และ freeze citrate-plasma จะทดสอบโดยใช้ Wilcoxon matched-pairs signed rank test

จริยธรรมการวิจัย

การใช้และการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองในงานวิจัยนี้ผ่านการรับรองและอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล National Laboratory Animal Center Animal Care and Use Committee (NLAC-ACUC) National Laboratory Animal Center, Mahidol University (หมายเลขโครงการ RA 2023-11) เมื่อวันที่ 29 กันยายน พ.ศ. 2566

ผล

ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า PT และ APTT ของหนู Mlac:WR ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ช่วงอายุต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ โดยจะแสดงจำนวนตัวอย่าง (n) ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(mean±SD) ค่ามัธยฐาน (median) ค่าเฉลี่ยของลำดับที่ (mean rank) ค่าสูงสุด (max) ค่าต่ำสุด (min) และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (%CV)

เพศของสัตว์ทดลองมีอิทธิพลต่อค่าการแข็งตัวของเลือด

ผลการศึกษาความแตกต่างของค่าการแข็งตัวของเลือด (ค่า PT และ APTT) ในหนู Mlac:WR อันเนื่องมาจากอิทธิพลของเพศ ดังแสดงในตารางที่ 1

และ 2 ตามลำดับ พบว่าทุกช่วงอายุของสัตว์ทดลองค่า PT ในหนูเพศผู้จะนานกว่าในเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ (4–8 weeks; $p < 0.01$ ส่วน 10–12 weeks, 18–20 weeks และ > 35 weeks; $p < 0.001$) ในทางตรงกันข้ามในหนูเพศ Mlac:WR ที่อายุมากกว่า 10 สัปดาห์ขึ้นไปค่า APTT ในหนูเพศเมียกลับยาวนานกว่าในเพศผู้ อย่างมีนัยสำคัญ (10–12 weeks; $p < 0.05$ แต่ที่ 18–20 weeks และ > 35 weeks; $p < 0.001$)

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบค่า PT ของหนู Mlac:WR ระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่ช่วงอายุต่างๆ

AGE	n	Mean±SD	Median	Mean rank	Max	Min	%CV
Male							
4–8 Weeks	20	7.3±0.18	7.30	25.45**	7.7	6.9	2.48
10–12 Weeks	20	8.5±0.24	8.50	30.10***	8.8	8.0	2.83
18–20 Weeks	20	7.8±0.22	7.80	28.25***	8.4	7.5	2.78
> 35 Weeks	20	7.7±0.39	7.85	26.45***	8.2	6.9	5.04
Female							
4–8 Weeks	19	7.1±0.20	7.10	14.26	7.5	6.7	2.77
10–12 Weeks	20	7.7±0.37	7.75	10.90	8.2	6.9	4.82
18–20 Weeks	19	7.4±0.23	7.30	11.32	7.7	6.9	3.10
> 35 Weeks	20	7.3±0.20	7.40	14.55	7.7	6.8	2.74

หมายเหตุ: *Significant parameters at $p < 0.05$; **at $p < 0.01$ และ ***at $p < 0.001$

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบค่า APTT ของหนู Mlac:WR ระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่ช่วงอายุต่างๆ

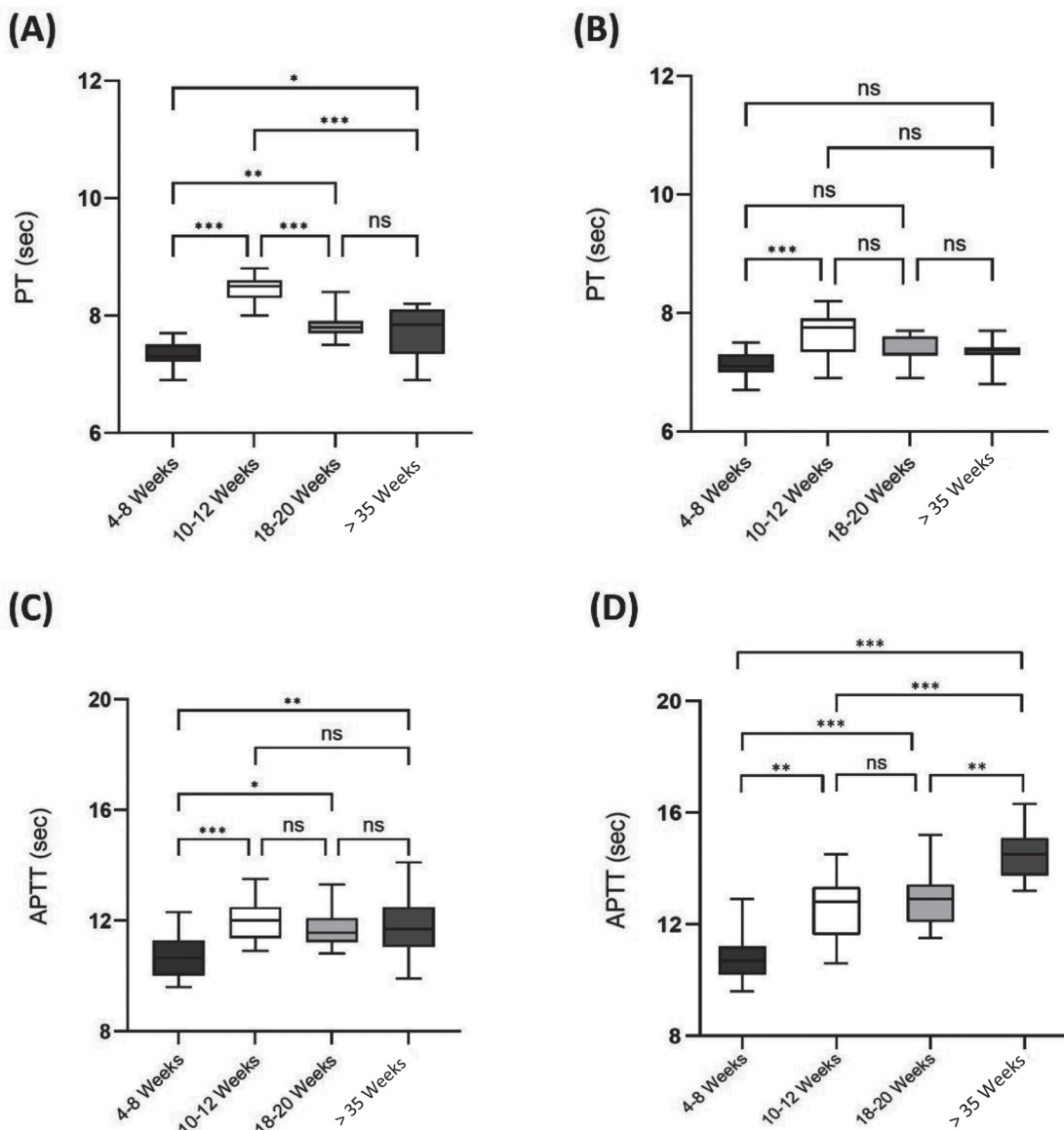
AGE	n	Mean±SD	Median	Mean rank	Max	Min	%CV
Male							
4–8 Weeks	20	10.7±0.81	10.65	19.78	12.3	9.6	7.60
10–12 Weeks	20	12.0±0.71	12.00	16.65	13.5	10.9	5.94
18–20 Weeks	20	11.7±0.65	11.55	12.93	13.3	10.8	5.59
> 35 Weeks	20	11.8±1.12	11.70	10.98	14.1	9.9	9.47
Female							
4–8 Weeks	19	10.8±0.84	10.70	20.24	12.9	9.6	7.81
10–12 Weeks	20	12.6±1.07	12.80	24.35*	14.5	10.6	8.51
18–20 Weeks	19	12.9±0.90	12.90	27.45***	15.2	11.5	6.96
> 35 Weeks	20	14.5±0.83	14.50	30.03***	16.3	13.2	5.71

หมายเหตุ: *Significant parameters at $p < 0.05$; **at $p < 0.01$ และ ***at $p < 0.001$

ค่าการแข็งตัวของเลือดอาจจะแตกต่างกันได้ในแต่ละช่วงอายุ

ในการศึกษาปัจจัยด้านอายุที่มีต่อค่าการแข็งตัวของเลือด พบว่าอายุส่งผลต่อค่า PT และ APTT ทั้งในหนู Mlac:WR เพศผู้และเพศเมีย ดังนี้ 1) ในหนูเพศผู้ ค่า PT ของแต่ละช่วงอายุมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นในช่วงอายุ 18–20 weeks และ > 35 weeks ที่ไม่พบความแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 1(A) 2) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่า PT

ในหนูเพศเมียของแต่ละช่วงอายุ ยกเว้นอายุ 4–8 weeks ที่แตกต่างจาก 10–12 weeks ดังแสดงในภาพที่ 1(B) 3) มีเพียงหนูก่อนวัยเจริญพันธุ์เพศผู้อายุ 4–8 weeks ที่มีค่า APTT แตกต่างจากช่วงอายุอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 1(C) และ 4) ค่า APTT ในหนูเพศเมียมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกช่วงอายุ ยกเว้นในหนู 10–12 weeks และ 18–20 weeks ที่ไม่พบความแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 1(D)



หมายเหตุ: *Significant parameters at $p < 0.05$; **at $p < 0.01$ ***at $p < 0.001$

ภาพที่ 1 กราฟแสดงความแตกต่างของค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR ที่ช่วงอายุต่างๆ (A) ค่า PT ในหนูเพศผู้, (B) ค่า PT ในหนูเพศเมีย, (C) ค่า APTT ในหนูเพศผู้ และ (D) ค่า APTT ในหนูเพศเมีย

การแช่แข็งตัวอย่าง citrate-plasma ส่งผลให้ค่าการแข็งตัวของเลือดเปลี่ยนแปลงไป

-20°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (freeze citrate-plasma) ดังแสดงในตารางที่ 3 ตามลำดับ

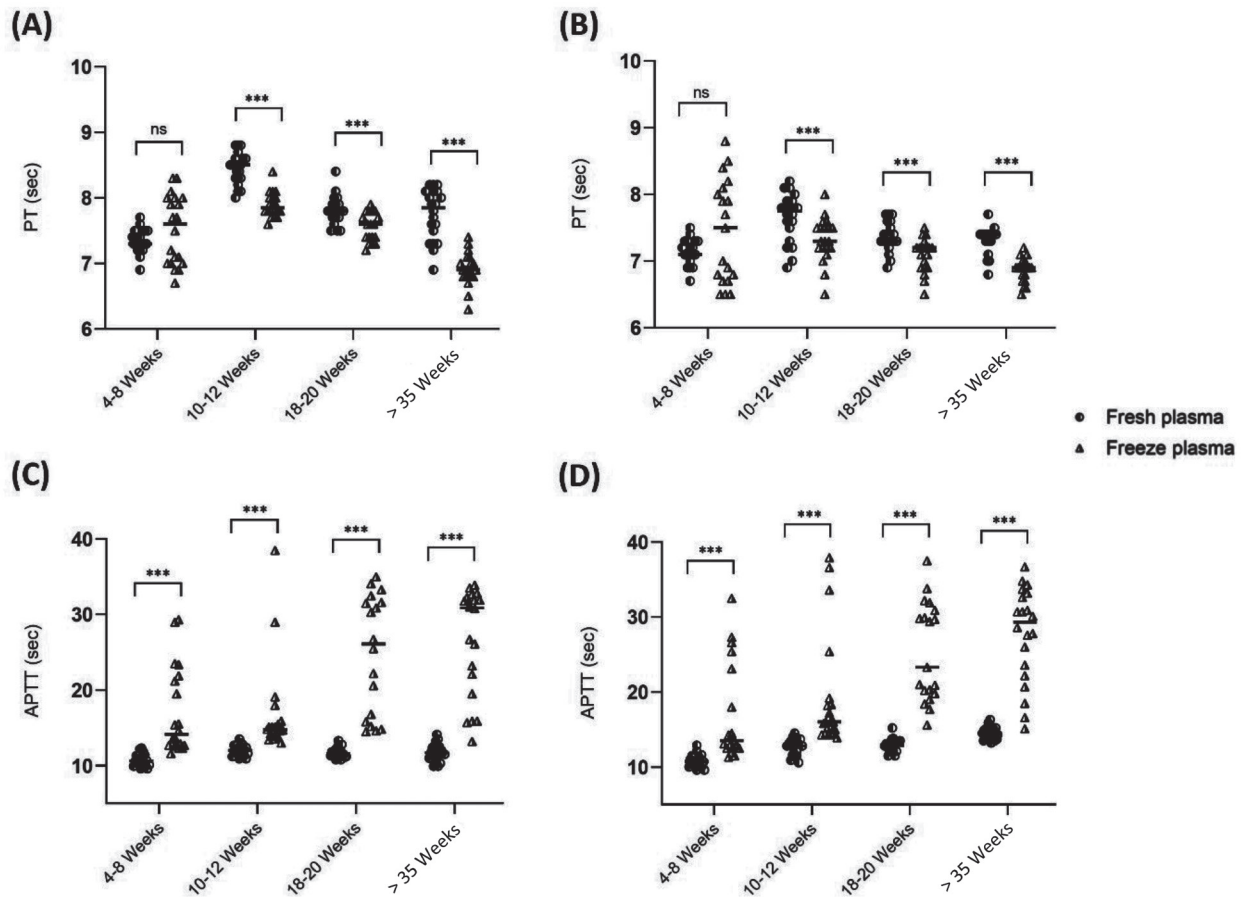
ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า PT และ APTT ของตัวอย่างจากหนู Mlac:WR ที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ

ตารางที่ 3 แสดงค่า PT และ APTT ของตัวอย่างในชุด freeze citrate-plasma

AGE	n	Mean±SD	Median	Max	Min	%CV
PT of Male						
4-8 Weeks	20	7.5±0.53	7.6	8.3	6.7	7.03
10-12 Weeks	20	7.9±0.19	7.9	8.4	7.6	2.38
18-20 Weeks	18	7.6±0.22	7.6	7.9	7.2	2.91
> 35 Weeks	20	6.9±0.25	6.9	7.4	6.3	3.66
PT of Female						
4-8 Weeks	19	7.4±0.77	7.5	8.8	6.5	10.9
10-12 Weeks	20	7.3±0.33	7.3	8.0	6.5	4.51
18-20 Weeks	19	7.1±0.26	7.2	7.5	6.5	3.61
> 35 Weeks	20	6.9±0.18	6.9	7.2	6.5	2.60
APTT of Male						
4-8 Weeks	20	17.0±5.73	14.2	29.3	11.6	33.68
10-12 Weeks	20	16.8±6.17	14.8	38.5	13.0	36.73
18-20 Weeks	18	24.8±7.88	26.1	35.0	14.5	31.82
> 35 Weeks	20	26.6±7.11	30.9	33.9	13.2	26.72
APTT of Female						
4-8 Weeks	19	16.9±6.57	13.5	32.5	11.3	38.94
10-12 Weeks	20	19.4±7.65	16.0	37.9	13.9	39.45
18-20 Weeks	19	25.3±6.60	23.3	37.5	15.6	26.04
> 35 Weeks	20	27.7±6.35	29.4	36.7	15.1	22.90

การทดสอบเพื่อดูความแตกต่างของค่าการแข็งตัวของเลือดระหว่าง citrate-plasma ที่ถูกนำไปตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดทันทีภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่าง (fresh citrate-plasma) และ citrate-plasma ที่ถูกเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำมาทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือด (freeze citrate-plasma) พบว่าค่า PT ในกลุ่ม freeze citrate-plasma ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ที่ $p < 0.001$ ในเกือบทุกช่วงอายุ ยกเว้นในหนูช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์อายุ 4-8 weeks ทั้งในเพศผู้และเพศเมียที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 2(A) และ 2(B) ซึ่งสวนทางกับค่า APTT ที่ตัวอย่างในชุด freeze citrate-plasma กลับมีค่ายาวนานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ ในทุกช่วงอายุทั้งเพศผู้และเพศเมีย ดังแสดงในภาพที่ 2(C) และ 2(D)



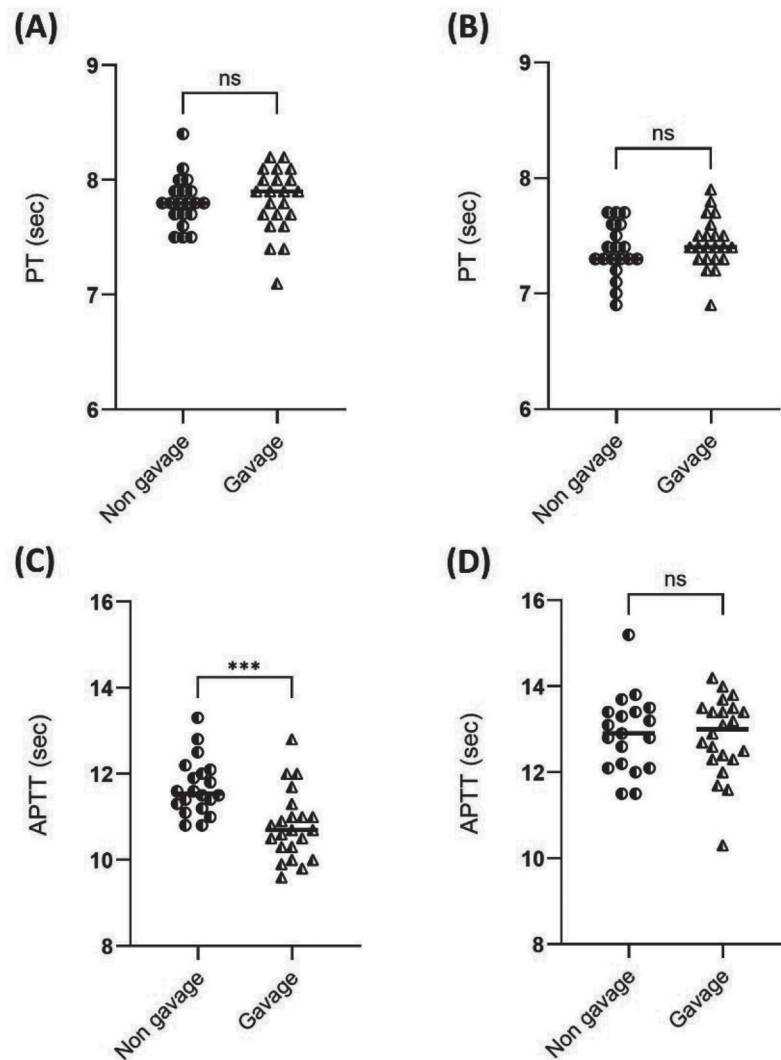
หมายเหตุ: *Significant parameters at $p < 0.05$; **at $p < 0.01$ ***at $p < 0.001$

ภาพที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าการแข็งตัวของเลือด โดยเปรียบเทียบระหว่าง fresh citrate-plasma และ freeze citrate-plasma; (A) ค่า PT ในหนูเพศผู้, (B) ค่า PT ในหนูเพศเมีย, (C) ค่า APTT ในหนูเพศผู้ และ (D) ค่า APTT ในหนูเพศเมีย

ค่าการแข็งตัวของเลือดในสัตว์ทดลองที่ผ่านการทำ oral gavage

เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของการทำ oral gavage ต่อค่าการแข็งตัวของเลือด หนู Mlac:WR ทั้งเพศผู้และเพศเมียถูกป้อน sterile water ด้วยวิธี oral gavage วันละ 1 ครั้ง ต่อเนื่องกัน เป็นระยะเวลา 90 วัน แล้วนำค่าการแข็งตัวของเลือดมาเปรียบเทียบกับหนูก่อนที่ไม่ได้ผ่านการทำ oral gavage ที่มีอายุใกล้เคียงกัน (หนูก่อน

18–20 weeks) ดังแสดงในภาพที่ 3 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการทำ oral gavage ไม่ส่งผลต่อค่า PT ทั้งในหนูเพศผู้และเพศเมีย ดังแสดงในภาพ 3(A) และ 3(B) อีกทั้งยังไม่ส่งผลต่อค่า APTT ในหนูเพศเมียอีกด้วย ดังแสดงในภาพ 3(D) แต่กลับส่งผลต่อค่า APTT ในหนูเพศผู้ให้สั้นกว่าหนูก่อน non-oral gavage อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ ดังแสดงในภาพ 3(C)



หมายเหตุ: *Significant parameters at $p < 0.05$; **at $p < 0.01$ ***at $p < 0.001$

ภาพที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบค่าการแข็งตัวของเลือดของหนู Mlac:WR ระหว่างกลุ่มที่ผ่านการทำและไม่ได้ทำ oral gavage (A) ค่า PT ในหนูเพศผู้, (B) ค่า PT ในหนูเพศเมีย, (C) ค่า APTT ในหนูเพศผู้ และ (D) ค่า APTT ในหนูเพศเมีย

วิจารณ์

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติเป็นหน่วยงานหลักของประเทศที่เปิดให้บริการการทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ ทั้งนี้ศูนย์ฯ ได้เลือกใช้หนู Wistar rat สายพันธุ์ Mlac:WR ที่ศูนย์ฯ ผลิตขึ้นเองมาเป็น animal model สำหรับการทดสอบความเป็นพิษใน OECD test guideline no.407 และ 408 เป็นต้น และเพื่อเป็นการประเมินความเป็นพิษของสารทดสอบที่มีต่อระบบการแข็งตัวของเลือดศูนย์ฯ จำเป็นต้องขยายขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดขึ้น

ได้แก่ PT และ APTT เพื่อมารองรับการทดสอบและช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบความเป็นพิษให้มากยิ่งขึ้น แต่เนื่องจากศูนย์ฯ ยังไม่เคยศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในสัตว์ทดลองใดๆ ที่ผลิตได้เองมาก่อน จึงตัดสินใจเลือกศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat สายพันธุ์ Mlac:WR เป็นอันดับแรกเนื่องจากเป็นสายพันธุ์หลักที่ใช้ในงานทดสอบความเป็นพิษและอาจเป็นประโยชน์ต่องานทดสอบความเป็นพิษของศูนย์ฯ ในอนาคตได้

ในอดีตมีคณะทำงานที่ได้ศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat มาก่อน เช่น คณะทำงานของ Lemini C และคณะ ซึ่งระบุค่า PT และ APTT ของหนู Wistar rat โตเต็มวัยเพศผู้ เท่ากับ 16.9 ± 0.30 และ 22.5 ± 0.60 ตามลำดับ ส่วนในเพศเมียโตเต็มวัยมีค่า PT และ APTT เป็น 18.4 ± 0.20 และ 19.7 ± 0.40 ตามลำดับ⁽¹³⁾ ในการศึกษาของ Goyal VK และคณะ ที่รายงานค่า PT และ APTT ในหนู Wistar rat อายุ 6-8 สัปดาห์ เพศผู้เป็น 15.32 ± 0.78 และ 13.15 ± 1.63 ตามลำดับ และในเพศเมียมีค่า 16.72 ± 0.99 และ 12.28 ± 1.72 ตามลำดับ⁽¹⁴⁾ จะเห็นได้ว่าค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat ของแต่ละคณะทำงานมีค่าที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก แม้ว่าจะทำการทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือดในสัตว์ species เดียวกันก็ตาม อาจเนื่องมาจาก experimental conditions ที่ใช้ในการทดสอบของแต่ละห้องปฏิบัติการนั้นแตกต่างกัน อาทิ วิธีการเก็บตัวอย่างหรือตำแหน่งที่ใช้เจาะเก็บตัวอย่าง ชนิดและความเข้มข้นของ anticoagulant ที่เลือกใช้ นิยมใช้ sodium citrate ที่ 3.2% หรือ 3.8% ระยะเวลาและวิธีการเก็บเพื่อรักษาสภาพของตัวอย่างก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ และที่สำคัญที่สุด คือ coagulation test reagents และเครื่องตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดที่เลือกใช้⁽¹³⁾ ในการเก็บตัวอย่างเลือดสำหรับตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือด นิยมใช้สารประกอบ citrate เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยใช้เลือด 9 ส่วน ผสมกับ citrate 1 ส่วน หากเก็บเลือดได้ปริมาณน้อยกว่าที่กำหนดหรือการที่สัตว์มีค่า hematocrit ที่สูงผิดปกติเนื่องจากมีภาวะ dehydration จะทำให้อัตราส่วนของ citrate เพิ่มขึ้น ซึ่งการมี citrate ที่เข้มข้นเกินไปจะสามารถเหนี่ยวนำให้ค่า PT และ APTT ยาวนานกว่าปกติได้⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ PT reagent มักจะเป็นส่วนผสมระหว่าง tissue thromboplastin และ Ca^{2+} ส่วน APTT reagent ประกอบด้วย surface activator, phospholipid และ Ca^{2+} ซึ่งผู้ผลิตแต่ละบริษัทจะมีสูตรและส่วนผสมที่ต่างกัน ในการวัดค่า PT และ APTT เป็นการวัดการเกิด clot formation หลังจากเติม PT/APTT reagent ลงไปในปฏิกิริยา และหลักในการวัดปฏิกิริยาการเกิด plasma clotting ของ

เครื่องตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดทั่วไปมี 2 วิธี ได้แก่ 1) monitoring turbidity of plasma during plasma coagulation และ 2) monitoring plasma viscosity during coagulation^(4,19) ดังนั้นค่า PT และ APTT ของแต่ละห้องปฏิบัติการอาจต่างกันได้ถึงแม้จะทดสอบในสัตว์สายพันธุ์เดียวกัน ทั้งนี้ขึ้นกับ coagulation test reagents และเครื่องมือที่ใช้ ซึ่งอาจมีหลักการตรวจและให้ equipment sensitivity ที่ต่างกัน

ในการศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat ของ Lemini C และคณะ พบว่าเพศของหนู Wistar rat ส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือด ซึ่งอาจเกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมนเพศ โดยพบว่าค่า PT และ APTT ของหนู Wistar rat เพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ (ovariectomized Wistar rat) กับหนู Wistar rat เพศผู้ มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ⁽¹³⁾ สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ที่พบว่าฮอร์โมน estrogen สามารถทำให้ค่า PT สั้นลงได้⁽²⁰⁾ อีกทั้งมีการศึกษาที่พบว่าฮอร์โมน 17β -oestradiol มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ blood coagulation factor gene และ transcription factor ของ factor XII ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการ coagulation cascade activation รวมไปถึงการเกิด fibrinolysis อีกด้วย^(21,22) ผลการศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR ของการศึกษานี้พบว่าค่า PT ในหนูเพศเมียสั้นกว่าในหนูเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเกิดจากอิทธิพลของ steroid sex hormones ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ร่วมกับการให้สัตว์ทดลองทำ fasting ในคืนก่อนที่จะตรวจวิเคราะห์อีกด้วย จึงมีผลให้ค่า PT ในหนูเพศผู้สั้นขึ้นกว่าปกติได้⁽²³⁾ ในทางตรงกันข้ามค่า APTT ของหนู Mlac:WR เพศเมียบกลับมีค่าที่นานกว่าในเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญ การที่ค่า APTT ของหนูเพศ Mlac:WR ในเพศเมียใช้เวลานานกว่าในเพศผู้ขัดแย้งกับผลของการศึกษาค่า APTT ในหนู Wistar rat ของคณะทำงานอื่นๆ ที่ค่า APTT ในเพศผู้และเมียมักจะใกล้เคียงกันหรือเพศเมียสั้นกว่าเล็กน้อย^(13,14) ซึ่งยังไม่ทราบเหตุผลที่แน่ชัดว่าเป็นเพราะเหตุใด แต่อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณสัดส่วนของ fibrinogen หรือ coagulation factors

ในส่วนของ intrinsic pathway ในหนู Mlac:WR เพศเมียน่าจะมีในระดับที่ต่ำกว่าในเพศผู้ จึงส่งผลให้เกิด plasma clot หลังจากโดนกระตุ้นได้ช้ากว่าในเพศผู้ ก็เป็นไปได้ว่าจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

ในแง่ปัจจัยด้านอายุที่มีต่อค่าการแข็งตัวของเลือด ได้เลือกศึกษาหนู Mlac:WR ทั้งหมด 4 ช่วงอายุ เพื่อเป็นตัวแทนระยะพัฒนาการของหนูในช่วงต่างๆ และสัมพันธ์กับการใช้งาน ดังนี้ 1) หนู 4-8 สัปดาห์ เป็นตัวแทนของหนูก่อนวัยเจริญพันธุ์หรือหนูเด็ก โดยในงานทดสอบความเป็นพิษมักเริ่มให้สารทดสอบในช่วงอายุนี้นี้ (นิยม treat สารทดสอบในหนูอายุ 5-6 สัปดาห์) 2) หนู 10-12 สัปดาห์ เป็นตัวแทนของหนูวัยเจริญพันธุ์หรือวัยรุ่น เป็นช่วงอายุที่เริ่มจับมาผสมพันธุ์ได้ อีกทั้งเป็นช่วงที่อายุใกล้เคียงกับหนูที่ผ่านโครงการ repeated dose 28-days oral toxicity study in rodents 3) หนู 18-20 สัปดาห์ เป็นตัวแทนของหนูโตเต็มวัย และมีอายุใกล้เคียงกับหนูที่ผ่านโครงการ repeated dose 90-days oral toxicity study in rodents และ 4) หนูอายุมากกว่า 35 สัปดาห์ เป็นตัวแทนของหนูที่เริ่มเข้าสู่วัยชราหรือเสื่อมสภาพ จากผลการเปรียบเทียบค่าการแข็งตัวของเลือดในหนูแต่ละช่วงอายุ พบว่าอายุส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือด (PT และ APTT) ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย โดยหนูก่อนวัยเจริญพันธุ์มักให้ค่าการแข็งตัวของเลือดที่สั้นกว่าช่วงอายุอื่นๆ และค่าการแข็งตัวของเลือดจะค่อนข้างเสถียรเมื่อหนูเริ่มโตเต็มวัย ซึ่งระบบต่างๆ ภายในร่างกายได้พัฒนาอย่างสมบูรณ์เต็มที่แล้ว สังเกตได้จากค่าการแข็งตัวของเลือดในหนูช่วงอายุ 18-20 สัปดาห์ และช่วงอายุมากกว่า 35 สัปดาห์ มักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นค่า APTT ของในหนูเพศเมีย การที่อายุส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือด อาจเป็นเพราะแต่ละช่วงอายุมีพัฒนาการของระบบต่างๆ รวมถึงระบบการแข็งตัวของเลือด ปริมาณของเกล็ดเลือด และระดับฮอร์โมนที่ต่างกันในแต่ละช่วงอายุ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าอายุมีความเกี่ยวข้องกับค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางเคมีคลินิกของหนู Wistar rat^(24,25)

แม้จะมีการแนะนำให้ตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดทันทีหลังจากเก็บตัวอย่าง แต่ในความเป็นจริง

แล้วห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มักไม่สามารถทดสอบตัวอย่างได้ในทันที เนื่องจากข้อจำกัดต่างๆ เช่น จำนวนสัตว์ทดลองที่ต้องเก็บตัวอย่างในคราวเดียวกันมีจำนวนมาก ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างที่ยุ่งยากและต้องใช้เวลา จำนวนเครื่องมือหรือแม้แต่ผู้ปฏิบัติงานไม่สอดคล้องกับจำนวนตัวอย่าง เป็นต้น ในกรณีที่ไม่สามารถทดสอบตัวอย่างในวันเดียวกับที่มีการเก็บตัวอย่างได้ ห้องปฏิบัติการบางแห่งจึงเลือกนำตัวอย่างไปแช่แข็งเพื่อรักษาสภาพของตัวอย่างก่อนนำไปตรวจในวันถัดไป ดังนั้นการทดสอบความเสถียรของตัวอย่างเพื่อศึกษาผลกระทบของการเก็บรักษาทั้งในแง่ของระยะเวลาและอุณหภูมิอาจมีความจำเป็น เพื่อให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือและสอดคล้องกับค่าจริงให้มากที่สุด ตามที่ CLSI guidelines ได้แนะนำว่าการตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดควรปฏิบัติให้เสร็จสิ้นภายใน 2-4 ชั่วโมง หากตัวอย่าง plasma อยู่ภายใต้อุณหภูมิห้อง แต่สามารถเก็บตัวอย่าง plasma ได้นานถึง 2 สัปดาห์ หากเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C ⁽¹²⁾ การศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดสอบความเสถียรของตัวอย่างตามข้อแนะนำดังกล่าวและพบว่า freeze citrate-plasma ของหนู Mlac:WR ที่ผ่านการแช่แข็งที่ตู้ -20°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำให้ค่า PT และ APTT เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีผลให้ค่า PT สั้นลง แต่ทำให้ค่า APTT ยาวนานขึ้น ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Goyal VK และคณะ ที่แสดงให้เห็นว่าแม้จะแช่แข็ง citrate-plasma ของหนู wistar rat ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถทำให้ค่า PT และ APTT เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญได้เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง citrate-plasma ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ทันทีหลังจากเก็บตัวอย่าง⁽¹⁴⁾ การที่ค่าการแข็งตัวของเลือดในตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็งเปลี่ยนแปลงไป อาจเนื่องมาจากการสูญเสียหรือลดประสิทธิภาพการทำงานของโปรตีนที่เป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือด มีรายงานระบุว่าค่า PT และ APTT ที่ยาวนานขึ้นมีความสัมพันธ์กับการลดปริมาณของโปรตีนที่เป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือด factor ไต factor หนึ่งอย่างมีนัยสำคัญ⁽²⁶⁾ นอกจากนี้ความล่าช้าในการขนส่งและการเตรียมตัวอย่าง อาจทำให้ factor

ที่มีความเสถียรค่อนข้างต่ำ อย่าง factor V และ VIII ลดปริมาณลง จึงส่งผลให้กระบวนการ clotting เกิดได้ช้าลงตามไปด้วย⁽²⁷⁾ อย่างไรก็ตามค่า PT ของ freeze citrate-plasma ในการศึกษานี้กลับสั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับ fresh citrate-plasma ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดว่าเพราะเหตุใด แต่เคยมีรายงานว่า factor VII ซึ่งเป็น coagulation factor ในส่วนของ extrinsic pathway เป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่มีความ stable มากสามารถทนต่ออุณหภูมิต่างๆ และใช้เวลาการสลายตัวค่อนข้างนานกว่า factor อื่นๆ^(12,28,29) แต่สามารถถูกกระตุ้นการทำงานได้ด้วยความเย็น (Cold activation)⁽³⁰⁾ การได้รับสารกระตุ้น เช่น kaolin⁽³¹⁾ และ Microclot ที่ปะปนในตัวอย่างที่มีกระบวนการจัดการที่ไม่เหมาะสม⁽¹²⁾ ซึ่งสามารถส่งผลให้ค่า PT สั้นลงกว่าปกติได้

การทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ฟันแทะที่ได้รับสารทดสอบผ่านทางปากในบางโครงการ อาจต้องใช้วิธี oral gavage ในการช่วยส่งสารทดสอบเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ทดลอง เพื่อให้แน่ใจว่าสัตว์ทดลองจะได้รับปริมาณยาที่ถูกต้องตามที่กำหนดและมีความสม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการทำ oral gavage ในสัตว์ทดลองอย่างต่อเนื่องสามารถทำให้สัตว์เกิดความเครียด รวมถึงเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ และมีระดับ corticosteroid ใน plasma สูงขึ้นได้^(9,10) เพื่อทดสอบผลการทำ oral gavage ในสัตว์ทดลองซ้ำๆ ว่าจะส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือดหรือไม่ คณะผู้วิจัยจึงได้จำลองกลุ่มสัตว์ทดลองให้คล้ายกับกลุ่ม control ในงาน repeated dose 90-days oral toxicity study in rodents ของ OECD test guideline no.408 โดยป้อน sterile water ผ่านวิธี oral gavage ให้แก่หนู Mlac:WR วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 90 วันต่อเนื่องกัน แล้ววัดค่าการแข็งตัวของเลือดเปรียบเทียบกับ หนู Mlac:WR ที่ไม่ได้ผ่านการทำ oral gavage ที่มีช่วงอายุเดียวกัน (18-20 สัปดาห์) เป็นตัวเปรียบเทียบ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหนู Mlac:WR ที่ผ่านการทำ oral gavage ให้ค่าการแข็งตัวของเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่ม non-oral gavage ยกเว้นค่า APTT ของหนูเพศผู้ที่สั้นลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม oral gavage การที่ค่า APTT

ในกลุ่ม oral gavage สั้นกว่านั้น อาจเชื่อมโยงกับสภาวะความเครียดที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการทำ oral gavage ในสัตว์ทดลองกลุ่มนี้ (stress-induced hypercoagulability) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่าความเครียดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งฮอร์โมน cortisol ออกมาได้ โดยฮอร์โมนชนิดนี้มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์และการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง factor VIII, vWF และ fibrinogen ซึ่งเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการห้ามเลือดในฝั่ง intrinsic pathway^(32,33) อย่างไรก็ตามประเด็นความแตกต่างที่ปรากฏเฉพาะในหนูเพศผู้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อหาข้อสรุปที่แน่ชัดต่อไป แม้การศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR ในครั้งนี้จะใช้จำนวนตัวอย่างเพียงกลุ่มละประมาณ 20 ตัวเท่านั้น แต่ทำให้เห็นแนวโน้มและทราบถึงปัจจัยต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR อย่างคร่าวๆ ได้ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นแนวทางในการตัดสินใจเลือกกระบวนการตรวจวิเคราะห์และการเลือกตัวอย่างให้เหมาะสมกับการเป็นตัวแทนกลุ่ม เพื่อนำมาใช้ในการจัดทำค่า reference interval ในอนาคต ที่จำเพาะเจาะจง และสามารถสะท้อนถึงสภาวะของระบบการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR ที่แท้จริงได้

สรุป

การศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR ในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าเพศ อายุ กระบวนการจัดการกับตัวอย่าง daily activity ที่ต่างกันของกลุ่มตัวอย่าง และ experimental conditions ที่เลือกใช้ในการทดสอบอาจส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือดได้ การทราบถึงปัจจัยต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือดนอกจากจะทำให้หลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงที่อาจส่งผลให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่สะท้อนกับภาวะสุขภาพของสัตว์ทดลองอย่างแท้จริงแล้ว ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการจัดทำค่า reference interval ในอนาคตได้ ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่แต่ละห้องปฏิบัติการต้องเป็นผู้กำหนดค่า reference interval ด้วยตัวเอง เพื่อให้มีความจำเพาะเจาะจงและเหมาะสมกับกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษามากยิ่งขึ้น

และเพิ่มความน่าเชื่อถือในการประเมินภาวะสุขภาพของสัตว์ทดลอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในงานทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองของผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์และเภสัชกรรม เช่น ยา สารเคมี สมุนไพร และวัคซีน เป็นต้น

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

การจัดเตรียมต้นฉบับของบทความนี้มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ Gemini (Google, USA) เพื่อช่วยในการสืบค้นวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องและช่วยปรับปรุงแก้ไขภาษาอังกฤษให้ถูกต้องตามหลักไวยากรณ์ยิ่งขึ้น ทั้งนี้ผู้พิมพ์ได้ตรวจสอบความถูกต้องเหมาะสมของเนื้อหาและเอกสารอ้างอิงด้วยตนเองแล้ว นอกจากนี้ได้มีการใช้ GraphPad Prism Software (version 10.5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ รวมถึงการสร้างกราฟและรูปภาพที่ได้จากการศึกษานี้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวัคซีนแห่งชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการดำเนินงานและอนุมัติให้เผยแพร่ผลงานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือดในหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ซึ่งเป็นข้อมูลภายใต้โครงการพัฒนาศักยภาพของการตรวจคุณภาพสัตว์ทดลอง เพื่อรองรับการผลิตวัคซีนของประเทศ ภายใต้สัญญาเลขที่ 2566.4/1 และ 2567.4/1 และขอขอบคุณ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Gale AJ. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol* 2011; 39(1): 273-80.
- Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 2014; 58(5): 515-23.
- Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation testing in the core laboratory. *Lab Med* 2017; 48(4): 295-313.
- Kurata M, Horii I. Blood coagulation tests in toxicological studies--review of methods and their significance for drug safety assessment. *J Toxicol Sci* 2004; 29(1): 13-32.
- Tomlinson L, Boone LI, Ramaiah L, Penraat KA, von Beust BR, Ameri M, et al. Best practices for veterinary toxicologic clinical pathology, with emphasis on the pharmaceutical and biotechnology industries. *Vet Clin Pathol* 2013; 42(3): 252-69.
- Zaidi SRH, Rout P. Interpretation of blood clotting studies and values (PT, PTT, aPTT, INR, anti-factor Xa, D-dimer) [updated 2025 Oct 8]. In: StatPearls. [online]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2026. [cited 2026 May 10]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK604215>.
- Levi M, Seligsohn U, Kaushansky K. Classification, clinical manifestations, and evaluation of disorders of hemostasis. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ, Caligiuri M, editors. *Williams hematology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2016. p. 1985-1992.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test Guideline No. 408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. [online]. 2025; [cited 2026 May 10]; [17 screens]. Available from: URL: https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2018/06/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_g1gh2931/9789264070707-en.pdf.
- Bonnichsen M, Dragsted N, Hansen AK. The welfare impact of gavaging laboratory rats. *Anim Welf* 2005; 14(3): 223-7.
- Brown AP, Dinger N, Levine BS. Stress produced by gavage administration in the rat. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2000; 39(1): 17-21.
- Clements PJM, Bolon B, McInnes E, Mukaratirwa S, Scudamore C. Chapter 17, Animal models in toxicologic research: rodents. In: Haschek and Rousseaux's handbook of

- toxicologic pathology Vol. 1. 4th ed. London: Academic Press; 2022. p. 653-694.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline. 5th ed. [online]. 2008; [cited 2026 May 10]; [11 screens]. Available from: URL: https://webstore.ansi.org/preview-pages/clsi/preview_h21-a5.pdf.
 13. Lemini C, Jaimez R, Franco Y. Gender and inter-species influence on coagulation tests of rats and mice. *Thromb Res* 2007; 120(3): 415-9.
 14. Goyal VK, Kakade S, Pandey SK, Gothi AK, Nirogi R. Determining the effect of storage conditions on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen concentration in rat plasma samples. *Lab Anim* 2015; 49(4): 311-8.
 15. Ingram GI, Hills M. The prothrombin time test: effect of varying citrate concentration. *Thromb Haemost* 1976; 36(1): 230-6.
 16. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *Am J Clin Pathol* 1997; 107(1): 105-10.
 17. O'Brien SR, Sellers TS, Meyer DJ. Artifactual prolongation of the activated partial thromboplastin time associated with hemoconcentration in dogs. *J Vet Intern Med* 1995; 9(3): 169-70.
 18. Kurata M, Noguchi N, Kasuga Y, Sugimoto T, Tanaka K, Hasegawa T. Prolongation of PT and APTT under excessive anticoagulant in plasma from rats and dogs. *J Toxicol Sci* 1998; 23(2): 149-53.
 19. Quick AJ, Stanley-Brown M, Bancroft FW. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Am J Med Sci* 1935; 190(4): 501-11.
 20. Jolly DW, Kadis BM, Nelson TE Jr. Estrogen and prothrombin synthesis. The prothrombinogenic action of estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 74(1): 41-9.
 21. Kaplan AP, Silverberg M. The coagulation-kinin pathway of human plasma. *Blood* 1987; 70(1): 1-15.
 22. Cushman M. Effects of hormone replacement therapy and estrogen receptor modulators on markers of inflammation and coagulation. *Am J Cardiol* 2002; 90(1 Suppl 1): F7-F10.
 23. Tabata H, Nakamura S, Matszawa T. Some species differences in the false prolongation of prothrombin times and activated partial thromboplastin times in toxicology. *Comp Haematol Int* 1995; 5: 140-4.
 24. Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, et al. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem* 2007; 388(5): 547-54.
 25. Patel S, Patel S, Kotadiya A, Patel S, Shrimali B, Joshi N, et al. Age-related changes in hematological and biochemical profiles of Wistar rats. *Lab Anim Res* 2024; 40(1): 7. (12 pages).
 26. Casella S, Giannetto C, Fazio F, Giudice E, Piccione G. Assessment of prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and fibrinogen concentration on equine plasma samples following different storage conditions. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21(5): 674-8.
 27. Favaloro EJ, Funk DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *Lab Med* 2012; 43(2): 1-10.
 28. Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-36.
 29. Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood

- transported at ambient temperature. *Thromb Haemost* 2008; 99(2): 416-26.
30. Seligsohn U, Zivelin A, Bar-Shani S. Cold-promoted activation of factor VII: is it a problem under blood bank conditions? *Haemostasis* 1983; 13(3): 186-91.
 31. Saito H, Ratnoff OD. Alteration of factor VII activity by activated Fletcher factor (a plasma kallikrein): a potential link between the intrinsic and extrinsic blood-clotting systems. *J Lab Clin Med* 1975; 85(3): 405-15.
 32. Obeagu EI. Stress-induced hemostasis: mechanisms and implications for health. *Ann Med Surg (Lond)* 2025; 87(6): 3300-9.
 33. von Känel R, Mills PJ, Fainman C, Dimsdale JE. Effects of psychological stress and psychiatric disorders on blood coagulation and fibrinolysis: a biobehavioral pathway to coronary artery disease?. *Psychosom Med* 2001; 63(4): 531-44.
-

Study of Blood Coagulation Parameters in Mlac:WR Rat Produced by the National Laboratory Animal Center

Kanda Veeravechsukij and Jirawat Khanongnoi

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

ABSTRACT Wistar rats have been used as animal models for testing the toxicity of pharmacological products. Blood coagulation tests are used to detect abnormalities in the blood clotting mechanism. Currently, the Wistar rats produced by the National Laboratory Animal Center have not been studied for their blood coagulation values. Therefore, this study measured the blood coagulation parameters, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT), in Mlac:WR rats using a SYSMEX CA-660 automated coagulation analyzer. The results showed that both sex and age significantly affected the mean PT and APTT values at the 95% confidence level ($p < 0.05$). In terms of stability, plasma samples stored at -20°C for 2 weeks prior to analysis tended to have shorter PT values but significantly prolonged APTT values ($p < 0.001$). Furthermore, Mlac:WR rats that received sterile water via oral gavage for 90 consecutive days showed no significant differences in coagulation values compared to the non-oral gavage group, except for the male APTT value, which significantly decreased in the oral gavage group ($p < 0.001$). This study demonstrates that sex, age, and variations in the daily routines of experimental animals, as well as pre-analytical sample storage conditions, can influence blood coagulation parameters in Wistar rats.

Keywords: Mlac:WR rat, Blood coagulation, Prothrombin time (PT), Activated partial thromboplastin time (APTT), Coagulation factors

การพัฒนาวิธีสกัดดีเอ็นเอจากกระดาศับเลือดแห้ง เพื่อการตรวจทางพันธุกรรม

กรรณิการ์ ปุณณภูมิ ภาวิณี อินนาค รจนาพรรณ ปันกาญจน์โต อรอนงค์ จาเรือน มะลิวัลย์ นุ่มนวล
รัชณีกร ใจชื่อ วิโรจน์ พงษ์ทับทิม ชรินทร์ทิพย์ เย็นยุดดี ปุณฺทริกา ไพบูลย์ศิริ และ หรรษา ไทยศรี
สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ การวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยีหาลำดับเบสยุคใหม่ ช่วยเพิ่มความแม่นยำและความครอบคลุมในการวินิจฉัยโรคพันธุกรรม รวมถึงการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิดจากตัวอย่างกระดาศับเลือดแห้ง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและประเมินวิธีสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกระดาศับเลือดแห้งให้เหมาะสมสำหรับเทคโนโลยีหาลำดับเบสยุคใหม่ โดยเปรียบเทียบวิธีสกัด 3 วิธี ได้แก่ ชุดสกัดสำเร็จรูป อนุภาคแม่เหล็กร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง และอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสสำเร็จรูป พร้อมเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดครบส่วนเป็นตัวอย่างอ้างอิง ผลการศึกษาจากอาสาสมัคร 5 ราย พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้ง 3 วิธี มีความเข้มข้นเฉลี่ย 5.28–6.88 ng/ μ l อัตราส่วนความบริสุทธิ์ A260/A280 และ A260/A230 อยู่ที่ 1.89–2.34 และ 0.2–1.4 ตามลำดับ มีความสมบูรณ์ (DNA Integrity Number: DIN) อยู่ที่ 8.8–9.9 เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งแบบ singleplex และ multiplex ได้ขนาดตามที่ระบุ (233–570 bp) และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DNA Nanoball Sequencing (DNBSEQ-E25) บนแพลตฟอร์ม MGI พบคุณภาพของการจับคู่กับจีโนมอ้างอิง ร้อยละ 99.85–99.87 ความครอบคลุมของการอ่าน 30 ครั้ง ร้อยละ 97.13–99.25 อัตราการซ้ำของลำดับดีเอ็นเอ ร้อยละ 7.87–9.11 และคุณภาพของการอ่านลำดับเบสถูกต้อง Q30 ร้อยละ 90.21–90.72 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้อนุภาคแม่เหล็กร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเองให้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอใกล้เคียงกับชุดสกัดสำเร็จรูป และมีความเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ความผิดปกติทางพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยีหาลำดับเบสยุคใหม่

คำสำคัญ: กระดาศับเลือดแห้ง, การสกัดดีเอ็นเอ, อนุภาคแม่เหล็ก, เทคโนโลยีการหาลำดับเบสยุคใหม่

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

Received: 2 February 2026

Revised: 17 June 2026

Accepted: 22 June 2026

บทนำ

การตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิด (new-born screening: NBS) เป็นมาตรการสำคัญของระบบสาธารณสุขที่ช่วยค้นหาความผิดปกติที่ยังไม่แสดงอาการในระยะเริ่มต้น การตรวจพบและให้การรักษาทันท่วงทีสามารถลดความรุนแรงของโรค เพิ่มคุณภาพชีวิต และลดภาระค่าใช้จ่ายด้านสาธารณสุขในระยะยาว การเก็บตัวอย่างที่ใช้กันแพร่หลายใน NBS คือ การใช้กระดาษซับเลือดแห้ง (dried blood spot: DBS) ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากสามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้จากการเจาะส้นเท้าโดยใช้เลือดเพียงเล็กน้อย⁽¹⁾ อีกทั้งยังเก็บรักษาและขนส่งได้สะดวกโดยไม่จำเป็นต้องใช้ระบบทำความเย็น ส่งผลให้ลดค่าใช้จ่ายด้านโลจิสติกส์ และเหมาะสมต่อการดำเนินงานตรวจคัดกรองในระดับประเทศ⁽²⁾ นอกจากนี้สารชีวโมเลกุลใน DBS ยังมีความคงตัวต่อการเก็บรักษากายได้สภาวะที่เหมาะสม⁽³⁾ และสามารถนำมาใช้ในการตรวจทางชีวเคมีและพันธุกรรมได้ และการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อบางชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽⁴⁻⁷⁾

เทคโนโลยีการหาลำดับเบสยุคใหม่ (next generation sequencing: NGS) ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในด้านการแพทย์ เช่น การวินิจฉัยโรคพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท โรคเลือด โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง⁽⁸⁻¹⁰⁾ การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี NGS ใน NBS จึงถือเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มศักยภาพในการตรวจคัดกรองในหลายด้าน ได้แก่ เพิ่มขอบเขตของโรคที่สามารถตรวจพบได้ สามารถตรวจพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับโรคต่างๆ ได้หลากหลายแม้จะไม่มีอาการแสดงออกในระดับเมตาบอไลต์ก็ตาม จากการศึกษาในสาธารณรัฐประชาชนจีนโดยใช้การหาลำดับพันธุกรรมเฉพาะชุดยีน (gene panel sequencing) ตรวจคัดกรองโรคหายากในทารกจำนวน 30,000 คน พบว่ามี 59 ราย ที่ตรวจไม่พบด้วยการตรวจชีวเคมีแต่พบโดย NGS คิดเป็นอุบัติการณ์ เท่ากับ 1 ต่อทารกแรกเกิด 500 ราย⁽¹¹⁻¹³⁾ ช่วยให้วางแผนการรักษาเชิงจำเพาะ ข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จาก NGS สามารถนำไปใช้กำหนดแนวทางดูแลเฉพาะบุคคล และให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมต่อครอบครัวได้อย่างแม่นยำ^(14,15) ลดอัตราการตรวจพบ

ผลบวกปลอม (false positive) และยืนยันการวินิจฉัยได้แม่นยำ เมื่อนำมาใช้ควบคู่กับการตรวจแบบดั้งเดิม^(16,17) แม้ทารกในหอผู้ป่วยวิกฤติทารกแรกเกิดที่เดิมไม่ได้ถูกพิจารณาว่าให้ตรวจพันธุกรรม แต่เมื่อตรวจด้วยการหาลำดับพันธุกรรมทั้งจีโนม พบโรคพันธุกรรม ร้อยละ 30 ในขณะที่ NBS แบบมาตรฐานพบผลบวกร้อยละ 3.6 และเมื่อตรวจยืนยันพบเป็นโรคจริง ร้อยละ 27 แต่ถ้าใช้การตรวจคัดกรองด้วยการหาลำดับพันธุกรรมทั้งจีโนม พบผลบวกร้อยละ 4.2 และทุกผลบวกนั้นตรวจยืนยันว่าเป็นโรคจริงทั้งหมด จึงเห็นได้ว่าการตรวจพันธุกรรมลดปัญหาผลการตรวจคลาดเคลื่อนจากวิธีมาตรฐานเดิม⁽¹⁸⁾ ภาวะสูญเสียการได้ยินเป็นหนึ่งในโรคที่สามารถตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ด้วยเทคโนโลยี targeted next generation sequencing (targeted NGS) ซึ่งมีบทบาทเพิ่มขึ้นในการตรวจวินิจฉัยทางพันธุกรรมและการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิด DBS เป็นวิธีมาตรฐานในการเก็บตัวอย่างเลือดในระบบการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิด และมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคโนโลยี NGS อย่างไรก็ดีตามปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ (DNA) ที่สกัดได้จาก DBS ยังคงเป็นข้อจำกัดสำคัญ เนื่องจากปริมาณ DNA มักต่ำกว่า DNA ที่สกัดจากเลือดครบส่วน (whole blood: WB) รวมถึงอาจได้รับผลกระทบจากสภาพการจัดเก็บตัวอย่างและสารยับยั้งปฏิกิริยา (inhibitors) ที่อาจมาจากส่วนประกอบของกระดาษหรือโปรตีนในเลือด ซึ่งอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม^(19,20)

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาวิธีสกัด DNA จาก DBS เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจทางพันธุกรรม โดยจะใช้สำหรับการตรวจหาภาวะสูญเสียการได้ยินเพื่อการคัดกรองทารกแรกเกิดในประเทศไทย แนวทางการศึกษามุ่งเน้นการพัฒนาและประเมินวิธีสกัด DNA จาก DBS ให้เหมาะสมสำหรับการใช้ร่วมกับเทคโนโลยี targeted NGS พัฒนาวิธีสกัด DNA จาก DBS โดยการเปรียบเทียบ 3 วิธี ได้แก่ วิธีที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (silica membrane column-based commercial kit) วิธีที่ใช้อนุภาคแม่เหล็ก (magnetic bead) ร่วมกับน้ำยาบัฟเฟอร์ไลซิสสำเร็จรูป และวิธีที่ใช้ magnetic

bead ร่วมกับน้ำยาบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง โดยประเมินคุณภาพ ปริมาณ และความสมบูรณ์ของ DNA พร้อมทั้งทดสอบความเหมาะสมในการนำไปใช้ในกระบวนการ downstream applications ได้แก่ Singleplex PCR, Multiplex PCR และการหาลำดับพันธุกรรมด้วย targeted NGS panel ในภาวะสูญเสียการได้ยิน (hearing loss) นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบผลลัพธ์ที่ได้จากการสกัด DNA จาก DBS และ WB เพื่อประเมินความแตกต่างด้านคุณภาพและประสิทธิภาพของ DNA ที่ได้จาก 2 ชนิดตัวอย่าง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้ใช้ whole blood (WB) และ dried blood spot (DBS) จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรงและมีอายุมากกว่า 18 ปี จำนวน 5 ราย ปริมาตร 5 ซีซี โดยตัวอย่าง DBS ได้จากการหยดเลือดอาสาสมัครลงบนกระดาศับเลือด (Cytiva 903, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อวง จำนวน 40 วง/อาสาสมัคร ตากกระดาศับเลือดที่อุณหภูมิห้อง โดยวางในแนวระนาบอย่างน้อย 3 ชั่วโมง บรรจุกระดาศับเลือดที่แห้งแล้วในซองอลูมิเนียมพร้อมซองดูดความชื้น เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C (REVCO, REVCO Scientific Inc., USA) ตัวอย่างเลือดที่เหลือนำไปสกัด DNA จาก WB ต่อไป

การสกัด genomic DNA (gDNA) จาก WB

การสกัด gDNA จาก WB ทำโดยการนำ WB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปสกัด DNA ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับชุดน้ำยา QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany)⁽²¹⁾ นำ gDNA ออกจากเมมเบรนด้วยสารละลาย TE low EDTA (ThermoFisher, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

การสกัด genomic DNA (gDNA) จาก DBS

การสกัด DNA จาก DBS ทำโดยเจาะ DBS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.2 มิลลิเมตร ตัวอย่างละ 5 วง ลงในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปสกัด DNA ด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่

วิธีที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปแบบ spin column ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany)⁽²¹⁾ นำ DNA ออกจากเมมเบรนด้วยสารละลาย TE low EDTA (ThermoFisher, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

วิธีที่ใช้อนุภาคแม่เหล็ก หรือ magnetic bead (KAPA Biosystems, USA) ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสสำเร็จรูป (Puregene Cell Lysis Solution, QIAGEN, Germany) โดยเติมบัฟเฟอร์ไลซิส ปริมาตร 495 ไมโครลิตร และ Proteinase K (Qiagen, Germany) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาในเตาหลุมไฟฟ้า (รุ่น SBH130D, Stuart, USA) ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาที และใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (รุ่น Centrifuge5420, Eppendorf, USA) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสเติม magnetic bead ปริมาตร 0.45 เท่าของสารละลายส่วนใส นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายวางบนแท่นแม่เหล็ก เป็นเวลา 5 นาที ที่ซึ่งส่วนสารละลายใสและล้างตะกอนด้วย 80% Ethanol (Merck, USA) จำนวน 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำ gDNA ออกจาก magnetic bead ด้วยสารละลาย TE low EDTA (ThermoFisher, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

วิธีที่ใช้ magnetic bead ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8.0 (Invitrogen, USA), 10 mM EDTA, disodium salt, pH 8.0 (Invitrogen, USA), 100 mM NaCl (ThermoFisher, USA), 2% w/v SDS (ThermoFisher, USA) จากนั้นดำเนินการสกัดตามขั้นตอนเดียวกับวิธีที่ 2 ข้างต้น

ประเมินคุณภาพและปริมาณของ gDNA

โดยวัดปริมาณด้วยเครื่อง Qubit Fluorometer (รุ่น Qubit 4, ThermoFisher, USA) วัดความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer (รุ่น 2000c, ThermoFisher, USA) และวัดความสมบูรณ์ด้วยเครื่อง Tape Station (รุ่น 4200, Agilent, USA) เก็บรักษา gDNA ที่อุณหภูมิ -20 °C จนถึงการใช้ในขั้นตอนต่อไป

การประเมินความใช้ได้ของ gDNA

ตรวจสอบความใช้ได้ของ gDNA ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลส (Phenylalanine hydroxylase: *PAH*) ที่ตำแหน่ง Exon 5, Exon 8, Exon 10 และ Exon 13 ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 233–507 bp⁽²²⁾ ดังแสดงในตารางที่ 1 และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAH* อ้างอิงตาม GenBank: Accession no. NG008690.2 จากฐานข้อมูล NCBI (The National Center for Biotechnology Information)⁽²³⁾ เตรียมส่วนผสม PCR master mix ของ KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit (KAPA

Biosystems, USA) โดยใช้ primers ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 nM และตัวอย่าง gDNA 10 ng ในปฏิกิริยา ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา⁽²⁴⁾ นำเข้าเครื่อง Thermal cycle (รุ่น ProFlex PCR System, Applied Biosystems, USA) ตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นในการทำ PCR ที่ 95°C นาน 3 นาที หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 35 รอบ โดยตั้งอุณหภูมิที่ 95°C นาน 15 วินาที ที่ 60°C นาน 30 วินาที และที่ 72°C นาน 30 วินาที เมื่อครบเพิ่มที่ 72°C นาน 1 นาที และตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยวิธี gel electrophoresis

ตารางที่ 1 รายละเอียด Forward และ Reverse primers สำหรับ exon 5, 8, 10 และ 13 ของยีน *PAH*

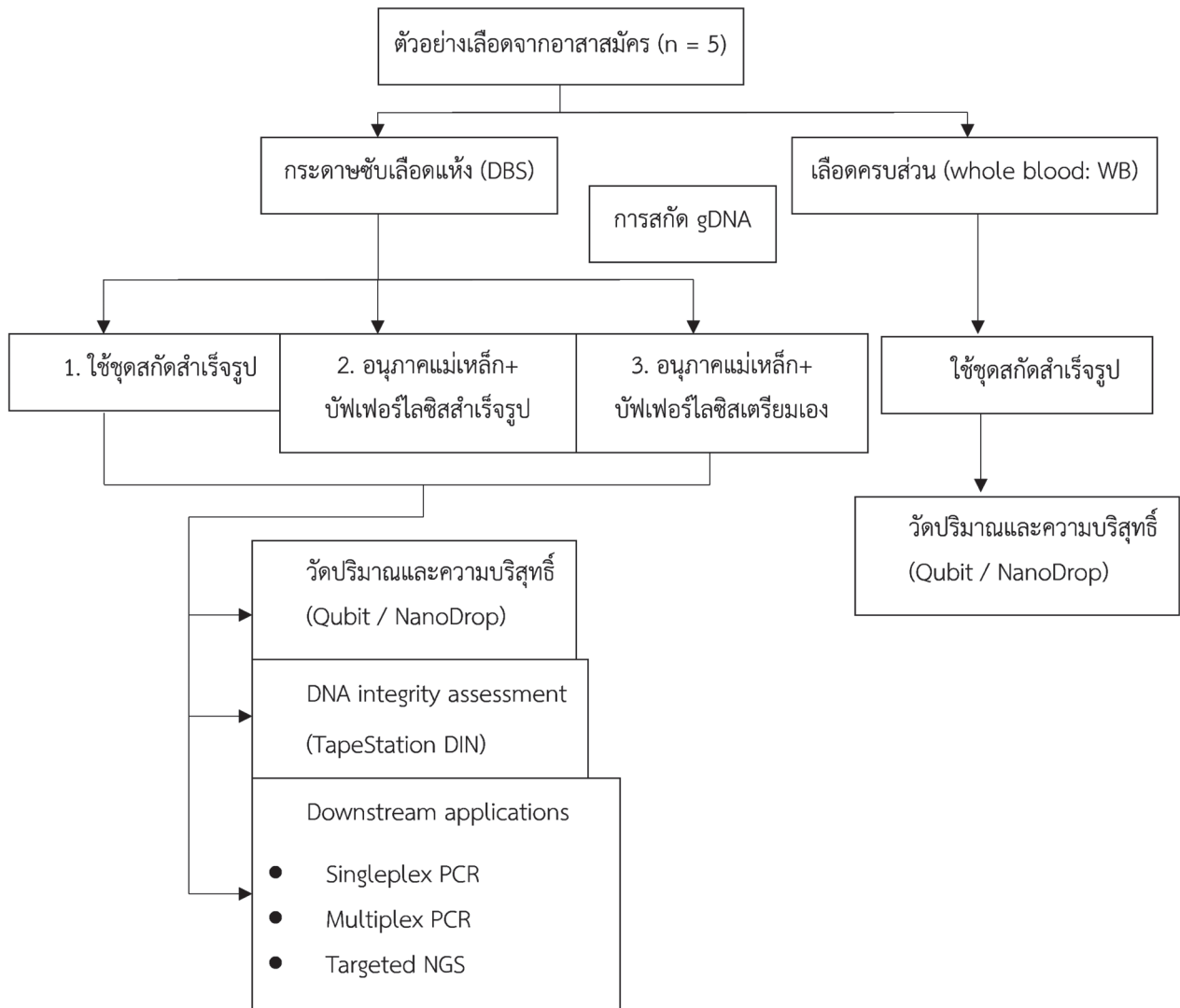
Primer Name	Sequence (5' to 3')	Position (Ref:NG008690.2)	Length (bp)	Tm (°C)	PCR Product size (bp)
5F	GCCCCATTCAAAGCATT	96668–85	18	53.5	233
5R	CCATCCTCAACTGGATGA	96883–900	18	50.9	
8F	GCCTTTTATGATCCCAACC	111489–507	19	50.8	383
8R	ACCACACACCCATTTTCAGGT	111852–71	20	56.8	
10F	TCATCCAGTCAAGGTGA	118910–26	17	49.1	297
10R	ACTGGAGAATGAGTTCCC	119189–206	18	50.9	
13F	TGAGGCTGTAAGCTCCTTGAA	124048–68	21	55.8	507
13R	CTTGAATGAAGCAGGTCCC	124536–54	19	53.5	

หมายเหตุ: Tm = melting temperature, F = Forward primer, R = Reverse primer และ ลำดับ primers ทั้งหมดแสดงในทิศทาง 5' to 3'

หาลำดับพันธุกรรมด้วย targeted NGS panel สำหรับโรคภาวะสูญเสียการได้ยิน (hearing loss) ด้วย platform DNBSEQ-E25 นำ gDNA ที่สกัดได้สร้าง libraries ซึ่งมีขั้นตอนการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ การเลือกชิ้นส่วน DNA ขนาด 300–500 bp เติม dATP บริเวณปลาย 3' ให้เป็น sticky end และติด index adapter ที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างเพื่อทำให้สามารถระบุตัวอย่างได้ ทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR นำ DNA libraries ที่เตรียมได้จากแต่ละตัวอย่างมารวมกัน ทำการ hybridize และ capture ยีนที่ต้องการด้วยชุดโพรบที่ออกแบบไว้ หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยทำการแยก DNA สายคู่จากการทำ DNA libraries ให้เป็น DNA สายเดี่ยว เพื่อทำเป็น single stranded DNA circle จากนั้นทำเป็น DNA

nanoball และนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNBSEQ-E25, MGI, China) ตามขั้นตอนกระบวนการของ DNBSEQ-E25 platform⁽²⁵⁾ วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อประเมินคุณภาพของการทำ NGS ในด้านการจับคู่กับจีโนมอ้างอิง (mapping quality) ความครอบคลุมในการอ่าน 30 ครั้ง (30x coverage) อัตราการซ้ำของลำดับ DNA (DNA duplicate rate) และคุณภาพของการอ่านลำดับเบสถูกต้อง (Phred quality score) ที่ Q30

ขั้นตอนแสดงกระบวนการสกัด DNA จาก DBS ด้วยวิธีต่างๆ และการประเมินคุณภาพ DNA สำหรับการนำไปใช้ในกระบวนการ downstream applications ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการสกัด DNA จากกระดาศับเลือด การประเมินคุณภาพ ปริมาณ และความใช้ได้ของ gDNA

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลเชิงปริมาณวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) และแสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและช่วงของข้อมูล

จริยธรรมการวิจัย

การวิจัยนี้ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เลขที่ DMSc-EC049 รหัสโครงการวิจัย 8/2567 วันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2568

ผล

วัดปริมาณ gDNA และความบริสุทธิ์ของ gDNA ที่สกัดได้จากตัวอย่าง WB และ DBS วิธีละ 5 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบ gDNA ในทุกวิธีการสกัดที่นำมาศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 2

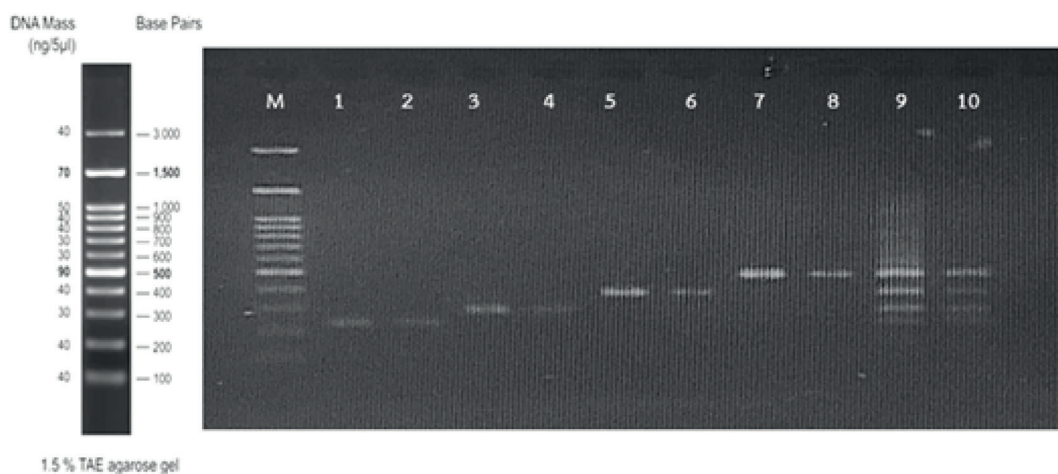
ตารางที่ 2 ผลการวัดปริมาณ gDNA ที่สกัดจากตัวอย่างเลือด (n = 5) และด้วยการสกัด 4 วิธี

วิธีสกัด	ชนิดของตัวอย่าง	ปริมาณเฉลี่ย (ng/ul) $\pm$ SD	ความบริสุทธิ์ A260/A280	ความบริสุทธิ์ A260/A230
ชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	WB	24.56 $\pm$ 6.99	2.09 $\pm$ 0.02	2.36 $\pm$ 0.09
ชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	DBS	6.87 $\pm$ 1.91	1.97 $\pm$ 0.06	1.33 $\pm$ 0.08
magnetic bead+บัฟเฟอร์ไลซิสสำเร็จรูป	DBS	6.88 $\pm$ 1.81	2.08 $\pm$ 0.14	0.26 $\pm$ 0.04
magnetic bead+บัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง	DBS	5.28 $\pm$ 1.48	2.01 $\pm$ 0.07	0.46 $\pm$ 0.05

หมายเหตุ: ค่าอัตราส่วน A260/A280 ใช้ประเมินความบริสุทธิ์ของ DNA (ค่าที่เหมาะสมประมาณ 1.8–2.0) ส่วนค่า A260/A230 ใช้ประเมินการปนเปื้อนของสารตกค้างจากกระบวนการสกัด (ค่าที่เหมาะสม > 2.0)

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งแบบ singleplex และ multiplex ด้วยวิธี gel electrophoresis ของ DNA จาก DBS ที่สกัดจากชุดสำเร็จรูปและ

ชุดสกัดที่เตรียมเอง ด้วยไพรเมอร์ของยีน *PAH* ที่ขนาด 233–507 bp พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ตามขนาดที่ระบุ ดังแสดงในภาพที่ 2



Lane M – DNA Marker 100 bp ladder (5 μ L)

DNA สกัดด้วยวิธีใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAamp DNA Blood Mini Kit)

Lane 1 – PCR Product Exon-5 (233 bp)

Lane 3 – PCR Product Exon-10 (297 bp)

Lane 5 – PCR Product Exon-8 (383 bp)

Lane 7 – PCR Product Exon-13 (507 bp)

Lane 9 – PCR Product Exon-5-8-10-13

DNA สกัดด้วย magnetic bead+บัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง

Lane 2 – PCR Product Exon-5 (233 bp)

Lane 4 – PCR Product Exon-10 (297 bp)

Lane 6 – PCR Product Exon-8 (383 bp)

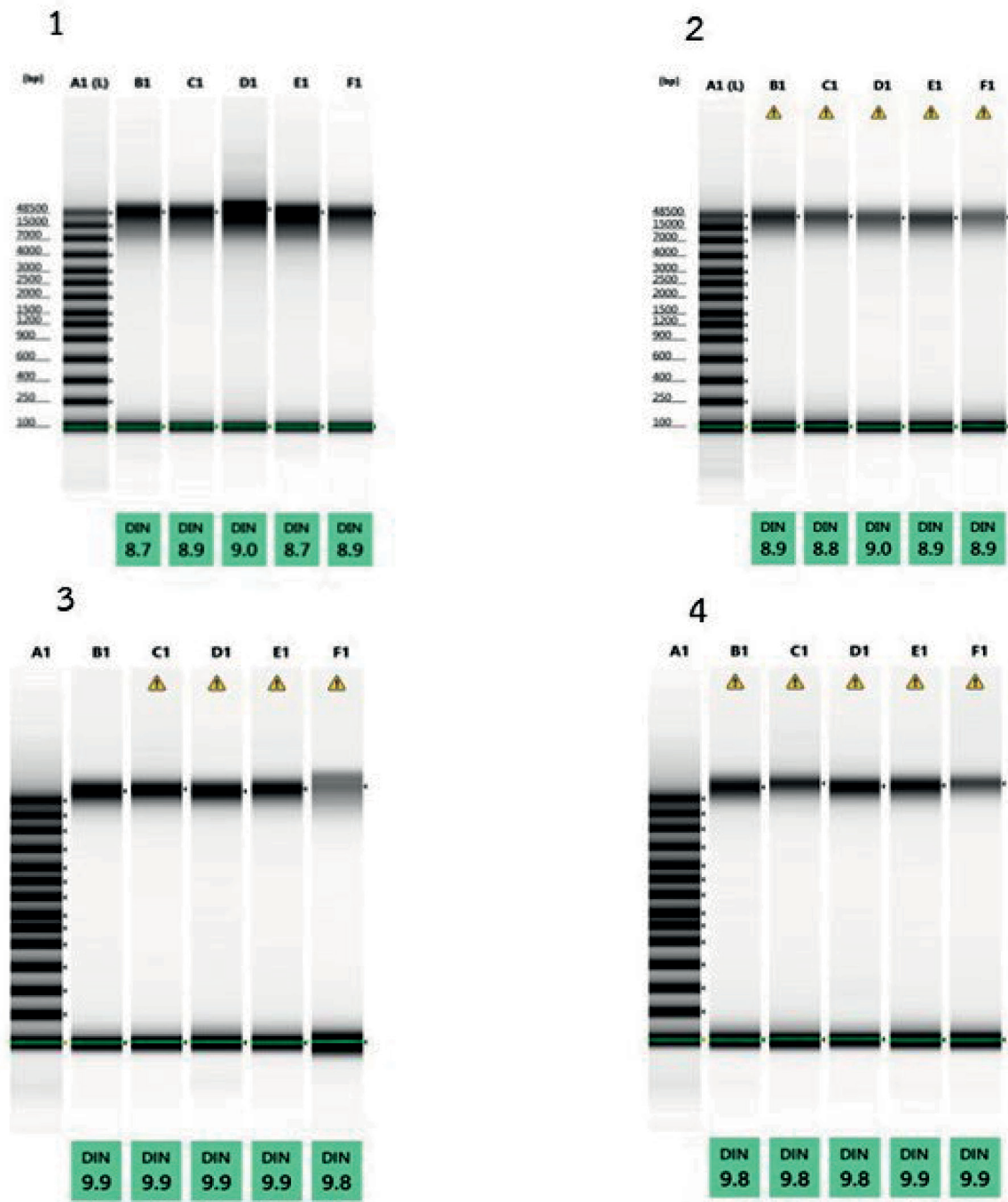
Lane 8 – PCR Product Exon-13 (507 bp)

Lane 10 – PCR Product Exon-5-8-10-13

ภาพที่ 2 แสดง PCR Products ของ DNA จาก DBS ที่สกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAamp DNA Blood Mini Kit) เปรียบเทียบกับ magnetic bead+บัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเองบน 1.5% Agarose gel

การตรวจสอบความสมบูรณ์ของ gDNA พบว่าทุกวิธีให้ DNA ที่มีความสมบูรณ์สูง โดยมีค่า DNA Integrity Number, DIN > 8 ซึ่งมีความเหมาะสม

ต่อการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วย NGS ต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงความสมบูรณ์ของ DNA ที่ได้จากตัวอย่างอาสาสมัคร 5 ตัวอย่าง และวิธีต่าง ๆ

- 1) WB: ชุดสกัดสำเร็จรูป
 - 2) DBS: ชุดสกัดสำเร็จรูป
 - 3) DBS: magnetic beads และบัฟเฟอร์ไลซิสชุดสกัดสำเร็จรูป
 - 4) DBS: magnetic beads และบัฟเฟอร์ไลซิสเตรียมเอง
- (Lane B1, C1, D1, E1, F1 หมายถึง ตัวอย่างอาสาสมัคร 1-5 ตามลำดับ)

การประเมินคุณภาพ gDNA ที่ได้จากตัวอย่าง และวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน โดยใช้ผลของข้อมูล การหาลำดับพันธุกรรมจากการทำ NGS ด้วยเทคนิค DNA Nanoball Sequencing (DNBSEQ-E25)

พบว่าทุกวิธีการสกัดมี mapping quality มากกว่า ร้อยละ 90 และ 30x coverage มากกว่าร้อยละ 97 แสดง ถึงคุณภาพของข้อมูลเชื่อถือได้ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลคุณภาพข้อมูลการหาลำดับพันธุกรรมจากตัวอย่างและวิธีสกัด DNA ที่แตกต่างกัน

ตัวอย่าง และวิธีสกัด	คุณภาพของการทำ NGS			
	mapping quality	30x coverage	DNA duplicate rate (%)	Phred quality score (Q30)
1) WB ชุดสกัดสำเร็จรูป	99.87	99.03	7.37	91.23
2) DBS ชุดสกัดสำเร็จรูป	99.85	99.25	9.11	90.72
3) DBS Magnetic bead ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสจากชุดสกัดสำเร็จรูป	99.89	98.75	7.99	90.41
4) DBS Magnetic bead ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง	99.87	97.13	7.87	90.21

หมายเหตุ: ข้อมูลคุณภาพการหาลำดับพันธุกรรมในตารางเป็นผลจากตัวอย่าง จำนวน 1 ราย ที่ผ่านการสกัด DNA ด้วยแต่ละวิธี

วิจารณ์

การประเมินปริมาณของ DNA จาก DBS ทั้ง 3 วิธีสกัด พบว่าวิธีที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปและ magnetic bead ทั้งร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสจากชุดสกัดสำเร็จรูปให้ ปริมาณใกล้เคียงกันและมากกว่าวิธีที่ใช้ magnetic bead ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง ซึ่งไม่สอดคล้อง กับงานวิจัยที่ได้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ว่า DNA จาก mag- netic bead ได้ปริมาณสูงกว่าชุดสกัดสำเร็จรูปที่เป็น column-base โดยเฉพาะเมื่อเริ่มต้นด้วยตัวอย่าง ที่มีปริมาณต่ำมีการสูญเสีย DNA ในขั้นตอนการจับ (binding) การล้าง (washing) น้อยกว่า ลดการตกค้าง ของ DNA ที่ column membrane⁽²⁶⁻²⁹⁾ ความไม่สอดคล้อง ดังกล่าวอาจอธิบายได้จากความแตกต่างของชนิดตัวอย่าง ที่ใช้ศึกษาโดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่จะใช้ WB หรือเซลล์เพาะเลี้ยง ในขณะที่ DBS เป็นตัวอย่างที่ผ่าน การทำให้แห้งและมีการตรึงของ DNA กับโปรตีนและ เส้นใยของกระดาษกรอง ส่งผลให้การปลดปล่อย DNA ในขั้นตอนไลซิสทำได้ยากกว่า หาก DNA ไม่ถูกปล่อย ออกมาอย่างสมบูรณ์ตั้งแต่ขั้นตอนแรกอาจทำให้ปริมาณ DNA ต่ำ นอกจากนี้บัฟเฟอร์ไลซิสสำเร็จรูปได้รับ

การออกแบบให้มืองค์ประกอบที่เหมาะสม ซึ่งช่วยทั้ง การสลายเซลล์และเพิ่มประสิทธิภาพของการจับ DNA กับ magnetic bead ในขณะที่บัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง อาจยังไม่สามารถสร้างสภาวะดังกล่าวได้อย่างเหมาะสม ส่งผลให้ DNA ถูกปล่อยออกมาไม่สมบูรณ์หรือจับกับ magnetic bead ไม่แน่นพอและสูญเสียในขั้นตอน การล้างในที่สุด ผลการตรวจสอบความสมบูรณ์ของ DNA พบว่าทุกวิธีให้ค่า DNA Integrity Number, DIN > 8 แสดงว่า DNA มีความสมบูรณ์สูง ไม่เกิดการเสื่อมสลาย และเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในกระบวนการ downstream เช่น PCR, sequencing

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่าง WB และ DBS จะพบว่า DNA จาก DBS มีค่าความบริสุทธิ์ A260/A280 ต่ำกว่าหรือใกล้เคียงเกณฑ์มาตรฐาน (1.8-2.0) และค่า A260/A230 ต่ำ (< 1.0) บ่งชี้ว่ามีสารปนเปื้อนที่ ดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร ปนมากับ DNA ซึ่งตาม มาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) เรื่อง Blood Collection on Filter Papers for Newborn Screening Programs กำหนดให้ DBS ต้องทำจากเส้นใยฝ้าย 100%⁽³⁰⁾ แม้ว่าจะใช้

วัสดุที่มีความบริสุทธิ์สูง ทั้งนี้ในการสกัด DNA อาจเกิดการย่อยสลายตัวบางส่วนของเซลลูโลส ทำให้ได้สารโมเลกุลเล็กหรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ เช่น กลูโคส (glucose) เซลโลไบโอส (cellobiose) เซลโลไตรโอส (cellotriose) กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) รวมทั้งอนุพันธ์ที่ผ่านการออกซิโดซ์ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) สารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงยูวีที่ 230 นาโนเมตรส่งผลให้ค่า A260/A230 ของ DNA ต่ำ (< 1.0) นอกจากนี้ยังมีฮีม (heme) โปรตีนจากเลือดและสารเคมีจากบัฟเฟอร์ไลซิส เช่น guanidine thiocyanate, guanidine hydrochloride, sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่อาจตกค้างและมีผลต่อค่า A260/A230 การตรวจสอบ PCR product ทั้งแบบ singleplex และ multiplex ของ DNA จาก DBS ที่สกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและ magnetic bead ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมเอง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ ยีน PAH ขนาด 233–570 bp ได้ตามขนาดที่ระบุ แสดงว่า DNA ที่ได้มีคุณภาพเพียงพอสำหรับการทำ PCR

การประเมินคุณภาพของข้อมูลที่ได้จากการทำ NGS พบว่าทุกวิธีสกัดมี mapping quality มากกว่าร้อยละ 90 และ 30x coverage มากกว่าร้อยละ 97 บ่งชี้ถึงความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของการอ่านเบสในกระบวนการหาลำดับพันธุกรรม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่าง WB และ DBS พบว่าทั้งสองชนิดให้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกัน โดยตัวอย่าง DBS ที่ผ่านการสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปให้ค่า 30x coverage Q30 ใกล้เคียงกับตัวอย่าง WB แสดงให้เห็นว่า DBS สามารถใช้เป็นตัวอย่างไม่ทดแทนได้อย่างเหมาะสมในงานตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค NGS สำหรับวิธีการสกัดด้วย magnetic bead ทั้งที่ใช้บัฟเฟอร์ไลซิสจากชุดสกัดสำเร็จรูปและบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง พบว่าผลลัพธ์ของข้อมูล NGS อยู่ในระดับที่เทียบเท่ากับชุดสกัดสำเร็จรูปโดยมีค่า DNA duplicate rate ต่ำกว่าร้อยละ 10 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงลึก เช่น การระบุการกลายพันธุ์หรือการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคทางพันธุกรรม ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการสกัด DNA จาก DBS ด้วยเทคนิค

magnetic bead เป็นทางเลือกที่มีศักยภาพสูง สามารถให้ DNA ที่มีความสมบูรณ์และคุณภาพเพียงพอสำหรับการหาลำดับพันธุกรรมได้เทียบเท่ากับการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ทั้งนี้ยังเหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในงานตรวจคัดกรองทางพันธุกรรม (genetic screening) หรืองานวิจัยทางอนุพันธุศาสตร์ที่มีข้อจำกัดด้านปริมาณตัวอย่างหรือการเก็บรักษา เช่น การใช้ตัวอย่าง DBS รวมถึงการประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์โรคการสูญเสียการได้ยิน (hearing loss) โดยใช้ targeted gene panel ซึ่งต้องการความแม่นยำสูงในการตรวจหาการกลายพันธุ์เฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค

แม้ว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละวิธีจะมีความแตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกวิธีมีปริมาณเพียงพอและสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างปริมาณน้อย เช่น DBS ซึ่งเหมาะกับงานตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิด มีคุณภาพเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการเตรียมไลบรารีและการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค next generation sequencing (NGS) นอกจากนี้มีข้อที่ควรระวัง ได้แก่ การเตรียมน้ำยาใช้เองอาจมีความไม่คงที่ในแต่ละรอบการเตรียมและความสม่ำเสมอในการทำซ้ำอาจต่ำกว่าชุดสกัดสำเร็จรูป หากไม่มีการควบคุมกระบวนการอย่างสม่ำเสมอและควรประเมินต้นทุนเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพที่ได้ เพื่อความคุ้มค่าของวิธีในระยะยาว การศึกษานี้มีข้อจำกัด ได้แก่ จำนวนตัวอย่างที่ค่อนข้างน้อย และเป็นการศึกษาที่ดำเนินการภายในห้องปฏิบัติการเดียว อาจยังไม่ครอบคลุมความแปรปรวนจากสภาพแวดล้อมหรือกระบวนการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการอื่น และยังไม่มีการประเมินความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของแต่ละวิธีสกัด รวมถึงจำนวนตัวอย่างอาจยังไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์เปรียบเทียบเชิงสถิติระหว่างวิธีสกัด อีกทั้งการประเมินประสิทธิภาพของ DNA ที่สกัดได้ในงานวิจัยนี้ทดสอบเฉพาะการประยุกต์ใช้ร่วมกับ targeted NGS panel สำหรับภาวะสูญเสียการได้ยิน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น รวมถึงการประเมินความสามารถในการทำซ้ำและการประยุกต์ใช้กับการตรวจทางพันธุกรรมในรูปแบบอื่นต่อไปในอนาคต

สรุป

วิธีการสกัด DNA จากบัพเฟอร์ที่เตรียมขึ้นเอง ร่วมกับเทคนิค magnetic bead-based extraction สามารถให้ DNA ที่มีคุณภาพและปริมาณเพียงพอสำหรับการศึกษาทางพันธุกรรม การประเมินคุณภาพของ DNA จาก DBS แสดงให้เห็นว่า DNA ที่ได้มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยี targeted NGS นอกจากนี้วิธีการนี้ยังเป็นทางเลือก สำหรับการสกัด ดีเอ็นเอจาก DBS สามารถนำมาใช้สำหรับงานคัดกรองภาวะสูญเสียการได้ยิน (hearing loss) ในทารกแรกเกิด ซึ่งสอดคล้องกับความต้องการในการสร้างระบบตรวจคัดกรองเชิงรุกโดยใช้ NGS ในอนาคต

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ผู้พิมพ์ได้มีการใช้โปรแกรมปัญญาประดิษฐ์ ได้แก่ ChatGPT (OpenAI, USA) เพื่อช่วยสืบค้นข้อมูลและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้ได้มีการพิจารณาความถูกต้องของข้อมูลที่สืบค้นแล้ว นอกจากนี้มีการใช้โปรแกรมปัญญาประดิษฐ์เพื่อช่วยตรวจสอบและปรับปรุงความถูกต้องทางไวยากรณ์ภาษาอังกฤษของต้นฉบับ และผู้พิมพ์ไม่ได้ใช้ในการออกแบบการวิจัย การวิเคราะห์ข้อมูล การแปลผล หรือการตัดสินใจทางวิชาการใดๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปี พ.ศ. 2567 และ 2568 ขอขอบคุณ ศูนย์การแพทย์จีโนมิกส์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และขอขอบคุณ ผู้อำนวยการสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ หัวหน้าศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ ที่ปรึกษาโครงการวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย และผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ในการให้ความร่วมมือในการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขต้นฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography* 2007; 44(4): 899-925.
2. Mei JV, Zobel SD, Hall EM, Jesus VR, Adam BW, Hannon WH. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. *Bioanalysis* 2010; 2(8): 1397-403.
3. Adam BW, Hall EM, Sternberg M, Lim TH, Flores SR, O'Brien S, et al. The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clin Biochem* 2011; 44(17-18): 1445-50.
4. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood spot specimens from newborns. *Clin Chem* 2003; 49(11): 1797-817.
5. Adam BW, Alexander JR, Smith SJ, Chace DH, Loeber JG, Elvers LH, et al. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume, and paper matrix. *Clin Chem* 2000; 46(1): 126-8.
6. Tuailon E, Kania D, Pisoni A, Bollore K, Taieb F, Ontsira Ngoyi EN, et al. Dried blood spot tests for the diagnosis and therapeutic monitoring of HIV and viral hepatitis B and C. *Front Microbiol* 2020; 11: 373. (7 pages).
7. Doornekamp L, Embregts CWE, Aron GI, Goeijenbier S, van de Vijver DAMC, van Gorp ECM, et al. Dried blood spot cards: a reliable sampling method to detect human antibodies against rabies virus. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14(10): e0008784. (10 pages).
8. Sun H, Shen XR, Fang ZB, Jiang ZZ, Wei XJ, Wang ZY, et al. Next-generation sequencing technologies and neurogenetic diseases. *Life* 2021; 11(4): 361. (17 pages).

9. Gallo V, Dotta L, Giardino G, Cirillo E, Lougaris V, D'Assante R, et al. Diagnostics of primary immunodeficiencies through next-generation sequencing. *Front Immunol* 2016; 7: 466. (10 pages).
10. Elsink K, Huibers MMH, Hollink IHIM, Simons A, Zonneveld-Huijssoon E, van der Veken LT, et al. Implementation of early next-generation sequencing for inborn errors of immunity: a prospective observational cohort study of diagnostic yield and clinical implications in dutch genome diagnostic centers. *Front Immunol* 2021; 12: 780134. (11 pages).
11. Veldman A, Kiewiet MBG, Heiner-Fokkema MR, Nelen MR, Sinke RJ, Sikkema-Raddatz B, et al. Towards next-generation sequencing (NGS)-based newborn screening: a technical study to prepare for the challenges ahead. *Int J Neonatal Screen* 2022; 8(1): 17. (11 pages).
12. Remec ZI, Trebusak Podkrajsek K, Repic Lampret B, Kovac J, Groselj U, Tesovnik T, et al. Next-generation sequencing in newborn screening: a review of current state. *Front Genet* 2021; 12: 662254. (11 pages).
13. Jiang S, Wang H, Gu Y. Genome sequencing for newborn screening—an effective approach for tackling rare diseases. *JAMA Netw Open* 2023; 6(9): e2331141. (3 pages).
14. Rudowski S, Boerkoel CF, He M, Kanungo S. Whole genome sequencing in era of newborn screening. *OBM Genetics* 2023; 7(4): 2304195. (13 pages).
15. Smith L, Willis MJ, Feigenbaum A, Scharer G, Mardach R, Hansen C, et al. Genome-to-treatment and begin newborn genome screening: a review of system guides for the acute management and newborn screening follow-up of genetic disorders in infants and children. *Med Res Arch*. [serial online]. 2023; 11(10): [cited 2026 Jan 12]; [20 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.18103/mra.v11i10.4528>.
16. Shen G, Li W, Zhang Y, Chen L. Next-generation sequencing based newborn screening and comparative analysis with MS/ MS. *BMC Pediatr* 2024; 24: 230. (7 pages).
17. Kingsmore SF, Wright M, Smith LD, Liang Y, Mowrey WR, Protopsaltis L, et al. Prequalification of genome-based newborn screening for severe childhood genetic diseases through federated training based on purifying hyperselection. *Am J Hum Genet* 2024; 111: 2618–42.
18. Kingsmore S, Wright M, Olsen L, Schultz B, Protopsaltis L, Averbuj D, et al. Genome-based newborn screening for severe childhood genetic diseases has high positive predictive value and sensitivity in a NICU pilot trial. *Am J Hum Genet* 2024; 111: 2643–67.
19. Boemer F, Fasquelle C, d'Otrepppe S, Josse C, Dideberg V, Segers K, et al. A next-generation newborn screening pilot study: NGS on dried blood spots detects casual mutations in patients with inherited metabolic diseases. *Sci Rep* 2017; 7: 17641. (9 pages).
20. Hendrix MM, Cuthbert CD, Cordovado SK. Assessing the performance of dried-blood-spot DNA extraction methods in next generation sequencing. *Int J Neonatal Screen* 2020; 6: 36. (15 pages).
21. QIAGEN. QIAamp DNA kits for DNA extraction. [online]. 2025; [cited 2026 Jan 12]; [97 screens]. Available from: URL: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-kits?catno=51304>.
22. รจนพรพนธ์ ปันกาญจน์โต, ภาวิณี อินนาค, มะลิวัลย์ นุ่มนวล, อีระยุทธ สมบุญ, สุภาพร นามมูลน้อย, นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา และคณะ. การกลายพันธุ์ของยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลสในทารกไทยที่สงสัยเป็นโรคฟีนิลคีโตนูเรีย. *ว กรมวิทย์ พ* 2565; 64(4): 223–6.

23. National Library of Medicine. Homo sapiens phenylalanine hydroxylase (PAH), RefSeqGene on chromosome 12. [online]. 2025; [cited 2026 Jan 12]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_008690.2.
24. Kapa Biosystems. KAPA2G fast multiplex PCR kit. [online]. 2016; [cited 2026 Jan 12]; [4 screens]. Available from: URL: https://n-genetics.com/files/co/Documents/manual/kapa_12664.pdf.
25. Twist Bioscience. Twist target enrichment fast hybridization protocol: for use with the twist NGS workflow [online]. 2025; [cited 2026 Jan 12]; [22 screens]. Available from: URL: <https://www.twistbioscience.com/content/dam/twistbioscience/resources/2026-01/DOC-001066-Protocol-FastHyb-REV6-singles-compressed.pdf>.
26. Pan S, Gu B, Wang H, Yan Z, Wang P, Pei H, et al. Comparison of four DNA extraction methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR and its clinical application in pulmonary tuberculosis. J Thorac Dis 2013; 5(3): 251-7.
27. Na B, Park J, Park S, Park E, Jang J, Kim YH, et al. Comparison evaluation of bacterial DNA extraction methods for improved molecular diagnostic accuracy of sepsis-causing pathogens in clinical whole blood samples. Sci Rep 2025; 15: 4167. (6 pages).
28. Zamuner FT, Ramos-López A, García-Negrón A, Purcell-Wiltz A, Cortés-Ortiz A, Cuevas AR, et al. Evaluation of silica spin column and magnetic bead formats for rapid DNA methylation analysis in clinical and point of care settings. Biomed Rep 2024; 21: 112. (11 pages).
29. Gall-David SL, Boudry G, Buffet-Bataillon S. Comparison of four DNA extraction kits efficiency for 16SrDNA microbiota profiling of diverse human samples. Future Sci OA 2023; 9(1): FS0837. (12 pages).
30. Clinical and Laboratory Standards Institute. Dried blood spot specimen collection for newborn screening. 7th ed. CLSI standard NBS01. Malvern, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.

Development of DNA Extraction Method from Dried Blood Spots for Genetic Analysis

Kannikar Punnapum, Pawinee Innark, Rotjanapan Pankanjanato, Onanong Jaruan, Maliwan Numnuan, Ratchaneekorn Jaisue, Wiroj Puangtabtim, Charintip Yenyuvadee, Pundharika Piboonsiri, and Hansa Thaisri

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

ABSTRACT Genetic analysis using next generation sequencing (NGS) technology has significantly improved the accuracy and comprehensiveness of genetic diagnosis, including newborn screening using dried blood spot (DBS) samples. This study aimed to develop and evaluate DNA extraction methods from DBS samples suitable for NGS applications. Three extraction methods were compared: a commercial extraction kit, a magnetic bead-based method combined with an in-house lysis buffer, and a magnetic bead-based method with a commercial lysis buffer. DNA extracted from whole blood (WB) was used as a reference. The results obtained from five volunteers showed that DNA extracted from all three methods had an average concentration of 5.28–6.88 ng/μL. The purity ratios (A₂₆₀/A₂₈₀ and A₂₆₀/A₂₃₀) ranged from 1.89–2.34 and 0.20–1.40, respectively, while DNA integrity numbers (DIN) were between 8.8 and 9.9. PCR amplification using both singleplex and multiplex assays produced target fragments of 233–570 bp as expected. NGS data generated by the DNA Nanoball Sequencing (DNBSEQ-E25) platform from MGI demonstrated high sequencing quality, with mapping rate of 99.85–99.87%, 30× coverage of 97.13–99.25%, duplicate rate of 7.87–9.11%, and base call accuracy (Q₃₀) of 90.21–90.72%. This study demonstrates that the magnetic bead-based extraction method combined with an in-house lysis buffer provides DNA yield and quality comparable to the commercial extraction kit, and is suitable for NGS-based genetic analysis.

Keywords: Dried blood spot (DBS), DNA extraction, Magnetic beads, Next generation sequencing

การศึกษาประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของ หน้ากาก N95 เพื่อการใช้ซ้ำ

กัญญารัตน์ นิธิ ปริยานุช สุตงาม และ พรเทพ จันทร์คุณภาส
สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อทางเดินหายใจ เช่น ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ โรคอุบัติใหม่ และโรคอุบัติซ้ำ ร่วมกับมลพิษจากฝุ่น PM_{2.5} ส่งผลให้เกิดภาวะขาดแคลนหน้ากาก N95 งานวิจัยนี้ศึกษาขีดจำกัดการฆ่าเชื้อหน้ากาก N95 เพื่อนำกลับมาใช้ซ้ำ โดยสุ่มตัวอย่างหน้ากากที่ได้รับความนิยมทั้งรุ่นที่มีลิ้นระบายอากาศ (8210V และ DD02V-N95-2K) และไม่มีลิ้นระบายอากาศ (8110s และ 9105) ฆ่าเชื้อด้วย 4 วิธี ได้แก่ การฉายรังสียูวีซี ความยาวคลื่น 254 nm ความเข้มแสง ไม่น้อยกว่า 400 mW/m² ด้านละ 20 นาที การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 75 °C เวลา 30 นาที การแช่น้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 60±5 °C เวลา 30 นาที และการแช่น้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 °C เวลา 10 นาที ประเมินประสิทธิภาพการกรองอนุภาค ตามวิธี 42 CFR 84 ซึ่งกำหนดให้ต้องมีประสิทธิภาพการกรองไม่น้อยกว่าร้อยละ 95 และทดสอบความกระชับกับใบหน้า ตามวิธี 29 CFR 1910.134 โดยกำหนดให้อัตราการรั่วไหลภายในหน้ากากต้องไม่เกินร้อยละ 5 พบว่าการฆ่าเชื้อด้วยรังสียูวีซี มีประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้าผ่านเกณฑ์มาตรฐานตลอดการฆ่าเชื้อ 20 รอบ ขณะที่การอบแห้ง ด้วยเตาอบลมร้อนมีประสิทธิภาพการกรองอนุภาคผ่านเกณฑ์ตลอดการฆ่าเชื้อ 20 รอบ แต่ความกระชับกับใบหน้าไม่ผ่านเกณฑ์ หลังฆ่าเชื้อ 13 รอบ การแช่น้ำร้อนและน้ำเดือดทำให้ประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้าไม่ผ่านเกณฑ์หลัง ฆ่าเชื้อเพียง 6 และ 4 รอบ ตามลำดับ ดังนั้นการฉายรังสียูวีซีเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดและไม่ส่งผลเสียต่อประสิทธิภาพการ ป้องกันของหน้ากาก

คำสำคัญ: ขีดจำกัดในการใช้ซ้ำ, หน้ากาก N95, การฆ่าเชื้อ, ประสิทธิภาพการกรอง

Corresponding author E-mail: Kanyarat.n@dmsc.mail.go.th

Received: 9 February 2026

Revised: 11 June 2026

Accepted: 15 June 2026

บทนำ

โรคติดเชื้อทางเดินหายใจตามฤดูกาลเป็นปัญหาสาธารณสุขที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีการระบาดซ้ำทุกปี และส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชากรและทรัพยากรทางการแพทย์⁽¹⁾ ในช่วงฤดูฝนของประเทศไทยพบการระบาดของโรคติดเชื้อทางเดินหายใจเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะโรคไข้หวัดใหญ่ (influenza: flu) โรคติดเชื้อไวรัสซิกาเชื้อระบบทางเดินหายใจ (respiratory syncytial virus infection: RSV infection) โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (coronavirus disease 2019: COVID-19) และโรคทางเดินหายใจอื่นๆ ซึ่งสามารถติดต่อผ่านละอองฝอยจากการไอหรือจาม ส่งผลให้จำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในกลุ่มเด็กเล็ก ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีโรคประจำตัว⁽²⁾ นอกจากนี้ในช่วงฤดูหนาวและช่วงเปลี่ยนฤดู ปัญหามลพิษทางอากาศ โดยเฉพาะฝุ่นละอองขนาดเล็ก (particulate matter with an aerodynamic diameter $\leq 2.5 \mu\text{m}$: PM2.5) มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้ระบบทางเดินหายใจมีความไวต่อการติดเชื้อและเกิดอาการรุนแรงได้ง่ายขึ้น ภาวะเหล่านี้ส่งผลให้ความต้องการใช้อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (personal protective equipment: PPE) โดยเฉพาะหน้ากาก N95 เพิ่มขึ้น⁽³⁾

หน้ากาก N95 (N95 respirator) เป็นหน้ากากกรองอากาศประเภทใช้แล้วทิ้งชนิดหนึ่งตามมาตรฐานคุณภาพการกรองจากสถาบันความปลอดภัยและอนามัยในการทำงานแห่งชาติ (The National Institute of Occupational Safety and Health: NIOSH) ของประเทศสหรัฐอเมริกา⁽⁴⁾ สามารถจำแนกตามลักษณะรูปทรงได้หลากหลายแบบ เช่น แบบทรงถ้วย (cup-shaped type) แบบพับ (flat-fold type) แบบสามพับ (three-panel flat-fold type) และแบบปากเป็ด (duckbill type) ซึ่งหน้ากากแต่ละรูปทรงมีจุดเด่นที่ตอบโจทย์การใช้งานต่างกัน⁽⁵⁾ โดยหน้ากากแบบทรงถ้วยมีโครงสร้างที่แข็งแรงและคงรูปได้ดีกว่าหน้ากากแบบพับ เนื่องจากมีโครงสร้างตาข่ายพลาสติกช่วยพยุงตัวหน้ากาก ขณะที่หน้ากากแบบพับมีความยืดหยุ่นและสะดวกต่อการพกพา อีกทั้งสามารถให้ความสบายในการสวมใส่มากกว่าหน้ากากแบบทรงถ้วย

เนื่องจากมีแรงกดทับบริเวณใบหน้าน้อยกว่า⁽⁶⁾ สำหรับหน้ากากแบบสามพับมีความกระชับกับใบหน้าและความสบายในการสวมใส่มากกว่าหน้ากากแบบทรงถ้วยและแบบพับ เนื่องจากสามารถปรับเข้ากับรูปหน้าได้ดี⁽⁷⁾ ส่วนหน้ากากแบบปากเป็ดเป็นหน้ากากที่มีพื้นที่ภายในหน้ากากมาก ช่วยเพิ่มความสะดวกในการหายใจระหว่างการสวมใส่ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าหน้ากากรูปทรงนี้มีอัตราการไม่ผ่านการทดสอบความกระชับกับใบหน้าสูงกว่ารูปทรงอื่นๆ⁽⁸⁾ นอกจากลักษณะรูปทรงที่แตกต่างกันแล้ว โดยทั่วไปโครงสร้างของหน้ากาก N95 ประกอบด้วย ชั้นกรอง 4 ชั้น ได้แก่ ชั้นในสุด (inner layer) ทำจากโพลีโพรพิลีนแบบไม่ทอ (spunbond nonwoven polypropylene) มีคุณสมบัติช่วยดูดซับความชื้นจากการหายใจ ชั้นกลาง (structural support layer) ประกอบด้วย วัสดุที่มีความหนาแน่นประมาณ 250 กรัมต่อตารางเมตร เพื่อช่วยให้หน้ากากคงรูปและมีความทนทาน ชั้นกรองหลัก (filter layer) ทำจากเส้นใยโพลีโพรพิลีนที่ขึ้นรูปด้วยการเป่าลมร้อนให้เป็นเส้นใยขนาดเล็กระดับไมโครเมตรจนเป็นแผ่น (melt blown process) ทำหน้าที่เป็นชั้นกรองโดยอาศัยกลไกการกรองเชิงกล (mechanical filtration) และชั้นนอกสุด (outer layer) ทำจากวัสดุประเภทเดียวกับชั้นในสุด มีคุณสมบัติป้องกันความชื้นและฝุ่นละอองจากภายนอก โครงสร้างชั้นกรองของหน้ากาก N95 ดังแสดงในภาพที่ 1⁽⁹⁾ โครงสร้างหลายชั้นนี้ทำให้หน้ากาก N95 สามารถกรองอนุภาคที่ไม่ใช่น้ำมัน ขนาด 0.1 ถึง 0.3 ไมครอนได้ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 95⁽¹⁰⁾

จากการแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อทางเดินหายใจร่วมกับมลพิษจากฝุ่น PM2.5 ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของหน้ากาก N95 ต่อบุคลากรทางการแพทย์และประชาชนกลุ่มเสี่ยง อย่างไรก็ตามความต้องการที่พุ่งสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในภาวะวิกฤตส่งผลให้หน้ากาก N95 มีราคาสูงขึ้นและจัดซื้อได้ยาก ประกอบกับข้อจำกัดด้านฐานการผลิตภายในประเทศที่ยังไม่สามารถผลิตหน้ากาก N95 ได้อย่างเพียงพอ จึงต้องพึ่งพาการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นหลัก ซึ่งมีความเสี่ยงจากปัญหาด้านการขนส่งหรือนโยบายระงับการส่งออกของประเทศต้นทาง⁽¹¹⁾ แม้ปัจจุบันยังไม่พบ

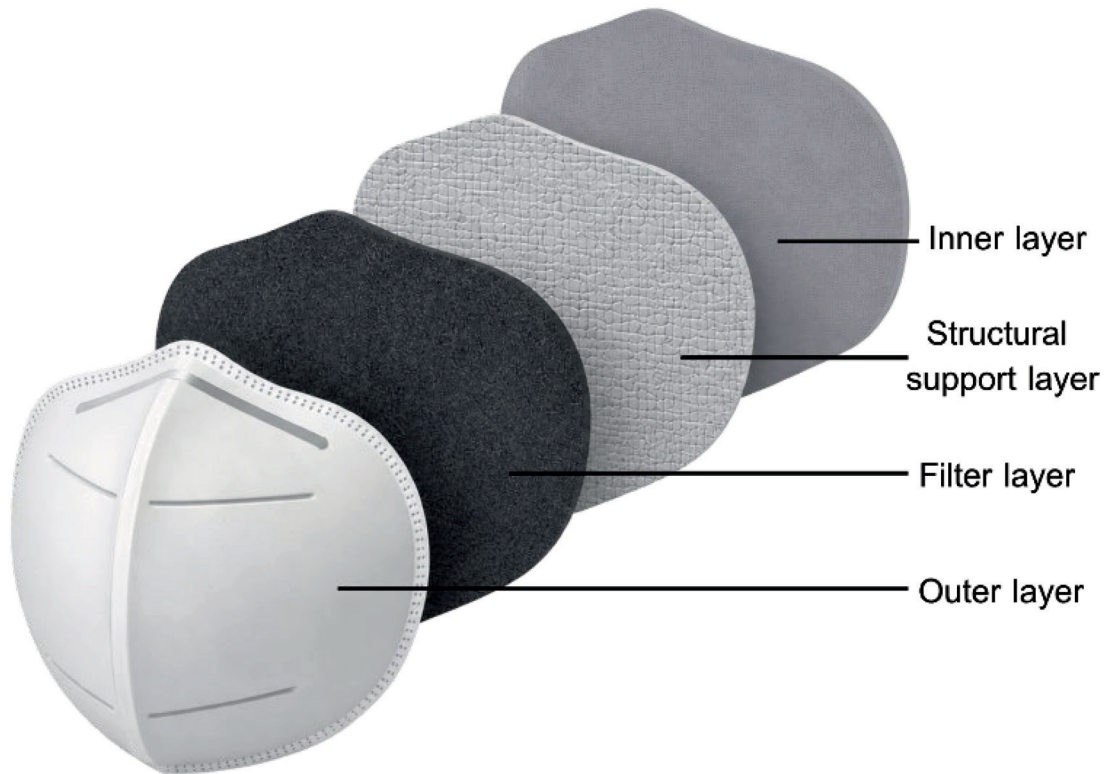
ปัญหาการขาดแคลนหน้ากาก N95 แต่การเตรียมความพร้อมเพื่อรองรับความเป็นไปได้ที่อาจเกิดขึ้นในอนาคตยังคงมีความจำเป็น โดยหนึ่งในแนวทางที่อาจช่วยลดความเสี่ยงจากภาวะขาดแคลน คือ การนำหน้ากาก N95 กลับมาใช้ซ้ำหลังผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อที่เหมาะสม การใช้ซ้ำโดยไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อที่ถูกต้องอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อโรคและนำไปสู่การติดเชื้อได้ นอกจากนี้อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการกรองอนุภาค (particle filtration efficiency) และความกระชับกับใบหน้า (fit check) ทำให้หน้ากากไม่สามารถคุณสมบัติตามมาตรฐานกำหนด^(12,13) โดยมาตรฐาน NIOSH กำหนดให้หน้ากาก N95 ต้องมีค่าร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาค (%filtration efficiency) ของอนุภาคที่ไม่ใช่น้ำมัน ขนาด 0.3 ไมครอนได้ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 95⁽¹⁴⁾ และมีค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากาก (%leakage rate) ไม่เกินร้อยละ 5⁽¹⁵⁾ วิธีการฆ่าเชื้อบนหน้ากาก N95 สามารถทำได้หลายวิธี หนึ่งในวิธีที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง คือ การฆ่าเชื้อด้วยการฉายรังสียูวีซี (UVC Irradiation: UVC) โดยมีงานวิจัยระบุว่า การใช้รังสียูวีซีที่มีความยาวคลื่น 260 ถึง 285 นาโนเมตร สามารถทำลายเชื้อไวรัสและแบคทีเรียบนพื้นผิวหน้ากากได้โดยไม่ลดประสิทธิภาพการป้องกันของหน้ากาก N95⁽¹⁶⁾ อีกหนึ่งวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ การฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (heat sterilization) ซึ่งสามารถทำได้หลายรูปแบบ อาทิ การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน การแช่น้ำร้อน การแช่น้ำเดือด การนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และการใช้ไอน้ำจากไมโครเวฟ เป็นต้น^(13,17,18) นอกจากนี้มีวิธีการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี (chemical decontamination) เช่น การใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แบบไอระเหย (vaporized hydrogen peroxide) เอทิลีนออกไซด์ (ethylene oxide) เอทานอล (ethanol) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) และไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol) เป็นต้น แม้ว่าวิธีทางเคมีเหล่านี้จะสามารถฆ่าเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่บางวิธีอาจทิ้งสารตกค้างหรือส่งผลต่อโครงสร้างของหน้ากาก ทำให้ไม่เหมาะสมสำหรับการนำกลับมาใช้ซ้ำอย่างปลอดภัย^(19,20) จากการทบทวนงานวิจัย

ที่เกี่ยวข้อง พบว่ามีวิธีการฆ่าเชื้อที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง ได้แก่ การฉายรังสียูวีซี การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน การแช่น้ำร้อน และการแช่น้ำเดือด ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้าของหน้ากาก⁽²¹⁾ แม้ว่าจะงานวิจัยที่เกี่ยวข้องจะยืนยันว่าวิธีฆ่าเชื้อทั้ง 4 วิธี มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อเพื่อการนำกลับมาใช้ซ้ำ แต่งานวิจัยดังกล่าวมีการทดสอบการฆ่าเชื้อซ้ำเพียง 3 รอบ จึงขาดข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนรอบสูงสุดของการฆ่าเชื้อซ้ำที่ยังสามารถรักษาประสิทธิภาพการป้องกันของหน้ากากได้ นอกจากนี้ขาดการศึกษาเปรียบเทียบผลของการฆ่าเชื้อด้วย 4 วิธีดังกล่าว ระหว่างหน้ากาก N95 รุ่นที่มีลิ้นระบายอากาศ และรุ่นที่ไม่มีลิ้นระบายอากาศ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาขีดจำกัดของการฆ่าเชื้อบนหน้ากาก N95 เพื่อรองรับการนำกลับมาใช้ซ้ำ โดยดำเนินการสุ่มตัวอย่างหน้ากาก N95 จำนวน 4 รุ่น ที่ได้รับความนิยมในการใช้งานทั้งในหน่วยงานทางการแพทย์และภาคอุตสาหกรรม รวมถึงมีจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด ทั้งรุ่นที่มีลิ้นระบายอากาศ และรุ่นที่ไม่มีลิ้นระบายอากาศมาทำการฆ่าเชื้อด้วย 4 วิธี ได้แก่ การฉายรังสียูวีซีด้วยตู้ปราศจากเชื้อแบบคลาส II ประเภท A2 ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ความเข้มแสงไม่น้อยกว่า 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเมตร ฉายรังสีด้านละ 20 นาที การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที การแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และการแช่น้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นประเมินประสิทธิภาพการป้องกันด้วยการทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคตามมาตรฐาน NIOSH 42 CFR part 84 ข้อ 84.174 และมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหน้ากากใช้ครั้งเดียวชนิด N95 (มอก.2480-2562)⁽²²⁾ ซึ่งกำหนดให้หน้ากากต้องมีค่าร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาคไม่ต่ำกว่าร้อยละ 95 และทดสอบความกระชับกับใบหน้าตามมาตรฐานสำนักงานความปลอดภัยและสุขภาพในการทำงาน (Occupational Safety and Health Administration: OSHA) ตามข้อกำหนด 29 CFR 1910.134 subpart I โดยกำหนดให้ค่าร้อยละอัตรา

การรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากต้องไม่เกินร้อยละ 5 ทั้งนี้ การฆ่าเชื้อและการทดสอบซ้ำจะดำเนินการต่อเนื่องสูงสุด 20 รอบ หรือจนกว่าหน้ากากจะไม่ผ่านเกณฑ์

ที่มาตรฐานกำหนด เพื่อระบุวิธีการฆ่าเชื้อที่ปลอดภัย และสามารถรักษาคูณสมบัติของหน้ากากตามมาตรฐาน NIOSH



ภาพที่ 1 โครงสร้างและองค์ประกอบของหน้ากาก N95

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือ: ตู้ปราศจากเชื้อแบบคลาส II ประเภท A2 (รุ่น 1384, Thermo Fisher Scientific, USA), เตาอบลมร้อน (รุ่น TS8136, Termaks, Norway), เตาให้ความร้อน (รุ่น C-MAG HS7, IKA, Germany), เทอร์โมมิเตอร์แบบแท่งแก้วใส่ปรอท (รุ่น SK, SATO, Taiwan), เครื่องทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคของหน้ากาก N95 (รุ่น G506, QINSUN, China), ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (รุ่น ZXMP-R1150, Labwit Scientific, Australia),

เครื่องทดสอบความกระชับกับใบหน้า (รุ่น MT-05U, SIBATA, Japan) และเครื่องฟั่นละอองแบบอัลตราโซนิค (รุ่น Y2, Unbranded, China)

วัสดุ: หน้ากาก N95 แบบทรงถ้วยไม่มีลิ้นระบายอากาศ (รุ่น 8110s, 3M™, Thailand), หน้ากาก N95 แบบพับไม่มีลิ้นระบายอากาศ (รุ่น 9105, VFlex™, Thailand), หน้ากาก N95 แบบทรงถ้วยมีลิ้นระบายอากาศ (รุ่น 8210V, 3M™, Thailand) และหน้ากาก N95 แบบพับมีลิ้นระบายอากาศ (รุ่น DD02V-N95-2K, SHIGEMATSU, Japan) ดังแสดงในภาพที่ 2 (ก)-(ง) ตามลำดับ



ภาพที่ 2 หน้ากาก N95 ที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาขีดจำกัดการฆ่าเชื้อ (ก) รุ่น 8110s⁽²³⁾, (ข) รุ่น 9105⁽²⁴⁾, (ค) รุ่น 8210V⁽²⁵⁾ และ (ง) รุ่น DD02V-N95-2K⁽²⁶⁾ (ที่มา: (ก) บริษัท ซาย แอนด์ เทคโนโลยี เซอร์วิส จำกัด, (ข) บริษัท 3M ประเทศไทย, (ค) บริษัท 3M ประเทศไทย และ (ง) Instocking Co., Ltd., China)

สารเคมี: โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, Supelco, USA) และเม็ดโซเดียมคลอไรด์ ขนาด 100 มิลลิกรัม (sodium chloride tablets 100 mg, First Lab International Inc., Canada)

การฆ่าเชื้อของหน้ากาก N95

การศึกษานี้ได้ทำการเตรียมหน้ากาก N95 จำนวน 4 รุ่น รุ่นละ 40 ชิ้น รวมเป็น 160 ชิ้น ประกอบด้วย รุ่น 8210V, DD02V-N95-2K, 8110s และ 9105 โดยหน้ากากแต่ละรุ่น แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ชิ้น หน้ากากแต่ละกลุ่ม ประกอบด้วย ชุดสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาค จำนวน 5 ชิ้น และชุดสำหรับการทดสอบความกระชับกับใบหน้า จำนวน 5 ชิ้น การศึกษานี้ประเมินประสิทธิภาพการป้องกันของหน้ากาก N95 จาก 2 พารามิเตอร์ ได้แก่ ประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้า ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการป้องกันระบบทางเดินหายใจตามแนวทางมาตรฐานของ NIOSH โดยหน้ากากที่

ผ่านเกณฑ์มาตรฐานต้องมีค่าร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาคไม่ต่ำกว่าร้อยละ 95 และมีค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากไม่เกินร้อยละ 5 ก่อนเริ่มกระบวนการฆ่าเชื้อนำหน้ากากทั้ง 4 กลุ่ม ไปทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้า ต่อมาหน้ากากแต่ละกลุ่มจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการฆ่าเชื้อด้วย 4 วิธี ได้แก่ การฉายรังสีวิธี การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน การแช่น้ำร้อน และการแช่น้ำเดือด หลังจากผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อในแต่ละรอบ หน้ากากในแต่ละกลุ่มจะถูกนำกลับมาทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้าอีกครั้ง เพื่อเปรียบเทียบผลประสิทธิภาพการป้องกันระหว่างก่อนและหลังผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ การฆ่าเชื้อและการทดสอบซ้ำจะดำเนินต่อเนื่องโดยใช้หน้ากากชุดเดิมทดสอบซ้ำจนครบ 20 รอบ (การฆ่าเชื้อซ้ำด้วย จำนวน 20 รอบ ถือเป็นระดับที่สูงกว่าการใช้งานซ้ำโดยทั่วไป อีกทั้งเพียงพอสำหรับประเมินและเปรียบเทียบผลกระทบของวิธีการฆ่าเชื้อทั้ง 4 วิธีต่อประสิทธิภาพ

การป้องกันของหน้ากาก) หรือจนกว่าผลการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันของหน้ากากในกลุ่มนั้นจะไม่ใช่ไปตามเกณฑ์มาตรฐานกำหนด โดยในกรณีที่หน้ากากไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานก่อนครบจำนวน 20 รอบ หน้ากากกลุ่มดังกล่าวจะถูกยุติการทดสอบในรอบถัดไป

การฉายรังสียูวีซี (UVC irradiation)⁽²⁷⁾ นำหน้ากาก N95 แต่ละกลุ่มวางเรียงบนพื้นตู้ปราศจากเชื้อแบบคลาส II ที่ผ่านการสอบเทียบและมีความเข้มรังสี UVC ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ไม่น้อยกว่า 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเมตร โดยจัดวางให้เว้นระยะห่างระหว่างชั้นของหน้ากากประมาณ 10 เซนติเมตร จากนั้นทำการปิดบานกระจกหน้าต่างให้สนิท และเริ่มเปิดหลอด UVC เพื่อฉายรังสีบนผิวด้านนอกของหน้ากากเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาหลอด UVC จะถูกปิด และหน้ากากจะถูกกลับด้านเพื่อฉายรังสีบนผิวด้านในของหน้ากาก เป็นเวลา 20 นาที

การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน (dry heat by hot air oven)⁽²⁸⁾ ตั้งค่าอุณหภูมิเตาอบลมร้อนที่ผ่านการสอบเทียบให้มีอุณหภูมิ 75 ± 2 องศาเซลเซียส จากนั้นนำหน้ากาก N95 ของแต่ละรุ่นจำนวน 10 ชิ้น ประกอบด้วยชุดสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคจำนวน 5 ชิ้น และชุดสำหรับการทดสอบความกระชับกับใบหน้า จำนวน 5 ชิ้น ไปแขวนกับตะแกรงโดยใช้ลวดหนีบ และนำไปอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาให้นำหน้ากาก N95 ออกมาจากเตาอบลมร้อน และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

การแช่น้ำร้อน (hot water)⁽²⁹⁾ เตรียมน้ำร้อนโดยเทน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1,800 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ ขนาด 2,000 มิลลิลิตร และให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 60 ± 5 องศาเซลเซียส โดยใช้เตาให้ความร้อนและสังเกตอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์แบบแท่งแก้วใส่ปรอท จากนั้นนำหน้ากาก N95 ลงไปแช่น้ำร้อนครั้งละ 1 ชิ้น เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้แท่งแก้วกดหน้ากากให้จมอยู่ในน้ำร้อนตลอดการทดสอบ เมื่อครบเวลาให้นำหน้ากากออกและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 16 ชั่วโมง

การแช่น้ำเดือด (boiling water)⁽¹³⁾ เตรียมน้ำเดือดโดยเทน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1,800 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ ขนาด 2,000 มิลลิลิตร และให้ความร้อนด้วยเตาให้ความร้อนจนน้ำภายในบีกเกอร์เดือด แล้วทำการแช่หน้ากาก N95 ในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที การทดสอบจะทำการแช่หน้ากากครั้งละ 1 ชิ้น และใช้แท่งแก้วกดหน้ากากให้จมอยู่ในน้ำเดือดตลอดการทดสอบ เมื่อครบเวลาให้นำหน้ากากออกและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง

การทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาค

การทดสอบดำเนินการตามวิธีมาตรฐาน NIOSH 42 CFR part 84 ข้อ 84.174 และ มอก. 2480-2562 โดยหน้ากาก N95 ถูกนำไปปรับสภาพที่อุณหภูมิ 38.0 ± 2.5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85.5 ± 5.0 เป็นเวลา 25 ± 1 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น จากนั้นนำหน้ากาก N95 ที่ผ่านการปรับสภาพไปวางบนแท่นทดสอบของเครื่องทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคของหน้ากาก N95 ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยควบคุมสภาวะที่ใช้ในการทดสอบให้มีอุณหภูมิ เท่ากับ 25 ± 5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 30 ± 10 และใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมจากโซเดียมคลอไรด์ละลายในน้ำปราศจากไอออน เพื่อสร้างละอองทดสอบ (test aerosols) ที่มีขนาดเชิงจำนวน (count median diameter: CMD) เท่ากับ 0.075 ± 0.02 ไมครอน และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานทางเรขาคณิต (geometric standard deviation: GSD) น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 1.8 เป็นอนุภาคมาตรฐานที่ใช้จำลองอนุภาคขนาดเล็กในบรรยากาศ การทดสอบดำเนินการภายใต้อัตราการไหลของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เจือปนในอากาศ เท่ากับ 85 ± 4 ลิตรต่อนาที บนพื้นที่ผิวของหน้ากากประมาณ 135 ตารางเซนติเมตร โดยเครื่องจะตรวจวัดความเข้มข้นของละอองลอยโซเดียมคลอไรด์ที่ผ่านด้านบนและด้านล่างของหน้ากาก และรายงานผลเป็นค่าร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาค



ภาพที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคด้วยเครื่องทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคของหน้ากาก N95 รุ่น G506 (ที่มา: สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

การทดสอบความกระชับกับใบหน้า

การทดสอบดำเนินการตามวิธีมาตรฐาน OSHA ข้อกำหนด 29 CFR 1910.134 โดยหน้ากาก N95 ถูกนำไปเจาะรูบริเวณตรงกลางเพื่อติดตั้งตัวเชื่อมต่อ และเชื่อมต่อหน้ากากเข้ากับเครื่องทดสอบความกระชับกับใบหน้าผ่านท่อสายยาง จากนั้นสวมหน้ากาก N95 ที่ติดตั้งอุปกรณ์ดังกล่าวบนหุ่นจำลองใบหน้าให้แนบสนิท เพื่อจำลองสภาพการสวมใส่จริง ดังแสดงในภาพที่ 4(ก) ต่อมาเปิดเครื่องฟองละอองแบบอัลตราโซนิกที่บรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร (เตรียมจากเม็ดโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ

ปราศจากไอออน) และจัดวางเครื่องฟองละอองไว้ด้านหน้าหุ่นจำลอง เพื่อให้มีปริมาณละอองทดสอบเพียงพอต่อการจำลองสภาวะการรั่วไหลที่เลวร้ายที่สุด (worst-case scenario) ดังแสดงในภาพที่ 4(ข) จากนั้นกดปุ่ม start บนเครื่องทดสอบความกระชับกับใบหน้า เครื่องทดสอบจะทำการวัดปริมาณของละอองโซเดียมคลอไรด์ทั้งภายนอกและภายในหน้ากาก เป็นเวลา 25 วินาที พร้อมทั้งคำนวณสัดส่วนการรั่วไหลเข้าสู่หน้ากาก และแสดงผลในรูปของค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากาก ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดความกระชับของหน้ากากอนามัยกับใบหน้า ดังแสดงในภาพที่ 4(ค)

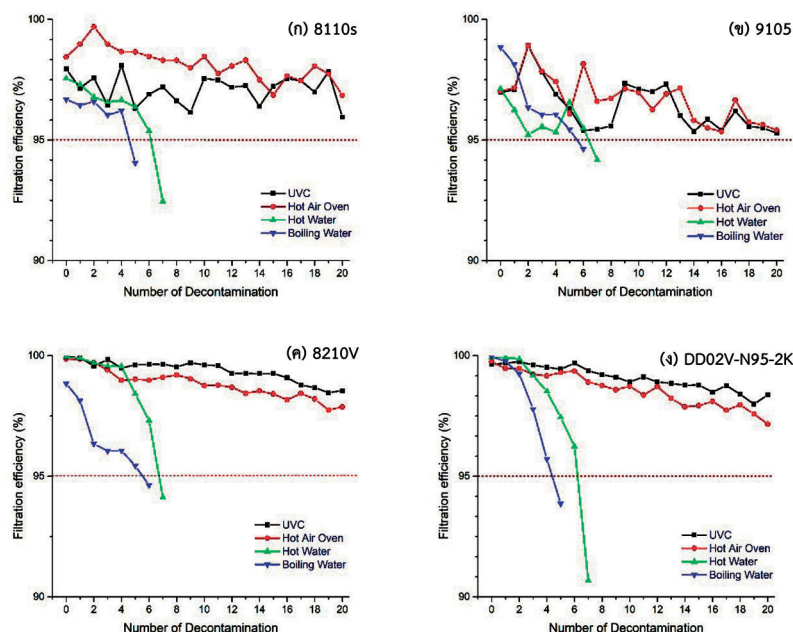


ภาพที่ 4 การทดสอบความกระชับกับใบหน้า (ก) การเชื่อมต่อหน้ากาก N95 เข้ากับเครื่องทดสอบความกระชับใบหน้า (ข) การสร้างละอองโซเดียมคลอไรด์ในบรรยากาศระหว่างการทดสอบความกระชับกับใบหน้า (ค) การแสดงผลการทดสอบบนหน้าจอเครื่องทดสอบความกระชับกับใบหน้า (ที่มา: สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

ผล

จากการศึกษาประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการกรองอนุภาคของหน้ากาก N95 ทั้งรุ่นที่มีลิ้นระบายอากาศ (8210V และ DD02V-N95-2K) และรุ่นที่ไม่มีลิ้นระบายอากาศ (8110s และ 9105) ดังแสดงในภาพที่ 5 (ก)–(ง) พบว่าหน้ากาก N95 ทุกรุ่นมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของประสิทธิภาพการกรองอนุภาคในทิศทางเดียวกัน โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างรุ่นของหน้ากาก เมื่อพิจารณาวิธีการฆ่าเชื้อเปรียบเทียบกับจำนวนรอบการฆ่าเชื้อ พบว่าการฉายรังสียูวีซีและการอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อนสามารถคงประสิทธิภาพการกรองอนุภาคให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานโดยมีค่าร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาคมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 95 ตลอดการทดสอบ ซึ่งภายหลังการฆ่าเชื้อรอบที่ 20 หน้ากาก N95 รุ่น 8110s, รุ่น 9105, รุ่น 8210V และ รุ่น DD02V-N95-2K ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการฉายรังสียูวีซีมีค่าเฉลี่ยร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาค เท่ากับ 95.95 ± 0.73 , 95.28 ± 0.42 , 98.54 ± 0.66 และ 98.37 ± 1.01 ตามลำดับ ขณะที่การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อนมีค่าเฉลี่ยร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาค เท่ากับ 96.85 ± 0.60 ,

95.41 ± 0.19 , 97.87 ± 1.22 และ 97.16 ± 0.99 ตามลำดับ ซึ่งยังคงมีประสิทธิภาพการกรองอนุภาคอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน อย่างไรก็ตามการแช่น้ำร้อนและการแช่น้ำเดือดส่งผลให้ประสิทธิภาพการกรองอนุภาคลดลงอย่างชัดเจนเมื่อจำนวนรอบการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น โดยภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยการแช่น้ำร้อน 7 รอบ หน้ากาก N95 รุ่น 8110s, รุ่น 9105, รุ่น 8210V และ รุ่น DD02V-N95-2K มีค่าเฉลี่ยร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาค เท่ากับ 92.46 ± 4.53 , 94.18 ± 0.37 , 94.13 ± 0.79 และ 90.68 ± 0.99 ตามลำดับ ขณะที่การแช่น้ำเดือดภายหลังการฆ่าเชื้อ 5 รอบ พบว่าหน้ากาก N95 รุ่น 8110s, รุ่น 8210V และรุ่น DD02V-N95-2K มีค่าเฉลี่ยร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาคเท่ากับ 94.05 ± 2.31 , 90.24 ± 2.79 และ 93.86 ± 0.99 ตามลำดับ ส่วนหน้ากาก รุ่น 9105 มีค่าเฉลี่ยร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาค เท่ากับ 94.62 ± 0.38 ภายหลังการฆ่าเชื้อ 6 รอบ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าร้อยละ 95 และไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนด ผลการทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคของหน้ากาก N95 ก่อนและภายหลังการฆ่าเชื้อด้วย 4 วิธี ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพการกรองอนุภาคของหน้ากาก N95 ทั้ง 4 รุ่น (ก) 8110s, (ข) 9105, (ค) 8210V และ (ง) DD02V-N95-2K ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วย 4 วิธี ได้แก่ การฉายรังสียูวีซี (UVC) การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน (Hot Air Oven) การแช่น้ำร้อน (Hot Water) และการแช่น้ำเดือด (Boiling Water)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคของหน้ากาก N95 ภายหลังจากฆ่าเชื้อด้วย 4 วิธี

วิธีฆ่าเชื้อ	รุ่น	จำนวนรอบ การฆ่าเชื้อสุดท้าย	ค่าร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาค	
			ก่อนการฆ่าเชื้อ	หลังการฆ่าเชื้อ รอบสุดท้าย
UVC	8110S	20	97.94±0.08	95.95±0.73
	9105	20	96.97±0.26	95.28±0.42
	8210V	20	99.95±0.02	98.54±0.66
	DD02V-N95-2K	20	99.63±0.44	98.37±1.01
Hot Air Oven	8110S	20	98.44±0.32	96.85±0.60
	9105	20	97.02±0.61	95.41±0.19
	8210V	20	99.87±0.18	97.87±1.22
	DD02V-N95-2K	20	99.75±0.38	97.16±0.99
Hot Water	8110S	7	97.54±0.17	92.46±4.53
	9105	7	97.12±0.12	94.18±0.37
	8210V	7	99.95±0.06	94.13±0.79
	DD02V-N95-2K	7	99.92±0.05	90.68±0.99
Boiling Water	8110S	5	96.68±1.24	94.05±2.31
	9105	6	98.84±0.08	94.62±0.38
	8210V	5	99.95±0.04	90.24±2.79
	DD02V-N95-2K	5	99.96±0.02	93.86±0.99

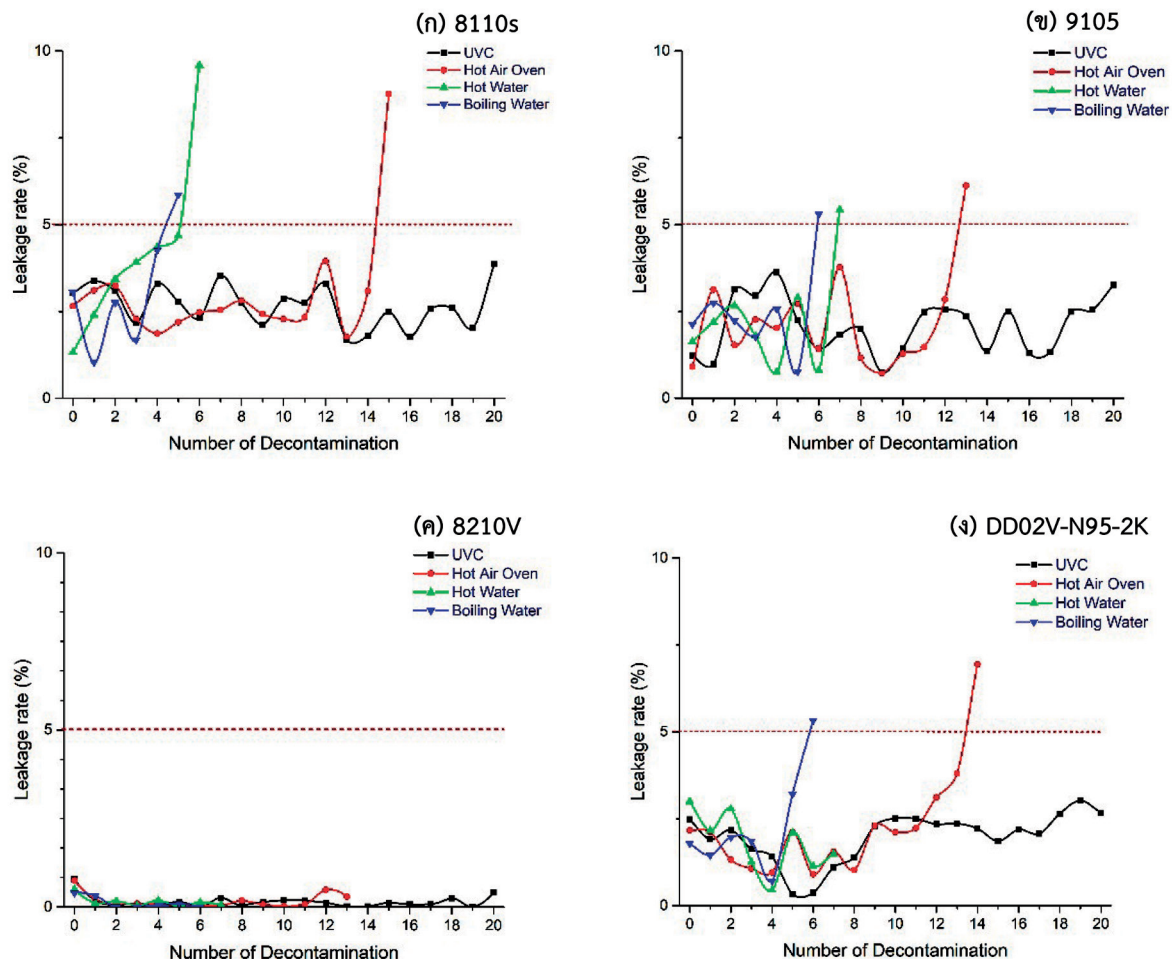
หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 5) โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับค่าร้อยละประสิทธิภาพการกรองอนุภาคต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 95

แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากาก N95 ทั้ง 4 รุ่น ภายหลังจากฆ่าเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 6 (ก)-(ง) โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับให้หน้ากากต้องมีค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากไม่เกินร้อยละ 5 พบว่าหน้ากาก N95 ทั้ง 4 รุ่น มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากในทิศทางเดียวกัน เมื่อพิจารณาผลการทดสอบโดยจำแนกตามวิธีการฆ่าเชื้อ พบว่าการฉายรังสียูวีซีสามารถรักษาค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานได้ตลอดการทดสอบ จำนวน 20 รอบ โดยหน้ากาก N95 รุ่น 8110s, รุ่น 9105, รุ่น 8210V และ รุ่น DD02V-N95-2K มีค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากรอบสุดท้าย เท่ากับ 3.86 ± 0.74 , 0.42 ± 0.11 , 3.26 ± 1.08 และ 2.67 ± 0.90 ตามลำดับ ขณะที่การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน พบว่า

หน้ากาก N95 รุ่น 8110s, รุ่น 9105 และ รุ่น DD02V-N95-2K มีแนวโน้มค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนรอบการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น โดยมีค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากรอบสุดท้าย เท่ากับ 8.76 ± 3.05 (รอบที่ 15), 6.12 ± 3.34 (รอบที่ 13) และ 6.94 ± 2.88 (รอบที่ 14) ตามลำดับ ยกเว้น หน้ากากรุ่น 8210V ซึ่งมีค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แต่ต้องยุติการทดสอบในรอบที่ 14 เนื่องจากสายรัดศีรษะเกิดการชำรุด ส่วนการแช่น้ำร้อนและการแช่น้ำเดือดส่งผลให้ค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากาก เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและเกินเกณฑ์มาตรฐานในจำนวนรอบการฆ่าเชื้อน้อยกว่าการฉายรังสียูวีซีและการอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน โดยภายหลังจากฆ่าเชื้อด้วยการแช่น้ำร้อนหน้ากาก N95 รุ่น 8110s และ รุ่น 9105 ซึ่งเป็นหน้ากากแบบไม่มีลิ้นระบายอากาศมี

ค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากาก รอบสุดท้ายเกินเกณฑ์มาตรฐานภายหลังการฆ่าเชื้อ จำนวน 6 และ 7 รอบ โดยมีค่าเท่ากับ 9.97 ± 0.72 และ 5.42 ± 4.3 ตามลำดับ แม้ว่าหน้ากาก N95 แบบมีลิ้น ระบายอากาศ รุ่น 8210V และ รุ่น DD02V-N95-2K จะมีค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายใน หน้ากาก เท่ากับ 0.05 ± 0.01 และ 1.50 ± 1.09 ตามลำดับ ซึ่งยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แต่ค่าร้อยละประสิทธิภาพ การกรองอนุภาคภายหลังการฆ่าเชื้อมีค่าต่ำกว่าร้อยละ 95 ในการฆ่าเชื้อรอบที่ 7 จึงยุติการทดสอบความกระชับ กับใบหน้าในรอบดังกล่าว สำหรับการแช่น้ำเดือด พบว่า หน้ากาก N95 รุ่น 9105 หน้ากากแบบพับไม่มีลิ้นระบาย อากาศ และรุ่น DD02V-N95-2K หน้ากากแบบพับมี

ลิ้นระบายอากาศ มีค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละออง ฝอยภายในหน้ากากเกินเกณฑ์มาตรฐานในรอบที่ 6 มีค่า เท่ากับ 5.30 ± 2.45 และ 5.33 ± 1.17 ตามลำดับ ในขณะที่ หน้ากาก N95 แบบทรงถ้วยทั้งรุ่นที่ไม่มีลิ้นระบายอากาศ รุ่น 8110s และรุ่นที่มีลิ้นระบายอากาศ รุ่น 8210V แม้ว่า ค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากาก จะยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 2.12 ± 1.69 และ 0.00 ± 0.00 ตามลำดับ แต่ต้องยุติการทดสอบการฆ่าเชื้อ ในรอบที่ 5 เนื่องจากประสิทธิภาพการกรองอนุภาค ภายหลังการฆ่าเชื้อมีค่าต่ำกว่าร้อยละ 95 ผลการทดสอบ ความกระชับกับใบหน้าของหน้ากาก N95 ก่อนและ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วย 4 วิธี ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากของหน้ากาก N95 ทั้ง 4 รุ่น (ก) 8110s, (ข) 9105, (ค) 8210V และ (ง) DD02V-N95-2K ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วย 4 วิธี ได้แก่ การฉายรังสียูวีซี (UVC) การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน (Hot Air Oven) การแช่น้ำร้อน (Hot Water) และการแช่น้ำเดือด (Boiling Water)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความกระชับกับใบหน้าของหน้ากาก N95 ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วย 4 วิธี

วิธีฆ่าเชื้อ	รุ่น	จำนวนรอบ การฆ่าเชื้อสุดท้าย	ค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอย ภายในหน้ากาก	
			ก่อนการฆ่าเชื้อ	หลังการฆ่าเชื้อ รอบสุดท้าย
UVC	8110S	20	3.03±0.40	3.86±0.74
	9105	20	1.23±1.04	3.26±1.08
	8210V	20	0.78±1.12	0.42±0.11
	DD02V-N95-2K	20	2.48±0.53	2.67±0.90
Hot Air Oven	8110S	15	2.66±0.75	8.76±3.05
	9105	13	0.91±0.60	6.12±3.34
	8210V	13	0.75±0.53	0.29±0.73
	DD02V-N95-2K	14	2.17±0.92	6.94±2.88
Hot Water	8110S	6	1.43±0.67	9.97±0.72
	9105	7	1.63±1.49	5.42±4.33
	8210V	7	0.50±0.17	0.05±0.01
	DD02V-N95-2K	7	3.00±0.56	1.50±1.09
Boiling Water	8110S	5	3.05±0.70	2.12±1.69
	9105	6	2.13±0.83	5.30±2.45
	8210V	6	0.40±0.48	0.00±0.00
	DD02V-N95-2K	6	1.78±0.39	5.33±1.17

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 5) โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับค่าร้อยละอัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากไม่เกินร้อยละ 5

การประเมินประสิทธิภาพการป้องกันของหน้ากาก N95 ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ พิจารณาร่วมกันระหว่างผลการทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้า พบว่าหน้ากาก N95 ทุกรุ่นทั้งชนิดที่มีลิ้นระบายอากาศและรุ่นที่ไม่มีลิ้นระบายอากาศสามารถคงประสิทธิภาพการป้องกันให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานได้ครบ 20 รอบ เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการฉายรังสียูวีซี ขณะที่การฆ่าเชื้อด้วยการอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน หน้ากากทั้ง 4 รุ่น สามารถคงประสิทธิภาพการป้องกันให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานได้ในช่วง 12-14 รอบ โดยหน้ากากรุ่น 8110s สามารถรักษาประสิทธิภาพการป้องกันได้สูงสุด 14 รอบ ขณะที่รุ่น 9105 สามารถคงประสิทธิภาพการป้องกันได้ 12 รอบ ส่วนหน้ากากรุ่น 8210V และ DD02V-N95-2K เป็นหน้ากากแบบมีลิ้นระบายอากาศสามารถรักษาประสิทธิภาพ

การป้องกันให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานหลังผ่านการฆ่าเชื้อ 13 รอบ ในส่วนของการแช่น้ำร้อน พบว่าหน้ากากสามารถคงประสิทธิภาพการป้องกันให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานได้ 5-6 รอบ โดยหน้ากากรุ่น 8110s คงประสิทธิภาพการป้องกันได้ 5 รอบ ขณะที่หน้ากาก N95 รุ่น 8210V DD02V-N95-2K และ 9105 สามารถรักษาประสิทธิภาพการป้องกันให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานได้ 6 รอบ กรณีการแช่น้ำเดือดแสดงให้เห็นว่า หน้ากาก N95 สูญเสียประสิทธิภาพการป้องกันเร็วกว่าวิธีอื่น โดยสามารถคงประสิทธิภาพการป้องกันให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานอยู่ในช่วง 4-5 รอบ ทั้งในกลุ่มหน้ากากที่มีลิ้นระบายอากาศและไม่มีลิ้นระบายอากาศ โดยผลการประเมินจำนวนรอบการฆ่าเชื้อที่หน้ากาก N95 ยังคงผ่านเกณฑ์มาตรฐานด้านประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้า ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จำนวนรอบการฆ่าเชื้อที่หน้ากาก N95 ยังคงผ่านเกณฑ์มาตรฐาน

ชนิดหน้ากาก N95	รุ่น	จำนวนรอบการฆ่าเชื้อ							
		UVC		Hot Air Oven		Hot Water		Boiling Water	
		PFE	FC	PFE	FC	PFE	FC	PFE	FC
ไม่มีลิ้นระบายอากาศ	8110s	20	20	20	14	6	5	4	5*
	9105	20	20	20	12	6	6	5	6
มีลิ้นระบายอากาศ	8210V	20	20	20	13	6	7*	4	5*
	DD02V-N95-2K	20	20	20	13	6	7*	4	5

หมายเหตุ: PFE คือ ประสิทธิภาพการกรองอนุภาค, FC คือ ความกระชับกับใบหน้า และ * คือ ยุติการทดสอบเนื่องจากค่าร้อยละ ประสิทธิภาพการกรองอนุภาคต่ำกว่าร้อยละ 95

วิจารณ์

การศึกษานี้เลือกวิธีการฆ่าเชื้อ 4 วิธี ได้แก่ การฉายรังสียูวีซี การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน การแช่น้ำร้อน และการแช่น้ำเดือด เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย มีต้นทุนต่ำ และมีการนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อหน้ากาก N95 เพื่อการใช้ซ้ำทั้งในหน่วยงานทางการแพทย์ และในประชาชนทั่วไป โดยวิธีการฆ่าเชื้อด้วยการฉายรังสียูวีซีและการอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อนเป็นวิธีที่ถูกใช้ในหน่วยงานทางการแพทย์และสถานพยาบาล⁽³⁰⁾ ขณะที่การแช่น้ำร้อนและการแช่น้ำเดือดเป็นวิธีที่ประชาชนทั่วไปนิยมใช้ในการฆ่าเชื้อหน้ากากในช่วงที่เกิดการขาดแคลนหน้ากากอนามัยจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคโควิด 19⁽³¹⁾ นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่สนับสนุนการใช้วิธีการฆ่าเชื้อดังกล่าวในการนำหน้ากาก N95 กลับมาใช้ซ้ำ อย่างไรก็ตามแม้งานวิจัยก่อนหน้านี้จะมีการศึกษาการฆ่าเชื้อของหน้ากาก N95 เพื่อการใช้ซ้ำอย่างแพร่หลาย แต่ส่วนใหญ่มุ่งเน้นการประเมินประสิทธิภาพการกรองอนุภาคเป็นหลักหรือศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันเฉพาะหน้ากากบางรูปทรง ขณะที่การศึกษารังสียูวีซีได้ประเมินประสิทธิภาพการป้องกันร่วมกันทั้งประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้าของหน้ากาก N95 ทั้งชนิดที่มีลิ้นระบายอากาศและไม่มีลิ้นระบายอากาศ และครอบคลุมหน้ากากทั้งแบบทรงถ้วยและแบบพับ ซึ่งเป็นรูปแบบหน้ากากที่มีจำหน่ายทั่วไปและนิยมใช้งานทั้งในภาคประชาชน

ภาคอุตสาหกรรม และหน่วยงานทางการแพทย์ กระบวนการทดสอบดำเนินการในห้องปฏิบัติการที่เปิดให้บริการทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้าของหน้ากาก N95 โดยอ้างอิงวิธีทดสอบและสภาวะที่ใช้ในการทดสอบตามมาตรฐาน NIOSH และ OSHA โดยในแต่ละวิธีการฆ่าเชื้อได้ใช้หน้ากาก N95 สำหรับการทดสอบแต่ละพารามิเตอร์จำนวน 5 ชิ้นต่อรุ่น และทำการวิเคราะห์ผลซ้ำขึ้นละ 5 ครั้ง เพื่อประเมินแนวโน้มและวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดสอบ ซึ่งจำนวนดังกล่าวเพียงพอสำหรับการประเมินแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของประสิทธิภาพการป้องกันของหน้ากาก N95 ภายหลังจากการฆ่าเชื้อ และสามารถใช้เปรียบเทียบผลระหว่างวิธีการฆ่าเชื้อแต่ละวิธีได้ จากการประเมินความแปรปรวนของผลการทดสอบ พบว่าข้อมูลบางส่วนมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างของลักษณะทางกายภาพและความกระชับกับใบหน้าของหน้ากากแต่ละชิ้นก่อนเริ่มการทดสอบ อย่างไรก็ตามแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลการทดสอบภายหลังจากการฆ่าเชื้อยังเป็นไปในทิศทางใกล้เคียงกัน

จากการศึกษาขีดจำกัดของวิธีการฆ่าเชื้อหน้ากาก N95 ทั้งแบบไม่มีลิ้นระบายอากาศ (รุ่น 8110s และ 9105) และแบบมีลิ้นระบายอากาศ (รุ่น 8210V และ DD02V-N95-2K) พบว่าการฆ่าเชื้อด้วยการฉายรังสียูวีซีเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพการป้องกันสูงสุด โดย

หน้ากากทุกรุ่นสามารถรักษาประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้าได้ต่อเนื่องถึง 20 รอบ ผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่าการฉายรังสียูวีซีไม่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของหน้ากากแม้จะมีการนำกลับมาใช้ซ้ำหลายรอบ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า ซึ่งได้ระบุว่ารังสียูวีซีในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมสามารถทำลายเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโมเลกุลของเส้นใยโพลิโพรพิลีนที่ใช้เป็นวัสดุหลักในการผลิตหน้ากาก⁽²⁷⁾ ซึ่งการที่หน้ากากทั้งแบบมีลิ้นระบายอากาศและไม่มีลิ้นระบายอากาศให้ผลการทดสอบในทิศทางเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการฉายรังสียูวีซีมีความเหมาะสมต่อการฆ่าเชื้อในหน้ากากหลากหลายรูปแบบ นอกจากนี้ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Fischer RJ และคณะ ซึ่งพบว่าการฉายรังสียูวีซีสามารถคงประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับกับใบหน้าของหน้ากาก N95 ได้ดีกว่าวิธีการฆ่าเชื้อที่ใช้ความร้อนหรือความชื้น การใช้ความร้อนขึ้นมักส่งผลให้โครงสร้างและส่วนประกอบของหน้ากากเสื่อมสภาพเร็วขึ้นเมื่อมีการนำกลับมาใช้ซ้ำหลายรอบ⁽³²⁾

การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้นทั้งการแช่น้ำร้อนและการแช่น้ำเดือด ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการป้องกันของหน้ากาก โดยหน้ากากเริ่มเสื่อมสภาพจนไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานภายหลังการฆ่าเชื้อเพียง 4-6 รอบ เนื่องจากความชื้นและอุณหภูมิที่สูง ส่งผลให้โครงสร้างและชั้นกรองของหน้ากากเสื่อมสภาพ นอกจากนี้ผลการทดสอบความแนบกระชับกับใบหน้าที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วยังชี้ให้เห็นว่า ความร้อนขึ้นทำให้โครงสร้างของหน้ากากเกิดการเสียรูปทรงทางกายภาพ (Structural Deformation) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการแนบสนิทกับใบหน้านลดลงและไม่สามารถกลับคืนรูปทรงเดิมได้ การฆ่าเชื้อหน้ากาก N95 ด้วยการอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อนหรือการใช้ความร้อนแห้ง แม้จะสามารถคงประสิทธิภาพการป้องกันของหน้ากากได้ดีกว่าการใช้ความร้อนขึ้น แต่ผลการศึกษพบว่า การสะสมของความร้อนเป็นเวลานานส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพของส่วนประกอบบางส่วนของหน้ากาก โดยเฉพาะสายรัดศีรษะ ซึ่งมีการสูญเสียความยืดหยุ่นส่งผล

กระทบโดยตรงต่อความกระชับกับใบหน้าของหน้ากาก ผลการทดสอบดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ South JT และคณะ ซึ่งระบุว่า การสัมผัสความร้อนอย่างต่อเนื่องก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพของยางและวัสดุพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นองค์ประกอบของหน้ากาก N95⁽³²⁾ การเสื่อมสภาพของส่วนประกอบเหล่านี้อาจนำไปสู่การลดลงของความแนบกระชับกับใบหน้า และส่งผลให้ประสิทธิภาพการป้องกันโดยรวมไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน แม้ประสิทธิภาพการกรองของแผ่นกรองจะยังคงอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ก็ตาม นอกจากนี้ NIOSH ระบุว่า การประเมินความปลอดภัยของหน้ากากกรองอากาศจำเป็นต้องพิจารณาความสมบูรณ์ของระบบโดยรวม ไม่ใช่เพียงประสิทธิภาพของชั้นกรองเท่านั้น⁽³⁴⁾ เนื่องจากหากสายรัดเกิดการชำรุดหรือคลายตัวจะทำให้อัตราการรั่วไหลของละอองฝอยภายในหน้ากากเพิ่มสูงขึ้น

การนำหน้ากาก N95 กลับมาใช้ซ้ำควรพิจารณาร่วมกันระหว่างประสิทธิภาพการต้านเชื้อจุลชีพและประสิทธิภาพการป้องกันภายหลังการฆ่าเชื้อ ควรดำเนินการภายใต้กระบวนการที่มีการควบคุมอย่างเหมาะสม โดยเฉพาะในการฆ่าเชื้อหน้ากาก N95 ด้วยการฉายรังสียูวีซี การควบคุมปริมาณรังสียูวีซี ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ และตำแหน่งการวางหน้ากากเพื่อให้รังสียูวีสามารถส่องผ่านได้อย่างทั่วทั้งชิ้น เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ ดังนั้นวิธีการฆ่าเชื้อด้วยรังสียูวีซีในหน้ากาก N95 เพื่อการนำกลับมาใช้ซ้ำจึงเหมาะสมสำหรับหน่วยงานทางการแพทย์หรือสถานพยาบาลที่มีความเชี่ยวชาญและมีระบบควบคุมที่ปลอดภัยมากกว่าการนำไปประยุกต์ใช้ในภาคประชาชนทั่วไป

สรุป

การศึกษาประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของหน้ากาก N95 เพื่อการใช้ซ้ำ โดยใช้วิธีฆ่าเชื้อ 4 วิธี ได้แก่ การฉายรังสียูวีซี การอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อน การแช่น้ำร้อน และการแช่น้ำเดือด จากการประเมินประสิทธิภาพการป้องกันด้วยการทดสอบประสิทธิภาพการกรองอนุภาคร่วมกับการทดสอบความกระชับกับใบหน้า พบว่า

การฆ่าเชื้อด้วยรังสียูวีซีมีประสิทธิภาพการกรองและความกระชับกับใบหน้าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แม้ผ่านการฆ่าเชื้อ 20 รอบ ส่วนการอบแห้งด้วยเตาลมร้อนสามารถรักษาประสิทธิภาพการกรองให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานหลังการฆ่าเชื้อ 20 รอบ แต่ความกระชับกับใบหน้าไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานหากฆ่าเชื้อมากกว่า 12 รอบ เนื่องจากสายรัดศีรษะเกิดการชำรุด การแช่น้ำร้อน และแช่น้ำเดือดส่งผลให้ประสิทธิภาพการกรองและความกระชับกับใบหน้าลดลงต่ำกว่ามาตรฐานหลังการฆ่าเชื้อเพียง 6 และ 4 รอบ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า หน้ากาก N95 ทั้งแบบมีลิ้นระบายอากาศและแบบไม่มีลิ้นระบายอากาศให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกัน ดังนั้น หน้ากาก N95 สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ โดยการฉายรังสียูวีซีเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดและไม่ส่งผลเสียต่อประสิทธิภาพการป้องกันของหน้ากาก ซึ่งเหมาะสำหรับหน่วยงานทางการแพทย์หรือสถานพยาบาลที่มีระบบควบคุมความปลอดภัย อย่างไรก็ตามการนำไปประยุกต์ใช้ในภาคประชาชนทั่วไปยังมีข้อจำกัด เนื่องจากต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะทางและควบคุมสภาวะการฉายรังสียูวีซีอย่างเหมาะสมเพื่อให้การฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพ

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

การศึกษานี้ไม่มีการนำปัญญาประดิษฐ์มาช่วยในการเรียบเรียงเนื้อหาทางวิชาการ การวิเคราะห์ข้อมูล และการสรุปผลของบทความ ทั้งนี้เนื้อหาในบทความเป็นผลงานของผู้เขียนทั้งหมด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักรังสีและเครื่องมือแพथวิทยาการแพทย์ สำหรับการสนับสนุนงบประมาณและสถานที่ในการดำเนินการทดลอง และขอขอบคุณ บุคลากรกลุ่มเครื่องมือแพथวิทยาการแพทย์ สำนักรังสีและเครื่องมือแพथวิทยาการแพทย์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet* 2018; 391(10127): 1285-300.
2. สำนักสื่อสารความเสี่ยงและพัฒนาพฤติกรรมสุขภาพ กรมควบคุมโรค. กรมควบคุมโรค เตือนเข้าสู่ฤดูฝน หวั่นเด็กเล็กป่วยโรคติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี (RSV). [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 24 ต.ค. 2568]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://ddc.moph.go.th/brc/news.php?news=44084&deptcode=brc&news_views=3504.
3. Luangwilai T, Ong-Artborirak P, Manomaipiboon B, Ruamtawee W, Kunno J. PM2.5 risk perception and associated with sociodemographic factors in urban Thailand. *Sci Rep* 2025; 15(1): 32283. (9 pages).
4. Centers for Disease Control and Prevention. NIOSH-approved N95 respirators. [online]. 2024; [cited 2025 Oct 26]; [5 screens]. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/niosh/ppe/niosh-approved-respirators/index.html>.
5. Ng I, Kave B, Begg F, Bodas CR, Segal R, Williams D. N95 respirators: quantitative fit test pass rates and usability and comfort assessment by health care workers. *Med J Aust* 2022; 217(2): 88-93.
6. Niezgoda G, Kim JH, Roberge RJ, Benson SM. Flat fold and cup-shaped N95 filtering facepiece respirator face seal area and pressure determinations: a stereophotogrammetry study. *J Occup Environ Hyg* 2013; 10(8): 419-24.
7. Wangsan K, Sapbamrer R, Sirikul W, Kiratipaisarl W, Ongprasert K, Assavanopakun P, et al. Evaluating the fit and performance of flat-fold, cup, and three-panel respirators

- among Thai healthcare personnel. *Front Public Health* 2025; 13: 1561571. (11 pages).
8. Degesys NF, Wang RC, Kwan E, Fahimi J, Noble JA, Raven MC. Correlation between N95 extended use and reuse and fit failure in an emergency department. *JAMA* 2020; 324(1): 94–6.
 9. Das S, Sarkar S, Das A, Das S, Chakraborty P, Sarkar J. A comprehensive review of various categories of face masks resistant to Covid-19. *Clin Epidemiol Glob Health* 2021; 12: 100835. (16 pages).
 10. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. Fact sheet การเลือกและการใช้หน้ากาก N95 ที่ถูกต้อง: ความรู้สำหรับประชาชน. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 26 ต.ค. 2568]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://nih.dm.sc.moph.go.th/data/data/fact_sheet/2_62.pdf.
 11. World Health Organization. Shortage of personal protective equipment endangering health workers worldwide. [online]. 2020; [cited 2026 May 2]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.who.int/news/item/03-03-2020-shortage-of-personal-protective-equipment-endangering-health-workers-worldwide>.
 12. Faridi-Majidi R, Norouz F, Boroumand S, Nasrollah Tabatabaei S, Faridi-Majidi R. Decontamination assessment of nanofiber-based N95 masks. *Environ Sci Pollut Res Int* 2022; 29(53): 80411–21.
 13. Juang PSC, Tsai P. N95 respirator cleaning and reuse methods proposed by the inventor of the N95 mask material. *J Emerg Med* 2020; 58(5): 817–20.
 14. National Archives and Records Administration. 84.174 Filter efficiency level determination test—non-powered series N, R, and P filtration. [online]. 2020; [cited 2025 Oct 28]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.ecfr.gov/on/2020-04-14/title-42/section-84.174>.
 15. Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.134: respiratory protection. [online]. 2016; [cited 2025 Oct 28]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.osha.gov/laws-regs/regulations/standardnumber/1910/1910.134AppA>.
 16. N95Decon. Technical report for UV-C-based N95 reuse risk management. [online]. 2020; [cited 2025 Oct 28]; [20 screens]. Available from: URL: https://static1.squarespace.com/static/5e8126f89327941b9453eeef/t/5f39ec50d689050994c07338/1597631576383/20200826_N95DECON_UVC_technical_report_v2_1.pdf.
 17. Yuen JG, Marshlok AC, Benziger PT, Yan S, Cello J, Stackhouse CA, et al. Dry heat sterilization as a method to recycle N95 respirator masks: the importance of fit. *PLoS ONE* 2022; 17(1): e0257963. (15 pages).
 18. Viscusi DJ, Bergman MS, Eimer BC, Shaffer RE. Evaluation of five decontamination methods for filtering facepiece respirators. *Ann Occup Hyg* 2009; 53(8): 815–27.
 19. Liao L, Xiao W, Zhao M, Yu X, Wang H, Wang Q, et al. Can N95 respirators be reused after disinfection? How many times? *ACS Nano* 2020; 14(5): 6348–56.
 20. Smith JS, Hanseler H, Welle J, Rattray R, Campbell M, French T, et al. Effect of various decontamination methods on filtration efficiency of N95 respirators. *J Hosp Infect* 2020; 105(4): 663–9.
 21. ปรียานุช บุตรมี, กัญญารัตน์ นิตี, พรเทพ จันทร์คุณภาส. การประเมินวิธีการจัดสิ่งปนเปื้อนของหน้ากาก N95 เพื่อการใช้งานซ้ำจากประสิทธิภาพการกรองอนุภาคและความกระชับ. *ว กรมวิทย์ พ* 2567; 66(4): 486–99.

22. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. มอก. 2480-2562 หน้ากากใช้ครั้งเดียวชนิด N95 ลดความเสี่ยงการติดเชื้อทางการแพทย์. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 พิเศษ 70 ง. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 19 ต.ค. 2568]; [13 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://a.tisi.go.th/t>.
23. บริษัท ซาย แอนด์ เทคโนโลยี เซอร์วิส จำกัด. 3M 8210 N95 หน้ากากกันฝุ่น ละออง PM2.5 และ PM10. [ออนไลน์]. 2568; [สืบค้น 7 ก.พ. 2569]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.safety-market.com/product/3m-8210-n95>.
24. 3M ประเทศไทย. 3M™ VFlex™ 9105 หน้ากากป้องกันฝุ่นละอองแบบพับได้ N95. [ออนไลน์]. 2568; [สืบค้น 7 ก.พ. 2569]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.3m.co.th/3M/th_TH/p/d/v000070763.
25. 3M ประเทศไทย. 3M™ 8210V หน้ากากป้องกันฝุ่น ละออง ฟูมโลหะแบบมีวาล์ว N95. [ออนไลน์]. 2568; [สืบค้น 7 ก.พ. 2569]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.3m.co.th/3M/th_TH/p/d/v000202511.
26. N95instock Professional N95 Mask Supplier. DD02V-N95-2K Shigematsu N95 mask made in Japan. [online]. 2024; [cited 2026 Feb 7]; [1 screen]. Available from: URL: <https://n95instock.com/dd02v-n95-2-k-shigematsu-n95-mask-made-in-japan>.
27. Ontiveros CC, Sweeney CL, Smith C, MacIsaac S, Bennett JL, Munoz S, et al. Assessing the impact of multiple ultraviolet disinfection cycles on N95 filtering facepiece respirator in-tegrity. Sci Rep 2021; 11(1): 12279. (9 pages).
28. Xiang Y, Song Q, Gu W. Decontamination of surgical face masks and N95 respirators by dry heat pasteurization for one hour at 70°C. Am J Infect Control 2020; 48(8): 880-2.
29. Mackenzie D. Reuse of N95 masks. Engineering 2020; 6(6): 593-6.
30. Thai NAPCI. ผลการวิจัยการฆ่าเชื้อด้วยการอบร้อนและฉายรังสี UV-C เพื่อนำหน้ากาก N95 และหน้ากากอนามัยกลับมาใช้ซ้ำ. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 17 พ.ค. 2569]; [59 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.thainapci.org/2021/wp-content/uploads/2021/05/ผลการวิจัยการฆ่าเชื้อด้วยการอบร้อน-และฉา.pdf>.
31. Wang D, Sun BC, Wang JX, Zhou YY, Chen ZW, Fang Y, et al. Can masks be reused after hot water decontamination during the COVID-19 pandemic? Engineering. 2020; 6(10): 1115-21.
32. Fischer RJ, Morris DH, van Doremalen N, Sarchette S, Matson MJ, Kamrud KI, et al. Effectiveness of N95 respirator decontamination and reuse against SARS-CoV-2 virus. Emerg Infect Dis 2020; 26(9): 2253-5.
33. South JT, Case SW, Reifsnider KL. Effects of thermal aging on the mechanical properties of natural rubber. Rubber Chem Technol 2003; 76(4): 785-802.
34. National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH guide to the selection and use of particulate respirators certified under 42 CFR 84. [online]. 2020; [cited 2026 Jan 7]; [34 screens]. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/96-101/default.html>.

A Study of Decontamination Efficacy on N95 Respirators for Reuse

Kanyarat Nitee, Preeyanut Sutngam, and Pornthep Chancunapas

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

ABSTRACT The outbreak of respiratory diseases, including novel influenza viruses as well as emerging and re-emerging infectious diseases, combined with PM_{2.5} air pollution, may lead to shortages of N95 respirators. The aim of this study was to evaluate the decontamination limits of N95 respirators to ensure their safe reuse. Popular N95 respirators with exhalation valves (8210V and DD02V-N95-2K) and without exhalation valves (8110s and 9105) were randomly selected. Four decontamination methods were evaluated, namely UVC irradiation at a wavelength of 254 nm with a light intensity of at least 400 mW/m² for 20 minutes on each side, dry heat by using hot air oven at 75°C for 30 minutes, immersion in hot water at 60±5°C for 30 minutes, and immersion in boiling water at 100°C for 10 minutes. Protective performance was assessed by measuring particle filtration efficiency testing according to 42 CFR 84, requiring a filtration efficiency of at least 95%, and evaluating fit check of mask according to 29 CFR 1910.134, with a maximum allowable leakage rate of 5%. The results showed that UVC irradiation maintained both particle filtration efficiency and fit check performance within standard criteria throughout 20 decontamination cycles. Dry heat treatment maintained acceptable particle filtration efficiency for 20 cycles; however, fit check performance failed after 13 cycles. Hot water and boiling water immersion reduced particle filtration efficiency and fit check performance below standard limits after only 6 and 4 cycles, respectively. Therefore, UVC irradiation was the most effective decontamination method and did not adversely affect the protective performance of N95 respirators.

Keywords: Reuse limits, N95 respirators, Decontamination, Filtration efficiency

การเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อจากน้ำนู้ลูกตาของ ผู้ป่วยที่สงสัยภาวะติดเชื้อภายในลูกตาโดยใช้ ขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็กกับวิธีการเพาะเชื้อ แบบมาตรฐาน โรงพยาบาลเมตตาประชารักษ์ (วัดไร่ขิง)

วิรงค์รัตน์ บุญเรือง

กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลเมตตาประชารักษ์ (วัดไร่ขิง) นครปฐม 73210

บทคัดย่อ ภาวะติดเชื้อภายในลูกตาเป็นภาวะฉุกเฉินทางจักษุวิทยาที่อาจทำให้สูญเสียการมองเห็นอย่างถาวร การวินิจฉัยที่รวดเร็วและถูกต้องโดยการเพาะเชื้อจากน้ำนู้ลูกตามีความสำคัญต่อการรักษา การเพาะเชื้อต้องการปริมาณตัวอย่างมาก ในขณะที่ปริมาณน้ำนู้ลูกตาที่เก็บได้มีจำกัด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อและศึกษาความสัมพันธ์ของผลการเพาะเชื้อระหว่างขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็ก (pediatric blood culture bottles: PBCB) กับการเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน (conventional culture method: CCM) และศึกษาความสัมพันธ์ของผลการย้อมสีแกรมกับผลการเพาะเชื้อด้วยวิธี PBCB และ CCM ในผู้ป่วยที่สงสัยภาวะติดเชื้อภายในลูกตา จำนวน 60 ราย โดยแบ่งตัวอย่างแต่ละรายเพาะเชื้อทั้งสองวิธี ย้อมสีแกรม และตรวจหาเชื้อรา ผลการศึกษาพบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อด้วยวิธี PBCB และ CCM เท่ากับ 15.00% และ 13.33% ตามลำดับ ทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องในระดับสูง (Cohen's Kappa = 0.795) โดยให้ผลตรงกัน 95.00% การย้อมสีแกรมให้ผลบวก 5.00% และมีความสัมพันธ์กับผลการเพาะเชื้อด้วยวิธี CCM อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.002$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าทั้งสองวิธีให้อัตราการตรวจพบเชื้อที่ใกล้เคียงกันและมีความสอดคล้องสูง การใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันอาจเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและการรักษาที่ทันทั่วถึง การย้อมสีแกรมแม้มีความไวต่ำแต่เมื่อให้ผลบวกจะมีความสัมพันธ์กับผลการเพาะเชื้อควรทำควบคู่กับการเพาะเชื้อ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม

คำสำคัญ: ภาวะติดเชื้อภายในลูกตา, น้ำนู้ลูกตา, การเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน, การใช้ขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็ก, การย้อมสีแกรม

Corresponding author E-mail: wirongrud@gmail.com

Received: 10 February 2026

Revised: 8 June 2026

Accepted: 10 June 2026

บทนำ

ภาวะติดเชื้อภายในลูกตา (endophthalmitis) เป็นภาวะฉุกเฉินทางจักษุวิทยาที่เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงของเนื้อเยื่อภายในลูกตา โดยเฉพาะบริเวณวุ้นตา (vitreous) และน้ำหล่อเลี้ยงลูกตา (aqueous humor)⁽¹⁾ ภาวะนี้มักเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือไวรัส ซึ่งหากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงทีอาจนำไปสู่การสูญเสียการมองเห็นอย่างถาวร ภาวะติดเชื้อภายในลูกตา แบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลัก ได้แก่ ภาวะติดเชื้อจากภายนอก (exogenous endophthalmitis) ซึ่งเกิดจากการผ่าตัด บาดแผลที่ลูกตา หรือการฉีดยาเข้าในลูกตา และภาวะติดเชื้อจากภายใน (endogenous endophthalmitis) เกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อโรคผ่านทางกระแสเลือด⁽²⁾ เชื้อก่อโรคที่พบในภาวะติดเชื้อภายในลูกตามีความหลากหลาย โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกพบได้ถึงร้อยละ 93 ในกรณีติดเชื้อหลังการผ่าตัด โดยเฉพาะ Coagulase-negative staphylococci (CNS) พบมากถึงร้อยละ 45 ตามด้วย *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus* spp.⁽³⁾ ในกรณีการติดเชื้อหลังการบาดเจ็บที่ลูกตามักพบเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Staphylococcus* spp.⁽⁴⁾ การวินิจฉัยและรักษาอย่างรวดเร็วมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการรักษาสายตาของผู้ป่วย โดยการตรวจทางจุลชีววิทยาเพื่อระบุชนิดของเชื้อก่อโรคจะนำไปสู่การเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมและเพิ่มโอกาสในการรักษาให้ประสบความสำเร็จ ปัจจุบันการเพาะเชื้อจากน้ำวุ้นลูกตา (vitreous fluid) ถือเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยภาวะติดเชื้อภายในลูกตา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ได้แก่ blood agar, MacConkey agar, chocolate agar, thioglycolate broth และ sabouraud dextrose agar พร้อมทั้งการย้อมสีแกรม (gram stain) และตรวจหาเชื้อรา (KOH preparation) ซึ่งต้องใช้ปริมาณน้ำวุ้นลูกตาที่เพียงพอ การเก็บตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาทำได้โดยการใช้เข็ม ขนาด 18–20 gauge แทะเข้าไปในลูกตาและดูดของเหลวออกมา ปริมาณการเก็บโดยทั่วไปอยู่ที่ 0.2–0.5 มิลลิลิตร แต่บางครั้งไม่สามารถเก็บได้ตามปริมาณดังกล่าว ขึ้นอยู่กับความหนืดหรือปริมาณน้ำวุ้นลูกตาที่มีอยู่ เนื่องจากการดูดออกมามากเกินไปอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อดวงตาของผู้ป่วย

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิธีการเพาะเชื้อจากของเหลวในร่างกายโดยการประยุกต์ใช้ขวดเพาะเชื้อจากเลือด (blood culture bottles: BCB) พบว่าสามารถเพิ่มอัตราความสำเร็จในการเพาะเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ เช่น จาก peritoneal dialysis fluid⁽⁵⁾, pleural fluid⁽⁶⁾ และ sterile body fluid อื่นๆ⁽⁷⁾ การศึกษาของ Thariya P และคณะ⁽⁸⁾ ได้นำขวดเพาะเชื้อจากเลือดมาใช้เพาะเชื้อกับน้ำวุ้นลูกตา โดยเป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective) ผลการศึกษาพบว่าขวดเพาะเชื้อจากเลือดให้ผลบวกร้อยละ 90.1 เปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อแบบมาตรฐานที่ได้ร้อยละ 65.56 การศึกษาดังกล่าวใช้ขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับผู้ใหญ่ (adult blood culture bottles) ซึ่งต้องการปริมาณตัวอย่างมาก ในขณะที่น้ำวุ้นลูกตาที่เก็บได้มักจะมีปริมาณจำกัด เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว Tanaka T และคณะ⁽⁹⁾ ได้ทำการศึกษาโดยใช้ขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็กซึ่งเหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างที่น้อยกว่า การศึกษานี้เปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อในสองช่วงเวลา ได้แก่ เดือนมกราคม ค.ศ. 2010 ถึง ธันวาคม ค.ศ. 2011 (การเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน จำนวน 20 ราย) และเดือนมกราคม ค.ศ. 2012 ถึง ธันวาคม ค.ศ. 2015 (ขวดเพาะเชื้อสำหรับเด็ก จำนวน 34 ราย) ผลการศึกษาพบว่าขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็กให้อัตราการตรวจพบเชื้อที่สูงกว่าวิธีการเพาะเชื้อแบบมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การศึกษานี้มีข้อจำกัดสำคัญ 2 ประการ คือ ประการแรกจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มค่อนข้างน้อย (รวมเพียง 54 ราย) อาจส่งผลต่อความน่าเชื่อถือและความสามารถในการนำไปใช้กับประชากรกลุ่มใหญ่ ประการที่สองทั้งสองวิธีถูกทดสอบในช่วงเวลาที่ต่างกัน อาจมีปัจจัยรบกวนที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลา เช่น ความชำนาญของบุคลากร เทคนิคในการเก็บตัวอย่าง หรือชนิดของเชื้อที่แพร่ระบาดในแต่ละช่วงเวลา นอกจากนี้มีการศึกษาของ Tan HS และคณะ⁽¹⁰⁾ ที่แสดงผลแตกต่างออกไป โดยรายงานว่าอัตราการตรวจพบเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานสูงกว่าการเพาะเชื้อด้วยขวดเพาะเชื้อจากเลือดเล็กน้อย แม้ความแตกต่างจะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าเมื่อใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันจะให้อัตราการตรวจพบเชื้อเพิ่มขึ้นได้ถึงร้อยละ 81 จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าแม้จะมีการศึกษาในต่างประเทศหลายเรื่อง

แสดงประสิทธิภาพของชุดเพาะเชื้อจากเลือดในการเพาะเชื้อจากน้ำวุ้นลูกตา แต่ผลการศึกษายังมีความไม่สอดคล้องกัน และสิ่งที่สำคัญ คือ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเชื้อจากน้ำวุ้นลูกตาในประเทศไทยมีจำนวนจำกัดมากทำให้ขาดข้อมูลที่เป็นตัวแทนของประชากรไทย ซึ่งอาจมีลักษณะทางระบาดวิทยาและชนิดของเชื้อก่อโรคที่แตกต่างจากประเทศอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งยังไม่มีการศึกษาในประเทศไทยที่ใช้ชุดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็ก ซึ่งมีความเหมาะสมกับปริมาณน้ำวุ้นลูกตาที่จำกัด และยังไม่มีการศึกษาแบบ prospective study ที่เปรียบเทียบทั้งสองวิธีพร้อมกันในผู้ป่วยกลุ่มเดียวกันและช่วงเวลาเดียวกัน ซึ่งจะช่วยลดปัจจัยรบกวนและให้ข้อมูลที่แม่นยำมากขึ้น นอกจากนี้การเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อแล้ว การศึกษาความสัมพันธ์ (Agreement) ระหว่างผลการเพาะเชื้อทั้งสองวิธีมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการนำไปใช้ในทางคลินิก เนื่องจากหากทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกันสูง แสดงว่าวิธีใดวิธีหนึ่งสามารถใช้ทดแทนกันได้โดยให้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งจะช่วยในการตัดสินใจเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมตามบริบทและทรัพยากรที่มีอยู่ได้ในทางตรงกันข้ามหากพบว่าทั้งสองวิธีให้ผลที่ไม่สอดคล้องกัน อาจบ่งชี้ว่าแต่ละวิธีมีข้อดีในการตรวจพบเชื้อชนิดที่ต่างกันหรือในสภาวะที่ต่างกันอาจแนะนำว่าควรใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อให้สูงที่สุด ดังการศึกษาของ Tan HS และคณะ⁽¹⁰⁾ พบว่าการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันสามารถเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อได้ถึงร้อยละ 81 ซึ่งสูงกว่าการใช้วิธีใดวิธีหนึ่งเพียงอย่างเดียว การทำความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างทั้งสองวิธีจึงมีประโยชน์ต่อการพัฒนาแนวปฏิบัติทางคลินิกที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อจากน้ำวุ้นลูกตาระหว่างการใช้ชุดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็กและการเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน ในผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อภายในลูกตา ณ โรงพยาบาลเมตตาประชารักษ์ (วัดไร่ขิง) เพื่อหาแนวทางในการพัฒนาการวินิจฉัยภาวะติดเชื้อภายในลูกตาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์

ต่อการรักษาผู้ป่วยได้อย่างทันทั่วทั้งที่และเหมาะสม รวมทั้งช่วยลดความเสี่ยงต่อการสูญเสียการมองเห็น นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษายังสามารถนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับการพัฒนาแนวปฏิบัติทางคลินิกในการดูแลผู้ป่วยด้านจักษุวิทยาในประเทศไทยต่อไป โดยการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อและศึกษาความสัมพันธ์ของผลการเพาะเชื้อระหว่างการใช้อุปกรณ์เพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็กกับการเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน ในผู้ป่วยที่สงสัยภาวะติดเชื้อภายในลูกตา และศึกษาความสัมพันธ์ของผลการย้อมสีแกรมระหว่างผลการเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็กและการเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงวิเคราะห์แบบไปข้างหน้า (prospective analytical study) เพื่อเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อจากน้ำวุ้นลูกตาระหว่างการใช้ชุดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็กและการเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน ในผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อภายในลูกตา โดยทำการศึกษาระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2567 ณ โรงพยาบาลเมตตาประชารักษ์ (วัดไร่ขิง) จังหวัดนครปฐม

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ศึกษา คือ ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาที่โรงพยาบาลเมตตาประชารักษ์ (วัดไร่ขิง) ซึ่งมีอาการทางคลินิกสงสัยภาวะติดเชื้อภายในลูกตา (clinically suspected endophthalmitis) กลุ่มตัวอย่างได้มาโดยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบเฉพาะเจาะจง (purposive sampling)

เกณฑ์การคัดเข้า (inclusion criteria) ดังนี้

- 1) ผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกสงสัยว่ามีภาวะติดเชื้อภายในลูกตา
- 2) ผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อภายในลูกตา (Infectious endophthalmitis) ไม่เกิน 3 สัปดาห์ และมีประวัติการบาดเจ็บในลูกตาหรือการผ่าตัดครั้งก่อน ไม่เกิน 6 สัปดาห์
- 3) ผู้ป่วยมีความคมชัดในการมองเห็นอยู่ที่ระดับ 6/15 หรือแย่กว่า และ
- 4) มีปริมาณน้ำวุ้นลูกตาเพียงพอสำหรับการเพาะเชื้อทั้งสองวิธี (อย่างน้อย 0.2 มิลลิลิตร)

เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) ผู้ป่วยที่เข้ายาปฏิชีวนะหยอดตาหรือฉีดเข้าลูกตาภายใน 48 ชั่วโมงก่อนการเก็บตัวอย่าง

การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่าง

การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างอ้างอิงจากการศึกษาของ Thariya P และคณะ⁽⁸⁾ พบว่าสัดส่วนของผลการเพาะเชื้อที่ไม่สอดคล้องกันระหว่างสองวิธีมีค่าร้อยละ 10 และ ร้อยละ 34 โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติ (α) = 0.05 และอำนาจการทดสอบ (power) = 80% คำนวณโดยใช้สูตรการเปรียบเทียบค่าสัดส่วนสองกลุ่มที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน (two dependent proportions) ได้ขนาดกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 58 ตัวอย่าง เพิ่มขนาดกลุ่มตัวอย่างอีกร้อยละ 5 เพื่อชดเชยการสูญเสียข้อมูล ดังนั้นขนาดกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด เท่ากับ 61 ราย

เครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์

แบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วย รวบรวมข้อมูลทั่วไปของ ผู้ป่วย อาการทางคลินิก ประวัติการรักษา และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

อาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด (blood agar, MacConkey agar, chocolate agar, thioglycolate broth และ sabouraud dextrose agar (BioMedia, Thailand))

การย้อมสีแกรม โดยใช้สีย้อม crystal violet, iodine, decolorizer และ safranin (VC supply lab, Thailand) และตรวจหาเชื้อรา โดยใช้สารละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 30% (30% KOH) (PN Intermedical Supply, Thailand)

เครื่องตรวจจับอัตโนมัติ BD BACTEC FX SYSTEM (BD Diagnostics, USA), กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10× และ 40× Olympus (รุ่น CX3, บริษัท Olympus, Japan) และขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็ก (BD BACTEC Peds Plus) (BD Diagnostics, USA)

การเก็บตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตา

ตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาที่ไม่เจือจาง (undiluted vitreous specimens) ถูกเก็บโดยจักษุแพทย์ที่มี

ประสบการณ์ภายใต้สภาวะปลอดเชื้ออย่างเข้มงวด ผู้ป่วยได้รับการเตรียมด้วยการทำความสะอาดบริเวณตาและรอบตา ตามด้วยการใช้ยาชาเฉพาะที่ (tetracaine hydrochloride 0.5%) (MILLIMED BFS, Thailand) ตัวอย่างที่เก็บได้จะถูกส่งไปยังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทันที ภายในเวลาไม่เกิน 30 นาที โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (20–25°C) ได้ปริมาณประมาณ 0.2–2.0 มิลลิลิตร

วิธีการเพาะเชื้อ

ตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาแต่ละราย แบ่งเป็น 3 ส่วน โดยมีรายละเอียดดังนี้

ส่วนที่ 1 การเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน (CCM) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่ blood agar สำหรับแบคทีเรียทั่วไป, MacConkey agar สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ, chocolate agar สำหรับแบคทีเรียที่ต้องการปัจจัยเสริม เช่น *Haemophilus* spp. และ *Neisseria* spp., sabouraud dextrose agar สำหรับเชื้อรา และ thioglycolate broth สำหรับเชื้อทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน ตัวอย่างจะถูกเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ปริมาณ 1 หยด (ประมาณ 0.05 มิลลิลิตร) และบ่มในสภาวะที่เหมาะสม โดยตรวจสอบการเจริญของเชื้อทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าจะพบการเจริญของเชื้อ

ส่วนที่ 2 การเพาะเชื้อด้วยขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็ก (PBCB) ใช้ขวด BD BACTEC Peds Plus ตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในขวดโดยเทคนิคปลอดเชื้อ ปริมาณประมาณ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องตรวจจับอัตโนมัติ BD BACTEC FX SYSTEM เป็นระบบอัตโนมัติที่ตรวจจับการเจริญของเชื้อโดยวัดการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ โดยระบบจะตรวจสอบอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 7 วัน

ทั้งสองวิธีมีการควบคุมคุณภาพภายในและภายนอกตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาสากล

ส่วนที่ 3 การย้อมสีแกรม โดยตัวอย่างจะถูกหยดลงบนแผ่นสไลด์ ปริมาณ 1 หยด (ประมาณ 0.05 มิลลิลิตร) รอให้แห้งแล้วทำการย้อมสีแกรมตาม protocol และการตรวจเชื้อรา โดยตัวอย่างจะถูกหยดลงบนแผ่นสไลด์

ปริมาณ 1 หยด (ประมาณ 0.05 มิลลิลิตร) หยดน้ำยา สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 30% ปริมาณ 1 หยด แล้วปิดด้วย cover slip นำไปส่องดู ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10× และ 40×

การระบุชนิดเชื้อ

เมื่อพบการเจริญของเชื้อจากทั้งสองวิธีจะทำการ ระบุชนิดเชื้อโดยใช้วิธีการทางจุลชีววิทยามาตรฐาน ประกอบด้วย การสังเกตลักษณะโคโลนี (colony morphology) การย้อมสีแกรม (gram stain) และการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical tests) สำหรับ เชื้อจะใช้วิธีการสังเกตลักษณะทางจุลทรรศน์และ ทางกายภาพ

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ข้อมูลเชิงปริมาณ (quantitative data) นำเสนอเป็น ค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation: SD) หรือค่ามัธยฐาน (Median) และ พิสัยควอไทล์ (Interquartile range: IQR) แล้วแต่ การกระจายของข้อมูล ข้อมูลเชิงคุณภาพ (Qualitative data) นำเสนอเป็นจำนวน (n) ความถี่ และค่าร้อยละ (%)

สถิติเชิงวิเคราะห์ (analytical statistics)
1) การเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อระหว่างสองวิธี ใช้สถิติ McNemar χ^2 -test 2) การศึกษาความสัมพันธ์ ของผลการเพาะเชื้อระหว่างสองวิธีใช้สถิติ Cohen's Kappa (K) โดยแปลผลค่า Kappa coefficient ดังนี้ $K < 0.20$ = ความสอดคล้องน้อยมาก (Slight agreement), $K = 0.21-0.40$ = ความสอดคล้องน้อย

(Fair agreement), $K = 0.41-0.60$ = ความสอดคล้อง ปานกลาง (Moderate agreement), $K = 0.61-0.80$ = ความสอดคล้องดี (Substantial agreement) และ $K = 0.81-1.00$ = ความสอดคล้องดีมาก (Almost perfect agreement) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ p -value < 0.05

จริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการ จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของโรงพยาบาลเมตตา ประชาภิรักษ์ (วัดไร่ขิง) เลขที่ 006/2567 เมื่อวันที่ 21 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2567

ผล

ลักษณะพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง

จากจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่คำนวณได้ คือ 61 ราย แต่พบตัวอย่างที่มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการตรวจทั้ง สองวิธี 1 ราย ทำให้มีจำนวนกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 60 ราย

กลุ่มตัวอย่าง ประกอบด้วย เพศชาย 35 ราย (คิดเป็นร้อยละ 58.33) และเพศหญิง 25 ราย (คิดเป็น ร้อยละ 41.67) ผลการตรวจทางจุลชีววิทยาเบื้องต้น พบว่าการย้อมสี Gram stain ให้ผลบวก 3 ราย (คิดเป็นร้อยละ 5.00) และการตรวจ KOH preparation ให้ผลบวก 1 ราย (คิดเป็นร้อยละ 1.67 บ่งชี้ว่าส่วนใหญ่ ของผู้ป่วยมีผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์เป็นลบ แม้จะมีอาการทางคลินิกสงสัยภาวะติดเชื้อภายในลูกตา ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างและผลการตรวจทางจุลชีววิทยาเบื้องต้น (N = 60)

ลักษณะพื้นฐาน	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
เพศ		
ชาย	35	58.33
หญิง	25	41.67
ปริมาตรสิ่งส่งตรวจ (ml)	0.44±0.47 Min: 0.20 ml. Max: 2.00 ml.	

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างและผลการตรวจทางจุลชีววิทยาเบื้องต้น (N = 60) (ต่อ)

ลักษณะพื้นฐาน	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
ผลการตรวจทางจุลชีววิทยาเบื้องต้น		
การย้อมสี Gram stain พบเชื้อ	3 (gram positive cocci in pair)	5.00
การย้อมสี Gram stain ไม่พบเชื้อ	57	95.00
การตรวจ KOH preparation ให้ผลบวก	1 (Septate hyphae)	1.67
การตรวจ KOH preparation ให้ผลลบ	59	98.33
ผลการเพาะเชื้อ		
วิธี CCM ให้ผลบวก	8	13.33
วิธี PBCB ให้ผลบวก	9	15.00

การเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อ

จากการเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ผลการเพาะเชื้อทั้งสองวิธี พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้ทั้งหมด 10 ราย (10/60) คิดเป็นอัตราการตรวจพบเชื้อร้อยละ 16.7 ของจำนวนกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 60 ราย ผลการเพาะเชื้อด้วยวิธี CCM พบการเจริญของเชื้อ 8 ราย คิดเป็นอัตราการตรวจพบเชื้อ ร้อยละ 13.33 ในขณะที่วิธี PBCB พบการเจริญของเชื้อ 9 ราย คิดเป็นอัตราการตรวจพบเชื้อ ร้อยละ 15.00

เมื่อวิเคราะห์ความสอดคล้องระหว่างผลการเพาะเชื้อทั้งสองวิธี พบว่ามีผลการเพาะเชื้อที่ให้ผลบวกตรงกันทั้งสองวิธี 7 ราย (7/60) คิดเป็นร้อยละ 11.7 และให้ผลลบตรงกันทั้งสองวิธี 50 ราย (50/60) คิดเป็นร้อยละ 83.3 โดยมีผลการเพาะเชื้อที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน 3 ราย ได้แก่ วิธี CCM ให้ผลบวกแต่วิธี PBCB ให้ผลลบ 1 ราย และวิธี CCM ให้ผลลบแต่วิธี PBCB ให้ผลบวก 2 ราย ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อระหว่างวิธี PBCB และวิธี CCM

วิธีการเพาะเชื้อ	วิธี PBCB ให้ผลบวก	วิธี PBCB ให้ผลลบ	รวม	อัตราผลบวก (%)
วิธี CCM ให้ผลบวก	7	1	8	13.3%
วิธี CCM ให้ผลลบ	2	50	52	-
รวม	9	51	60	15.0%

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์การเปรียบเทียบผลการตรวจเพาะเชื้อทั้งสองวิธี โดยใช้สถิติ McNemar χ^2 -test กำหนดความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างทั้งสองวิธี ($p = 1.00$)

เมื่อวิเคราะห์ความสอดคล้องของผลการเพาะเชื้อระหว่างวิธี CCM และ PBCB พบว่ามีความสอดคล้องที่สังเกตได้ (Observed agreement) ร้อยละ 95.00 โดยทั้งสองวิธีให้ผลลบเหมือนกัน 50 ราย และให้ผลบวกเหมือนกัน 7 ราย มีเพียง 3 ราย ที่ให้ผลไม่ตรงกัน ได้แก่

CCM ให้ผลบวกแต่ PBCB ให้ผลลบ 1 ราย และ CCM ให้ผลลบแต่ PBCB ให้ผลบวก 2 ราย

เมื่อดำเนินการคำนวณค่า Cohen's Kappa coefficient เพื่อประเมินความสอดคล้องโดยหักล้างความสอดคล้องที่เกิดจากโอกาส พบว่าค่า Kappa เท่ากับ 0.795 (95% CI: 0.568–1.021) ซึ่งอยู่ในระดับความสอดคล้องดี (Substantial agreement) ตามเกณฑ์การแปลผลมาตรฐาน แสดงว่าทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกันในระดับสูง ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าสถิติ	ผลลัพธ์	การแปลผล
อัตราผลบวกด้วยวิธี PBCB	9/60 = 15.0%	-
อัตราผลบวกด้วยวิธี CCM	8/60 = 13.3%	-
McNemar χ^2 -test	$p = 1.000$	ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)
Cohen's Kappa (K)	$K = 0.795$	Substantial agreement
Observed agreement	95.0%	-

หมายเหตุ: การแปลผลค่า Kappa: < 0.20 = ความสอดคล้องน้อยมาก, 0.21-0.40 = ความสอดคล้องน้อย, 0.41-0.60 = ความสอดคล้องปานกลาง, 0.61-0.80 = ความสอดคล้องดี และ 0.81-1.00 = ความสอดคล้องดีมาก

การระบุชนิดเชื้อ

จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อที่ตรวจพบมากที่สุดในการเพาะเชื้อโดยใช้ขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็ก คือ Coagulase-negative Staphylococci พบ 3 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 33.3) รองลงมา คือ *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus gallolyticus* ssp *pasteurianus*, เชื้อรา (*Thyridium hongkongense*), *Corynebacterium* spp., *Spingomonas* *Pseudomonas paucimobilis*

และ *Microbacterium hominis* พบอย่างละ 1 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 11.1) สำหรับการเพาะเชื้อแบบเดิม พบเชื้อ *S. alactolyticus* มากที่สุด พบ 2 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 25.0) รองลงมา คือ Coagulase negative Staphylococci, *S. gallolyticus* ssp *pasteurianus*, เชื้อรา (*T. hongkongense*), *Corynebacterium* spp., *S. paucimobilis* และ *M. hominis* ซึ่งพบอย่างละ 1 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 11.1) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดของเชื้อที่ตรวจพบจากการเพาะเชื้อทั้งสองวิธี

ชนิดของเชื้อ	pediatric blood culture จำนวน (ร้อยละ)	4 Conventional culture จำนวน (ร้อยละ)
Coagulase-negative staphylococci (CNS)	3 (33.3)	1 (12.5)
<i>S. alactolyticus</i>	1 (11.1)	2 (25.0)
<i>S. gallolyticus</i> ssp <i>pasteurianus</i>	1 (11.1)	1 (12.5)
Fungus (<i>T. hongkongense</i>)	1 (11.1)	1 (12.5)
<i>Corynebacterium</i> spp.	1 (11.1)	1 (12.5)
<i>S. (Pseudomonas) paucimobilis</i>	1 (11.1)	1 (12.5)
<i>M. hominis</i>	1 (11.1)	1 (12.5)
รวม	9 (100)	8 (100)

ความสัมพันธ์ระหว่างผล Gram stain กับผลการเพาะเชื้อ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผล Gram stain กับผลการเพาะเชื้อ พบว่าการย้อมสี Gram stain ให้ผลบวกทั้งหมด 3 ราย โดยวิธี CCM ให้ผลบวกในการย้อมสี Gram stain 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 100.00 และวิธี PBCB ให้ผลบวกในการย้อมสี Gram stain 2 ราย

คิดเป็นร้อยละ 66.67 ขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่พบว่าการย้อมสี Gram stain ให้ผลลบมีทั้งหมด 57 ราย โดยมี 5 ราย ที่ผลการย้อมสีให้ผลลบ แต่มีการขึ้นเชื้อด้วยวิธี CCM คิดเป็นร้อยละ 8.77 และมี 7 ราย ที่ผลการย้อมสีให้ผลลบแต่มีการขึ้นเชื้อด้วยวิธี PBCB คิดเป็นร้อยละ 12.28 เมื่อทดสอบความสัมพันธ์พบว่า Gram stain มีความสัมพันธ์กับการเพาะเชื้อด้วยวิธี CCM อย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.002$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับผลการเพาะเชื้อด้วยวิธี PBCB อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.056$) ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า Gram stain มีความ

จำเพาะสูงแต่มีความไวต่ำในการทำนายผลการเพาะเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับวิธี CCM ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างผลการย้อมสี Gram stain กับผลการเพาะเชื้อด้วยวิธี CCM และวิธี PBCB

ผลการย้อมสี gram stain	CCM		PBCB	
	ผลลบ จำนวน (ร้อยละ)	ผลบวก จำนวน (ร้อยละ)	ผลลบ จำนวน (ร้อยละ)	ผลบวก จำนวน (ร้อยละ)
ผลบวก ($n = 3$)	0 (0.00)	3 (100.00)	1 (33.33)	2 (66.67)
ผลลบ ($n = 57$)	52 (91.23)	5 (8.77)	50 (87.72)	7 (12.28)
χ^2	20.52		6.61	
p -value	0.002*		0.056	

หมายเหตุ: Chi-square test

ความสัมพันธ์ระหว่างผลทางกล้องจุลทรรศน์กับชนิดของเชื้อที่พบ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์และผลการเพาะเชื้อ โดยในการศึกษาครั้งนี้พบผู้ป่วยที่มีผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์เป็นบวกทั้งสิ้น 4 ราย สามารถแบ่งลักษณะที่พบตามผลการย้อมสีและผลการเพาะเชื้อ ดังนี้

ผู้ป่วยรายที่ 1 พบลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์เป็น Gram positive cocci in pair in chain ผลการเพาะเชื้อด้วยทั้งสองวิธีให้ผลบวกสอดคล้องกัน โดยวิธี CCM และ PBCB ต่างให้ผลการเจริญของเชื้อ (growth) และสามารถระบุชนิดเชื้อได้ว่าเป็น *S. alactolyticus*

ผู้ป่วยรายที่ 2 พบลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์เป็น Gram positive cocci in pair อย่างไรก็ตามผลการเพาะเชื้อระหว่างสองวิธีไม่สอดคล้องกัน โดยวิธี CCM ให้ผลการเจริญของเชื้อ (growth) และระบุชนิดเชื้อได้ว่าเป็น *S. alactolyticus* ในขณะที่วิธี PBCB ให้ผลไม่พบการเจริญของเชื้อ (no growth)

ผู้ป่วยรายที่ 3 พบลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์เป็น Gram positive cocci in pair ผลการเพาะเชื้อด้วยทั้งสองวิธีให้ผลบวกสอดคล้องกัน โดยทั้งวิธี CCM

และ PBCB ให้ผลการเจริญของเชื้อและสามารถระบุชนิดเชื้อได้ว่าเป็น Coagulase-negative staphylococci (CNS)

ผู้ป่วยรายที่ 4 พบลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์เป็น Septate hyphae บ่งชี้ถึงการติดเชื้อรา ผลการเพาะเชื้อด้วยทั้งสองวิธีให้ผลบวกสอดคล้องกัน โดยทั้ง CCM และ PBCB ให้ผลการเจริญของเชื้อและสามารถระบุชนิดเชื้อได้ว่าเป็น Fungus (*T. hongkongense*)

ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์แสดงเพียงลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อเบื้องต้น เช่น ชนิดของเชื้อเป็นแกรมบวกหรือแกรมลบและรูปร่างของเชื้อเป็นข้อมูลสำคัญในการวางแผนการรักษาเบื้องต้น ขณะที่การระบุชนิดของเชื้อได้อย่างแม่นยำต้องอาศัยผลการเพาะเชื้อในกรณีที่ผู้ป่วย 1 ราย ที่ได้รับการตรวจ KOH preparation พบผลการเพาะเชื้อด้วย ซึ่งสนับสนุนความสำคัญของการส่งตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ควบคู่กับการเพาะเชื้อเสมอ

ผลการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าผลทางกล้องจุลทรรศน์มีความสัมพันธ์กับผลการเพาะเชื้อในระดับสูง และลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ที่พบสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกวิธีการรักษาได้ก่อนที่จะได้ผลการเพาะเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างผลทางกล้องจุลทรรศน์กับชนิดของเชื้อที่พบ

ผลการดูทางกล้องจุลทรรศน์	CCM	PBCB	ชื่อเชื้อ
Gram positive cocci in pair in chain	growth	growth	<i>S. alactolyticus</i>
Gram positive cocci in pair	growth	No growth	<i>S. alactolyticus</i>
Gram positive cocci in pair	growth	growth	Coagulase-negative staphylococci (CNS)
Septate hyphae	growth	growth	Fungus (<i>T. hongkongense</i>)

วิจารณ์

จากผลการศึกษาพบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อด้วยวิธี PBCB (ร้อยละ 15.00) สูงกว่าวิธี CCM (ร้อยละ 13.33) เล็กน้อย แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 1.00$) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Tan HS และคณะ⁽¹⁰⁾ ที่พบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อระหว่างทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน โดยพบว่าวิธี blood culture bottles (BCB) ให้ผลบวกร้อยละ 69 และวิธี conventional media (CM) ให้ผลบวกร้อยละ 72 อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาของ Thariya P และคณะ⁽⁸⁾ และ Tanaka T และคณะ⁽⁹⁾ รายงานว่าการใช้ขวดเพาะเชื้อจากเลือดให้อัตราการตรวจพบเชื้อที่สูงกว่าวิธีเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ความแตกต่างของผลการศึกษาอาจเกิดจากหลายปัจจัย การศึกษาของ Thariya P และคณะ⁽⁸⁾ ใช้ขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับผู้ใหญ่ (adult blood culture bottles) ซึ่งมีส่วนประกอบและปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างจากขวดเพาะเชื้อสำหรับเด็กที่ใช้ในการศึกษานี้ นอกจากนี้การศึกษานี้ทั้งสองเป็นการศึกษาแบบ retrospective และเปรียบเทียบในช่วงเวลาที่ต่างกัน อาจมีปัจจัยรบกวนต่างๆ เช่น ความชำนาญของบุคลากรเทคนิคในการเก็บตัวอย่าง หรือชนิดของเชื้อที่แพร่ระบาดในแต่ละช่วงเวลา ขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับผู้ใหญ่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 25–30 มิลลิลิตร และออกแบบมาสำหรับปริมาณตัวอย่างเลือด 3–10 มิลลิลิตร โดยปริมาตรที่เหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 8–10 มิลลิลิตร ด้วยปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มาก เมื่อใส่ตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาเพียง 0.1–0.5 มิลลิลิตร อัตราส่วนตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยงเชื้อจะต่ำมาก (ประมาณ 1:250–1:300) ซึ่ง

อาจเจือจางจำนวนเชื้อที่มีอยู่น้อยอยู่แล้วจนต่ำกว่าระดับที่ระบบสามารถตรวจจับได้ ในทางตรงกันข้ามขวดเพาะเชื้อจากเลือดสำหรับเด็กบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 20 มิลลิลิตร และออกแบบมาสำหรับตัวอย่างปริมาณน้อยเพียง 0.5–5.0 มิลลิลิตร โดยปริมาตรที่เหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 1–3 มิลลิลิตร เมื่อใส่น้ำวุ้นลูกตาปริมาณ 0.1–0.5 มิลลิลิตร อัตราส่วนตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยงเชื้อจะสูงกว่า (ประมาณ 1:40–1:200) ทำให้เชื้อที่มีจำนวนน้อยมีโอกาสเจริญและถูกตรวจพบได้มากกว่า สอดคล้องกับปริมาณน้ำวุ้นลูกตาที่เก็บได้ในการศึกษารั้งนี้ (0.2–2.0 มิลลิลิตร)

อัตราการตรวจพบเชื้อโดยรวมในการศึกษานี้ (ร้อยละ 13.33–15.00) ต่ำกว่าการศึกษาอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด เช่น การศึกษาของ Thariya P และคณะ⁽⁸⁾ พบอัตราการตรวจพบเชื้อ ร้อยละ 65.56–90.1 และการศึกษาของ Tanaka T และคณะ⁽⁹⁾ พบอัตราร้อยละ 35–64.7 สาเหตุที่เป็นไปได้ ได้แก่ 1) เกณฑ์การคัดเข้าของการศึกษานี้ใช้อาการทางคลินิกสงสัยภาวะติดเชื้อภายในลูกตาเป็นหลัก ซึ่งอาจรวมผู้ป่วยที่มีภาวะอักเสบที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ (sterile endophthalmitis) เช่น toxic anterior segment syndrome (TASS) หรือ postoperative inflammation 2) ผู้ป่วยบางรายอาจได้รับยาปฏิชีวนะก่อนการเก็บตัวอย่างโดยไม่รายงาน ซึ่งส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ และ 3) ความแตกต่างทางระบาดวิทยาของภาวะติดเชื้อภายในลูกตาในประเทศไทยเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศอื่น อย่างไรก็ตามอัตราการตรวจพบเชื้อดังกล่าวใกล้เคียงกับการศึกษาของ Pongsachareonnont P และคณะ⁽¹¹⁾ ที่พบอัตราการตรวจพบเชื้อ ร้อยละ 12.2–36.5 โดย

วิธีเพาะเชื้อแบบมาตรฐานพบเพียงร้อยละ 12.2 เป็นการศึกษาที่อยู่ในภาคกลางของประเทศไทยเช่นเดียวกัน ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้องระหว่างทั้งสองวิธี พบค่า Cohen's Kappa เท่ากับ 0.795 ซึ่งอยู่ในระดับ substantial agreement แสดงว่าทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกันในระดับสูง มีความสอดคล้องที่สังเกตได้ (observed agreement) ร้อยละ 95.00 ผลการศึกษานี้ บ่งชี้ว่าทั้งสองวิธีมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกันในการตรวจจับเชื้อก่อโรคจากน้ำวุ้นลูกตา อย่างไรก็ตามพบว่า มีผู้ป่วย 3 ราย ที่ให้ผลไม่ตรงกัน ได้แก่ 1 ราย ที่วิธี CCM ให้ผลลบแต่ PBCB ให้ผลลบ และ 2 ราย ที่ CCM ให้ผลลบแต่ PBCB ให้ผลบวก กรณีที่วิธี PBCB ให้ผลลบแต่ CCM ให้ผลบวก อาจเกิดจากการที่ขวดเพาะเชื้อจากเลือดมีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อมาก (20 ml) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณตัวอย่างที่ใส่เข้าไป (ประมาณ 0.1 ml) อาจทำให้เชื้อจากจำนวนเชื้อมากเกินไป โดยเฉพาะในกรณีที่จำนวนเชื้อต่ำอยู่แล้ว ในทางตรงกันข้ามกรณีที่ CCM ให้ผลลบแต่ PBCB ให้ผลบวกอาจเกิดจากข้อดีของระบบอัตโนมัติที่สามารถตรวจจับการเจริญของเชื้อได้อย่างต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง และมีความไวในการตรวจจับ CO_2 ที่เกิดจากการเจริญของเชื้อ แม้ว่าจำนวนเชื้อจะน้อยก็ตาม ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับข้อเสนอของ Tan HS และคณะ⁽¹⁰⁾ ที่แนะนำให้ใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันเพื่อเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อ โดยในการศึกษาดังกล่าวพบว่าการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันสามารถเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อได้ถึงร้อยละ 81 ซึ่งสูงกว่าการใช้วิธีใดวิธีหนึ่งเพียงอย่างเดียว

การศึกษานี้พบว่า Gram stain ให้ผลบวกเพียงร้อยละ 5.00 (3 ราย จาก 60 ราย) แม้ว่าผู้ป่วยทั้งหมดจะมีอาการทางคลินิกสงสัยภาวะติดเชื้อภายในลูกตา อัตราผลบวกที่ต่ำนี้สอดคล้องกับรายงานในวรรณกรรมซึ่งระบุว่า Gram stain มักมีความไวต่ำในการตรวจหาเชื้อจากน้ำวุ้นลูกตาโดยเฉพาะเมื่อจำนวนเชื้อต่ำ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ พบว่า Gram stain มีความสัมพันธ์กับผลการเพาะเชื้อด้วยวิธี CCM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.002$) โดยในผู้ป่วยที่ Gram stain ให้ผลบวกวิธี CCM สามารถตรวจพบเชื้อได้ทั้งหมด (ร้อยละ 100) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับวิธี PBCB

($p = 0.056$) แม้ว่าจะมีแนวโน้มใกล้เคียง ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากขนาดกลุ่มตัวอย่างที่มี Gram stain บวกมีน้อยเกินไป (เพียง 3 ราย) ทำให้ไม่มีอำนาจทางสถิติเพียงพอที่จะตรวจจับความสัมพันธ์ได้ สิ่งที่น่าสนใจ คือ พบว่ามีผู้ป่วยที่ Gram stain ให้ผลลบแต่การเพาะเชื้อให้ผลบวก ร้อยละ 8.77 สำหรับวิธี CCM และร้อยละ 12.28 สำหรับวิธี PBCB ผลการศึกษานี้เน้นย้ำความสำคัญของการเพาะเชื้อแม้ว่า Gram stain จะให้ผลลบ เนื่องจาก Gram stain มีความไวต่ำและอาจพลาดการตรวจพบเชื้อได้ โดยเฉพาะเมื่อจำนวนเชื้อน้อยหรือเชื้อมีการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอในตัวอย่าง ข้อดีและข้อเสียของวิธี CCM ข้อดี คือ 1) สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อได้โดยตรง 2) สามารถระบุชนิดของเชื้อได้เร็วกว่าหากเชื้อเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และ 3) ใช้ได้กับทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เนื่องจากมีอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด รวมถึง Sabouraud dextrose agar ข้อเสีย คือ 1) ต้องการปริมาณตัวอย่างมากกว่า เนื่องจากต้องเพาะลงอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด 2) การตรวจสอบการเจริญของเชื้อต้องทำด้วยมนุษย์ซึ่งอาจพลาดการตรวจพบหากเชื้อเจริญช้าหรือในปริมาณน้อย และ 3) ต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญในการสังเกตและระบุโคโลนี วิธี PBCB ข้อดี คือ 1) เป็นระบบอัตโนมัติที่ตรวจจับการเจริญของเชื้อได้อย่างต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง ทำให้ไม่พลาดการตรวจพบแม้เชื้อจะเจริญช้า 2) มีความไวในการตรวจจับ CO_2 ที่เกิดจากการเจริญของเชื้อแม้ว่าจำนวนเชื้อจะน้อย 3) ต้องการปริมาณตัวอย่างน้อยกว่า (ประมาณ 0.1 ml) ซึ่งเหมาะสมกับน้ำวุ้นลูกตาที่มีปริมาณจำกัด และ 4) ลดภาระงานของบุคลากรในการตรวจสอบอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสายตา ข้อเสีย คือ 1) ต้องการการ subculture เพื่อระบุชนิดเชื้อและทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งอาจใช้เวลานานกว่า และ 2) มีค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธี CCM เนื่องจากต้องใช้ขวดเพาะเชื้อพิเศษและเครื่องตรวจจับอัตโนมัติ

การศึกษานี้มีข้อจำกัดหลายประการที่ควรนำมาพิจารณา คือ อัตราการตรวจพบเชื้อโดยรวมต่ำกว่าที่คาดไว้ (ร้อยละ 13.33–15.00) ทำให้จำนวนผู้ป่วย

ที่มีผลการเพาะเชื้อบวกร้อยน้อย (8-9 ราย) อาจส่งผลต่อความสามารถในการตรวจจับความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างทั้งสองวิธี การศึกษาที่มีขนาดตัวอย่างใหญ่ขึ้นและมีอัตราการตรวจพบเชื้อสูงกว่าอาจให้ผลที่แตกต่างออกไป นอกจากนี้ไม่ได้ศึกษาระยะเวลาในการตรวจพบการเจริญของเชื้อ (time to detection) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการรักษาผู้ป่วยอย่างทันท่วงที ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ทางคลินิก แม้ว่าทั้งสองวิธีจะให้อัตราการตรวจพบเชื้อที่ใกล้เคียงกัน แต่จากค่า Cohen's Kappa ที่แสดงความสอดคล้องกันในระดับสูง และการที่พบผู้ป่วยบางรายที่วิธีหนึ่งให้ผลบวกแต่อีกวิธีให้ผลลบ แนะนำให้พิจารณาใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันเพื่อเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อให้สูงที่สุด โดยเฉพาะกรณีที่มีความสงสัยสูงทางคลินิก หากต้องเลือกใช้เพียงวิธีเดียวเนื่องจากข้อจำกัดของทรัพยากร วิธี CCM เป็นทางเลือกที่เหมาะสม เนื่องจากให้ผลใกล้เคียงกับวิธี PBCB แต่มีต้นทุนต่ำกว่าและสามารถเพาะเชื้อราได้ และการย้อมสี Gram stain และ KOH แม้จะมีความไวต่ำ แต่เมื่อให้ผลบวกก็มีความจำเพาะสูง ดังนั้นควรทำ Gram stain และ KOH ควบคู่กับการเพาะเชื้อเสมอ เพื่อให้ข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์ต่อการเริ่มการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเชิงประจักษ์ สำหรับการวิจัยในอนาคตควรมีการศึกษาที่มีขนาดตัวอย่างใหญ่ขึ้นและเป็นแบบ multicenter เพื่อเพิ่มอำนาจทางสถิติและความสามารถในการนำผลไปใช้กับประชากรกลุ่มใหญ่ ควรศึกษาระยะเวลาในการตรวจพบการเจริญของเชื้อระหว่างทั้งสองวิธี เพื่อประเมินความเร็วในการให้ผลที่จะช่วยในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงที ควรมีการวิเคราะห์ต้นทุนและประสิทธิผล (cost-effectiveness analysis) ระหว่างทั้งสองวิธีรวมถึงการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมตามบริบทและทรัพยากรของแต่ละสถานพยาบาล และควรติดตามผลการรักษาของผู้ป่วยเพื่อประเมินผลกระทบของการใช้วิธีการเพาะเชื้อที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิก

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเพาะเชื้อด้วยวิธี PBCB และ CCM ให้อัตราการตรวจพบเชื้อที่ใกล้เคียงกันและมีความสอดคล้องกันในระดับสูง (Cohen's Kappa = 0.795) ในผู้ป่วยที่สงสัยภาวะติดเชื้อภายในลูกตา แม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างทั้งสองวิธี แต่การใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันอาจเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อได้มากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงทีและเหมาะสม นอกจากนี้การย้อมสี Gram stain แม้จะมีความไวต่ำ แต่เมื่อให้ผลบวกจะมีความสัมพันธ์กับผลการเพาะเชื้อโดยเฉพาะกับวิธี CCM ดังนั้นควรทำ Gram stain ควบคู่กับการเพาะเชื้อเสมอเพื่อให้ข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์ต่อการเริ่มการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเชิงประจักษ์ อย่างไรก็ตามหากมีข้อจำกัดด้านทรัพยากรและต้องเลือกใช้เพียงวิธีเดียว CCM ยังคงเป็นทางเลือกที่เหมาะสม เนื่องจากมีต้นทุนต่ำกว่า ไม่ต้องการเครื่องตรวจจับอัตโนมัติ สามารถตรวจพบเชื้อราได้ดีโดยไม่ต้องพึ่งชุดเพาะเชื้อพิเศษ และหากสถานพยาบาลมีความพร้อม การใช้ PBCB ร่วมด้วยโดยเฉพาะในกรณีที่มีความสงสัยสูงทางคลินิก ผู้ป่วยได้รับยาปฏิชีวนะก่อนการเก็บตัวอย่าง หรือผล CCM เป็นลบแต่อาการทางคลินิกยังคงบ่งชี้ถึงการติดเชื้อจริง การเพาะเชื้อด้วยวิธี CCM และ PBCB ทั้งสองวิธีร่วมกันจะเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มโอกาสในการระบุเชื้อก่อโรคและนำไปสู่การรักษาที่เหมาะสมยิ่งขึ้น

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ Claude (Anthropic, USA) ช่วยในการปรับปรุงการใช้ภาษา การแก้ไขไวยากรณ์ภาษาอังกฤษเพื่อให้มีความถูกต้องมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ พญ.กาญจน์ธิดา จันทน์วิมล นายแพทย์ชำนาญการพิเศษ จักษุแพทย์ โรงพยาบาลเมตตา

ประชากร (วัดไร่ขิง) สาขาจอประสาทตาและวุ้นตา ที่ให้คำปรึกษา และขอขอบคุณ มูลนิธิเมตตาประชากร โรงพยาบาลเมตตาประชากร (วัดไร่ขิง) ในการสนับสนุนทุนงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Vaziri K, Schwartz SG, Kishor K, Flynn HW Jr. Endophthalmitis: state of the art. *Clin Ophthalmol* 2015; 9: 95-108.
- Sadiq MA, Hassan M, Agarwal A, Sarwar S, Toufeeq S, Soliman MK, et al. Endogenous endophthalmitis: diagnosis, management, and prognosis. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2015; 5(1): 32. (11 pages).
- Gower EW, Keay LJ, Stare DE, Arora P, Cassard SD, Behrens A, et al. Characteristics of endophthalmitis after cataract surgery in the United States Medicare population. *Ophthalmology* 2015; 122(8): 1625-32.
- Ahmed Y, Schimel AM, Pathengay A, Colyer MH, Flynn HW Jr. Endophthalmitis following open-globe injuries. *Eye* 2012; 26(2): 212-7.
- van der Vyver JA, Thomas T. Improving peritoneal dialysis fluid culture-positivity yield from 2022 to 2023. *S Afr J Infect Dis* 2024; 39(1): 684. (5 pages).
- Amer AM, Gad MA, El Akhal AA. Inoculation of pleural fluid in blood culture bottles could be a routine practice in pleural infection. *Egypt J Chest Dis Tuberc* 2024; 73(3): 284-9.
- Mengeloglu Z, Tas T, Bucak O, Kocoglu E, Kucukbayrak A. Comparison of classical methods versus BACTEC blood culture system for culture of normally sterile body fluids. *Russ open med J* 2015; 4(4): e0401. (3 pages).
- Thariya P, Yospaiboon Y, Sinawat S, Sanguansak T, Bhoomibunchoo C, Laovirojjanakul W. Blood culture bottles are superior to conventional media for vitreous culture. *Clin Exp Ophthalmol* 2016; 44(6): 488-91.
- Tanaka T, Ferreira BFA, Oliveira LMS, Kato JM, Gioia TSRD, Rossi F, et al. Diagnostic value of pediatric blood culture bottles for acute postoperative endophthalmitis. *Clinics* 2019; 74: e837. (4 pages).
- Tan HS, Ghyczy-Carlborg EA, Spanjaard L, de Smet MD. The additional value of blood culture bottles in the diagnosis of endophthalmitis. *Eye* 2011; 25(8): 1069-73.
- Pongsachareonnont P, Honglertnapakul W, Chatsuwat T. Comparison of methods for identifying causative bacterial microorganisms in presumed acute endophthalmitis: conventional culture, blood culture, and PCR. *BMC Infect Dis* 2017; 17(1): 165. (9 pages).

Comparison of Vitreous Culture Results in Patients with Suspected Endophthalmitis Using Pediatric Blood Culture Bottles and Conventional Culture Method at Mettapracharak (Wat Rai Khing) Hospital

Wirongrud Boonruang

Department of Clinical Pathology and Medical Technology, Metta Pracharak (Wat Rai Khing) Hospital, Nakhon Prathom 73210, Thailand

ABSTRACT Endophthalmitis is an ophthalmic emergency that may cause permanent vision loss. Rapid and accurate diagnosis through vitreous culture is crucial for appropriate treatment, but conventional culture methods require large specimen volumes while obtainable vitreous fluid is often limited. This study aimed to compare the detection rates and evaluate the agreement between usage of pediatric blood culture bottle (PBCB) and conventional culture method (CCM) in 60 patients with clinically suspected endophthalmitis. Each sample was cultured using both methods simultaneously, with Gram stain and KOH preparation performed. Detection rates for PBCB and CCM were 15.00% and 13.33%, respectively. Both methods demonstrated substantial agreement (Cohen's Kappa = 0.795) with 95.00% concordance. Gram stain was positive in only 5.00% of cases and showed significant correlation with CCM results ($p = 0.002$). This study demonstrates that both methods provide comparable detection rates with high agreement. Combined use may increase overall detection rates, benefiting timely diagnosis and treatment. Although Gram stain has low sensitivity, positive results correlate with culture outcomes and should always be performed alongside culture methods to provide preliminary information for appropriate antibiotic selection.

Keywords: Endophthalmitis, Vitreous fluid, Conventional culture method, Pediatric blood culture bottles, Gram stain

ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ Human Papilloma Virus จีโนไทป์เสี่ยงสูงชนิด Non-16/18 กับรูปแบบความผิดปกติทางเซลล์วิทยา ในอำเภอพรหมพิราม วังทอง และนครไทย จังหวัดพิษณุโลก ปี พ.ศ. 2567

ดุจดาว บุญยอด บัณฑิต พรหมรักษา และ ชวิศา เพ็ชรอำไพ

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พิษณุโลก 65000

บทคัดย่อ โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญในสตรีไทย การติดเชื้อไวรัสเอชพีวี (HPV) สายพันธุ์เสี่ยงสูงเป็นสาเหตุหลัก การศึกษาเชิงพรรณนาแบบย้อนหลังมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายจีโนไทป์เชื้อ HPV ชนิดเสี่ยงสูง non-16/18 กับความผิดปกติทางเซลล์วิทยาโดยรวมข้อมูลสตรีไทยอายุ 30-60 ปี จำนวน 5,680 ราย ที่รับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกวิธี HPV DNA test และ liquid-based cytology (LBC) ในอำเภอพรหมพิราม วังทอง และนครไทย จังหวัดพิษณุโลก ปี พ.ศ. 2567 ผลการศึกษาพบความชุกติดเชื้อ HPV ร้อยละ 11.1 (628 ราย) แบ่งเป็นกลุ่ม HPV 16/18 ร้อยละ 22.1 (139 ราย) และกลุ่ม HPV non-16/18 ร้อยละ 77.9 (489 ราย) โดยในกลุ่ม HPV non-16/18 ที่ได้รับการตรวจเซลล์วิทยาต่อ จำนวน 226 ราย พบว่า HPV genotype 51 มีความชุกสูงสุด ร้อยละ 14.2 รองลงมา HPV 52 และ 68 ร้อยละ 12.4 และพบการติดเชื้อแบบหลายจีโนไทป์ ร้อยละ 13.7 นอกจากนี้พบความผิดปกติทางเซลล์วิทยาตั้งแต่ระดับ ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) ขึ้นไป ร้อยละ 19.0 (43 ราย) แม้กลุ่มที่ติดเชื้อหลายจีโนไทป์จะมีแนวโน้มพบความผิดปกติทางเซลล์วิทยาสูงกว่าการติดเชื้อแบบเดี่ยว แต่ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการติดเชื้อ HPV non-16/18 กับความผิดปกติทางเซลล์วิทยาของปากมดลูก ($p > 0.05$) ผลการศึกษานี้เน้นย้ำถึงความสำคัญของการเฝ้าระวังการติดเชื้อกลุ่ม HPV non-16/18 โดยเฉพาะการติดเชื้อร่วมหลายจีโนไทป์ ซึ่งข้อมูลการกระจายจีโนไทป์ในพื้นที่จะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนฉีดวัคซีนและเพิ่มประสิทธิภาพการป้องกันมะเร็งปากมดลูกในอนาคต

คำสำคัญ: มะเร็งปากมดลูก, เชื้อเอชพีวี, จีโนไทป์, การตรวจเซลล์วิทยา, HPV DNA test

Corresponding author E-mail: dujdao.b@dmsc.mail.go.th

Received: 12 February 2026

Revised: 18 June 2026

Accepted: 22 June 2026

บทนำ

โรคมะเร็งปากมดลูก (Cervical Cancer) สาเหตุหลักเกิดจากการติดเชื้อ Human Papilloma Virus (HPV) ซึ่งติดต่อผ่านการมีเพศสัมพันธ์ ทำให้เซลล์บริเวณปากมดลูกมีการเจริญเติบโตผิดปกติ พบได้บ่อยในผู้หญิงทั่วโลกและประเทศไทย เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 2 รองจากมะเร็งเต้านมและเป็นภัยเงียบที่คุกคามสุขภาพผู้หญิง จากสถิติล่าสุดของ International Agency for Research on Cancer (IARC) ลงวันที่ 10 มีนาคม พ.ศ. 2566 พบผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ของไทยปีละ 9,158 ราย และอัตราการเสียชีวิต 4,705 รายต่อปี หรือเท่ากับในแต่ละวันจะมีหญิงไทยเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูกถึง 13 คน นับว่าเป็นปัญหาสำคัญของสาธารณสุขไทย⁽¹⁾ อัตราการติดเชื้อ HPV มากกว่าร้อยละ 90 มักไม่มีการแสดงอาการจนกว่าจะตรวจพบหรือรอให้มีอาการนั้นบางรายอาจมีการกระจายของโรคไปมากแล้ว ส่งผลต่อโอกาสการรักษาให้หายขาด จึงทำได้ยาก หากได้รับการตรวจคัดกรองตั้งแต่ระยะแรก สามารถเพิ่มโอกาสในการรักษาให้หายขาดได้ เชื้อไวรัส HPV มีมากกว่า 200 จีโนไทป์ โดย HPV type 16/18 เป็นจีโนไทป์ที่มีศักยภาพในการก่อมะเร็ง (oncogenicity) ประมาณร้อยละ 67.6 และมีรายงานให้เฝ้าระวัง 12 จีโนไทป์เสี่ยงสูงที่อาจทำให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูก ได้แก่ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68⁽²⁻⁵⁾ การทำความเข้าใจการกระจายจีโนไทป์ของเชื้อ HPV ในแต่ละพื้นที่จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการวางแผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งปากมดลูก

กระทรวงสาธารณสุขร่วมกับสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติมุ่งหวังให้สตรีไทยได้รับการตรวจได้อย่างทั่วถึง โดยบรรจุการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกไว้ในชุดสิทธิประโยชน์สำหรับสตรีไทย ซึ่งได้กำหนดเป้าหมายคัดกรองฯ กลุ่มสตรีไทยอายุ 30-60 ปี จำนวน 15.7 ล้านคน จากผลการดำเนินการตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2564-2566 พบว่ายังมีผู้หญิงที่ควรได้รับการตรวจคัดกรองอีกกว่า 13 ล้านราย ซึ่งโรคมะเร็งปากมดลูกเป็นเพียงชนิดเดียวที่รู้สาเหตุของการเกิดที่แน่ชัดและสามารถป้องกันรักษาให้หายขาดได้ หากได้รับการตรวจ

คัดกรองเพื่อหาเชื้อ HPV รอยโรคก่อนเป็นมะเร็งในระยะเริ่มแรกหรือป้องกันโดยการฉีดวัคซีน⁽⁶⁾ ปัจจุบันวัคซีนป้องกันการติดเชื้อ HPV ชนิด 9 สายพันธุ์ (9-valent HPV vaccine) สามารถป้องกันเชื้อ HPV ชนิด 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 และ 58 ซึ่งครอบคลุมจีโนไทป์เสี่ยงสูงที่เป็นสาเหตุสำคัญของมะเร็งปากมดลูกหลายชนิด อย่างไรก็ตามยังมีจีโนไทป์เสี่ยงสูงบางชนิด เช่น HPV 51, 66 และ 68 ที่ไม่อยู่ในขอบเขตการป้องกันของวัคซีน ดังนั้นข้อมูลการกระจายจีโนไทป์ในแต่ละพื้นที่ จึงมีความสำคัญต่อการประเมินความเหมาะสมของการใช้วัคซีนและการวางแผนมาตรการป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูกในระดับประเทศ ปัจจุบันการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกสามารถทำได้หลายวิธีตามแนวทางของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ได้แก่ การตรวจเซลล์วิทยาของปากมดลูก (Cervical cytology) แบบมาตรฐาน (Papanicolaou stain smear: Pap smear หรือ conventional cytology) การตรวจเซลล์วิทยาโดยเก็บเซลล์ในน้ำยารักษาสภาพ (liquid-based cytology (LBC)) และการตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อไวรัส HPV (Human papillomavirus deoxyribonucleic acid test: HPV DNA test)⁽⁴⁾ โดยเฉพาะการตรวจด้วยวิธี HPV DNA test มีความจำเพาะและความไวสูง⁽⁷⁾ ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่มักไม่มีการแสดงอาการตรวจวิธีนี้ช่วยให้ค้นพบกลุ่มเสี่ยงได้ก่อนที่จะมีรอยโรคปรากฏ ช่วยให้ผู้ป่วยเข้าสู่กระบวนการดูแลรักษาได้เร็วขึ้น กลุ่มที่ตรวจพบมีการติดเชื้อจีโนไทป์เสี่ยงสูง HPV type 16/18 จะมีการตรวจยืนยันด้วยการส่องกล้อง Colposcopy หากพบมีการติดเชื้อ HPV non-16/18 จะติดตามกลุ่มเสี่ยงมาเก็บตัวอย่าง เพื่อส่งตรวจทางเซลล์วิทยา LBC ตามแนวทางของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ส่วนภูมิภาคทุกแห่ง ในฐานะห้องปฏิบัติการที่เป็นหน่วยบริการตรวจวิเคราะห์และเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงของประเทศ มีภารกิจวิจัย พัฒนา นวัตกรรมทางการแพทย์และสาธารณสุขได้ดำเนินโครงการ “การณรงค์ตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกเชิงรุกด้วยวิธี HPV DNA test แบบแยก 14 จีโนไทป์เสี่ยงสูง” ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 กำหนดเป้าหมาย

1 ล้านคนทั่วประเทศ เพื่อคัดกรองกลุ่มเสี่ยงและรวบรวมข้อมูลการกระจายจีโนไทป์ตามกลุ่มประชากรในแต่ละพื้นที่ และจากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมายังไม่พบข้อมูลการศึกษาความชุกและการกระจายจีโนไทป์แบบ 14 สายพันธุ์เสี่ยงสูง ในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก ดังนั้นศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก จึงได้ดำเนินการวิจัยเชิงพรรณนาแบบย้อนหลัง (Retrospective descriptive study) ในกลุ่มสตรีไทยอายุ 30–60 ปีในพื้นที่ที่ดำเนินการ 3 อำเภอ ได้แก่ โรงพยาบาลวังทอง อำเภอวังทอง โรงพยาบาลพรหมพิราม อำเภอพรหมพิราม และโรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชนครไทย อำเภอนครไทย จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 5,680 ราย ในการดำเนินการศึกษาครั้งนี้จะไม่สามารถทวนสอบข้อมูลรายบุคคลได้ เพื่อศึกษาการกระจายของจีโนไทป์เสี่ยงสูง (High Risk HPV: HrHPV) type non-16/18 ได้แก่ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68 และใช้เป็นข้อมูลติดตามเฝ้าระวังกลุ่มเสี่ยง รวมทั้งการเลือกใช้วัคซีนป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูกให้เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ ซึ่งจากข้อมูลการกระจายจีโนไทป์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประกอบการพิจารณาเลือกใช้วัคซีนป้องกันการติดเชื้อ HPV ให้เหมาะสมกับบริบทของพื้นที่ โดยพบว่า HPV 52 และ 58 เป็นจีโนไทป์ที่อยู่ในวัคซีนชนิด 9 สายพันธุ์ มีความชุกค่อนข้างสูง ขณะที่ HPV 51 และ 68 ซึ่งพบได้บ่อยในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ครอบคลุมวัคซีน ดังนั้นแม้การฉีดวัคซีนจะช่วยลดความเสี่ยงของโรคได้ แต่การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกอย่างต่อเนื่องยังมีความจำเป็น เพื่อเฝ้าระวังการติดเชื้อชนิดที่อยู่นอกขอบเขตการป้องกันของวัคซีน

วัสดุและวิธีการ

ดำเนินงานภายใต้โครงการขับเคลื่อนของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ การรณรงค์ตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกเชิงรุกด้วยวิธี HPV DNA test แบบแยก 14 จีโนไทป์เสี่ยงสูง โดยการเก็บตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกด้วยตนเองปี พ.ศ. 2567 กลุ่มเป้าหมายสตรีไทยอายุ 30–60 ปี พร้อมแบบฟอร์มบันทึกรายละเอียดผู้รับบริการ โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก

ร่วมกับเครือข่ายโรงพยาบาลในพื้นที่ 3 อำเภอ ได้แก่ โรงพยาบาลวังทอง อำเภอวังทอง โรงพยาบาลพรหมพิราม อำเภอพรหมพิราม และโรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชนครไทย อำเภอนครไทย จังหวัดพิษณุโลก ส่งตัวอย่างตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก เพื่อตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้น้ำยา Biotron™ (Biotron Technology Ltd., China) มีขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection: LOD) ไม่เกิน 100 copies/reaction แยกได้ 15 จีโนไทป์ ได้แก่ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 และ 73 ชุดน้ำยากำหนดเกณฑ์การประเมินความใช้ได้ของผลตรวจจากยีน human β -globin gene (internal control) เพื่อยืนยันคุณภาพสิ่งส่งตรวจ^(8,9)

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบเก็บข้อมูลย้อนหลังเชิงพรรณนา (Retrospective descriptive study) และมีการรักษาความลับข้อมูลผู้ป่วยเป็นไปตามหลัก personal data protection act (PDPA) โดยมีการขอความยินยอม ซึ่งรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล 3 ส่วน เพื่อศึกษาการกระจายจีโนไทป์เชื้อไวรัสเอชพีวี (HPV Genotypes) และความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ High Risk Human Papilloma Virus (HrHPV) จีโนไทป์เสี่ยงสูงชนิด non-16/18 ได้แก่ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 และ 73 ด้วยวิธี HPV DNA test กับรูปแบบความผิดปกติทางเซลล์วิทยาในอำเภอพรหมพิราม วังทอง และนครไทย จังหวัดพิษณุโลก กำหนดตัวแปรต้นเป็นผลตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกวิธี HPV DNA test สตรีไทย 3 อำเภอ อายุ 30–60 ปี และตัวแปรตามเป็นช่วงอายุผู้รับบริการ (30–40, 41–50 และ 51–60 ปี) รายงานผลการตรวจ HPV DNA test และผลตรวจ LBC โดยเก็บข้อมูล ดังนี้ 1) ข้อมูลทั่วไปจากแบบฟอร์มบันทึกรายละเอียดผู้รับบริการ เกณฑ์การคัดออกกลุ่มตัวอย่าง (exclusion criteria) ได้แก่ การบันทึกข้อมูลไม่ครบถ้วน หรือคุณภาพตัวอย่างไม่เหมาะสม 2) ผลการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก HPV DNA test ปี พ.ศ. 2567 จากระบบ Co-lab2 เพื่อแยกการกระจายจีโนไทป์ของเชื้อ HPV และ 3) ข้อมูลผลตรวจทางเซลล์วิทยา LBC ประเมินภาวะ

อักเสบและการติดเชื้อร่วมในช่องคลอดดำเนินการรวบรวมจากผล LBC โดยพิจารณาลักษณะทางเซลล์วิทยา เช่น presence of inflammatory cells, clue cells, hyphae และ Trichomonas และประเมินพยาธิสภาพความผิดปกติทางเซลล์วิทยาและรอยโรคตามระยะต่างๆ ตามเกณฑ์ The Bethesda System ในการประเมินความเหมาะสมของสิ่งส่งตรวจ (Specimen Adequacy) ดังนั้นการตรวจไม่พบความผิดปกติทางเซลล์วิทยา negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM) และพบความผิดปกติทางเซลล์วิทยา แบ่งเป็น Epithelial cells abnormalities, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US), Atypical Squamous Cells-Cannot Exclude High-grade Squamous Intraepithelial Lesion (ASC-H), Low grade squamous intraepithelial lesion (CIN I), High grade squamous intraepithelial lesion (CIN II, CIN III), HSIL with features suspicious for invasion, Squamous cell carcinoma และ Atypical Glandular Cells-Not Otherwise Specified (AGC-NOS) พบเชื้อก่อโรค เช่น สายรา (Hyphae) ของเชื้อรา Clue cells (เซลล์ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย) หรือโปรโตซัว (Trichomonas)

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ในการศึกษาดำเนินการภายใต้โครงการรณรงค์ตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกเชิงรุกด้วยวิธี HPV DNA test แบบแยก 14 จีโนไทป์เสี่ยงสูงปี พ.ศ. 2567 จาก 3 อำเภอ ได้แก่ วังทอง พรหมพิราม และนครไทย จังหวัดพิษณุโลก โดยเก็บตัวอย่างด้วยตนเองและส่งตรวจคัดกรอง ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก การตรวจหาเชื้อ HPV ดำเนินการด้วยวิธี real-time PCR ขนาดตัวอย่างเป็นข้อมูลทุติยภูมิจากโครงการคัดกรองในประชากรจริงจึงไม่ได้มีการคำนวณขนาดตัวอย่างล่วงหน้า กลุ่มเป้าหมายเริ่มต้นเป็นสตรีไทยอายุ 30-60 ปี จำนวน 5,680 ราย ไม่เคยได้รับการตรวจคัดกรองด้วยวิธี HPV DNA test ภายใน 5 ปี ไม่ได้รับวัคซีน HPV และไม่เคยรักษาความผิดปกติของปากมดลูก ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งพบอัตรา

ผู้ติดเชื้อ HPV ร้อยละ 11.1 (628 ราย) พบจีโนไทป์ HPV type 16,18 ร้อยละ 22.1 (139 ราย) จีโนไทป์เสี่ยงสูง HPV non-16/18 จากสัดส่วนกลุ่มที่ติดเชื้อทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 77.9 (489 ราย) โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์การติดเชื้อจีโนไทป์เสี่ยงสูงชนิด HPV non-16/18 กับรูปแบบความผิดปกติทางเซลล์วิทยามีการระบุเกณฑ์การคัดเข้า (Inclusion criteria) เป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีผลการตรวจ HPV DNA test พบจีโนไทป์เสี่ยงสูงชนิด non-16/18 และมีผลการตรวจทางเซลล์วิทยาด้วยวิธี LBC ที่ได้คุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐาน (Satisfactory for evaluation) รวมจำนวนทั้งสิ้น 226 ราย (46.2%)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

แบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วยสำหรับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก ซึ่งพัฒนาขึ้นเฉพาะโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับบันทึกข้อมูลผลการตรวจ HPV DNA test โดยวิธี real-time PCR ลงระบบรายงานผลผ่าน Krungthai Digital Health Platform KTB และ Colab-2 และผลการตรวจยืนยันทางเซลล์วิทยาด้วยวิธี liquid-based cytology จากศูนย์พยาธิวิทยาและวิจัยอินเทอร์แล็บวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Association) ระหว่างการติดเชื้อ HPV จีโนไทป์เสี่ยงสูงชนิด non-16/18 กับรูปแบบความผิดปกติทางเซลล์วิทยา โดยใช้สถิติ Chi-square test และคำนวณค่า Odds Ratio (OR) พร้อมช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (95% CI) เพื่อประเมินระดับความเสี่ยงในการเกิดความผิดปกติทางเซลล์วิทยาของปากมดลูก

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ได้แก่ ข้อมูลทั่วไป อายุ และผลการตรวจ HPV DNA test การกระจายจีโนไทป์ของเชื้อ HPV และผลการตรวจทางเซลล์วิทยา liquid-based cytology ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ การหาค่าความถี่ ร้อยละ และหาความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ HPV non-16/18 กับผลตรวจทางเซลล์วิทยา LBC และความสัมพันธ์กับผลการตรวจ LBC และภาวะ bacterial vaginosis ด้วย

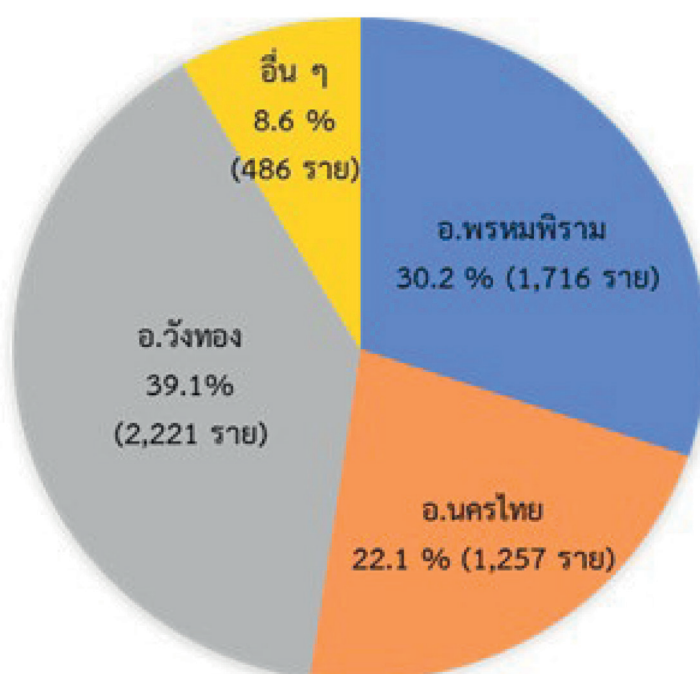
สถิติ Chi-square และคำนวณค่า Odds ratio (OR) ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (95% CI) เนื่องจากเป็นการศึกษาแบบย้อนหลังและมีขนาดตัวอย่างจำกัด จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์พหุตัวแปร (multivariate analysis)

จริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดพิษณุโลก เอกสารรับรองเลขที่ PREC 001-2569 เมื่อวันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2569

ผล

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก ดำเนินการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกด้วย HPV DNA test แบบแยก 14 จีโนไทป์เสี่ยงสูง ด้วยวิธี real-time PCR ปี พ.ศ. 2567 จำนวน 5,680 ราย ใน 3 อำเภอ ได้แก่ วังทอง พรหมพิราม นครไทย และอำเภออื่นๆ จำนวน 2,221, 1,716, 1,257 และ 486 ราย ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 อัตราผู้เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกแยกรายอำเภอ

ผลการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกแบบแยก 14 จีโนไทป์เสี่ยงสูง ด้วยวิธี real-time PCR จำนวน 5,680 ราย พบไม่ติดเชื้อ ร้อยละ 88.9 (5,052 ราย) ติดเชื้อทั้งหมด ร้อยละ 11.1 (628 ราย) พบจีโนไทป์เสี่ยงสูง HPV type 16/18 ร้อยละ 22.1 (139 ราย) และ HPV non-16/18 ร้อยละ 77.9 (489 ราย) ซึ่งเป็นกลุ่มมุ่งเน้นในการศึกษาครั้งนี้ โดยมีผลตรวจทางเซลล์วิทยา ร้อยละ 46.2 (226 ราย) พบผู้ติดเชื้อสูงสุดช่วงอายุ 51-60 ปี ร้อยละ 37.6 (85 ราย) รองลงมา 31-40 ปี ร้อยละ 34.1 (77 ราย) และ 41-50 ปี ร้อยละ 28.3 (64 ราย)

เมื่อพิจารณารายจีโนไทป์พบว่า HPV type 51 ความชุกสูงสุด ร้อยละ 14.2 (32 ราย) รองลงมา คือ HPV type 52 และ HPV type 68 ร้อยละ 12.4 (28 ราย เท่ากัน) และ HPV type 58 ร้อยละ 11.9 (27 ราย) โดยจีโนไทป์ดังกล่าวพบกระจายอยู่ในทุกช่วงอายุ แต่มีแนวโน้มพบมากขึ้นในกลุ่มอายุ 51-60 ปี นอกจากนี้พบการติดเชื้อร่วมหลายจีโนไทป์พร้อมกัน ร้อยละ 13.7 (31 ราย) ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ค่อนข้างสูงและพบมากในช่วงอายุ 41-50 ปี จำนวน 14 ราย และ 51-60 ปี จำนวน 12 ราย ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการจำแนกกลุ่มอายุและจีโนไทป์ HPV non-16/18

High risk HPV genotype	จำนวนที่พบแยกตามช่วงอายุ (ราย)			รวม (ร้อยละ)
	31-40 ปี	41-50 ปี	51-60 ปี	
31	6	1	2	9 (4.0)
33	6	2	2	10 (4.4)
35	0	0	1	1 (0.4)
39	7	5	0	12 (5.3)
45	1	0	2	3 (1.3)
51	5	10	17	32 (14.2)
52	8	6	14	28 (12.4)
56	7	0	5	12 (5.3)
58	10	6	11	27 (11.9)
59	2	1	1	4 (1.8)
66	8	7	5	20 (8.8)
68	8	8	12	28 (12.4)
73	4	4	1	9 (4.0)
multiple genotype	5	14	12	31 (13.7)
รวม (ร้อยละ)	77 (34.1)	64 (28.3)	85 (37.6)	226 (100.0)

หมายเหตุ: Hr = High risk, ตัวอย่าง 1 ราย ไม่มีคุณภาพ

กลุ่มเป้าหมายที่ใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ HPV จีโนไทป์เสี่ยงสูงชนิด non-16/18 กับรูปแบบความผิดปกติทางเซลล์วิทยา LBC พบว่า ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่มีผลปกติ (NILM) ร้อยละ 80.5 และพบความผิดปกติทางเซลล์วิทยาระดับ ASC-US ขึ้นไป จำนวน 43 ราย (ร้อยละ 19.0) ในกลุ่มที่มีความผิดปกติ พบว่า ASC-US เป็นรูปแบบที่พบบ่อยที่สุด (ร้อยละ 14.6) รองลงมา คือ LSIL (ร้อยละ 2.7) และ ASC-H (ร้อยละ 0.9) ขณะที่ความผิดปกติระดับสูง เช่น CIN I และ AGC-NOS พบในสัดส่วนต่ำ (ร้อยละ 0.4 เท่ากัน) เมื่อพิจารณาเชิงจีโนไทป์ พบว่า HPV type 51, 52, 58 และ 68 เป็นกลุ่มที่สัมพันธ์กับการพบความผิดปกติของเซลล์บ่อยกว่าจีโนไทป์อื่น โดยเฉพาะ HPV 51 ซึ่งพบร่วมกับ ASC-US และ LSIL หลายราย ในกลุ่มที่ติดเชื้อหลายจีโนไทป์ พบความผิดปกติของเซลล์ 8 ราย (จาก 31 ราย) และพบความผิดปกติระดับสูง (CIN I และ AGC-NOS) เฉพาะในกลุ่มนี้ สะท้อนถึงแนวโน้มความเสี่ยงที่สูงขึ้นของการติดเชื้อร่วมหลายจีโนไทป์ ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการวิเคราะห์เฉพาะกลุ่มที่ติดเชื้อร่วมหลายจีโนไทป์ (31 ราย) พบความผิดปกติทางเซลล์วิทยา (ระดับ ASC-US ขึ้นไป) ร้อยละ 25.8 (8 ราย) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มติดเชื้อแบบเดี่ยว นอกจากนี้พบความผิดปกติในระดับที่รุนแรงกว่า ได้แก่ CIN I และ AGC-NOS อย่างละ 1 ราย ซึ่งไม่พบในกลุ่มติดเชื้อเดี่ยว สะท้อนถึงแนวโน้มของความรุนแรงที่อาจเพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อหลายจีโนไทป์ร่วมกัน และมักพบจีโนไทป์ 68 ร่วมด้วย ดังแสดงในตารางที่ 3 อย่างไรก็ตามแม้จะมีแนวโน้มดังกล่าวแต่ยังไม่สามารถสรุปเชิงสถิติได้อย่างชัดเจน เนื่องจากจำนวนตัวอย่างในกลุ่มนี้มีขนาดจำกัด การติดตามผู้ป่วยให้เข้ารับการตรวจทางเซลล์วิทยา LBC ได้น้อย และการออกแบบภาคตัดขวางที่ไม่สามารถประเมินการเปลี่ยนแปลงของโรคในระยะยาวได้ จึงควรมีการศึกษาแบบติดตาม (longitudinal study) เพิ่มเติมเพื่อยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ HPV และการดำเนินโรคทางเซลล์วิทยา โดยเฉพาะกลุ่มที่พบความผิดปกติทางเซลล์วิทยาตั้งแต่ ASC-US ขึ้นไป เพื่อเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงเซลล์

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเชื้อ HPV และผลการตรวจทางเซลล์วิทยา (LBC)

	NILM	Epithelial cells abnormalities	ASC-US	ASC-H	LSIL	CIN I	AGC-NOS	รวม (ร้อยละ)
31	8	0	1	0	0	0	0	9 (4.0)
33	8	0	1	1	0	0	0	10 (4.4)
35	1	0	0	0	0	0	0	1 (0.4)
39	10	0	1	0	1	0	0	12 (5.3)
45	3	0	0	0	0	0	0	3 (1.3)
51	26	0	3	0	3	0	0	32 (14.2)
52	23	1	4	0	0	0	0	28 (12.4)
56	8	0	3	0	1	0	0	12 (5.3)
58	22	0	4	0	1	0	0	27 (11.9)
59	4	0	0	0	0	0	0	4 (1.8)
66	16	0	4	0	0	0	0	20 (8.8)
68	23	0	4	1	0	0	0	28 (12.4)
73	7	0	2	0	0	0	0	9 (4.0)
multiple genotype	23	0	6	0	0	1	1	31 (13.7)
รวม (ร้อยละ)	182 (80.5)	1 (0.4)	33 (14.6)	2 (0.9)	6 (2.7)	1 (0.4)	1 (0.4)	226 (100)

หมายเหตุ: Hr = High risk, Reporting cytology results by The 2014 Bethesda System^(10,11)

ตารางที่ 3 การแจกแจงรูปแบบการติดเชื้อหลายจีโนไทป์และผลทางเซลล์วิทยา (n = 31)

HPV Genotypes (Common Pairs/Groups)	HILM	ASC-US	CIN I	AGC-NOS	Total
HPV 58+68	3	2	1	0	6
HPV 51+68	1	2	0	0	3
HPV 39+45/52/56/58	4	1	0	0	5
HPV 16+others	1	0	0	0	2
Other combinations	14	1	0	1	15
Total	23	6	1	1	31

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการติดเชื้อแบบเดียวกับติดเชื้อร่วมหลายจีโนไทป์ กับรายงานผลตรวจ LBC พบว่ากลุ่มติดเชื้อแบบเดียวมีความผิดปกติทางเซลล์ระดับ ASC-US ขึ้นไป 35 ราย จาก 194 ราย กลุ่มติดเชื้อร่วมหลายจีโนไทป์มีความผิดปกติระดับ ASC-US ขึ้นไป 8 ราย จาก 31 ราย กลุ่มติดเชื้อร่วมหลายจีโนไทป์มีความผิดปกติ $\geq$ ASC-US 8 ราย จาก 31 ราย เมื่อคำนวณค่า Odds ratio (OR) พบว่า

OR = 1.59 (95% CI: 0.66–3.85) และ p -value = 0.31 ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแม้กลุ่มที่ติดเชื้อหลายจีโนไทป์จะมีแนวโน้มเกิดความผิดปกติของเซลล์สูงกว่า แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเกิดจากขนาดตัวอย่างที่ไม่เพียงพอในการตรวจจับความแตกต่างช่วงความเชื่อมั่นที่กว้างอาจสะท้อนถึงขนาดตัวอย่างที่จำกัด ซึ่งส่งผลต่ออำนาจการทดสอบทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการติดเชื้อ HPV non-16/18 และผลทางเซลล์วิทยา

HPV non-16/18	ผล LBC		OR	95% CI	p-value
	≥ ASC-US	NILM			
single genotype	35	159	1		
multiple genotype	8	23	1.59	0.66-3.85	0.31
รวม	43	182			

ผลการวิเคราะห์ภาวะร่วมจากการตรวจ LBC พบว่าการติดเชื้อจุลชีพอื่นร่วมด้วยในบางราย โดยพบ bacterial vaginosis (BV) มากที่สุด ร้อยละ 10.2 รองลงมา คือ *Candida* spp. ร้อยละ 2.7 และ *Trichomonas vaginalis* ร้อยละ 1.3 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ BV กับความผิดปกติ

ทางเซลล์วิทยา พบค่า p -value = 0.071 ซึ่งยังไม่ถึงระดับนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 5 ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่า แม้การติดเชื้อร่วมอาจมีบทบาทต่อสภาวะการอักเสบและอาจส่งผลต่อ microenvironment ของปากมดลูก แต่ไม่มีหลักฐานเพียงพอที่จะยืนยันว่ามีผลโดยตรงต่อการเกิดความผิดปกติของเซลล์ในระดับที่มีนัยสำคัญ

ตารางที่ 5 ภาวะร่วมจากผลการตรวจทางเซลล์วิทยา LBC

ภาวะร่วม	จำนวน 226 ราย (ร้อยละ)	p-value
Bacterial Vaginosis	23 (10.2)	0.071
<i>Candida</i> spp.	6 (2.7)	
<i>Trichomonas vaginalis</i>	3 (1.3)	

การศึกษานี้พบว่าการติดเชื้อ HPV non-16/18 พบมาก และกระจายในทุกช่วงอายุ สูงสุดช่วงอายุ 51-60 ปี จีโนไทป์เด่น 51, 52 และ 68 ความผิดปกติทางเซลล์วิทยา พบประมาณร้อยละ 19 ส่วนใหญ่ระดับต่ำ (ASC-US) และการติดเชื้อร่วมหลายจีโนไทป์มีแนวโน้มเสี่ยงสูงกว่า รวมทั้งกลุ่มที่มีการติดเชื้อร่วมกับจุลชีพอื่นๆ ยังไม่พบความสัมพันธ์เช่นเดียวกัน ด้วยข้อจำกัดในการศึกษาแบบตัดขวางและขนาดตัวอย่างน้อย จึงไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน

วิจารณ์

โครงการขับเคลื่อนการรณรงค์ตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกเชิงรุกด้วยวิธี HPV DNA test แบบแยก 14 จีโนไทป์เสี่ยงสูง โดยการเก็บตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกด้วยตนเอง ปี พ.ศ. 2567 เป็นนโยบายสำคัญของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อให้สตรีไทยได้รับการตรวจคัดกรองได้เพิ่มขึ้น ข้อมูลผลดำเนินงาน

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 ปี พ.ศ. 2567 พบว่า สตรีในพื้นที่ 3 อำเภอ ได้รับการตรวจคัดกรองเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2566⁽¹²⁾ กลุ่มสตรีที่ได้รับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกเริ่มต้น จำนวน 5,680 ราย พบอัตราความชุกการติดเชื้อ HPV ร้อยละ 11.1 (628 ราย) เป็นกลุ่มที่ติดเชื้อเสี่ยงสูงชนิด HPV non-16/18 ร้อยละ 77.9 (489 ราย) ซึ่งมีสัดส่วนมากกว่ากลุ่ม HPV 16/18 ประมาณ 3.5 เท่า ร้อยละ 22.1 (139 ราย) ทั้งนี้ได้มีการติดตามกลับมารตรวจทางเซลล์วิทยา LBC ได้ ร้อยละ 46.2 (226 ราย) ซึ่งเป็นกลุ่มเป้าหมายในการศึกษาครั้งนี้ กลุ่มที่ติดเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุ 51-60 ปี เป็นกลุ่มที่เข้ารับการตรวจจำนวนมากและเป็นช่วงที่มีปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เช่น ฮอร์โมนเพศเปลี่ยนแปลง ไกล่หลวม หรือวัยหมดประจำเดือน ซึ่งอาจมีส่วนสัมพันธ์กับความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang RY และคณะ ที่รายงานว่าผู้หญิงอายุเยาะ มีความชุกในการติดเชื้อ HPV สูง⁽¹³⁾ และการศึกษา

ของ Kantathavorn N และคณะ ที่พบว่าในผู้หญิงไทยที่มีอายุมากกว่า 50 ปี มีการติดเชื้อเสี่ยงสูงเพิ่มขึ้นในกรณีที่มีผลลัพธ์ทางเซลล์วิทยาผิดปกติ⁽¹⁴⁾

การศึกษานี้สะท้อนรูปแบบการกระจายจีโนไทป์ของเชื้อ HPV ชนิดเสี่ยงสูงในบริบทพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก พบ HPV type 51 เป็นจีโนไทป์ที่มีความชุกสูงสุด แตกต่างจากรายงานระดับประเทศที่มักพบ HPV type 52, 58 และ 68 เป็นชนิดเด่น^(15,16) ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์เชิงภูมิศาสตร์ โครงสร้างประชากร หรือปัจจัยเสี่ยงเฉพาะพื้นที่ และชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของข้อมูลระบาดวิทยาเชิงพื้นที่ (local epidemiological data) ในการสนับสนุนมาตรการป้องกันที่เหมาะสม แม้ว่าส่วนใหญ่ของการติดเชื้อ HPV ชนิดเสี่ยงสูง non-16/18 ในการศึกษาซึ่งยังไม่แสดงความผิดปกติทางเซลล์วิทยา (NILM) แต่ผลลัพธ์ดังกล่าวสอดคล้องกับธรรมชาติของการติดเชื้อ HPV ซึ่งมักเกิดขึ้นก่อนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และอาจใช้เวลานานหลายปีก่อนพัฒนาไปสู่รอยโรคก่อนมะเร็งหรือมะเร็ง⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ ประเด็นนี้มีนัยสำคัญทางคลินิกเนื่องจากการตรวจพบเชื้อระยะเริ่มต้นช่วยเพิ่มโอกาสให้สามารถติดตามและเฝ้าระวังกลุ่มเสี่ยงได้อย่างเหมาะสม ในกลุ่มที่มีการติดเชื้อร่วมหลายจีโนไทป์ พบแนวโน้มของความผิดปกติทางเซลล์วิทยาที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การติดเชื้อแบบเดี่ยว สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ ระบุว่า การติดเชื้อหลายสายพันธุ์อาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดรอยโรคหรือเร่งการดำเนินโรค^(17,18) อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเกิดจากข้อจำกัดของขนาดตัวอย่างในกลุ่มย่อยและ ลักษณะการศึกษาแบบภาคตัดขวางที่ไม่สามารถประเมิน การติดเชื้อแบบคงอยู่ (persistent infection) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้โดยตรง แม้ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ผลลัพธ์ดังกล่าวยังมีนัยเชิงคลินิก โดยสอดคล้องกับแนวทางการดูแลตามความเสี่ยง (risk-based management) โดยเฉพาะในผู้ที่ตรวจพบการติดเชื้อ HPV กลุ่ม non-16/18 ร่วมกับผลเซลล์วิทยาปกติ ซึ่งแนวทางของสมาคมโคโลโปสโคปีและพยาธิวิทยา

ปากมดลูกแห่งสหรัฐอเมริกา American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) แนะนำให้ติดตามซ้ำภายใน 1 ปี แทนการส่งตรวจเพิ่มเติมทันที เพื่อลดการใช้ทรัพยากรที่ไม่จำเป็น และลดภาระของระบบบริการสุขภาพ⁽¹⁹⁾ สอดคล้องกับแนวทางระดับชาติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่มีข้อแนะนำในทิศทางเดียวกัน⁽⁹⁾ สะท้อนถึงความสอดคล้องของผลการศึกษา กับแนวปฏิบัติทางคลินิกในปัจจุบัน

การใช้ HPV DNA test แบบแยกจีโนไทป์ร่วมกับการเก็บตัวอย่างด้วยตนเอง (HPV self-sampling) ช่วยเพิ่มศักยภาพในการเข้าถึงบริการคัดกรอง โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีข้อจำกัดด้านทรัพยากร สอดคล้องกับข้อแนะนำขององค์การอนามัยโลกที่สนับสนุนการใช้ HPV DNA test เป็นเครื่องมือหลักในการคัดกรองมะเร็งปากมดลูก⁽⁷⁾ นอกจากนี้ ข้อมูลการกระจายจีโนไทป์ในระดับพื้นที่ยังมีบทบาทสำคัญในการสนับสนุนการวางแผนนโยบายวัคซีนให้เหมาะสมกับบริบทประชากร แม้ว่าวัคซีนชนิด 9-valent จะครอบคลุมจีโนไทป์เสี่ยงสูงหลายชนิดที่พบในการศึกษานี้ เช่น 31, 33, 45, 52 และ 58 และมีศักยภาพในการป้องกันที่กว้างกว่าวัคซีนชนิด 2-valent และ 4-valent⁽²⁰⁾ แต่การตรวจพบจีโนไทป์ที่อยู่นอกขอบเขตวัคซีน เช่น HPV 68 และ 66 บ่งชี้ว่าการตรวจคัดกรองยังคงมีความจำเป็นแม้ในประชากรที่ได้รับวัคซีนแล้ว ข้อจำกัดของการศึกษานี้ ได้แก่ การศึกษาแบบภาคตัดขวางซึ่งไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์เชิงเหตุและผลได้ และไม่สามารถติดตาม การติดเชื้อแบบคงอยู่ได้ นอกจากนี้ จำนวนตัวอย่างในบางจีโนไทป์มีขนาดเล็ก ซึ่งอาจจำกัดพลังทางสถิติ ในการตรวจหาความแตกต่างระหว่างกลุ่ม การศึกษาในอนาคตควรออกแบบเป็นการศึกษาแบบติดตามระยะยาว (longitudinal study) เพื่อประเมินการติดเชื้อแบบคงอยู่ (persistent infection) เป็นปัจจัยสำคัญ ในการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้น จุดแข็งของการศึกษานี้ คือ การใช้ข้อมูลจากโครงการคัดกรองในระดับประชากรจริง (real-world data) ร่วมกับการวิเคราะห์จีโนไทป์แบบจำแนกรายชนิด ซึ่งให้ข้อมูล

เชิงลึกที่เป็นประโยชน์ต่อการวางแผนนโยบายสาธารณสุข ผลการศึกษานี้เน้นย้ำถึงความสำคัญของการเฝ้าระวัง การติดเชื้อ HPV ชนิดเสี่ยงสูงกลุ่ม non-16/18 และสนับสนุนการบูรณาการการตรวจคัดกรองด้วย HPV DNA test ร่วมกับการติดตามตามระดับความเสี่ยง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมมะเร็ง ปากมดลูกในระยะยาว

สรุป

การศึกษานี้พบความชุกของการติดเชื้อ HPV ร้อยละ 11.1 โดยส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม HPV ชนิดเสี่ยงสูง non-16/18 (ร้อยละ 77.9) และในกลุ่มที่ได้รับการตรวจทางเซลล์วิทยา พบว่า HPV type 51 เป็น จีโนไทป์ที่มีความชุกสูงสุด รองลงมา คือ HPV type 52 และ 68 นอกจากนี้พบการติดเชื้อร่วมหลายจีโนไทป์ ร้อยละ 13.7 และพบความผิดปกติทางเซลล์วิทยาตั้งแต่ ระดับ ASC-US ขึ้นไป ร้อยละ 19.0 แม้ว่ากลุ่มที่ ติดเชื้อหลายจีโนไทป์จะมีแนวโน้มพบความผิดปกติของ เซลล์สูงกว่า แต่ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติระหว่างการติดเชื้อ HPV non-16/18 กับความ ผิดปกติทางเซลล์วิทยาของปากมดลูก ผลการศึกษานี้ สะท้อนถึงความจำเป็นของการเฝ้าระวังการติดเชื้อ HPV ชนิดเสี่ยงสูง non-16/18 โดยเฉพาะการติดเชื้อร่วม หลายจีโนไทป์ และสนับสนุนการใช้ HPV DNA test แบบแยกจีโนไทป์เสี่ยงสูงร่วมกับการเก็บตัวอย่างด้วย ตนเอง เพื่อเพิ่มโอกาสการเข้าถึงบริการคัดกรองและ การตรวจพบกลุ่มเสี่ยงในระยะเริ่มแรก รวมทั้งสามารถใช้ข้อมูลการกระจายจีโนไทป์เพื่อสนับสนุนการวางแผน นโยบายวัคซีนให้เหมาะสมกับบริบทของพื้นที่ นอกจากนี้ ควรมีการติดตามกลุ่มที่ติดเชื้อ HPV อย่างต่อเนื่องใน เชิงปฏิบัติ โดยเฉพาะกลุ่มติดเชื้อ HPV non-16/18 และ ผู้ที่มีการติดเชื้อร่วมหลายจีโนไทป์ รวมทั้งพิจารณาการใช้ ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เช่น E6/E7 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ในการประเมินความเสี่ยงและส่งเสริมการคัดกรองเชิงรุก ให้ครอบคลุมกลุ่มเป้าหมาย

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ไม่มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ในการศึกษาวิจัยนี้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้บริหารและเจ้าหน้าที่สำนักงาน สาธารณสุขจังหวัดพิษณุโลก สำนักสาธารณสุขอำเภอ วังทอง พรหมพิราม และนครไทย เครือข่ายหน่วยบริการ โรงพยาบาลวังทอง โรงพยาบาลพรหมพิราม และ โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชนครไทย หน่วยบริการ ปฐมภูมิ ที่ให้ความอนุเคราะห์และสนับสนุนการดำเนินการ ตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในพื้นที่ดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

1. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer. Thailand: Human papillomavirus and related cancers, fact sheet. [online]. 2023; [cited 2025 Aug 13]. [2 screens]. Available from: URL: https://hpvcentre.net/statistics/reports/THA_FS.pdf.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Chapter 5: Human papillomavirus. [online]. 2024; [cited 2025 Aug 13]. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/surv-manual/php/table-of-contents/chapter-5-human-papillomavirus.html>.
3. World Health Organization. Human papillomavirus and cancer. [online]. 2024; [cited 2025 Aug 13]. Available from: URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papilloma-virus-and-cancer>.
4. National Cancer Institute. HPV and cancer. [online]. 2025; [cited 2025 Aug 13]. Available from: URL: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-and-cancer>.

5. American Cancer Society. Types of HPV. [online]. 2024; [cited 2025 Aug 13]. Available from: URL: <https://www.cancer.org/cancer/risk-prevention/hpv/types-of-hpv.html>.
6. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมเครือข่ายตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก ด้วยวิธี HPV DNA Test ตั้งเป้าตรวจหญิงไทย 30-60 ปี 1 ล้านคน ภายในปี 67 เริ่ม ธ.ค. นี้ ทั่วประเทศ. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 25 ส.ค. 2568]. เข้าถึงได้: URL: <https://www.dmsc.moph.go.th/th/detailAll/256/nw/25>.
7. World Health Organization. WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention. 2nd ed. [online]. 2021; [cited 2025 Aug 13]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030824>.
8. Guangzhou Biotron Technology Co., Ltd. Human papillomavirus (HPV) 15 genotype detection kit (fluorescence PCR melting curve method): instruction manual. Guangzhou: Guang-zhou Biotron Technology Co., Ltd.; 2021.
9. Z-Medic. Biotron HPV 15 genotypes. [online]. [cited 2025 Aug 13]. Available from: URL: <https://z-medic.com/product/human-papillomavirus-hpv-15-genotype-detection-kit-fluorescence-pcr-melting-curve-method>.
10. Garg P, Gupta K, Mohan A, Kumar R, Varshney A. Spectrum of Pap smear cytology according to The Bethesda System 2014. IP J Diagn Pathol Oncol. [online] 2023. [cited 2025 Aug 13]; 8(3): [7 screens]. Available from: URL: <https://jdpo.org/archive/volume/8/issue/3/article/2838/pdf>.
11. ปิยวัฒน์ เลาวหุตานนท์, อาคม ชัยวีระวัฒน์, วีรวัฒน์ อิ่มสำราญ, บรรณาธิการ. แนวทางการตรวจคัดกรอง วินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก. กรุงเทพฯ: สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
12. สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดพิษณุโลก กระทรวงสาธารณสุข. รายงานประจำปี 2566. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 13 ส.ค. 2568]; [433 หน้า]. เข้าถึงได้: URL: <https://cloud.plkhealth.go.th/index.php/s/9r9ycAWoN2D638s>.
13. Zhang R, Xu W, Yang S, Hu D, Bai L, Xiang RM, et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus infection, associated risk factors, and relationship with cervical precancerous lesions in perimenopausal and older women in an area with high cervical cancer incidence in china. Cureus 2024; 16(4): e58081. (33 pages).
14. Kantathavorn N, Mahidol C, Sritana N, Sricharunrat T, Phoolcharoen N, Auewarakul C, et al. Genotypic distribution of human papillomavirus (HPV) and cervical cytology findings in 5906 Thai women undergoing cervical cancer screening programs. Infect Agent Cancer 2015; 10: 7. (9 pages.)
15. ศิริญา เพชรพิชัย, ณัฐพร คล้ายคลึง, อมรัตน์ โพธิ์ตา, อนุกุล บุญคง, ปาริชาติ กัญญาบุญ. ความชุกของการติดเชื้อ Human papillomavirus สายพันธุ์เสี่ยงสูงของสตรีไทยในพื้นที่จังหวัดพิจิตร อุทัยธานี ชัยนาท และกำแพงเพชร. ว กรมวิทย์ พ 2564; 63(4): 766-81.
16. เทียนแสง พันธุ์ศรี, กฤติกา บุญมาก, จริญญา งามขำ. การศึกษาย้อนหลังการติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพปพิโลมาในประเทศไทย: การทบทวนอย่างเป็นระบบ. ว โรคมะเร็ง 2565; 42(1): 10-29.
17. Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. Cancer

- Epidemiol Biomarkers Prev 2006; 15(7): 1274–80.
18. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodríguez AC, Quint W, Schiffman M, et al. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease. *J Infect Dis* 2011; 203(7): 910–20.
 19. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, Chelmow D, Einstein MH, Garcia F, et al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *J Low Genit Tract Dis* 2020; 24(2): 102–31.
 20. World Health Organization. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017. *Wkly Epidemiol Rec* 2017; 92(19): 241–68.
-

Association of High-Risk Human Papilloma Virus Type Non-16/18 Infection with Cytological Abnormalities in Phrom Phiram, Wang Thong, and Nakhonthai Districts, Phitsanulok Province, 2024

Dujdao Boonyod, Bundit Promraksa, and Chawisa Phetumpai

Regional Medical Sciences Center 2 Phitsanulok, Department of Medical Sciences, Phitsanulok 65000, Thailand

ABSTRACT Cervical cancer is a significant public health problem among Thai women, with high-risk human papillomavirus (HPV) infection being the primary cause. This retrospective descriptive study aimed to investigate the distribution of high-risk human papillomavirus (HPV) non-16/18 genotypes and their association with cervical cytological abnormalities. Data were collected from 5,680 Thai women, aged 30–60 years, who underwent cervical cancer screening using HPV DNA testing and liquid-based cytology (LBC) in Phrom Phiram, Wang Thong, and Nakhon Thai districts, Phitsanulok Province, in 2024. The results revealed an overall HPV prevalence of 11.1% (628 cases), consisting of HPV 16/18 at 22.1% (139 cases) and HPV non-16/18 at 77.9% (489 cases). Among the non-16/18 group, 226 cases underwent subsequent LBC. The most prevalent genotype was HPV 51 (14.2%), followed by HPV 52 and 68 (12.4% each). Multiple genotype infections were identified in 13.7% of cases. Cytological abnormalities ($\geq$ ASC-US) were detected in 19.0% (43 cases) of the HPV non-16/18 group. Although multiple infections showed a higher trend of cytological abnormalities compared to single infections, no significant association was observed between HPV non-16/18 infection and cervical cytological abnormalities ($p > 0.05$). These findings underscore the importance of monitoring non-16/18 HPV genotypes, particularly multiple infections. The regional genotype distribution data will be instrumental in vaccination planning and enhancing cervical cancer prevention strategies.

Keywords: Cervical cancer, HPV, Genotypes, Cytological abnormalities, HPV DNA test

การสำรวจติดตามและประเมินความเสี่ยงการได้รับสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผลไม้เศรษฐกิจของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2568

วีรวิทย์ วิทยานันท์¹ พรรคพล ชะพลพรรค์² ขนิษฐา พุทธสุชา³ ศศิธร สุกรีธา⁴ และ กิ่งแก้ว กาญจนรัตน์⁵

¹สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงราย 57100

³ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชลบุรี 20000

⁴ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นครราชสีมา 30000

⁵ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สงขลา 90100

บทคัดย่อ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ร่วมกับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 4 แห่ง ได้ดำเนินโครงการสำรวจสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง จำนวน 250 ชนิด และสาร ethephon ในผลไม้เศรษฐกิจของประเทศไทย 4 ชนิด ได้แก่ทุเรียน มะม่วง กัลย และสับปะรด ในปี พ.ศ. 2568 โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งจำหน่ายใน 5 จังหวัด ซึ่งเป็นตัวแทนของทุกภูมิภาค ได้แก่ กรุงเทพมหานคร เชียงราย ชลบุรี นครราชสีมา และสงขลา จังหวัดละ 40 ตัวอย่าง รวม 200 ตัวอย่าง เพื่อทราบสถานการณ์การตกค้างและประเมินความเสี่ยงจากการได้รับสัมผัสสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชของผู้บริโภค ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 รายการวิเคราะห์สาร 250 ชนิด โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ multi-residue method (QuEChERS) ร่วมกับเครื่อง GC-MS/MS, LC-MS/MS และ LC-QTOF/MS สำหรับสาร ethephon ทำการวิเคราะห์แบบสารเดี่ยว โดยตรวจวัดในรูปของเอทิลีนด้วยเครื่อง GC-MS ผลการวิเคราะห์พบสารพิษตกค้าง จำนวน 38 ชนิด ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.01 ถึง 73.18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างผลไม้ 4 ชนิด ชนิดละ 50 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 43.0 โดยพบตัวอย่างที่มีปริมาณสารตกค้างเกินเกณฑ์มาตรฐาน ร้อยละ 26.0 ผลการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสาร จำนวน 8 ชนิด ที่พบการตกค้างสูงสุด พบว่าการได้รับสารพิษของประชากรไทยไม่เกินค่า Acceptable Daily Intake (ADI) ตามที่องค์การอนามัยโลกกำหนด ซึ่งบ่งชี้ว่าประชากรไทยมีความปลอดภัยจากการได้รับสารพิษจากการบริโภคผลไม้เศรษฐกิจดังกล่าว อย่างไรก็ตามยังตรวจพบตัวอย่างที่มีปริมาณสารตกค้างเกินเกณฑ์มาตรฐานซึ่งจัดเป็นอาหารที่ไม่บริสุทธิ์ จึงควรดำเนินการสำรวจและเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งกำหนดมาตรการควบคุมการใช้สารเคมีอันตรายในภาคเกษตรกรรมอย่างเข้มงวดเพื่อป้องกันอันตรายต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ: การสำรวจติดตาม, การประเมินความเสี่ยง, สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช, อีทีฟอน, ผลไม้

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

Received: 5 February 2026

Revised: 30 March 2026

Accepted: 1 April 2026

บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตที่สำคัญของไม้ผลเมืองร้อน (tropical fruit) ปัจจุบันไทยเป็นผู้ส่งออกผลไม้อันดับที่ 8 ของโลก และเป็นอันดับ 1 ของอาเซียน⁽¹⁾ ภายในช่วงหนึ่งทศวรรษที่ผ่านมาการส่งออกผลไม้และผลิตภัณฑ์ของประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จนปัจจุบันกลายเป็นสินค้าเกษตรส่งออกเป็นอันดับหนึ่งแข่งขันอย่างพาราล⁽²⁾ ด้วยอัตราการส่งออกที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องผนวกกับการส่งเสริมให้เปลี่ยนจากสวนยางเป็นสวนผลไม้เพราะมีมูลค่าทางเศรษฐกิจต่อพื้นที่การเพาะปลูกสูงกว่าการปลูกพืชเชิงเดี่ยวอายุสั้นหลายเท่า ข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร⁽³⁾ พบว่าในปี พ.ศ. 2567 การส่งออกผลไม้และผลิตภัณฑ์มีมูลค่าสูงถึง 309,519 ล้านบาท โดยทุเรียนและสับปะรดมีมูลค่าการส่งออกสูงถึง 157,110 และ 12,973 ล้านบาทตามลำดับ สร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจมหาศาล ข้อมูลการบริโภคอาหารของคนไทยระบุว่าคนไทยบริโภคกล้วยมากเป็นอันดับ 1 ในกลุ่มผลไม้: ตลอดปีและมะม่วงเป็นอันดับ 2 ในกลุ่มผลไม้: เดือนมกราคมถึง เมษายน สำหรับทุเรียนและสับปะรดมีปริมาณการบริโภคเป็นอันดับต้นๆ เช่นเดียวกัน⁽⁴⁾ อย่างไรก็ตามผลสำรวจพฤติกรรมมารับประทานผลไม้ของคนไทยปี พ.ศ. 2562 โดยสถาบันวิจัยประชากรและสังคมมหาวิทยาลัยมหิดล⁽⁵⁾ พบว่าคนไทยที่มีอายุ 15 ปีขึ้นไปรับประทานผลไม้ต่ำกว่าเกณฑ์ที่องค์การอนามัยโลกกำหนด จึงมีการส่งเสริมแนะนำให้ทานผลไม้ให้เพียงพอในแต่ละวันจะช่วยลดปัญหาการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตจากโรคไม่ติดต่อเรื้อรังแต่ผลไม้บางชนิดมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงจึงควรบริโภคแต่พอเหมาะและผลไม้เหล่านั้นต้องเป็นผลไม้ที่ปลอดภัยจากสารตกค้างจากสารเคมีทางการเกษตรต่างๆ ที่อาจมีการใช้ในขั้นตอนการผลิต การเพาะปลูก การเก็บรักษา รวมถึงสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช สารที่ใช้ในการเร่งให้ผลไม้สุกในระยะเวลาที่ต้องการ เพื่อให้มีรูปลักษณะสวยงามน่าซื้อ นำรับประทาน ผู้บริโภคควรคำนึงถึงความปลอดภัยก่อนเลือกซื้อ เช่น ทุเรียนต้องไม่ใช่ทุเรียนผ่านการใช้สารเร่งให้สุกหรือหากมีการใช้ต้องปราศจากสารตกค้าง เป็นต้น

สาร ethephon (2-chloroethyl phosphonic acid) หรืออีทรีลเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ในการเร่งให้ผลไม้สุกตามเวลาที่ต้องการและทำให้ผลไม้สีส้มสวยงามสม่ำเสมอ เป็นของแข็งสีขาว ละลายได้ดีในน้ำ และจะปล่อยเอทิลีนออกมาเรียกว่า ethylene generator⁽⁶⁾ จัดเป็นสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) สารเอทิลีนที่ปลดปล่อยออกมานั้นจัดเป็นฮอร์โมนพืชที่มีพืชค่อนข้างต่ำและสลายตัวได้ง่าย⁽⁷⁾ มีความคงตัวในสภาพกรดจัด ($\text{pH} < 3.5$)⁽⁸⁾ ช่วยเร่งให้พืชออกดอก ใช้ทดแทนสารแคลเซียมคาร์ไบด์ในการเร่งการออกดอกของสับปะรด⁽⁹⁾ ใช้เร่งให้ผักและผลไม้สุกเร็วขึ้น เช่น เร่งการสุกของผลมะเขือเทศในแปลงปลูกสำหรับนำไปแปรรูป⁽¹⁰⁾ และเร่งให้ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เช่น เร่งให้ใบยาสูบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง⁽¹¹⁾ สำหรับการใช้ในผลไม้เศรษฐกิจ เช่น ทุเรียน มะม่วง กล้วย โดยธรรมชาติการสุกของผลไม้เหล่านี้จะไม่สม่ำเสมอทั้งระหว่างผลและภายในผลเดียวกันก็ตาม ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่อการบริโภค การจัดจำหน่ายและการส่งออก ดังนั้นการบ่มให้ผลสุกสม่ำเสมอพร้อมกันจะช่วยทำให้สะดวกต่อการบริโภคมากขึ้นและลดการสูญเสียได้ การได้รับสาร ethephon มากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพ สาร ethephon ความเข้มข้น 1.65 และ 4.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม อาจก่ออันตรายต่อเด็กและผู้ใหญ่ ตามลำดับ ทำให้เกิดการปัสสาวะผิดปกติและมีอาการถ่ายท้อง แต่ไม่ใช่สารก่อมะเร็งและไม่ใช่สารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยมีค่า LD_{50} เท่ากับ 3,400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว⁽¹²⁾ สำหรับมาตรฐานปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRL) มาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex)⁽¹³⁾ มาตรฐานมกษ. 9002-2568⁽¹⁴⁾ และประกาศกระทรวงสาธารณสุขเลขที่ 460 พ.ศ. 2568 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง⁽¹⁵⁾ กำหนดปริมาณสาร ethephon ตกค้างสูงสุดในผลทุเรียน มะม่วง กล้วย และสับปะรดไว้ที่ 1, 2, 0.5 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว (mg/kg) ตามลำดับ สำหรับสาธารณสุขประชาชนจีนและฮ่องกง ซึ่งเป็นผู้นำเข้ารายใหญ่ของผลไม้ไทยกำหนดค่ามาตรฐานสำหรับผลไม้ทั้ง 4 ชนิดไว้ที่ไม่เกิน 2 mg/kg⁽¹⁶⁾ ขณะที่สหภาพยุโรปกำหนดค่า

MRL ของผลไม้ขนาดใหญ่ที่ไม่รับประทานเปลือกไว้ที่ไม่เกิน 0.25 mg/kg ส่วนอาหารอื่นๆ มีค่า MRL เป็น 0.05 mg/kg⁽¹⁷⁾ สำหรับผลไม้ที่ประเทศไทยส่งออกไปยังต่างประเทศพบว่าในปี พ.ศ. 2551 สหพันธ์สาธารณสุขเยอรมนีตรวจพบสาร ethephon ตกค้างในผลทุเรียนนำเข้าจากไทย จำนวน 2 ตัวอย่าง ปริมาณ 0.31 และ 10.1 mg/kg⁽¹⁸⁾ และปี พ.ศ. 2558 ห้องกตรวจพบ ethephon ตกค้างในทุเรียนสดนำเข้าจากไทย 3 ตัวอย่าง ปริมาณ 5.4, 5.6 และ 6.6 mg/kg ซึ่งเกินกว่ามาตรฐานและอยู่ในระดับที่เป็นอันตราย⁽¹⁹⁾

การเฝ้าระวังโดยการตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ของห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 จนถึงปัจจุบัน โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้จัดทำข้อมูลการสำรวจประจำปี ได้แก่ ผักและผลไม้ที่จำหน่ายในประเทศไทย และอาหารชนิดต่างๆ ฐานข้อมูลเหล่านี้ได้ถูกส่งมอบให้แก่หน่วยงานที่เป็นผู้กำกับดูแลมาตรฐานและความปลอดภัยอาหารเป็นประจำทุกปี เพื่อการบริหารจัดการความเสี่ยงต่อผู้บริโภค ผักและผลไม้ที่จะสามารถนำมาบริโภคได้จะต้องปลอดภัย และไม่มีสารใดๆ ที่ระบุว่าเป็นอันตรายหรือมีพิษตามธรรมชาติ และต้องปลอดภัยจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างจากภาคการเกษตร สำหรับโครงการสำรวจติดตามขนาดใหญ่ที่เน้นการตรวจสอบความปลอดภัยของผลไม้เศรษฐกิจที่ผลิตในประเทศไทยและมีอัตราการบริโภคภายในประเทศสูง⁽⁴⁾ รวมถึงมีปริมาณการส่งออกต่างประเทศมาก ยังไม่มีหน่วยงานใดมีรายงานฉบับสมบูรณ์ที่เสนอข้อมูลได้อย่างครบถ้วน และสามารถนำไปใช้อ้างอิงได้ นอกจากนี้ปัจจุบันไม่พบงานวิจัยเกี่ยวกับการสำรวจติดตามอย่างเป็นระบบทั่วประเทศ ที่มีการสุ่มตัวอย่างที่จำหน่ายให้กับผู้บริโภคโดยตรงในประเทศไทยที่สามารถใช้อ้างอิงทางวิชาการได้ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคภายในประเทศ และเพื่อส่งเสริมการส่งออก ป้องกันการกีดกันทางการค้าจากประเทศปลายทาง จึงควรมีการติดตามสถานการณ์การตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสาร

ethephon ในผลไม้ไทยที่เป็นพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ ทุเรียน มะม่วง ถั่วลิสง และสับปะรด เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับแจ้งเตือนภัย สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ในฐานะห้องปฏิบัติการอ้างอิงและเป็นหน่วยงานภาครัฐที่มีบทบาทในการหาแนวทาง แนะนำ ป้องกัน มาตรฐานความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารให้เป็นไปตามกฎหมาย จึงได้จัดทำโครงการตรวจเฝ้าระวังสารตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 250 ชนิด และสาร ethephon ในผลไม้เศรษฐกิจของประเทศไทยขึ้น เพื่อสนับสนุนความปลอดภัยและสร้างภาพลักษณ์ที่ดีของการบริโภคผลไม้ไทย และเป็นฐานข้อมูลสำหรับการสร้างระบบการเฝ้าระวังให้เข้มแข็งและยั่งยืนในรูปแบบบูรณาการที่มุ่งเน้นความต้องการของประชาชนเป็นสำคัญ

ปี พ.ศ. 2568 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ร่วมกับ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 4 แห่งในจังหวัดที่มีประชากรจำนวนมาก เป็นศูนย์กลางการคมนาคมและการกระจายสินค้าและเป็นหน่วยงานรับผิดชอบหลักงานด้านการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในอาหาร ได้แก่ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย (ศวก. ที่ 1/1 เชียงราย) ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี (ศวก. ที่ 6 ชลบุรี) ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา (ศวก. ที่ 9 นครราชสีมา) และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา (ศวก. ที่ 12 สงขลา) เพื่อเป็นตัวแทน 5 ภูมิภาคของประเทศ จึงจัดทำโครงการตรวจเฝ้าระวังสารตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 250 ชนิด และสาร ethephon ในผลไม้เศรษฐกิจของประเทศไทย ได้แก่ ทุเรียน มะม่วง ถั่วลิสง และสับปะรด เพื่อให้ทราบสถานการณ์และข้อมูลปริมาณการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสารอื่นที่พบนอกจากนั้นนำข้อมูลมาใช้ในการประเมินสถานการณ์ความปลอดภัยและความเสี่ยงในการบริโภคผลไม้เศรษฐกิจของคนไทย ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการบริหารจัดการ วางแผนเพื่อดำเนินการเชิงนโยบายในการลดอันตรายและลดความเสี่ยงของสารเคมีทางการเกษตรต่อผู้บริโภคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างผลไม้เศรษฐกิจ 4 ชนิด ได้แก่ ทุเรียน มะม่วง แก้ว และสับปะรด จากแหล่งจำหน่าย โดยอาจเป็นร้านค้าย่อยในชุมชน ตลาดสด หรือตลาดนัด ที่มีประชาชนเข้าไปใช้จำนวนมาก ตลาดค้าส่งขนาดใหญ่ที่มีการกระจายตัวของสินค้าในท้องถิ่นนั้นๆ โดยมีแนวทางการเลือกตัวอย่างผลไม้ที่เก็บเป็นการเลือกเก็บตัวอย่างที่มีความหลากหลายทั้งสายพันธุ์และแหล่งที่มา โดยเน้นเป็นพื้นที่ที่เป็นแหล่งผลิตภายในภูมิภาคหรือเป็นผลไม้ที่มีอัตราการบริโภคสูง เช่น ทุเรียนหมอนทอง ร้อยละ 60 ทุเรียนชะนี ร้อยละ 10 และทุเรียนอื่นๆ รวมกัน ร้อยละ 10 เป็นต้น จาก 5 จังหวัด ที่เป็นที่ตั้งของหน่วยงานที่ร่วมโครงการ ได้แก่ กรุงเทพมหานคร เชียงราย ชลบุรี นครราชสีมา และสงขลา ที่เป็นตัวแทนของภูมิภาค กรุงเทพมหานครและปริมณฑล ภาคเหนือ ภาคกลาง

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ตามลำดับ จังหวัดละ 40 ตัวอย่าง (10 ตัวอย่าง/ชนิดผลไม้) จำนวนรวมทั้งหมด 200 ตัวอย่าง โดยขนาดตัวอย่างกำหนดด้วยการใช้สูตรของ Cochran⁽²⁰⁾ เพื่อการสำรวจหาความชุกกรณีไม่ทราบจำนวนประชากร จำนวนประชากรและค่าสัดส่วนของประชากรตัวอย่างที่ต้องการศึกษาคำนวณจากสูตรการหาขนาดตัวอย่าง โดยใช้อัตราการตรวจพบของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในงานบริการช่วงเวลา 3 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2565–2567 ดังแสดงในตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างที่ต้องตรวจวิเคราะห์คำนวณจากสูตรได้ 207 ตัวอย่าง เพื่อให้สะดวกต่อการบริหารจัดการด้านงบประมาณ การขนส่งตัวอย่าง และการรวบรวมผลวิเคราะห์ โดยส่งผลกระทบต่อความเชื่อมั่นน้อยที่สุด จึงกำหนดจำนวนตัวอย่างเป็น 200 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 อัตราการตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ย้อนหลัง 3 ปี (พ.ศ. 2565–2567)

ปี	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ (Sample Analyzed, n)	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ (Sample Detected, n)	อัตราการตรวจพบ (ร้อยละ)
2565	1092	192	17.6
2566	382	64	16.8
2567	1227	177	14.4
รวม	2701	433	16.0

ตัวอย่างที่ตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ในช่วงเวลา 3 ปี คิดเป็นร้อยละ 16.0
การคำนวณตัวอย่างกรณีไม่ทราบจำนวนประชากร ดังสมการ

$$n_0 = \frac{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{E^2} \quad n = 207 \text{ ตัวอย่าง}$$

เมื่อ n_0 = จำนวนตัวอย่างที่ต้องตรวจวิเคราะห์
 Z = คะแนนมาตรฐาน = 1.96 (ค่าคงที่)
 p = สัดส่วนของลักษณะที่สนใจในประชากร
 $= 16.0/100 = 0.16$
 E = ค่าความคลาดเคลื่อนของการประมาณค่า
 $= 0.05$ (ความเชื่อมั่น 95%)

หน่วยงานที่ร่วมโครงการดำเนินการเก็บตัวอย่าง ในช่วงเดือนมกราคม ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2568 และเตรียมตัวอย่างเพื่อส่งตรวจสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 250 สาร และสาร ethephon ณ ห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 4 แห่ง ได้แก่ ศวก. ที่ 1/1 เชียงราย ศวก. ที่ 6 ชลบุรี ศวก. ที่ 9 นครราชสีมา และ ศวก. ที่ 12 สงขลา เป็นผู้ตรวจวิเคราะห์รายการทดสอบ 106 สาร ด้วย GC-MS/MS และส่งให้สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารเป็นผู้ตรวจวิเคราะห์รายการทดสอบ 144 สาร ด้วย LC-MS/MS หรือ LC-QTOF/MS และ

ethephon ดังแสดงในตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ทั้งหมด เป็นผู้รวบรวม ประมวลผล วิเคราะห์ข้อมูล สรุป และจะถูกส่งให้สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร รายงานผล

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างและรายการวิเคราะห์ที่แต่ละหน่วยงานรับผิดชอบ

หน่วยตรวจวิเคราะห์	จำนวนตัวอย่าง (n)		
	106 สาร by GC-MS/MS	144 สาร by LC-MS/MS, LC-QTOF/MS	ethephon
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร	40	200	200
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย	40	-	-
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี	40	-	-
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา	40	-	-
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา	40	-	-

การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

วิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 250 (106+144) ชนิด

วิธีวิเคราะห์ที่ใช้เป็น modified QuEChERS, In-house method based on BS EN 15662:2018⁽²¹⁾ เป็นการวิเคราะห์แบบ multi-residue method โดยซังตัวอย่างผลไม้ที่บดละเอียด 10.0 กรัม ด้วยเครื่องซังไฟฟ้าความละเอียด 0.001 กรัม (LC 620S, Sartorius, Germany) ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม acetonitrile (HPLC, Merck, USA) 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ เป็นเวลา 1 นาที เติมสารผสม QuEChERS Extraction Packet, EN Method Part No: 5982-7650 (Agilent Technologies, USA) แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วยมือ เป็นเวลา 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Multifuge X Pro series, Thermo Fisher, Germany) ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตัวอย่างจะเกิดการแยกชั้น แบ่งสารสกัดส่วนใสด้านบนที่ได้เป็น 2 ส่วน เพื่อ clean up สำหรับตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างด้วยเทคนิค GC-MS/MS และ LC-MS/MS หรือ LC-QTOF/MS โดยสำหรับสารสกัดส่วนที่ 1 ปิเปตสารละลาย 3 มิลลิลิตร มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย dispersive SPE (Agilent Technologies, USA) ที่เหมาะสม จากนั้นหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ

และเวลาเท่าเดิม เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างของแข็งและของเหลว ปิเปตสารละลายด้านบน 2 มิลลิลิตร ระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายผสมระหว่าง n-hexane (PG, Burdick & Jackson, USA) และ ethyl acetate (HPLC, Burdick & Jackson, Korea) สัดส่วน 3 ต่อ 1 เติมสารละลาย D-sorbitol 3% (AR, purity $\geq 98\%$) (Loba, india) ปริมาณ 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณด้วยเครื่องมือ GC-MS/MS: Agilent Technology 7890B, TQ7000C Triple Quadrupole MS/MS (Agilent Technology, USA) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค matrix-matched calibration curve สำหรับสารสกัดส่วนที่ 2 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS หรือ LC-QTOF/MS ปิเปตสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร ใส่ใน dispersive SPE (Agilent Technologies, USA) เขย่าเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม ปิเปตสารละลายส่วนใสลงใน micro-spin filters P/N:0256-0101 (Vertical, Thailand) 0.2 μm ชนิด nylon จากนั้นหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บสารละลายส่วนใส นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างด้วยเทคนิค LC-MS/MS: Agilent Technology 1260 Series (Agilent Technology, USA) หรือ LC-QTOF/MS: Agilent

Technology 1290 Infinity II-G6546A (Agilent Technology, USA) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค procedural calibration curve โดยมี LOD = 0.005 mg/kg และ LOQ = 0.01 mg/kg

สารที่วิเคราะห์โดยเครื่อง 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, 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, ethoprophos, etrimfos, fenchlorphos, fenitrothion, fenpropathrin, fenthion, fenvalerate, fipronil, folpet, fosthiazate, heptachlor, heptachlor epoxide-cis, heptachlor epoxide-trans, heptenophos, hexachlorobenzene, isofenphos, isoxathion, λ -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,

tolyfluanid, triadimefon, triazophos และ trifluralin

สารที่วิเคราะห์โดยเครื่อง LC-MS/MS 144 ชนิด ได้แก่ abamectin, acetamiprid, acibenzolar-S-methyl, aldicarb, aldicarb-sulfone, aldicarb-sulfoxide, ametocetradin, aminocarb, anilazine, atrazine, azamethiphos, azoxystrobin, bendiocarb, bentazone, bioresmethrin, bixafen, boscalid, bromacil, bupirimate, carbaryl, carbendazim, carbetamide, carbofuran, carbofuran-3-hydroxy, carbofuran-3-keto, carbosulfan, carboxin, chlorbromuron, chloridazon, chlorotoluron, chloroxuron, clethodim, clothianidin, cyanazine, cycluron, cyflumetofen, cyproconazole, demeton-S-methyl sulfone, demeton-S-Methyl sulfoxid, diethofencarb, dimefox, dimethachlor, dimethomorph, diphenamid, diuron, epoxiconazole, ethiofencarb, ethiofencarb-sulfone, ethiofencarb-sulfoxide, ethirimol, ethofumesate, etofenprox, etoxazole, famoxadone, fenamidone, fenamiphos, fenarimol, fenbuconazole, fenhexamid, fenobucarb, fenothiocarb, fenoxycarb, fenpropidin, fensulfothion, fenthion-Sulfoxide, flubendiamide, fludioxonil, flufenacet, flufenoxuron, fluometuron, fluopyram, fluquinconazole, fluridone, flurtamone, flusilazole, hexazinone, hexythiazox, imazalil, imidacloprid, indoxacarb, iprovalicarb, isoprocarb, isoproturon, linuron, lufenuron, malaoxon, mepanipyrim, metaflumizone, metalaxyl, methiocarb, methomyl, methoxyfenozide, metobromuron, metolachlor, metrafenone, monocrotophos, monolinuron, novaluron, omethoate, oxamyl, penconazole, phenthoate, pirimicarb, promecarb, prometon, prometryn, propiconazole, propoxur, propyzamide, prosulfocarb, prothoate, pyraclostrobin,

pyridaben, pyrifenoxy, pyrimethanil, rotenone, sedaxane, simazine, spinetoram, spinozad, spiroxamine, tebuconazole, tebufenozide, tebufenpyrad, terbufenmeton, terbuthylazine, tetraconazole, thiabendazole, thiacloprid, thiamethoxam, thiobencarb, thiodicarb, thiofanox, thiofanox-sulfone, thiofanox-sulfoxide, thiophanate-methyl, tolclofos-methyl, triadimenol, tri-Allate, tricyclazole, trifloxystrobin, triflumizole, triticonazole และ vamidothion

วิธีวิเคราะห์สาร ethephon

วิธีวิเคราะห์ใช้วิธี In-house method based on J. Integr. Agric. 2015;14(1):106-113.⁽²²⁾ เป็นวิธีที่มีการเปลี่ยนรูปทางเคมี (derivatization) ภายใต้สภาวะที่เป็นเบส เพื่อปลดปล่อยแก๊ส ethylene และถูกตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-MS headspace: TRACE 1610 - ISQ 7610 Single Quadrupole พร้อมระบบฉีดตัวอย่างอัตโนมัติแบบ headspace TriPlu RSH (Thermo Scientific, USA) โดยชั่งตัวอย่างผลไม้ที่บดละเอียดแล้ว 5.0 ± 0.1 g ใส่ใน headspace vial ขนาด 20 ml ปิดด้วยฝายาง (หากยังไม่ได้วิเคราะห์ทันที หลังจากได้รับตัวอย่าง ให้เก็บรักษาตัวอย่างในห้องแช่แข็งที่อุณหภูมิ $\leq -15^{\circ}\text{C}$) เติม MeOH (HPLC, Honeywell Burdick & Jackson, USA) 3.0 mL และ saturated NaOH solution (Analysis grade, Supelco Sigma-Aldrich, Merck, Germany) 2.0 mL ลงในขวดตัวอย่างแล้วปิดขวดด้วย aluminum crimp seal ทันที (ทำในขณะสารละลายมีอุณหภูมิเย็น) ปั่นผสมด้วยเครื่องหมุนปั่นผสมสารละลายแบบ Vortex (Vortex-2 Genie, Scientific Industries, USA) เป็นเวลา 1 นาที เขย่าในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) WBU22 (Mettler, Germany) ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไป sonicate เพื่อขจัดแก๊สเป็นเวลา 2 นาที ทำการฉีดตัวอย่างด้วยเครื่อง GC-MS: Thermo Scientific Trace 1610 ISQ 7610 (Thermo Scientific, USA) โดยใช้เทคนิค headspace โดยมี LOD = 0.1 mg/kg และ LOQ = 0.3 mg/kg

การประเมินการได้รับสัมผัสและการประเมินความเสี่ยง (exposure and risk assessment)

การประเมินการได้รับสัมผัสสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากผลไม้เศรษฐกิจของคนไทย⁽²³⁾ คำนวณโดยนำปริมาณสารพิษที่พบผลไม้เศรษฐกิจแต่ละชนิด (หน่วย mg/kg) แต่เนื่องจากการตรวจพบสารจำนวนมาก จึงเลือกสารพิษตกค้าง 8 อันดับแรก ที่มีการตรวจพบบ่อยที่สุด โดยนำค่ามัธยฐานของปริมาณที่ตรวจพบทั้งหมดคูณด้วยน้ำหนักผลไม้เศรษฐกิจที่คนไทยบริโภคใน 1 วัน (หน่วย g หรือ kg) มาคำนวณปริมาณสารพิษที่บริโภคจะได้ปริมาณสารพิษที่คนไทยได้รับใน 1 วัน (หน่วย mg/person/day) แล้วหารด้วยน้ำหนักเฉลี่ยของคนไทยอายุ 3 ปีขึ้นไปรวมเพศ (เท่ากับ 57.57 kg) จะได้ปริมาณสารพิษที่คนไทยได้รับจากอาหาร (หน่วย mg/kg bw/day) จากนั้นประเมินความปลอดภัยหรือความเสี่ยงของการได้รับสัมผัสสารพิษ จากการเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงขององค์การอนามัยโลก คือ ปริมาณที่บริโภคได้ต่อวัน (Acceptable Daily Intake: ADI) หรือปริมาณสารที่บริโภคทุกวันตลอดชีวิตแล้วไม่พบความเสี่ยงที่มีผลกระทบและเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังสมการ

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

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

หน่วยงานทั้ง 5 ที่รับผิดชอบในแผนบูรณาการระหว่างหน่วยงาน ดำเนินการเก็บตัวอย่าง เตรียมตัวอย่าง และตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลไม้เศรษฐกิจ จำนวน 200 ตัวอย่าง จาก 5 ภูมิภาคทั่วประเทศไทย โดยตรวจวิเคราะห์

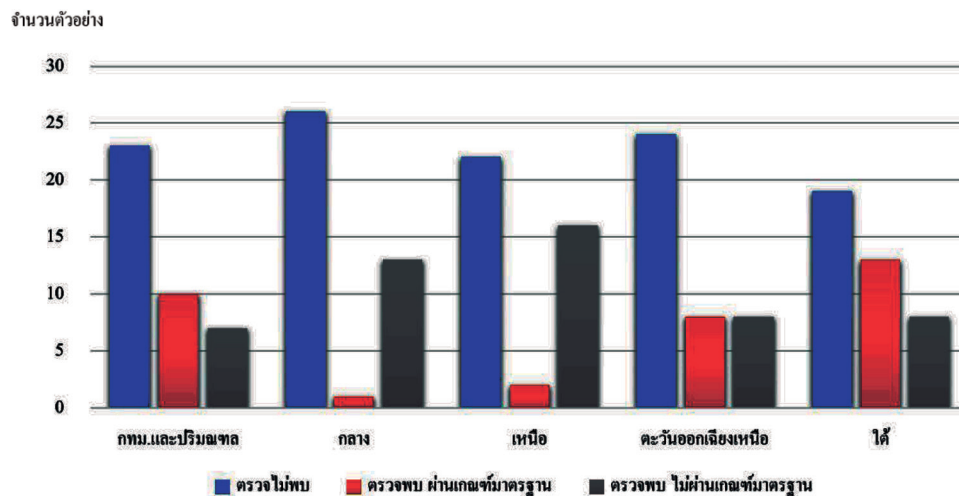
ตัวอย่างมีแหล่งผลิตภายในภูมิภาคนั้น ๆ แต่ในบางจังหวัด
ที่ไม่ได้เป็นแหล่งผลิตจะได้ผลไม้ที่เก็บตามสัดส่วนของ
อัตราการบริโภคของแต่ละสายพันธุ์ จำนวนตัวอย่างที่เก็บ
ของแต่ละภูมิภาคและจังหวัดที่เก็บ และจำนวนตัวอย่างที่
ตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 3

ภูมิภาค/จังหวัด	ผลไม้	จำนวนตัวอย่าง ที่เก็บ/ที่พบ	พบ/ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน	
			จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละ
กรุงเทพมหานครและปริมณฑล	ทุเรียน	10/9	5	50.0
	มะม่วง	10/6	0	0
	กล้วย	10/2	2	20.0
	สับปะรด	10/0	0	0
	รวม	40/17	7	17.5
กลาง/ชลบุรี	ทุเรียน	10/9	8	80.0
	มะม่วง	10/0	0	0
	กล้วย	10/5	5	50.0
	สับปะรด	10/0	0	0
	รวม	40/14	13	32.5
เหนือ/เชียงราย	ทุเรียน	10/10	10	100.0
	มะม่วง	10/2	1	10.0
	กล้วย	10/5	5	50.0
	สับปะรด	10/1	0	0
	รวม	40/18	16	40.0
ตะวันออกเฉียงเหนือ/นครราชสีมา	ทุเรียน	10/10	7	70.0
	มะม่วง	10/2	0	0
	กล้วย	10/0	0	0
	สับปะรด	10/4	1	10.0
	รวม	40/16	8	20.0
ใต้/สงขลา	ทุเรียน	10/9	1	10.0
	มะม่วง	10/5	0	0
	กล้วย	10/7	7	70.0
	สับปะรด	10/0	0	0
	รวม	40/21	8	20.0
รวมทั้งสิ้น		200/86	52	26.0

21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 52.5) รวมมีตัวอย่างที่ตรวจพบ
ทั้งสิ้น 86 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 43.0 เป็นตัวอย่างที่
ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 17.5),
13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 32.5), 16 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40.0),
8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20.0) และ 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20.0)

ตามลำดับ ข้อมูลจำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ ตัวอย่างที่ตรวจพบผ่านเกณฑ์มาตรฐาน และตัวอย่างที่ตรวจพบไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าอัตรา การตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐานเรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

และกรุงเทพฯ และปริมณฑล ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อรวม ตัวอย่างทุกชนิดจากทุกภูมิภาค จำนวน 200 ตัวอย่าง ตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐานทั้งสิ้น 52 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 26.0



ภาพที่ 1 สถานการณ์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผลไม้เศรษฐกิจแยกภูมิภาค

สถานการณ์การตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในภาพรวมของประเทศ พบว่าผลการตรวจวิเคราะห์ผลไม้เศรษฐกิจทั้ง 4 ชนิด จำนวน 200 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบการตกค้าง จำนวน 114 ตัวอย่าง (ร้อยละ 57.0) ตรวจพบการตกค้าง จำนวน 86 ตัวอย่าง (ร้อยละ 43.0) โดยเป็นตัวอย่างไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน จำนวน 52 ตัวอย่าง (ร้อยละ 26.0) เมื่อจำแนกตามชนิดตัวอย่างที่ตรวจพบการตกค้าง ตรวจพบการตกค้างในทุเรียน

จำนวน 47 ตัวอย่าง (ร้อยละ 94.0) มะม่วง จำนวน 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30.0) กล้วย จำนวน 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 38.0) และสับปะรด จำนวน 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10.0) ตามลำดับ จำนวนชนิดสารที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานในทุเรียน มะม่วง กล้วย และสับปะรด เป็น 20, 1, 3 และ 1 ชนิด ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 และจำนวนผลไม้ที่มีสารตกค้างมากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 2

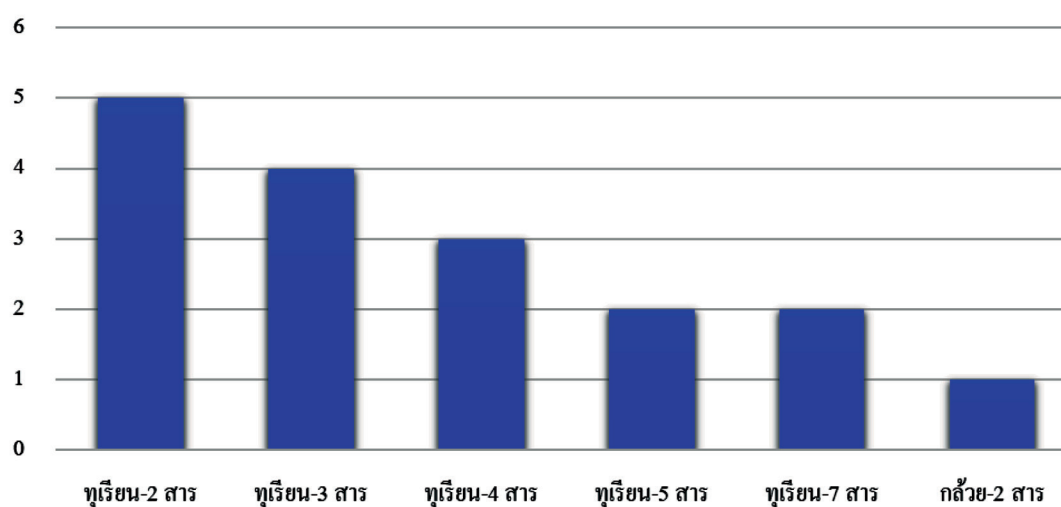
ตารางที่ 4 การตกค้างสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผลไม้เศรษฐกิจ

ชนิดตัวอย่าง	สารที่ตรวจพบ (n, ไม่ผ่าน)	จำนวน (ตัวอย่าง)	ตรวจไม่พบ (ตัวอย่าง)	พบ (ตัวอย่าง)	
				ผ่าน	ไม่ผ่าน
ทุเรียน	dimethomorph (10) carbendazim (9) ethephon (7) omethoate (6) azoxystrobin (5) prothiofos (5) thiamethoxam (5) chlorfenapyr (4) propiconazole (4)	50	3	16	31

ตารางที่ 4 การตกค้างสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผลไม้เศรษฐกิจ (ต่อ)

ชนิดตัวอย่าง	สารที่ตรวจพบ (n, ไม่ผ่าน)	จำนวน (ตัวอย่าง)	ตรวจไม่พบ (ตัวอย่าง)	พบ (ตัวอย่าง)	
				ผ่าน	ไม่ผ่าน
	pyraclostrobin (4) imidacloprid (2) lufenuron (2) tebuconazole (2) triazophos (2) anilazine (1) bifenthrin (1) buprofezin (1) fipronil (1) methomyl (1) trifloxystobin (1)				
มะม่วง	clothianidin (1)	50	35	14	1
กล้วย	ethephon (18) carbendazim (1) propargite (1)	50	31	0	19
สับปะรด	ethephon (1)	50	45	4	1
รวมตัวอย่าง (ร้อยละ)		200 (100)	114 (57)	34 (17)	52 (26)

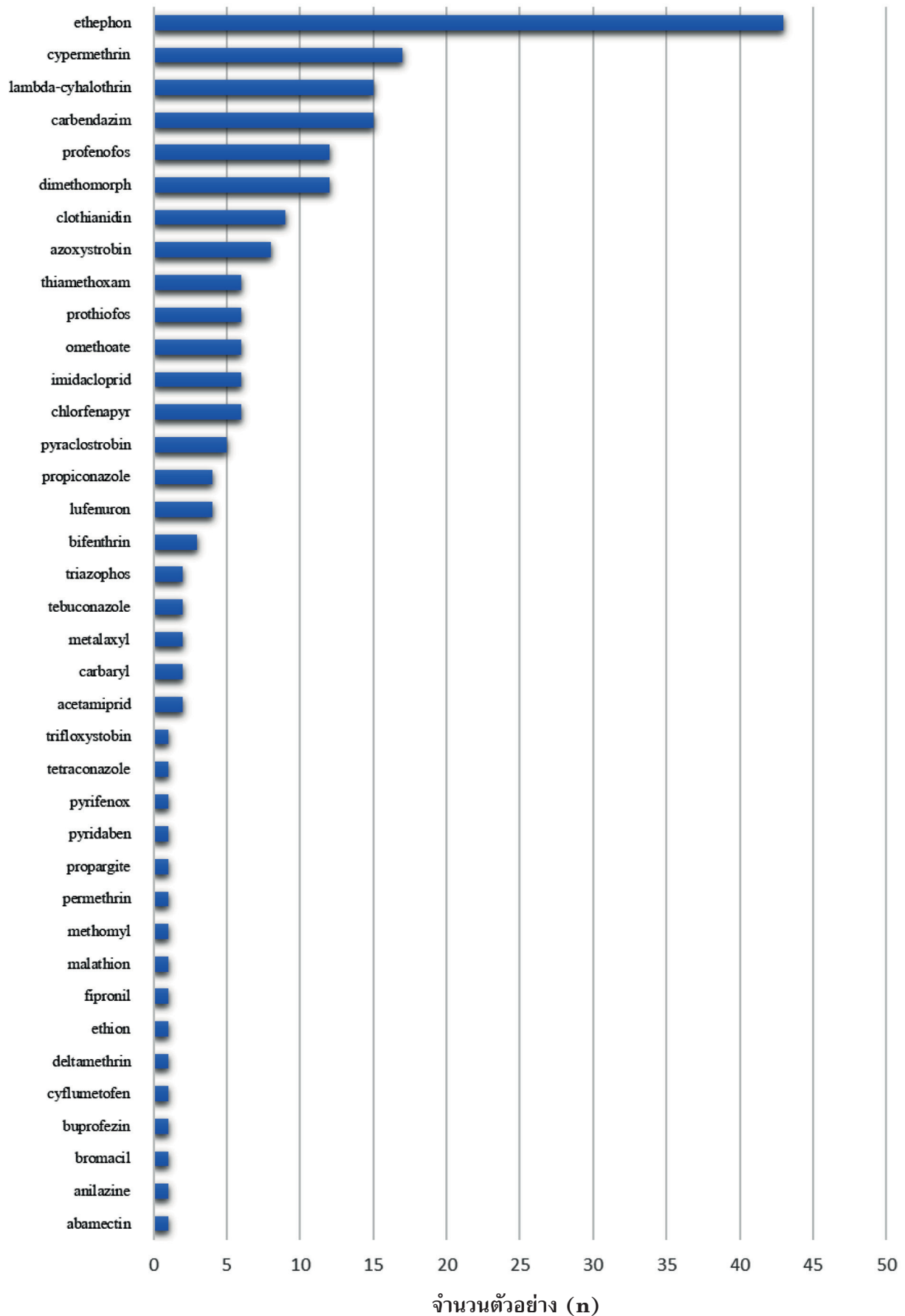
จำนวนตัวอย่าง (n)



ภาพที่ 2 จำนวนผลไม้ที่มีสารตกค้างมากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป และไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน

ชนิดของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างที่ตรวจพบในผลไม้เศรษฐกิจ ในขอบข่ายสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตรวจวิเคราะห์ 250 ชนิด และสาร ethephon ตัวอย่างผลไม้ จำนวน 200 ตัวอย่าง ตรวจพบการตกค้าง จำนวน 86 ตัวอย่าง จำนวนสารที่ตรวจพบ

ทั้งสิ้น 38 ชนิด โดยชนิดสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง และจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบในผลไม้ ดังแสดงในภาพที่ 3 สำหรับข้อมูลอัตราการตรวจพบสูง 8 อันดับแรก และข้อมูลเชิงสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 5



ภาพที่ 3 ชนิดและจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผลไม้เศรษฐกิจ

ตารางที่ 5 ชนิดและช่วงของปริมาณสารที่ตรวจพบของสารที่มีอัตราการตรวจพบสูงสุด 8 อันดับแรก

ชนิดสาร ที่ตรวจพบ	จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละ	Min-Max (mg/kg)	Median (mg/kg)	Mean (mg/kg)
ethephon	43	21.5	< 0.30–73.18	1.25	5.98
cypermethrin	17	8.5	< 0.01–0.93	0.10	0.18
carbendazim	15	7.5	0.01–3.92	0.34	0.79
λ -cyhalothrin	15	7.5	< 0.01–0.16	0.02	0.04
dimethomorph	12	6.0	< 0.01–1.06	0.12	0.21
profenofos	12	6.0	0.01–0.30	0.07	0.11
clothianidin	9	4.5	< 0.01–0.05	0.01	0.02
azoxystrobin	8	4.0	< 0.01–0.37	0.04	0.09

หมายเหตุ: 1) รายการ 250 สาร มี LOD = 0.005 mg/kg, LOQ = 0.01 mg/kg

2) สาร ethephon มี LOD = 0.1 mg/kg, LOQ = 0.3 mg/kg

สำหรับการตรวจวิเคราะห์สาร ethephon ในผลไม้เศรษฐกิจ ตรวจพบสาร ethephon ในผลไม้ทั้ง 4 ชนิด จำนวน 43 ตัวอย่าง ปริมาณน้อยกว่า 0.30 ถึง 73.18 mg/kg คิดเป็นร้อยละ 21.5 ตกค้างในทุเรียน มะม่วง กล้วย และ สับปะรด คิดเป็นร้อยละ 9.5, 1.5, 9.0 และ 1.5 ตามลำดับ เป็นตัวอย่างที่ตรวจพบปริมาณมากกว่า 1, 2, 0.5 และ 1.5 mg/kg ซึ่งเป็นค่ามาตรฐาน (MRLs) ของสาร ethephon ในทุเรียน มะม่วง กล้วย และสับปะรด ตามลำดับ จำนวน 26 ตัวอย่าง (ร้อยละ 13.0)

การประเมินการได้รับสัมผัสสารพิษตกค้างและการประเมินว่าคนไทยมีความเสี่ยงจากการบริโภคผลไม้หรือไม่ ใช้ข้อมูลจากการบริโภคอาหารของประเทศไทย พ.ศ. 2559 ของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ⁽⁴⁾ ซึ่งเป็นฉบับล่าสุด โดยนำข้อมูลการสำรวจปริมาณการบริโภคผลไม้แต่ละชนิดที่ค่าเฉลี่ยและค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 97.5 ของปริมาณผลไม้ที่บริโภคสำหรับประชากรทั้งหมด (per capita) อายุ 3 ปีขึ้นไป นำค่ามัธยฐานของปริมาณความเข้มข้นที่พบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผลไม้ชนิดนั้นๆ ที่พบในอัตราที่สูงที่สุด 8 อันดับแรก หน่วยเป็น mg/kg คูณกับปริมาณการบริโภคของผลไม้ ทั้งนี้ปริมาณการบริโภคมะม่วงจะใช้มะม่วงสุกเนื่องจากเก็บตัวอย่างมะม่วงรับประทานสุก สำหรับกล้วยใช้ผลรวมของกล้วยน้ำว้า (130.28 กรัม) กล้วยหอม (77.14 กรัม) กล้วยเล็บมือนาง (16.58 กรัม) และกล้วยไข่ (41.43 กรัม) หน่วยเป็น g หรือ kg หารด้วยน้ำหนักตัวเฉลี่ยของคนไทยอายุ 3 ปีขึ้นไปรวมเพศ (57.57 kg)

ได้ปริมาณที่ได้รับต่อวัน หน่วยเป็น g/person/day แล้วนำมาเปรียบเทียบกับค่า ADI อ้างอิง โดยค่า ADI คือ ปริมาณที่บริโภคได้ต่อวัน (Acceptable Daily Intake) เป็นปริมาณสารที่บริโภคทุกวันตลอดชีวิตแล้วไม่พบความเสี่ยงที่มีผลกระทบและเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยคำนวณค่า CDI (Chronic daily intake) คิดเป็นร้อยละ หากค่า CDI ที่คำนวณได้จากการบริโภคสารพิษมีค่ามากกว่าร้อยละ 100 แสดงว่าผู้บริโภคมีความเสี่ยงที่จะได้รับอันตรายจากสารพิษนั้น

สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่คนไทยได้รับการศึกษา 8 อันดับแรก เมื่อคำนวณปริมาณที่ได้รับต่อคนต่อวัน แล้วนำมาเปรียบเทียบกับค่า ADI ที่องค์การอนามัยโลกกำหนด พบว่าคนไทยได้รับ ethephon และ carbendazim สูงที่สุด โดยได้รับจากผลไม้ทั้ง 4 ชนิด รวมเท่ากับ 0.014527 และ 0.004410 mg/kg bw/day ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 29.1 และ 14.7 ของค่า ADI ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าสารที่ตรวจพบบ้อยทั้ง 8 ชนิด มีค่าความเป็นพิษไม่สูงมาก โดยมีค่า ADI ระหว่าง 0.02–0.2 mg/kg bw/day ล้วนแล้วแต่เป็นสารที่อนุญาตให้ใช้ในผลไม้เหล่านี้ได้ และค่ามัธยฐานของสารที่ตรวจพบอยู่ในระดับต่ำ เมื่อคำนวณปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตรวจพบในอัตราสูงสุด 8 อันดับแรก ที่คนไทยได้รับจากการบริโภคผลไม้ พบว่าคนไทยได้รับสารพิษทุกชนิดน้อยกว่าค่า ADI ของ WHO รายละเอียด ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่คนไทยได้รับจากผลไม้เศรษฐกิจ

สาร	Median (mg/kg)	ผลไม้	ปริมาณบริโภค (g/person/day)	mg/kg bw/day			CDI (%)	Reference
				ปริมาณที่ได้รับ	รวม	ADI		
ethephon	1.12	ทุเรียน	103.99	0.002023	0.014527	0-0.05	4.05	JMPR 2015
		มะม่วง	255.00	0.004961			9.92	
		กล้วย	265.43	0.005164			10.33	
		สับปะรด	122.28	0.002379			4.76	
cypermethrin	0.10	ทุเรียน	103.99	0.000181	0.001297	0-0.02	0.90	JMPR 2006
		มะม่วง	255.00	0.000443			2.21	
		กล้วย	265.43	0.000461			2.31	
		สับปะรด	122.28	0.000212			1.06	
carbendazim	0.34	ทุเรียน	103.99	0.000614	0.004410	0.03	2.05	JMPR 1995
		มะม่วง	255.00	0.001506			5.02	
		กล้วย	265.43	0.001568			5.23	
		สับปะรด	122.28	0.000722			2.41	
λ-cyhalothrin	0.02	ทุเรียน	103.99	0.000036	0.000259	0-0.02	0.18	JMPR 2007
		มะม่วง	255.00	0.000089			0.44	
		กล้วย	265.43	0.000092			0.46	
		สับปะรด	122.28	0.000042			0.21	
dimethomorph	0.12	ทุเรียน	103.99	0.000217	0.001556	0-0.2	0.11	JMPR 2007
		มะม่วง	255.00	0.000532			0.27	
		กล้วย	265.43	0.000553			0.28	
		สับปะรด	122.28	0.000255			0.13	
profenofos	0.07	ทุเรียน	103.99	0.000126	0.000908	0-0.03	0.42	JMPR 2007
		มะม่วง	255.00	0.000310			1.03	
		กล้วย	265.43	0.000323			1.08	
		สับปะรด	122.28	0.000149			0.50	
clothianidin	0.01	ทุเรียน	103.99	0.000018	0.000130	0-0.1	0.02	JMPR 2010
		มะม่วง	255.00	0.000044			0.04	
		กล้วย	265.43	0.000046			0.05	
		สับปะรด	122.28	0.000021			0.02	
azoxystrobin	0.04	ทุเรียน	103.99	0.000072	0.000519	0-0.2	0.04	JMPR 2008
		มะม่วง	255.00	0.000177			0.09	
		กล้วย	265.43	0.000184			0.09	
		สับปะรด	122.28	0.000085			0.04	

หมายเหตุ: 1) FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Residues ที่มาของค่า ADI, CDI = Chronic daily intake (%)
 2) ปริมาณการบริโภคมะม่วงใช้มะม่วงสุก กล้วยใช้ผลรวมของกล้วยน้ำว้า (130.28 กรัม) กล้วยหอม (77.14 กรัม) กล้วยเล็บมือนาง (16.58 กรัม) และ กล้วยไข่ (41.43 กรัม)

วิจารณ์

มาตรฐานสารพิษตกค้างในประเทศไทยต้องเป็นตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 โดยมีข้อกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 460) พ.ศ. 2568 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง⁽¹⁴⁾ ระบุไว้ว่าอันตรายจากการเกษตร ตรวจพบปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด Maximum Residue Limit (MRL) ได้ไม่เกินที่กำหนดไว้ในบัญชีหมายเลข 2 หรือที่ไม่เกินข้อกำหนดของคณะกรรมการอาหารของโครงการมาตรฐานอาหาร เอฟ เอ โอ/ดับบลิว เอช โอ (Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme) หรือพบได้ไม่เกินข้อกำหนดของอาเซียน (ASEAN MRLs) กรณีพบสารที่นอกเหนือจากบัญชีดังกล่าว มีการกำหนดค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit) สำหรับพืชและสัตว์ตรวจพบได้ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมสารพิษตกค้างต่อกิโลกรัมอาหาร เว้นแต่ค่าดีฟอลต์ลิมิตสำหรับพืชที่กำหนดไว้ในบัญชีหมายเลข 3 แนบท้ายประกาศ นอกจากนี้ต้องตรวจไม่พบสารที่เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตรชนิดที่ 4 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 และที่แก้ไขเพิ่มเติม ตามบัญชีหมายเลข 1 สถานการณ์การตรวจพบสารตกค้างในผลไม้ ได้แก่ ทุเรียน มะม่วง ถั่วลิสง และสับปะรด ในปี พ.ศ. 2568 ที่ไม่ผ่านมาตรฐานส่วนใหญ่เนื่องจากสาเหตุการตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างเกินค่า default limit ที่กำหนดไว้ต่ำมากที่สุดที่ 0.01 mg/kg แม้ว่าประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง ฉบับที่ 460 จะเป็นการแก้ไขปรับปรุงประกาศฉบับเดิม (ฉบับที่ 387) ให้ครอบคลุมชนิดสารในอาหารที่หลากหลายมากขึ้น วัตถุประสงค์เพื่อให้การพบสารที่มีค่าเกิน default limit แต่เมื่อนำมาคำนวณเปรียบเทียบกับค่าความปลอดภัยแล้วยังไม่เป็นอันตรายจะทำให้ตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามมาตรฐานมีจำนวนน้อยลง อย่างไรก็ตามยังคงมีสารจำนวนหนึ่งที่ตรวจพบเกินค่ามาตรฐาน สารเหล่านี้เป็นสารที่อนุญาตให้ใช้ในประเทศไทยกับผักและผลไม้บางชนิดแต่ยังไม่มีการประเมินความปลอดภัยกับผักและผลไม้หลายชนิด จึงยังไม่สามารถกำหนดค่า MRL ได้อย่างครบถ้วน นอกจากนี้เพื่อให้มาตรฐานทางกฎหมายสามารถนำมา

ประยุกต์ใช้ได้อย่างครอบคลุมได้มีการกำหนดค่า MRL โดยการพิจารณามาตรฐานสากลเพิ่มเติม ได้แก่ Codex และ ASEAN แล้วนำมากำหนดเป็นมาตรฐานของประเทศไทยควบคู่กันไปด้วย

สำหรับการประเมินความเสี่ยง พบว่าคนไทยมีโอกาสได้รับสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 38 ชนิด เมื่อประเมินโดยการเปรียบเทียบสารที่มีอัตราการตรวจพบสูงสุด 8 อันดับแรก คำนวณโดยใช้ค่ามัธยฐานของปริมาณการตรวจพบกับอัตราการบริโภคของผลไม้แต่ละชนิดกับค่าความปลอดภัย (ADI) พบว่าปริมาณที่ได้รับต่ำกว่าร้อยละ 10.33 ของ ADI ซึ่งเป็นความเสี่ยงจากการได้รับสาร ethephon จากกล้วย ผลการประเมินความเสี่ยงบ่งชี้ว่าคนไทยยังคงปลอดภัยจากการได้รับสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในผลไม้เศรษฐกิจ โดยไม่มีสารใดที่คนไทยได้รับจากการบริโภคเกินเกณฑ์มาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าในการผลิตอาหารประเภทผลไม้ที่เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยซึ่งเป็นต้นน้ำของอาหารนั้น ได้รับการกำกับดูแลควบคุมให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปลอดภัย ผลไม้เศรษฐกิจทั้ง 4 ชนิดที่มีการผลิตด้วยระบบเกษตรกรรมเชิงพาณิชย์ เป็นผลไม้ที่มีอัตราการบริโภคสูงและมีการส่งออกไปยังต่างประเทศจำนวนมาก เป็นสินค้าที่มีการผลิตได้คุณภาพตรงตามมาตรฐาน ผลวิเคราะห์จากโครงการนี้สอดคล้องกับโครงการสำรวจติดตามสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้จาก 77 จังหวัดของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2565⁽²⁴⁾ ซึ่งเป็นการสำรวจผัก 26 ชนิด และผลไม้ 20 ชนิด เป็นกล้วย มะม่วง และสับปะรด จำนวน 5, 3 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยไม่มีตัวอย่างทุเรียน ผลพบสาร pirimiphos-methyl ปริมาณน้อยกว่า 0.02 mg/kg ในตัวอย่างมะม่วงเพียงตัวอย่างเดียว แม้จะเป็นตัวอย่างผิดมาตรฐานแต่ยังคงปลอดภัยต่อการบริโภค นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างในโครงการนี้เก็บเพียง 1 จังหวัด เพื่อเป็นตัวแทนของภูมิภาค ในขณะที่โครงการของ ปี พ.ศ. 2565 เก็บครบทั้ง 77 จังหวัดของประเทศไทยผลที่ได้อาจสะท้อนภาพรวมของประเทศได้เพียงระดับหนึ่ง จำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ในแต่ละภูมิภาคจัดทำโครงการลักษณะเดียวกันในเขตพื้นที่

ของตนเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมตัวอย่างได้ดีขึ้น แม้การประเมินความเสี่ยงที่นำเสนอในงานวิจัยนี้จะบ่งชี้ว่าคนไทยมีความเสี่ยงต่ำจากการบริโภคผลไม้ทั้ง 4 ชนิด แต่ควรมีการประเมินความเสี่ยงเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากขึ้น เช่น การขยายขอบข่ายไปยังผักและผลไม้ชนิดอื่นๆ ที่คนไทยบริโภคในปริมาณสูง การประเมินความเสี่ยงแบบ Cumulative Risk Assessment โดยนำตัวอย่างที่มีการตกค้างของสารหลายชนิดมาคำนวณให้ได้ความเสี่ยงต่อการบริโภค 1 ครั้ง เป็นต้น และยังสามารถประเมินความเสี่ยงโดยใช้กลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยงสูง เช่น เด็กที่มีน้ำหนักตัวน้อยหรือกลุ่มคนชราที่มีความเสี่ยงด้านสุขภาพสูงกว่าประชากรทั่วไป เป็นต้น

มะม่วงและสับปะรดเป็นตัวอย่างที่ตรวจพบการตกค้างเกินเกณฑ์มาตรฐานน้อยมากเพียงชนิดละ 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.0) โดยมะม่วงพบ clothianidin 0.05 mg/kg (MRL 0.04 mg/kg) และสับปะรดพบ ethephon 2.53 mg/kg (MRL 1.5 mg/kg) ขณะที่ตัวอย่างทุเรียนและกล้วย พบการตกค้างที่ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานสูงถึงร้อยละ 62.0 และ 38.0 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาชนิดสารที่พบเกินเกณฑ์มาตรฐาน พบว่าทุเรียนพบสารตกค้างที่มีปริมาณสูงกว่าค่ามาตรฐานหลากหลายชนิด ทั้งสารกำจัดแมลง สารกำจัดโรคพืช สารป้องกันเชื้อรา และสารเร่งสุก บ่งชี้ว่าเกษตรกรใช้สารหลายชนิดในลักษณะของ cocktail ในหลายขั้นตอน เช่น การเพาะปลูก หลังการเก็บเกี่ยว และก่อนออกจำหน่าย โดยยังไม่มีมีการกำกับดูแลที่ดีพอ แต่กล้วยพบสารที่เกินเกณฑ์มาตรฐานส่วนใหญ่เป็น ethephon ซึ่งอาจมาจากการบ่มเร่งสุก ส่วนสารชนิดอื่นๆ พบน้อยมาก ทั้งนี้ผลไม้ทุกตัวอย่างตรวจไม่พบ chlorpyrifos ซึ่งเป็นสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ยกเลิกการใช้ในการเกษตรตามนโยบายกระทรวงสาธารณสุข ส่วนสาร methomyl ที่ถูกยกเลิกการใช้งาน เมื่อ พ.ศ. 2558 โดยมีเงื่อนไขอนุญาตให้ใช้เฉพาะในบ้านเรือนเท่านั้น ยังคงถูกตรวจพบในทุเรียนที่ระดับต่ำที่ 0.02 mg/kg นอกจากนี้พบสาร omethoate ซึ่งเป็นสารตกค้างที่เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจากสาร 2 ชนิด คือ dimethoate และ omethoate สาร

ที่ตรวจพบในครั้งนี้นับส่วนใหญ่เป็นสารที่อยู่ในขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำและมีค่า MRL สูง สามารถละลายน้ำได้ดี และส่วนมากตรวจพบที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ในการสำรวจปริมาณการตกค้างของสาร ethephon ในครั้งนี้ พบมากในทุเรียนและกล้วย ซึ่งอาจมีการใช้งานเพื่อเร่งให้ผลไม้สุกตามความต้องการ แต่พบน้อยมากในมะม่วงและสับปะรด โดยวิธีวิเคราะห์ใช้เทคนิคการตรวจวัดแก๊ส ethylene ที่เป็นอนุพันธ์ของ ethephon ปริมาณที่ตรวจพบอาจเป็นผลรวมของสาร ethylene ที่เกิดจาก ethephon ที่ใช้ และสาร ethylene ที่เกิดจากผลไม้ เนื่องจากทุเรียน มะม่วง และกล้วย เป็น climacteric fruit ที่สามารถปลดปล่อยสาร ethylene ได้ตามธรรมชาติเมื่อสุก อย่างไรก็ตามได้ทำการศึกษาปริมาณสาร ethylene ตามธรรมชาติของทุเรียนและกล้วย พบ baseline ไม่เกิน 0.1 mg/kg ซึ่งต่ำกว่าค่า LOD ของวิธี

เมื่อพิจารณาสารตกค้างที่พบในแต่ละภูมิภาคพบว่าทั้งชนิดสารตกค้างที่พบในผลไม้แต่ละชนิดและความสอดคล้องกับมาตรฐาน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างภูมิภาค ผลวิเคราะห์สอดคล้องกันทั้ง 5 ภูมิภาค ดังนั้นสามารถบริหารจัดการความเสี่ยงและการลดสารตกค้างได้พร้อมกันโดยใช้มาตรการเดียวกันทั่วประเทศ อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างผลไม้ให้ผลผลิตตามฤดูกาลทำให้ช่วงเวลาที่สามารถเก็บตัวอย่างได้มีระยะเวลาที่จำกัด โดยเฉพาะทุเรียนและมะม่วงในจังหวัดที่อยู่ในเขตภาคใต้มีผลผลิตทุเรียนที่ล่าช้ากว่าภาคอื่นๆ จึงเก็บตัวอย่างได้ช้ากว่าและทำให้ได้ผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการช้าตามไปด้วย การเก็บผลไม้นอกฤดูกาลที่ต้องมีการใช้สารเคมีทางการเกษตรในปริมาณมากกว่าปกติ อาจทำให้ตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในปริมาณสูงและอาจไม่สะท้อนปริมาณที่ตกค้างที่แท้จริง ทำให้ผลการสำรวจอาจมีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ สิ่งหนึ่งที่มีความสำคัญในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง คือ ต้องมีการทำความเข้าใจกับห้องปฏิบัติการเครือข่ายเกี่ยวกับวิธีการเตรียมตัวอย่างที่มีความจำเพาะ เนื่องจากตามภาคผนวก ค ท้ายมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9045-1-2568 การจัดหมวดหมู่สินค้าเกษตร เล่ม 1: พืช⁽²⁵⁾ ระบุส่วนของสินค้าเกษตรที่จะตรวจ

วิเคราะห์ กำหนดให้ทุเรียน มะม่วง และผลไม้ที่มีเมล็ดแข็ง วิเคราะห์ทั้งผลโดยเอาเมล็ดออก แต่สารตกค้างที่วิเคราะห์ได้จะคำนวณและแสดงค่าเป็นต่อน้ำหนักทั้งผล ซึ่งวิธีการเตรียมตัวอย่าง การคำนวณผลการวิเคราะห์และการรายงานผล ห้องปฏิบัติการต้องมีความรู้ความเข้าใจและดำเนินการได้อย่างถูกต้อง นอกจากการให้ความสำคัญกับการตรวจสอบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผลไม้ที่เป็นที่นิยมสำหรับการบริโภคและเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการส่งออกสูงแล้ว ควรมีการเฝ้าระวังผลไม้ที่บริโภคภายในประเทศอย่างเป็นระบบเพื่อให้เห็นแนวโน้มสถานการณ์ของประเทศไทย ทั้งนี้เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคและตอบโต้ภาวะฉุกเฉินด้านอาหารปลอดภัย สำหรับสารที่ห้ามใช้และจำกัดการใช้ หน่วยงานต้นน้ำที่เกี่ยวข้องทั้งการนำเข้า จำหน่าย และอบรมการใช้งาน ควรมีแนวปฏิบัติในการควบคุม กำกับ ติดตาม สารดังกล่าวที่เข้มงวดมากขึ้น ผลที่ได้จากโครงการนี้สามารถนำไปต่อยอดใช้ประโยชน์ในกลุ่มเป้าหมาย โดยลดอัตราการป่วยและภาระค่าใช้จ่ายของประชาชนที่บริโภคผลไม้เศรษฐกิจจากโรคที่มีสาเหตุจากสารพิษตกค้างในอาหาร สามารถสร้างความรอบรู้ด้านสุขภาพ (health literacy) ในการเลือกซื้อและมีพฤติกรรมในการบริโภคผลไม้ที่ดี

ข้อมูลที่ได้จากโครงการเฝ้าระวังสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผลไม้ในครั้งนี้จะถูกส่งมอบให้แก่หน่วยงานกำกับดูแลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ซึ่งปฏิบัติงานภายใต้คณะทำงานจัดทำแผนบูรณาการตรวจติดตามเฝ้าระวังสารพิษตกค้างจากวัตถุอันตรายทางการเกษตรในผักผลไม้พืชอาหารคณะที่ 2 ด้านความปลอดภัยด้านอาหารของคณะกรรมการอาหารแห่งชาติ เพื่อการบริหารจัดการและการลดความเสี่ยงของการบริโภคอาหารของคนไทย ข้อมูลการตกค้างสามารถนำไปประเมินความเสี่ยง และออกมาตรการที่เหมาะสมและเกิดผลจริงเพื่อลดความเสี่ยงของผู้บริโภคได้ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นหนึ่งในหน่วยงานของคณะทำงานฯ ที่เป็นหน่วยวิชาการทำหน้าที่สนับสนุนข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ทาง

ห้องปฏิบัติการ และดำเนินงานเชิงแผนบูรณาการจัดทำโครงการสำรวจติดตามอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ หน่วยงานระดับท้องถิ่น ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ในเขตภูมิภาคจะได้รับข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์เพื่อใช้สื่อสารความเสี่ยงในระดับพื้นที่ต่อไป ทั้งนี้ ภาครัฐควรมีแผนดำเนินงานอย่างเป็นระบบ เพื่อให้เห็นแนวโน้มสถานการณ์ของประเทศไทย เพื่อเป็นการแจ้งเตือนไปยังผู้เกี่ยวข้องและสื่อสารให้ผู้บริโภคได้ตระหนักถึงอันตรายต่อไป

สรุป

การสำรวจสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผลไม้เศรษฐกิจ 4 ชนิด ได้แก่ ทุเรียน มะม่วง กัลย และสับปะรด ชนิดละ 50 ตัวอย่าง รวมจำนวน 200 ตัวอย่าง เก็บจาก 5 ภูมิภาคของประเทศไทย ดำเนินการในปี พ.ศ. 2568 โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ร่วมกับ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 4 แห่ง ตรวจวิเคราะห์ขอบข่ายสารเคมี 250 ชนิด และสาร ethephon สถานการณ์การตกค้างสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผลไม้ พบว่ามีผลไม้ที่ไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 26.0 ชนิดตัวอย่างไม่ผ่านเกณฑ์จากมากไปน้อย ได้แก่ ทุเรียน (ร้อยละ 62.0) กัลย (ร้อยละ 38.0) มะม่วง (ร้อยละ 2.0) และสับปะรด (ร้อยละ 2.0) ตามลำดับ ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนภูมิภาคต่างๆ ไม่ผ่านเกณฑ์จากมากไปน้อย ได้แก่ ภาคใต้ (ร้อยละ 52.5) ภาคเหนือ (ร้อยละ 45.0) กรุงเทพมหานครและปริมณฑล (ร้อยละ 42.5) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ร้อยละ 40.0) และภาคกลาง (ร้อยละ 35.0) ตามลำดับ ชนิดสารเคมีทางการเกษตรที่ตรวจพบทั้งหมด 38 ชนิดสาร พบมากที่สุด 4 อันดับแรก ได้แก่ ethephon, cypermethrin, carbendazim และ λ -cyhalothrin สำหรับผลการตรวจสาร ethephon พบการตกค้างและไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ คิดเป็นร้อยละ 13.0 โดยเป็นตัวอย่างทุเรียนและกัลยที่พบมากและเกินเกณฑ์ยอมรับมากที่สุด ผลการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารพิษตกค้างทางการเกษตร 8 อันแรก พบว่าคนไทยได้รับสารพิษทุกชนิดต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน (น้อยกว่าร้อยละ 10.33) บ่งชี้ว่าคนไทยยังคงปลอดภัยจากการได้รับสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างใน

ผลไม้ อย่างไรก็ตามมีการตรวจพบเกินค่ามาตรฐานทางกฎหมาย จึงควรมีการกำกับดูแลการใช้สารเคมีอย่างเข้มงวดจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้ผลไม้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ไม่มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ในการช่วยจัดทำแก้ไขหรือจัดการต้นฉบับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางวิชาดา จงมีวาสนา ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร สำหรับคำแนะนำในการดำเนินโครงการและการให้คำปรึกษาเชิงวิชาการสำหรับการจัดทำต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

- กรมประชาสัมพันธ์. สินค้าเกษตรไทยขึ้นแท่นที่ 1 อาเซียน ติดอันดับ 8 ของโลก. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 2 เม.ย. 2568]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.prd.go.th/th/content/category/detail/id/39/iid/335085>.
- สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้า กระทรวงพาณิชย์. พาณิชย์เผยผลไม้ไทยขึ้นแท่นสินค้าเกษตรส่งออกสูงสุด. [ออนไลน์]. 2568; [สืบค้น 2 เม.ย. 2568]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://tpso.go.th/news/2503-0000000006>.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2567. กรุงเทพฯ: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2568.
- สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 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.
- สิรินธรียา พูลเกิด, อภิชาติ จำรัสฤทธิ์รงค์, รศรินทร์ เกรย์, สาสินี เทพสุวรรณ, ณัฐจิรา ทองเจริญชูพงศ์. รายงานโครงการติดตามพฤติกรรมการกินผักและผลไม้ของคนไทย ครั้งที่ 2 พ.ศ. 2562. นครปฐม: สถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล; 2563.
- Hartley D, Kidd H, Royal Society of Chemistry, editors. The agrochemicals handbook. 2nd ed. Nottingham, England: Royal Society of Chemistry; 1987.
- New Jersey Department of Health and Senior Services. Hazardous substance fact sheet: ethylene. [online]. 1996; [cited 2025 April 3]; [6 screens]. Available from: URL: <https://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/0873.pdf>.
- Tseng SH, Chang PC, Chou SS. A rapid and simple method for the determination of ethephon residue in agricultural products by GC with headspace sampling. J Food Drug Anal 2000; 8(3): 213-7.
- Dass HC, Randhawa SG, Negi SP. Flowering in pineapple as influenced by ethephon and its combinations with urea and calcium carbonate. Sci Hortic 1975; 3(3): 231-8.
- Moniruzzaman M, Khatoun R, Hossain MFB, Rahman MT, Alam SN. Influence of ethephon on ripening and quality of winter tomato fruit harvested at different maturity stages. Bangladesh J Agric Res 2015; 40(4): 567-80.
- Eure PM, Fisher LR, Stewart AM, Jordan DL. Evaluation of growth regulators and ripening agent used in flue-cured tobacco when spray-solution application is delayed. Tob Sci 2012; 49(49): 21-4.
- European Food Safety Authority. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance ethephon. EFSA J 2006; 4(6): 174. (65 pages).
- Codex Alimentarius Commission. Pesticide index. [online]. 2025; [cited 2025 April 3]; [1 screens]. Available from: URL: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/>.
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร: สารพิษตกค้าง: ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 142

- ตอนพิเศษ 170 ง (วันที่ 22 เมษายน 2568). หน้า 5.
15. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 460 (พ.ศ. 2568) เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 142 ตอนพิเศษ 240 ง (วันที่ 7 กรกฎาคม 2568).
 16. Centre for Food Safety, Food and Environmental Hygiene Department. Hong Kong pesticide MRL database. [online]. 2017; [cited 2025 April 3]; [1 screens]. Available from: URL: <https://www.cfs.gov.hk/english/mrl/index.php>.
 17. European Commission. EU pesticides database. [online]. [cited 2025 April 3]; [1 screens]. Available from: URL: https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en.
 18. Anastassiades M, Mack D, Tasdelen B, Sigalova I, Kostelac D, Scherbaum E. Residues of highly polar pesticides in samples from the market. [online]. 2008; [cited 2025 April 3]; [1 screens]. Available from: URL: <http://cvuas.xn--untersuchungsmter-bw-nzb.de/pdf/EPRW08-SRM-highpolar.pdf>.
 19. Centre for Food Safety. CFS follows up on unsatisfactory samples of Thai durian and salted fish. [online]. 2015; [cited 2025 April 3]; [1 screens]. Available from: URL: https://www.cfs.gov.hk/english/press/20150612_0287.
 20. 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).
 21. 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. London: British Standards Institution; 2008.
 22. Dong JN, Ma YQ, Liu FM, Jiang NW, Jian Q. Dissipation and residue of ethephon in maize field. *J Integr Agric* 2015; 14(1): 106-13.
 23. 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).
 24. วีรภูมิ วิทยานันท์, พรรคพล ชะพลพรรค, ชนิษฐา พุทธสุชา, ศศิธร สุกีรธา, กิ่งแก้ว กาญจนรัตน์. การสำรวจติดตามสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้จาก 77 จังหวัด ของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2565. *ว กรมวิทย์ พ* 2568; 67(2): 210-28.
 25. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร: การจัดหมวดหมู่สินค้าเกษตร เล่ม 1: พืช ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 142 ตอนพิเศษ 170 ง (วันที่ 22 เมษายน 2568). หน้า 7.

Monitoring Survey and Dietary Risk Assessment of Pesticide Residues in Thailand's Economically Important Fruits in 2025

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT A national monitoring programme for 250 pesticide residues, and ethephon, in economically valuable tropical fruits namely durian, mango, banana, and pineapple was conducted through a collaboration between the Bureau of Quality and Safety of Food and four Regional Medical Sciences Centers. A total of 200 samples were collected from retail markets in five provinces, representing all regions of Thailand, including Bangkok, Chiang Rai, Chonburi, Nakhon Ratchasima, and Songkhla, in 2025, with 40 samples per province. The samples were evaluated to assess the potential health risks associated with pesticide residues. All samples were analyzed at the ISO/IEC 17025:2017 accredited laboratories. The study focused on the quantification of 250 pesticide residues using GC-MS/MS, LC-MS/MS, and LC-QTOF/MS with multi-residue QuEChERS methods, combined with single-residue analysis of ethephon by GC-MS detection of generated ethylene. The results showed that thirty-eight pesticide residues, at concentrations ranging from < 0.01 to 73.18 mg/kg, were detected in 43.0% of 4 fruit samples (50 samples per fruit), with 26.0% exceeding the maximum residue limits (MRLs). The eight highest prevalence pesticide residues were further assessed for dietary health risks in the Thai population. The estimated exposure levels, when compared with the acceptable daily intake (ADI) values established by WHO, were all below 100%, indicating an acceptable level of risk for individual pesticide exposure.

However, the high incidence of samples exceeding regulatory limits, indicating the presence of illegal or improper pesticide use, highlights a critical need for regular monitoring and stricter control of pesticide application in fruits and vegetables to minimize potential health hazards to consumers.

Keywords: Monitoring, Risk assessment, Pesticide residue, Ethephon, Fruits

Prevalence and Genetic Heterogeneity of *Coxiella burnetii* Strains from Reservoir Goat Placentas: Implications for Human Q Fever Risk

Decha Pangjai¹, Ratana Tacharoenmuang¹, Sittiporn Parnmen¹, Maskiet Boonyaretha¹, Nattapon Nukhunthod¹, Dararat Bangdee¹, Chonlada Meesub¹, Kanjana Sanongboon¹, Sumalee Boonmar², Kamchai Kidsin³, and Archawin Rojanawiwat⁴

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

²Akkhraratchakumari Veterinary College, Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80161, Thailand

³Animal Health Section, The Eight Regional Livestock Development, Surat Thani 84000, Thailand

⁴Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT *Coxiella burnetii* is an obligate intracellular Gram-negative bacterium that causes Q fever in humans and coxiellosis in animals. Goats are important reservoirs of *C. burnetii*, particularly through heavily contaminated placental tissues, yet the epidemiology and genetic diversity of this pathogen in Thailand remain insufficiently characterized. This study investigated the molecular prevalence and genetic heterogeneity of *C. burnetii* in goat placentas collected from 26 farms across 10 provinces in northern, central, western, and southern Thailand in 2022. DNA was extracted from 1,404 placental samples and screened by real-time PCR targeting the *IS1111* gene. Representative positive samples were further characterized by multispacer sequence typing (MST) and phylogenetic analysis based on concatenated sequences from 10 loci. Overall, *C. burnetii* DNA was detected in 27.64% (388/1,404) of samples. Phylogenetic and MST analyses demonstrated marked genetic heterogeneity among Thai strains and revealed three novel genotypes, designated MST94, MST95 and MST96, which were closely related to

MST85, MST27, MST28, MST31, MST55, and MST77. These findings indicate that *C. burnetii* strains detected in goat placentas in Thailand belong to a broader transregional zoonotic lineage maintained within a ruminant–tick–human transmission cycle similar to that described in Eurasia and Europe.

Keywords: *Coxiella burnetii*, Genotyping, Multispacer sequence typing, Goat placenta, Thailand

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

Received: 6 May 2026

Revised: 3 July 2026

Accepted: 8 July 2026



Introduction

Coxiella burnetii is an obligate intracellular Gram-negative bacterium that causes Q fever in humans and coxiellosis in animals.⁽¹⁾ The organism is widely distributed worldwide and can infect a broad range of hosts, with domestic ruminants (cattle, sheep, and goats) serving as the primary reservoirs.^(1,2) *C. burnetii* is recognized as an emerging infectious pathogen by international organizations such as WHO/FAO/OIE and EFSA/ECDC⁽³⁾ and is classified as a category B potential bioterrorism agent by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), USA.⁽⁴⁾ Polymerase chain reaction (PCR) has become the preferred method for screening large numbers and diverse types of biological samples, thereby reducing reliance on bacterial culture and isolation. The remarkable environmental persistence of the organism, its transmission via inhalation, and its extremely low infectious dose necessitate handling *C. burnetii* in biosafety level 3 laboratories.⁽⁵⁻⁷⁾ A variety of molecular approaches have been developed to genotype and characterize *C. burnetii* strains. Currently, the three principal discriminatory genotyping methods include multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), multispacer sequence typing (MST), and single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping. PCR-based methods such as MLVA and MST are widely applied in epidemiological investigations.⁽⁸⁾ MST targets housekeeping genes, which are less susceptible to selective pressure and exhibit greater genetic stability than MLVA.⁽⁹⁻¹¹⁾ Numerous studies have reported MST genotyping of *C. burnetii* isolated from human, animal,

and environmental sources, contributing to a global database that enables interlaboratory comparison and reproducibility.⁽¹²⁾ Additionally, MST has therefore been described as a “geotyping” method, as many genotypes display broad geographical distribution. Differences in pathogenicity and virulence have been observed among distinct genogroups.⁽¹³⁾ However, the current MST scheme remains incomplete and requires further expansion to achieve a comprehensive representation of global genetic diversity.⁽¹⁴⁾ SNP genotyping has also been proposed as an alternative approach, identifying polymorphisms within the same spacer regions used in MST.⁽¹⁰⁾ This method allows assignment of sequence types compatible with MST without requiring sequencing or bacterial isolation.⁽¹⁵⁾ In contrast, MST can be more complex to interpret and may require highly purified DNA derived from cultured isolates. More recently, whole-genome sequencing has emerged as a potential approach for revealing the substantial genetic diversity of *C. burnetii*. These technologies have identified geographically structured populations, host-associated patterns, and novel genotypes that are highly relevant to outbreak investigation and transmission dynamics.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ Despite these advances, the molecular epidemiology of *C. burnetii* in Thailand remains poorly characterized and underreported, largely because of limited diagnostic capacity and laboratory resources.

In animals, *C. burnetii* infection is frequently subclinical but may lead to reproductive disorders, including abortion, stillbirth, and weak offspring, particularly in

goats with extensive placental colonization. Infected ruminants can shed large amounts of bacteria in the absence of clinical signs, facilitating silent transmission within herds and environmental persistence.⁽¹⁹⁾ During parturition or abortion, extremely high bacterial loads present in placental tissues, birth fluids, and vaginal secretions can generate infectious aerosols, which represent the primary route of human infection.⁽²⁰⁾ Consequently, transmission of *C. burnetii* to humans is most commonly associated with small ruminants, particularly goats, which play a key epidemiological role and have been implicated in numerous outbreaks linked to goat farms.^(21,22) In humans, infection is often asymptomatic; however, when symptoms occur, they may include headache, flu-like illness, chills, pneumonia, fatigue, weight loss, nausea, and myalgia. More severe complications can develop, including pericarditis, myocarditis, endocarditis, hepatitis, vascular infections, prosthetic joint arthritis, osteoarticular infections, and lymphadenitis.^(23,24) The pathogen is highly infectious, with an estimated infectious dose of a single bacterium sufficient to cause infection in 50% of exposed individuals, highlighting the risk even at very low exposure levels.⁽²⁵⁾

Q fever in Thailand. Several serological and molecular studies have documented the presence and epidemiology of *C. burnetii* in Thailand. Evidence of infection has been reported since 1966 in both humans and domestic animals (goats, sheep, and cattle), initially identified using the complement fixation test.^(26,27) Between 2002 and 2005, acute Q fever cases were detected among patients presenting with acute febrile illness using the indirect

fluorescent antibody test (IFA).^(28,29) In 2012, two fatal cases of *C. burnetii* endocarditis in northeastern Thailand were confirmed through various methodologies, ranging from serology, PCR, and immunohistochemistry.⁽³⁰⁾ In 2013, subsequent investigations expanded to animal reservoirs through PCR-based surveillance of placental tissues from healthy ruminants in areas associated with reported human cases.⁽³¹⁾ Furthermore, serological studies conducted in the same year using ELISA reported animal- and herd-level antibody prevalence of *C. burnetii* in dairy cattle in Chiang Mai.⁽³²⁾ Further nationwide assessments were reported in 2017, describing the seroprevalence of *C. burnetii* among ruminants and occupationally exposed individuals during 2012–2013 using ELISA, IFA, and PCR.⁽³³⁾ In 2018, combined serological and molecular analyses, including SNP genotyping, characterized *C. burnetii* strains in ruminants from northern and northeastern Thailand, identifying sequence types ST20 and ST18/25 in buffalo and goat placentas.⁽³⁴⁾ Regional surveys conducted between 2013 and 2015 in the upper northern and central regions of Thailand reported individual seroprevalence in goats ranging from 3.5% to 12.8%, based on IFA testing.⁽³⁵⁾ In 2021, additional serological evidence was reported in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Phatthalung Province using IFA.⁽³⁶⁾ More recently, studies conducted during 2021–2023 reported substantially higher seroprevalence in goats, with individual- and herd-level rates of 22.39% and 58.42%, respectively, determined using commercial ELISA in central and western Thailand.⁽³⁷⁾ In 2024, investigations of meat

goat herds in northeastern Thailand identified prevalence and associated risk factors using both serological and molecular approaches. Notably, herd owners' knowledge of coxiellosis transmission was identified as a protective factor against infection at the herd level.⁽³⁸⁾ In Thailand, serological evidence indicates that approximately 4% of goats are positive for *C. burnetii* antibodies, while up to 12.6% of occupationally exposed individuals demonstrate seropositivity, highlighting a notable risk of zoonotic transmission.⁽³³⁾ Similarly, *Brucella* spp. seropositivity has been documented in goats and goat herds, with human outbreaks associated with direct contact with parturient animals and the consumption of raw goat products. A high proportion of individuals involved in outbreak settings have been shown to possess antibodies against *B. melitensis*, underscoring close livestock exposure as a major risk factor for infection.⁽³⁹⁾

Despite these findings, genomic and molecular data on *C. burnetii* in Thailand remain limited. Characterizing circulating strains in reproductive tissues, particularly placentas, is therefore essential to improve understanding of local epidemiology and to better assess zoonotic risk. In this study, we investigated the prevalence and genetic heterogeneity of *C. burnetii* in goat placentas collected from farms in Thailand. Molecular detection combined with MST was employed to identify circulating strains and compare them with globally reported lineages. The findings

provide critical baseline data and offer insights into the evolution, host adaptation, and epidemiology of *C. burnetii* in Thailand.

Materials and Methods

Study Population

Goat placental samples were collected in 2022 from four regions of Thailand: northern (Chiang Mai and Phrae provinces), central (Nonthaburi and Chai Nat provinces), western (Kanchanaburi and Ratchaburi provinces), and southern (Krabi, Surat Thani, Chumphon, and Phatthalung provinces) (Figure 1). A total of 26 goat farms across these regions were included in the study. These areas were selected because of their high density of ruminant populations, particularly goats.

Pregnant goats at the late gestation stage were recruited on a voluntary basis. For each collected placental sample and its corresponding animal, data were recorded, including owner information, geographic location, age, production purpose, and farm type. In addition, reproductive history was obtained using a standardized one-page data collection form, including parity number, history of abortion, stillbirth, weak offspring, and gross placental characteristics. Then, placental samples were collected immediately after parturition and stored at -20°C until DNA extraction. Genomic DNA was extracted from all samples using the DNeasy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

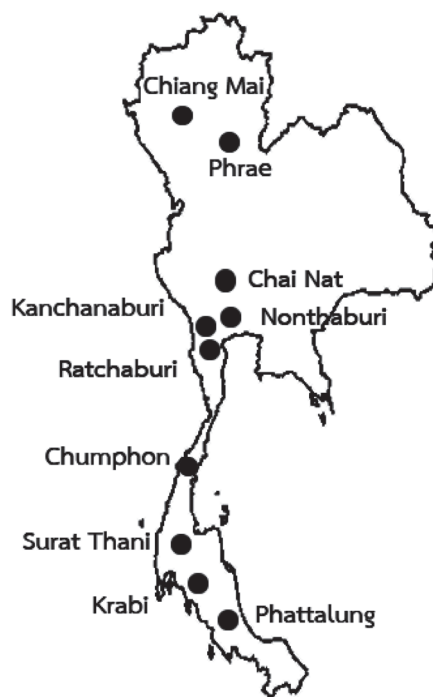


Figure 1 Geographical locations of *C. burnetii* infection, showing the regions and provinces included in the study in Thailand.

Detection of *C. burnetii* by real-time PCR

Extracted DNA from each sample was screened for *C. burnetii* using a real-time PCR assay targeting the *IS1111* gene, employing primers and a TaqMan probe⁽⁴⁰⁾ with in-house optimization. Each 20 μ L reaction mixture contained 0.1 μ M of forward primer (5'-CAT CACATTGCCGCGTTTAC-3'), 0.1 μ M of reverse primer (5'-GGTTGGTCCCTCGA CAACAT-3'), and 0.2 μ M of TaqMan probe (FAM-AATCCCCAACAACACCTCCT TATTCCCAC-BHQ1), together with 10 μ L of 2 $\times$ PerfeCTa[®] Multiplex qPCR Supermix (Quantabio, USA), 1 μ L of DNA template, and nuclease-free water to the final volume. Amplification was performed on a Bio-Rad Real-time PCR system (Bio-Rad, USA) with an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 5 s and annealing/extension at 60°C

for 25 s. Each run included a positive control consisting of purified *C. burnetii* DNA and a no-template negative control to verify assay performance and monitor potential contamination.

Multispacer sequence typing (MST) and phylogenetic analysis

Each PCR was performed using a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). A total of 40 μ L reaction mixture comprised 14 μ L of nuclease-free water, 20 μ L GoTaq[®] Green Master Mix, 400 μ M of dATP, dGTP, dCTP and dTTP, and 3 mM MgCl₂ (Promega, USA), 2 μ L each of forward and reverse of 200 nM primers (Table 1) and 2 μ L of DNA template. Amplification was conducted under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 37 cycles of denaturation at 95°C, for 30 s, annealing

at 57°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min.⁽⁹⁾ A 5 µL aliquot of each PCR product was analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels containing ethidium bromide and visualized under UV illumination. The PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Denmark), and subjected to DNA sequencing with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, USA) and a Genetic Analyzer (Model 3130x1; Applied Biosystems, USA). Each fragment of sequence data was verified using GeneMapper™ Software 5 (Applied Biosystems, USA), and confirmed fragments were assembled in Sequencher 4.10.1 (Gene Codes Corporation, MI, USA), resulting in consensus sequences. Spacer sequence alignments were performed using Geneious Pro

5.4.3 (<http://www.geneious.com/>). Reference sequences from 65 groups were retrieved from the MST database (https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/spacers.html) and combined with sequences, obtained in this study for phylogenetic analysis. Phylogenetic analysis was inferred using the maximum likelihood (ML) method implemented in RAxML 7.2.6 using the GTRGAMMA model with 25 rate parameter categories,⁽⁴¹⁾ with assessed node support using 1,000 bootstrap replicates. Phylogenetic trees were illustrated using FigTree 1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>), and allele profiles were compared with reference sequences available in the MST database, which is available on the website (https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/groups.html).

Table 1 Primers used for PCR amplification and sequencing of *C. burnetii* gene spacers.⁽⁹⁾

Spacer name	ORF	Nucleotide Sequence (5'–3')	Amplified Fragment length (bp)
Co×2	Hypothetical protein	Co×20766 CAACCCTGAATACCCAAGGA	397
	Hypothetical protein	Co×21004 GAAGCTTCTGATAGGCGGGA	
Co×5	Sulfatase domain protein	Co×77554 CAGGAGCAAGCTTGAATGCG	395
	Entericidin putative	Co×77808 TGGTATGACAACCCGTCATG	
Co×18	Ribonuclease H	Co×283060 CGCAGACGAATTAGCCAATC	557
	DNA polymerase III, epsilon subunit	Co×283490 TTCGATGATCCGATGGCCTT	
Co×20	Hypothetical protein	Co×365301 GATATTTATCAGCGTCAAAGCAA	631
	Hypothetical protein	Co×365803 TCTATTATTGCAATGCAAGTGG	
Co×22	Hypothetical protein	Co×378718 GGGAATAAGAGAGTTAGCTCA	383
	Amino acid permease family protein	Co×378965 CGCAAATTTTCGGCACAGACC	
Co×37	Hypothetical protein	Co×657471 GGCTTGTCTGGTGTAAGTGT	463
	Hypothetical protein	Co×657794 ATTCCGGGACCTTCGTTAAC	

Table 1 Primers used for PCR amplification and sequencing of *C. burnetii* gene spacers.⁽⁹⁾
(Continue)

Spacer name	ORF	Nucleotide Sequence (5'-3')*	Amplified Fragment length (bp)
Co×51	Replicative DNA helicase, intein-containing	Co×824598 TAACGCCCCGAGAGCTCAGAA	674
	Conserved hypothetical protein– Uridine kinase	Co×825124 GCGAGAACCGAATTGCTATC	
Co×56	OmpA-like transmembrane domain protein	Co×886418 CCAAGCTCTCTGTGCCCAAT	479
	Conserved hypothetical protein	Co×886784 ATGCGCCAGAAACGCATAGG	
Co×57	Rhodanese-like domain protein	Co×892828 TGGAAATGGAAGGCGGATTC	617
	Hypothetical protein	Co×893316 GGTGGAAGGCGTAAGCCTTT	
Co×61	Dioxygenase, putative	Co×956825 GAAGATAGAGCGGCAAGGAT	611
	Hypothetical protein	Co×957249 GGGATTTCAACTTCCGATAGA	

Statistical analysis

Pearson's chi-square test or Fisher's exact test was applied in the bivariate analyses through bivariate odds ratios (ORs), along with their 95% confidence intervals, which were estimated using binary logistic regression analysis to assess the magnitude of association between study factors and *C. burnetii* infection in goats in Thailand. For multiple comparisons in the post hoc analysis, *p*-values were adjusted using the Bonferroni correction.

Ethical approval

The research procedures in this study were reviewed and approved by the Department of Medical Sciences, under animal protocol number 64-037 on 31 January 2021, granted by the Institutional Animal Care and Use Committee (DMSc IACUC), for the use of animals.

Results

The overall prevalence of *C. burnetii* infection in goat placentas by PCR was 27.64% (388/1,404). At the provincial level, the highest prevalence was observed in Nonthaburi at 61.58% (125/203). This was followed by Ratchaburi at 49.26% (167/339), Krabi at 29.51% (36/122), and Kanchanaburi at 22.92% (33/144). Lower prevalence was recorded in Chiang Mai at 7.50% (6/80), Chai Nat at 6.50% (8/123), Surat Thani at 5.19% (8/154), and Phrae at 4.35% (5/155). No positive samples were detected in Chumphon (0/35) or Phatthalung (0/89) (Table 2). At the regional level, the western region had the highest molecular prevalence at 41.41% (200/483), followed by the central region at 40.80% (133/326), and the southern region at 11.00% (44/400). In contrast, the northern region demonstrated the lowest prevalence at 5.64% (11/195) (Table 3).

Table 2 Molecular prevalence of *C. burnetii* in goat placental samples classified by the selective regions and provinces.

Region	Province	No. of samples tested	No. of positive qPCR	Prevalence (%)
Central	Nonthaburi	203	125	61.58
	Chai Nat	123	8	6.50
Northern	Chiang Mai	80	6	7.50
	Phrae	115	5	4.35
Western	Ratchaburi	339	167	49.26
	Kanchanaburi	144	33	22.92
Southern	Krabi	122	36	29.51
	Surat Thani	154	8	5.19
	Chumphon	35	0	0.00
	Phatthalung	89	0	0.00
Total		1,404	388	27.64

Table 3 Association of demographic characteristics with *C. burnetii* infection among goats in Thailand.

Risk Factor	Category	Prev. (%)	OR	95% CI	p-value
Region	Western	200/483 (41.41)	ref		
	Central	133/326 (40.80)	0.98	0.73–1.30	0.863 ^a
	Southern	44/400 (11.00)	0.17	0.12–0.25	< 0.001 ^a
	Northern	11/195 (5.64)	0.08	0.04–0.16	< 0.001 ^a
Age	< 6 years	385/1378 (27.94)	ref		
	≥ 6 years	3/26 (11.54)	0.34	0.10–1.13	0.064 ^a
Breed	Cross-breed	83/644 (12.89)	ref		
	Pure-breed	298/730 (40.82)	4.66	3.55–6.13	< 0.001 ^a
	Native breed	7/30 (23.33)	2.06	0.85–4.94	0.103 ^b
Production type	Meat goat	97/822 (11.80)	ref		
	Dairy goat	291/582 (50.00)	7.47	5.72–9.76	< 0.001 ^a
Parity	1–3	335/1078 (31.08)	ref		
	≥ 4	53/326 (16.26)	0.43	0.31–0.59	< 0.001 ^a
Farming condition	Type A (free roaming)	8/123 (6.50)	ref		
	Type B (semi-free roaming)	41/266 (15.41)	2.62	1.19–5.77	0.014 ^a
	Type C (indoor)	334/776 (43.04)	10.86	5.23–22.55	< 0.001 ^a
Presence of other livestock	No	286/922 (31.02)	ref		
	Yes	102/482 (21.16)	0.60	0.46–0.77	< 0.001 ^a
Introduction of new goats within 6 months	No	383/1164 (32.90)	ref		
	Yes	0/125 (no prev.)	0.01 ^c	0.00–0.13 ^c	< 0.001 ^b

Note: Prevalence (Prev.), odds ratio (OR), confidence interval (CI), ^a = Pearson's chi-square test, ^b = Fisher's exact test and ^c = Haldane–Anscombe correction.

The risk of *C. burnetii* infection was significantly higher in Ratchaburi and Nonthaburi than in Kanchanaburi (both $p < 0.001$). In contrast, significantly lower risks were observed in Chai Nat, Phrae, and Surat Thani than in Kanchanaburi (all $p < 0.001$). Chiang Mai also had a lower risk than Kanchanaburi ($p = 0.004$). At the regional level, the northern and southern regions had significantly lower risks of infection than the western region (both $p < 0.001$).

Moreover, the associations between demographic characteristics and *C. burnetii* infection in goats in Thailand are presented in Table 3. Goats aged < 6 years had a significantly higher risk of infection than those aged ≥ 6 years (all p -values < 0.001). Pure-bred goats, including Anglo-Nubian, Boer, and Saanen, had a higher risk of infection than cross-bred goats (a mix of Anglo-Nubian and Boer; all p -values < 0.001). Dairy goats also showed a higher risk of infection than meat goats (all p -values < 0.001). Goats with 1st–3rd parity had a higher risk than those with $\geq 4^{\text{th}}$ parity (all p -values < 0.001). In addition, goats reared under Type C (indoor) farming conditions had a significantly higher risk of infection than those under Type A (free-roaming) conditions (all p -values < 0.001).

The absence of other livestock on the farm was associated with a higher risk of *C. burnetii* infection than the presence of other livestock (all p -values < 0.001). Introduction of new goats to the farm within 6 months was also associated with a higher risk of infection than in farms without newly introduced goats (all p -values < 0.001).

Genotyping by MST and phylogenetic analysis based on concatenated sequences

from 10 loci of *C. burnetii* from four provinces identified novel genotypes among the examined strains (Figure 2). Phylogenetic analysis demonstrated that *Coxiella* DNA, isolated from goat placentas from Kanchanaburi (TH-KRI-16), Nonthaburi (TH-NBI-3), Phrae (TH-PRE-80), and Ratchaburi (TH-RBR-114), formed a monophyletic group distinct from previously described *C. burnetii* sequence types. The MST profiles of these strains differed from publicly available reference strains and from one another. The strains from Kanchanaburi (TH-KRI-16) and Nonthaburi (TH-NBI-3) were assigned to MST94, whereas the strains from Phrae (TH-PRE-80) and Ratchaburi (TH-RBR-114) were assigned to MST95 and MST96, respectively (Table 3).

These findings indicate that multiple novel *C. burnetii* sequence types are circulating in Thailand. Sequence data for the *Cox2*, *Cox5*, *Cox18*, *Cox20*, *Cox22*, *Cox37*, *Cox51*, *Cox56*, *Cox57*, and *Cox61* genes in this study were submitted to GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/>), with the corresponding accession numbers shown in Tables 4 and 5. Most of the *C. burnetii* sequence type data in humans have been reported in European, African, and Central Asian countries; in particular, France has reported the presence of various groups of MST in humans, including MST1, MST2, MST3, MST4, MST5, MST6, MST9, MST11, MST12, MST13, MST16, MST18, MST20, MST32, MST33, MST42, and MST49 (Table 5). (https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html)

The phylogenetic tree based on multispacer sequence typing shows that the Thai genotypes MST94, MST95, and MST96

cluster within the same clade as the previously reported MST66, MST67, MST68, MST69, and MST70, all of which were detected in goat

placentas. This Thai placental clade is closely related to MST27, MST28, MST31, MST55, and MST85 (Figure 2).

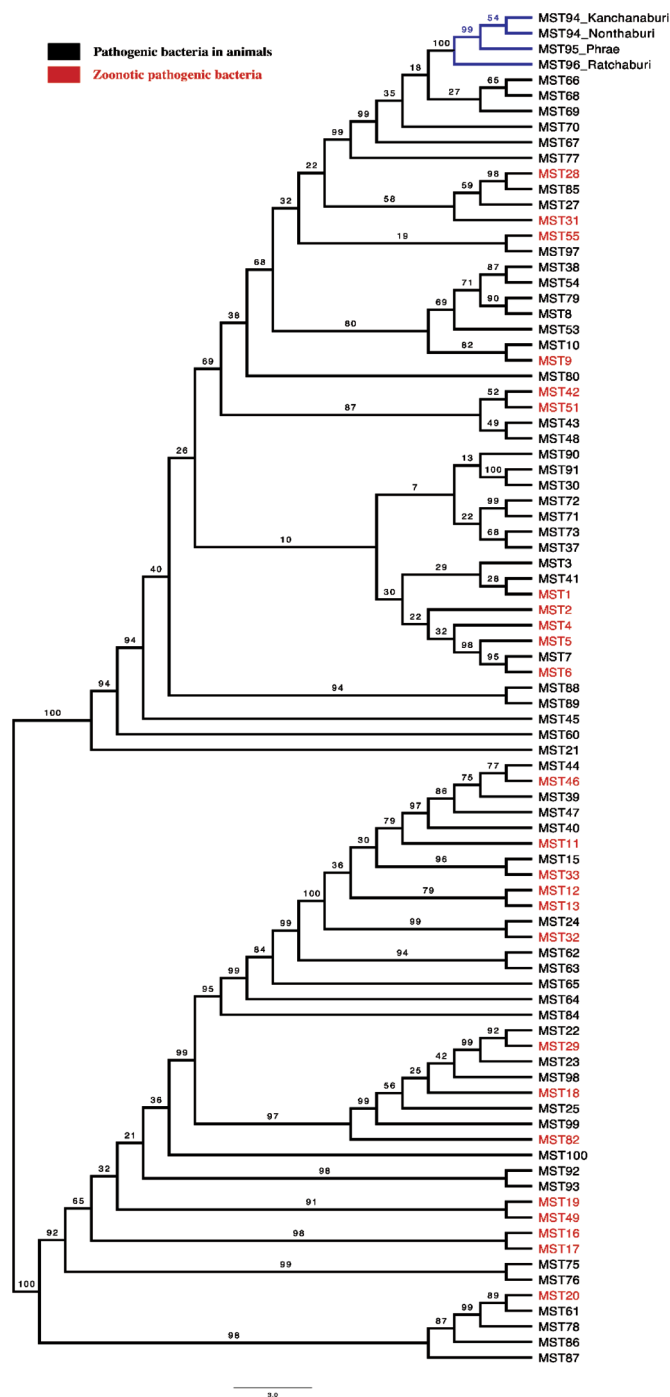


Figure 2 Phylogenetic analysis using the Maximum Likelihood (ML) method with the IQ-TREE program (<http://www.iqtree.org/>), applying the General Time-Reversible (GTR) model with a gamma distribution. Clade support was then assessed using bootstrap analysis with 1,000 replicates to evaluate statistical confidence and construct the phylogenetic tree. Clades with bootstrap (BS) values greater than 70% were considered strongly supported. The phylogenetic tree was visualized using FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Table 4 GenBank accession numbers of *C. burnetii* sequences identified from goats placental samples in Thailand, 2022.

Spacer	GenBank acc no. of identified <i>C. burnetii</i>			
	TH-KRI-16	TH-NBI-3	TH-PRE-80	TH-RBR-114
<i>Co</i> ×2	PX619166	PX619167	PX619168	PX619169
<i>Co</i> ×5	PX672292	PX672293	PX672294	PX672295
<i>Co</i> ×18	PX672296	PX672297	PX672298	PX672299
<i>Co</i> ×20	PX672300	PX672301	PX672302	PX672303
<i>Co</i> ×22	PX672304	PX672305	PX672306	PX672307
<i>Co</i> ×37	PX672308	PX672309	PX672310	PX672311
<i>Co</i> ×51	PX672312	PX672313	PX672314	PX672315
<i>Co</i> ×56	PX672316	PX672317	PX672318	PX672319
<i>Co</i> ×57	PX672320	PX672321	PX672322	PX672323
<i>Co</i> ×61	PX672324	PX672325	PX672326	PX672327

Table 5 Alleles of 10 spacers which allow the definition of the different *C. burnetii* sequence. Comparison of the reference sequence types from humans and goats worldwide with the novel genotypes described in the present study.

Geographic	MST group	Co×2	Co×5	Co×18	Co×20	Co×22	Co×37	Co×51	Co×56	Co×57	Co×61
Human											
France	1	5	6	3	4	6	5	8	1	5	6
France, Russia and Kyrgyzstan	2	5	6	3	5	6	5	8	1	5	6
France	3	5	6	3	4	6	7	8	1	5	6
France, Spain and Portugal	4	5	6	3	2	6	5	8	1	5	6
France and Tunisia	5	4	6	3	5	6	2	8	2	5	6
France	6	4	3	3	5	6	5	8	2	5	6
France	9	1	4	2	5	1	5	2	3	4	6
France and Belgium	11	6	5	1	6	5	4	5	4	3	2
France, Switzerland, and Senegal	12	3	5	1	6	5	4	5	4	3	2
France and Portugal	13	3	5	1	6	5	4	5	5	3	2

Table 5 Alleles of 10 spacers which allow the definition of the different *C. burnetii* sequence. Comparison of the reference sequence types from humans and goats worldwide with the novel genotypes described in the present study. (Continue)

Geographic	MST group	Co×2	Co×5	Co×18	Co×20	Co×22	Co×37	Co×51	Co×56	Co×57	Co×61
Poland, Central Africa, Romania, France, Italy and USA	16	3	8	5	3	4	1	6	7	6	5
French Guiana	17	3	8	5	7	4	1	10	8	6	7
Romania, France, Slovakia, Romania, Greece, Italy and Italy	18	3	8	1	6	3	4	7	9	6	3
Senegal	19	3	7	7	8	5	4	11	7	6	5
USA and France	20	3	2	6	1	5	4	4	10	6	5
Kazakhstan	28	8	4	9	5	7	5	2	3	4	6
Italy	29	3	8	1	6	3	8	7	1	6	3
Uzbekistan	31	9	4	9	5	8	5	2	3	4	6
Germany, France and Austria	32	3	5	1	6	5	4	5	12	3	2
Netherlands, France and Reunion	33	7	5	1	6	5	9	9	4	3	2
France and USA	42	5	4	1	5	8	5	2	3	4	6
France	46	7	5	2	4	5	9	9	4	3	2
France	49	3	7	2	6	5	4	11	7	6	5
Saudi Arabia	51	5	4	1	5	8	5	2	3	4	2
United Kingdom	55	5	4	9	5	8	5	2	3	4	6
Iran	82	3	8	1	6	3	4	10	9	6	3
Iran	83	12	11								
Goat											
Spain and USA	8	5	4	2	5	1	5	3	3	4	4
Spain	13	3	5	1	6	5	4	5	5	3	2
Spain and Germany	18	3	8	1	6	3	4	7	9	6	3
Namibia	30	5	6	10	5	6	5	8	13	9	6
Austria	32	3	5	1	6	5	4	5	12	3	2
France	53	5	4	2	5	1	7	3	3	4	6
Liban	58	4	8	2							
Iran	62	3	8	1	6	5	4	5	4	6	11

Table 5 Alleles of 10 spacers which allow the definition of the different *C. burnetii* sequence. Comparison of the reference sequence types from humans and goats worldwide with the novel genotypes described in the present study. (Continue)

Geographic	MST group	Co×2	Co×5	Co×18	Co×20	Co×22	Co×37	Co×51	Co×56	Co×57	Co×61
Thailand	66	5	4	9	5	8	13	15	16	11	6
Thailand	67	5	4	9	5	9	11	14	15	11	6
Thailand	68	5	4	9	5	8	11	15	16	11	6
Thailand	69	5	4	9	5	8	12	14	16	11	6
Thailand	70	5	4	9	5	10	11	14	16	11	6
Brazil	74	3	2	5			10		10		5
Thailand	94 ^a	5	16	16	14	8	11	19	16	18	17
Thailand	95 ^b	5	16	16	14	8	11	20	25	19	18
Thailand	96 ^c	5	17	17	14	8	16	21	16	20	19

Note: ^a = Kanchanaburi no TH-KRI-16, ^b = Phrae no. TH-PRE-80 and ^c = Ratchaburi no. TH-RBR-114

Discussion

The present study revealed that 27.64% of the goats sampled in Thailand harboured *C. burnetii* in placental tissues. *C. burnetii* has previously been reported in goat milk and placental samples, with a prevalence of 100% (2/2) and sequence types of MST18/25.⁽¹¹⁾ Data retrieved from the MST database (https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html) indicated a wide distribution of sequence types in goats across different countries. Specifically, MST8 has been identified in goat placentas from Spain and the USA, whereas MST13 and MST18 have been reported in Spain, with MST18 also identified in Germany. In addition, MST30, MST32, and MST53 have been identified in goat placentas from Namibia, Austria, and France, respectively. Regarding MST58, it has also been reported in goat milk in Liban, while MST62 has been identified in aborted goat fetuses and goat milk

in Iran. In Thailand, a previous study assigned a goat placenta sample no. L34 from Lopburi province to MST66, whereas goat samples no. C1 from Chai Nat, no. N130 from Nonthaburi, no. K2 from Kanchanaburi, and no. R180 from Ratchaburi provinces corresponded to MST67, MST68, MST69, and MST70, respectively. In contrast, MST74 has been reported in cattle, goats, and sheep in Brazil (Table 5).

In our phylogenetic analysis, all Thai *C. burnetii* genotypes identified in goat placentas (MST66, MST67, MST68, MST69, MST70, MST94, MST95, and MST96) clustered within a single monophyletic clade. This clade showed close relatedness to MST85, which was originally detected in ticks in China,⁽⁴²⁾ to MST27 and MST28 reported from ewe placenta, cow milk, Hyalomma ticks and human blood in Kazakhstan, to MST31 and MST55 described from human blood and a human heart valve in Uzbekistan and the

United Kingdom(https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html) and to MST77 recently identified in ticks in Korea.⁽⁴³⁾ The tight clustering of Thai placental genotypes with these tick- and ruminant-associated MSTs, as well as with MSTs linked to human Q fever and endocarditis, indicates that the strains circulating in goats in Thailand are part of a wider Eurasian zoonotic lineage maintained by ticks and small ruminants, rather than a distinct local population. The repeated association of this lineage with reproductive tissues and milk in small ruminants suggests that parturition and lactation are key points for environmental contamination and human exposure, as documented in outbreaks in other regions. The close relationship to MST31 and MST55, which have caused bacteremia and endocarditis in humans, further raises concern that Thai strains may have comparable pathogenic potential, particularly among occupationally exposed groups such as farmers, veterinarians, and abattoir workers. Taken together, these findings highlight the need to integrate Q fever into national surveillance and control programs focusing on goat herds and tick vectors, and to increase clinical awareness of Q fever and Q fever endocarditis in Thailand.

To date, no studies have specifically examined the association between *C. burnetii* infection in goats and factors such as parity, farming conditions, the presence of other livestock species on the farm, or the introduction of new goats within the previous 6 months. In the present study, goats with 1st–3rd parity show a significantly higher prevalence

of *C. burnetii* infection than those with higher parity.⁽⁴⁴⁾ This finding suggests that goats of lower parity could cause a greater risk of infection. In addition, Type C farming conditions (indoor housing) were associated with a higher risk of *C. burnetii* infection than Type A conditions (free-roaming management).⁽⁴⁵⁾ Goat farms without other livestock species also had a higher risk of infection than farms where goats were co-housed with other livestock species.^(46,47)

Introduction of new goats to the farm within the previous 6 months was also associated with a higher risk of *C. burnetii* infection than in farms without newly introduced goats.⁽⁴⁸⁾ In addition, the Co×5, Co×18, Co×20, Co×22, Co×37, Co×51, Co×56, Co×57, and Co×61 spacer loci have been suggested as the most appropriate markers for discriminating *C. burnetii* strains in Thailand. The studies have proposed that phylogenetic analysis based on concatenated sequences of the Co×2, Co×5, Co×18, Co×20, Co×22, Co×37, Co×51, Co×56, Co×57, and Co×61 loci can separate *C. burnetii* into distinct clusters and may therefore be useful for strain characterization at the species level. Accordingly, phylogenetic analysis in this study was performed to further characterize the genetic relationships among four goat-derived strains from Kanchanaburi, Nonthaburi, Phrae, and Ratchaburi. The Kanchanaburi and Nonthaburi strains shared identical genetic characteristics, while all four goat strains were clearly separated from previously reported *C. burnetii* strains in the phylogenetic tree. Their MST profiles also

differed from publicly available reference strains. These findings suggest that goat populations in Thailand harbour novel strains of *C. burnetii*. Comprehensive surveillance and further characterization of isolates are needed to determine the distribution of distinct sequence types in goats and humans in Thailand.

Conclusion

This study provides new molecular epidemiological and genetic characterization data on *C. burnetii* in Thailand based on MST analysis. The findings demonstrate the prevalence of *C. burnetii* infection in goat placentas and identify three novel genotypes in four provinces: Kanchanaburi, Nonthaburi, Phrae, and Ratchaburi. To further characterize strains within the same MST group, MST analysis should be complemented by MLVA.⁽⁴⁹⁾ In conclusion, Thai *C. burnetii* genotypes from goat placentas form a single clade that is closely related to MST85, MST27, MST28, MST31, MST55, and MST77 detected in ticks, ruminant reproductive tissues, milk and human Q fever cases across China, Kazakhstan, Korea, Uzbekistan and the United Kingdom. This genetic relatedness suggests that Thailand is part of a broader transregional network of *C. burnetii* circulation involving ticks, small ruminants and humans, with important implications for veterinary and human public health.

Declaration of the Use of Artificial Intelligence

No artificial intelligence was used.

Acknowledgements

The present study was financially supported by the project “Prevalence and genetic study of important bacterial zoonotic diseases in Thailand: Q fever, Rickettsiosis, Bartonellosis, Brucellosis, Leptospirosis, and Melioidosis (Project code: DGHP-BAC-ZOO-NOSIS, 2022–2024),” Thailand MOPH–United States CDC Collaboration, National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. We would like to express our sincere gratitude to Dr. Pongpun Sawatwong, Division of Global Health Protection, Thailand MOPH–U.S. CDC Collaboration, Thailand, for his invaluable support and guidance throughout this study.

References

1. Ullah Q, Jamil T, Saqib M, Iqbal M, Neubauer H. Q fever—a neglected zoonosis. *Microorganisms* 2022; 10(8): 1530. (17 pages).
2. Angelakis E, Raoult D. Q fever. *Vet Microbiol* 2010; 140(3–4): 297–309.
3. Bielawska-Drózd A, Cieřlik P, Mirski T, Gawęł J, Michalski A, Niemcewicz M, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* in environmental samples collected from cattle farms in Eastern and Central Poland (2011–2012). *Vet Microbiol* 2014; 174(3–4): 600–6.
4. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(2): 225–30.
5. Sidi-Boumedine K, Adam G, Angen Ø, Aspán A, Bossers A, Roest HIJ, et al. Whole genome PCR scanning (WGPS) of *Coxiella burnetii* strains from ruminants. *Microbes Infect* 2015; 17(11–12): 772–5.

6. Sidi-Boumedine K, Duquesne V, Prigent M, Yang E, Joulié A, Thiéry R, et al. Impact of IS1111 insertion on the MLVA genotyping of *Coxiella burnetii*. *Microbes Infect* 2015; 17 (11-12): 789-94.
7. World Organization for Animal Health (WOAH). Chapter 3.1.18. – Q fever. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 13th ed. Paris: WOAH; 2024. p. 1-19.
8. Astobiza I, Tilburg JJHC, Piñero A, Hurtado A, García-Pérez AL, Nabuurs-Franssen MH, et al. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain. *BMC Vet Res* 2012; 8: 241. (8 pages).
9. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, et al. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(8): 1211-7.
10. Hornstra HM, Priestley RA, Georgia SM, Kachur S, Birdsell DN, Hilsabeck R, et al. Rapid typing of *Coxiella burnetii*. *PLoS One* 2011; 6(11): e26201. (8 pages).
11. Pearson T, Hornstra HM, Hilsabeck R, Gates LT, Olivas SM, Birdsell DM, et al. High prevalence and two dominant host-specific genotypes of *Coxiella burnetii* in U.S. milk. *BMC Microbiol.* 2014; 14: 41. (9 pages).
12. van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 49(1): 22-7.
13. Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MW, Shive HR, Weeks BR, Zhang GQ, et al. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infect Immun* 2009; 77(12): 5640-50.
14. Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, et al. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clin Microbiol Rev* 2017; 30(1): 115-90.
15. Kersh GJ, Priestley RA, Hepp CM, Kaufman EK, Wiley MR, Frey KG, et al. Genotyping and axenic growth of *Coxiella burnetii* isolates found in the United States environment. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2016; 16(9): 588-94.
16. Abou Abdallah R, Million M, Delerce J, Anani H, Diop A, Caputo A, et al. Pangenomic analysis of *Coxiella burnetii* unveils new traits in genome architecture. *Front Microbiol* 2022; 13: 1022356. (18 pages).
17. McLaughlin HP, Cherney B, Hakovirta JR, Priestley RA, Conley A, Carter A, et al. Phylogenetic inference of *Coxiella burnetii* by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One* 2017; 12(12): e0189910. (18 pages).
18. Hemsley CM, Essex-Lopresti A, Norville IH, Titball RW. Correlating genotyping data of *Coxiella burnetii* with genomic groups. *Pathogens* 2021; 10(5): 604. (17 pages).
19. Agerholm JS. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals--a critical review. *Acta Vet Scand* 2013; 55(1): 13. (11 pages).
20. Anderson A, Bijlmer H, Fournier PE, Graves S, Hartzell J, Kersh GJ, et al. Diagnosis and management of Q fever—United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR Recomm Rep* 2013; 62(RR-03): 1-30.
21. Van den Brom R, van Engelen E, Roest HIJ, van der Hoek W, Vellema P. *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Vet Microbiol* 2015; 181(1-2): 119-29.
22. Bauer AE, Johnson AJ, Weng HY, Pogranichniy RM, Moore GE. An evaluation of risk factors for infection with *Coxiella burnetii* in domestic goats. *Res Vet Sci* 2017; 114: 181-5.
23. Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol* 1998; 36(7): 1823-34.
24. Gomes MM, Chaves A, Gouveia A, Santos L. Two rare manifestations of Q fever: splenic

- and hepatic abscesses and cerebral venous thrombosis, with literature review ma non troppo. *BMJ Case Rep* 2014; 2014:bcr2013202843. (7 pages).
25. Brooke RJ, Kretzschmar ME, Mutters NT, Teunis PF. Human dose response relation for airborne exposure to *Coxiella burnetii*. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 488. (8 pages).
 26. Sangkasuwan V, Pongpradit P. SEATO medical research study on rickettsial diseases in Thailand. In: Annual research progress report. Bangkok, Thailand: US Army–SEATO Medical Research Unit; 1967. p. 499–504.
 27. Sangkasuwan V, Pongpradit P. SEATO medical research study on rickettsial diseases in Thailand. In: Annual research progress report. Bangkok, Thailand: US Army–SEATO Medical Research Unit; 1968. p. 444–448.
 28. Suputtamongkol Y, Rolain JM, Losuwanaruk K, Niwatayakul K, Suttinont C, Chierakul W, et al. Q fever in Thailand. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(9): 1186–7.
 29. Greiner AL, Bhengsri S, Million M, Edouard S, Thamthitiwat S, Clarke K, et al. Acute Q fever case detection among acute febrile illness patients, Thailand, 2002–2005. *Am J Trop Med Hyg* 2018; 98(1): 252–7.
 30. Pachirat O, Fournier PE, Pussadhamma B, Taksinachanekij S, Lulitanond V, Baggett HC, et al. The first reported cases of Q fever endocarditis in Thailand. *Infect Dis Rep* 2012; 4(1): e7. (2 pages).
 31. Yingst SL, Opaschaitat P, Kanitpun R, Thammasart S, Ekgatat M, Jirathanawat V, et al. Q fever surveillance in ruminants, Thailand, 2012. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(12): 2056–8.
 32. Rodtian P, Nuamjit M, Srijan M, Opaschaitat P, Ekgatat M. Q fever among dairy cattle in Chiang Mai Province, Thailand, 2012: a preliminary study. *OSIR* 2013; 6(4): 8–12.
 33. Doung-Ngern P, Chuxnum T, Pangjai D, Opaschaitat P, Kittiwat N, Rodtian P, et al. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies among ruminants and occupationally exposed people in Thailand, 2012–2013. *Am J Trop Med Hyg* 2017; 96(4): 786–90.
 34. Opaschaitat P, Ramrin L, Yingst SL. Epidemiology of Q fever in ruminants in the north-east and the north region of Thailand, 2012 to 2013. *KKU Vet J* 2018; 28(1): 19–25.
 35. Pangjai D, Wangroongsarb P, Boonmar S, Rukkwamsuk T. Seropositivity rate of *Coxiella burnetii* infection in cattle and goats raised in the upper north and central regions of Thailand during 2013–2015. *J Kasetsart Vet* 2021; 31(2): 79–88.
 36. Kidsin K, Panjai D, Boonmar S. The first report of seroprevalence of Q fever in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Phatthalung, Thailand. *Vet World* 2021; 14(9): 2574–8.
 37. Ratanapob N, Lertwatcharasarakul P, Jala S, Pangjai D, Vongtongsalee K, Rukkwamsuk T. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in goats from central and western Thailand: implications for zoonotic disease surveillance and control. *Vet Sci* 2025; 12(12): 1173. (9 pages).
 38. Rerkyusuke S, Lerk-U-Suke S, Sukon P, Phuektes P. Prevalence and risk factors of coxiellosis in meat goat herds: an epidemiological investigation in Northeastern Thailand. *Int J Vet Sci Med* 2024; 12(1): 60–70.
 39. Burns RJL, Douangngeun B, Theppangna W, Khounsy S, Mukaka M, Selleck PW, et al. Serosurveillance of coxiellosis (Q fever) and brucellosis in goats in selected provinces of Lao People's Democratic Republic. *PLoS Negl Trop Dis* 2018; 12(4): e0006411. (15 pages).
 40. Jones RM, Twomey DF, Hannon S, Errington J, Pritchard GC, Sawyer J. Detection of *Coxiella burnetii* in placenta and abortion

- samples from British ruminants using real-time PCR. *Vet Rec* 2010; 165(25): 965-7.
41. Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 2006; 22(21): 2688-90.
42. Xu ZY, Wang FN, Jian R, Xue J, Guo YC, Guo WP. Multiple spacer sequence typing of *Coxiella burnetii* carried by ticks in Gansu, China. *Front Vet Sci* 2024; 11: 1470242. (10 pages).
43. Lee YJ, Chae SJ, Kim B, Shin HS, Kwak SM, Jeong H, et al. First molecular typing of tick-derived *Coxiella burnetii* from wildlife in South Korea: surveillance and genetic characterization. *Transbound Emerg Dis* 2025; 2025: 2533438. (17 pages).
44. Bond KA, Vincent G, Wilks CR, Franklin L, Sutton B, Stenos J, et al. One Health approach to controlling a Q fever outbreak on an Australian goat farm. *Epidemiol Infect* 2016; 144(6): 1129-41.
45. Attia MM, Mahmoud HY, Ali AO, Fereig RM. *Coxiella burnetii* seroprevalence, risk factors, and health hazards in sheep and goats in Upper Egypt. *Ger J Vet Res* 2024; 4(1): 23-31.
46. Bauer BU, Knittler MR, Herms TL, Frangoulidis D, Matthiesen S, Tappe D, et al. Multispecies Q fever outbreak in a mixed dairy goat and cattle farm based on a new bovine-associated genotype of *Coxiella burnetii*. *Vet Sci* 2021; 8(11): 252. (15 pages).
47. Leahy E, Shome R, Deka RP, Sahay S, Grace D, Mazeri S, et al. Risk factors for *Brucella* spp. and *Coxiella burnetii* infection among small ruminant in Eastern India. *Infect Ecol Epidemiol* 2020; 10(1): 1783091. (9 pages).
48. Neare K, Tummeleht L, Lassen B, Viltrop A. *Coxiella burnetii* seroprevalence and associated risk factors in cattle, sheep, and goats in Estonia. *Microorganisms* 2023; 11(4): 819. (12 pages).
49. Di Domenico M, Curini V, De Massis F, Di Provvido A, Scacchia M, Cammà C. *Coxiella burnetii* in Central Italy: novel genotypes are circulating in cattle and goats. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014; 14(10): 710-5.

ความชุกและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Coxiella burnetii* ที่ตรวจพบในรกแพะ: นัยสำคัญต่อความเสี่ยงโรคไข้ควในคน

เดชา แปงใจ¹ รัตนา ตาเจริญเมือง¹ สิทธิพร ปานเม่น¹ มาสเกียรติ บุญยฤทธิ์¹ ณัฐพล นุชนท¹
ดาร์รัตน์ แบ่งดี¹ ชลลดา มีทรัพย์¹ กาญจนา สอนงบุญ¹ สุมาลี บุญมา² กำชัย กิจศิลป์³
และ อาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์⁴

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²วิทยาลัยสัตวแพทยศาสตร์อัครราชกุมารี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

³กลุ่มสุขภาพสัตว์ สำนักงานปศุสัตว์เขต 8 สุราษฎร์ธานี 84000

⁴สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ *Coxiella burnetii* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในเซลล์และก่อให้เกิดโรคไข้ควในคนและโรค coxiellosis ในสัตว์ โดยมีแพะเป็นแหล่งรังโรคสำคัญผ่านทางรกที่ปนเปื้อนเชื้อในปริมาณสูง อย่างไรก็ตามข้อมูลด้านระบาดวิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อในประเทศไทยยังมีจำกัด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความชุกเชิงชีวโมเลกุลและลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *C. burnetii* ในรกแพะในประเทศไทย ตัวอย่างรกแพะจำนวน 1,404 ตัวอย่าง เก็บจากฟาร์ม 26 แห่ง ใน 10 จังหวัด ครอบคลุมพื้นที่ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก และภาคใต้ ในปี พ.ศ. 2565 ทำการสกัดดีเอ็นเอและตรวจหาเชื้อ *IS1111* โดยวิธี real-time PCR จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกบางส่วนเพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี multispacer sequence typing (MST) และสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์แบบต่อรวมของตำแหน่งยีน 10 ตำแหน่ง ผลการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ *C. burnetii* ในอัตรา 27.64% (388/1,404) การวิเคราะห์ MST และสายวิวัฒนาการแสดงให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อในประเทศไทยอย่างชัดเจนและพบจีโนไทป์ใหม่ 3 ชนิด ได้แก่ MST94, MST95 และ MST96 ซึ่งมีความใกล้ชิดกับ MST85, MST27, MST28, MST31, MST55 และ MST77 ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ *C. burnetii* ที่ตรวจพบในรกแพะของประเทศไทยเป็นส่วนหนึ่งของสายพันธุ์โรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่แพร่กระจายข้ามภูมิภาค โดยเกี่ยวข้องกับวงจรการแพร่เชื้อแบบสัตว์เคี้ยวเอื้อง-เห็บ-มนุษย์ คล้ายกับที่รายงานในภูมิภาคยูเรเชียและยุโรป

คำสำคัญ: *Coxiella burnetii*, การจำแนกจีโนไทป์, Multispacer sequence typing, รกแพะ, ประเทศไทย

การเปรียบเทียบค่า Sigma Metrics และ Quality Goal Index (QGI) ของการทดสอบทางเคมีคลินิก โดยใช้ค่า Bias จาก Peer Group และ โครงการประเมินคุณภาพภายนอก (EQA)

ไชยา ก่องดวง และ พวิทย์ จิระวงศ์โรจน์

กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34000

บทคัดย่อ ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีบทบาทสำคัญในการประเมินผู้ป่วยมะเร็ง การควบคุมคุณภาพที่รวดเร็ว และแม่นยำ จึงเป็นสิ่งจำเป็น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินดัชนี Sigma metrics และดัชนีเป้าหมายคุณภาพ (Quality Goal Index, QGI) โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) จากการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control, IQC) และค่าความเอนเอียง (%Bias) จาก 2 แหล่งข้อมูล คือ กลุ่มเปรียบเทียบ (peer group) และโครงการประเมินคุณภาพ ภายนอก (External Quality Assessment, EQA) รูปแบบการวิจัยเป็นการศึกษาเชิงพรรณนาแบบย้อนหลัง ครอบคลุม รายการวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก 21 รายการ โดยวิเคราะห์จากสารควบคุมคุณภาพ 3 ระดับความเข้มข้น (รวม 63 ชุดข้อมูล) ณ โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี ระหว่างเดือนเมษายน ถึง กันยายน พ.ศ. 2568 โดยประเมินตามเกณฑ์ความคลาดเคลื่อน ที่ยอมรับได้มาตรฐาน CLIA 2025 และทดสอบความแตกต่างด้วยสถิติ Paired t-test ผลการศึกษาพบว่าพารามิเตอร์ ร้อยละ 52.38 มีสมรรถนะระดับดีเยี่ยมขึ้นไป ($\text{Sigma} \geq 5$) โดย potassium, triglycerides และ uric acid มีคุณภาพ ระดับโลก ($\text{Sigma} \geq 6$) ขณะที่ BUN, albumin และ total protein มีสมรรถนะต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับ ($\text{Sigma} < 3$) การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Sigma Peer (5.74 ± 2.90) และ Sigma EQA (5.95 ± 3.03) ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p = 0.1817$) การวิเคราะห์ด้วยดัชนี QGI พบว่าปัญหาหลักของรายการ BUN คือ ความไม่แม่นยำ (Inaccuracy) ส่วน glucose และ LDH คือ ความไม่เที่ยง (Imprecision) ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า ข้อมูล %Bias จาก peer group อาจนำมาใช้เป็นข้อมูลเสริมในการเฝ้าระวังคุณภาพเชิงวิเคราะห์แบบ near real-time เพื่อช่วยลดข้อจำกัดด้านความล่าช้า ของการรายงานผลจาก EQA นอกจากนี้การประยุกต์ใช้ QGI ช่วยระบุสาเหตุข้อผิดพลาดได้อย่างตรงจุด นำไปสู่การกำหนด กลยุทธ์การควบคุมคุณภาพที่เหมาะสมเพื่อยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยในการดูแลรักษาผู้ป่วยมะเร็งต่อไป

คำสำคัญ: Sigma metrics, ดัชนีเป้าหมายคุณภาพ, กลุ่มเปรียบเทียบ, การประเมินคุณภาพภายนอก, เคมีคลินิก

Corresponding author E-mail: chaiyaubch2565@gmail.com

Received: 3 March 2026

Revised: 10 June 2026

Accepted: 15 June 2026

บทนำ

ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการดูแลรักษาผู้ป่วย โดยเฉพาะในบริบทของโรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานีซึ่งเป็นสถานพยาบาลเฉพาะทาง ผลการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกไม่เพียงใช้ในการวินิจฉัยโรค และมีบทบาทในการประเมินความพร้อมของผู้ป่วยก่อนรับยาเคมีบำบัดและรังสีรักษารวมถึงการพยากรณ์โรค ดังนั้นความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของผลการตรวจ จึงเป็นปัจจัยชี้วัดความปลอดภัยและประสิทธิภาพการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง สอดคล้องกับมาตรฐาน ISO 15189:2022 ที่กำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องมีระบบประกันคุณภาพที่เข้มงวด ทั้งการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control, IQC) และการประเมินคุณภาพภายนอก (External Quality Assessment, EQA)⁽¹⁾ ในอดีตการควบคุมคุณภาพภายในมักอาศัยกฎของ Westgard multi-rules ร่วมกับกราฟ Levey-Jennings ซึ่งแม้จะเป็นมาตรฐานสากล^(2,3) แต่ในทางปฏิบัติมักพบปัญหาการเกิดสัญญาณเตือนที่ผิดพลาด (false rejection) นำไปสู่การทำงานซ้ำซ้อนและการสิ้นเปลืองทรัพยากร อีกทั้งประเมินระดับสมรรถนะที่แท้จริงของการทดสอบได้ยาก⁽⁴⁾ ปัจจุบันจึงมีการนำแนวคิดระดับซิกมา (Sigma metrics) มาประยุกต์ใช้เพื่อแปลงข้อมูลความเที่ยงที่แสดงค่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) และความแม่นยำที่แสดงค่าเป็นค่าความเอนเอียง (%Bias) ให้เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพเดียวที่เข้าใจง่าย และสามารถนำไปกำหนดกลยุทธ์การควบคุมคุณภาพที่เหมาะสมกับสมรรถนะของการทดสอบแต่ละรายการได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽⁵⁻¹⁰⁾ ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความแม่นยำของการคำนวณดัชนี Sigma metrics คือ ค่าความเอนเอียง (%Bias) โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการนิยมอ้างอิงค่าความเอนเอียงจากโครงการประเมินคุณภาพภายนอก (EQA) อย่างไรก็ตามการประเมินด้วย EQA มีข้อจำกัดบางประการ เนื่องจากค่าเป้าหมาย (assigned value) ของแต่ละโครงการขึ้นอยู่กับวิธีการกำหนดค่าและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ประเมิน ซึ่งอาจไม่ได้สะท้อนถึงค่ามาตรฐานสากลอ้างอิง (True international reference value) ในทุกกรณี

เสมอไป⁽¹¹⁾ นอกจากนี้รายงานผลจากโครงการ EQA มักมีระยะเวลาดำเนินการที่ล่าช้า ทำให้ห้องปฏิบัติการไม่สามารถตรวจจับและแก้ไขข้อผิดพลาดเชิงระบบได้ในทันที⁽¹²⁾

ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวข้อมูลค่าความเอนเอียงจากกลุ่มเปรียบเทียบ (peer group) ในโปรแกรม IQC ซึ่งเป็นการรวบรวมข้อมูลจากห้องปฏิบัติการที่ใช้เครื่องมือและน้ำยาชนิดเดียวกัน จึงถูกเสนอให้เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่มีศักยภาพสำหรับการเฝ้าระวังสมรรถนะเชิงวิเคราะห์แบบ real-time monitoring⁽¹³⁾ อย่างไรก็ตามการนำข้อมูลจาก peer group มาใช้อ้างอิงในการคำนวณดัชนีระดับซิกมาในบริบทของห้องปฏิบัติการระดับภูมิภาคและระดับประเทศ ยังคงต้องการการศึกษาเปรียบเทียบความสอดคล้องทางสถิติอย่างเป็นระบบ⁽¹⁴⁾ นอกจากนี้การทราบเพียงค่า Sigma metrics ที่ต่ำกว่าเกณฑ์อาจไม่เพียงพอต่อการแก้ปัญหา ดัชนีเป้าหมายคุณภาพ (Quality Goal Index, QGI) จึงถูกนำมาใช้วิเคราะห์เพื่อค้นหาสาเหตุ root cause ว่าความคลาดเคลื่อนเกิดจากความไม่เที่ยง (Imprecision) หรือความไม่แม่นยำ (Inaccuracy) หรือทั้งสองประการ เพื่อให้ห้องปฏิบัติการสามารถวางมาตรการแก้ไขได้ตรงจุด^(15,16)

ด้วยเหตุนี้ผู้นิพนธ์จึงมีความสนใจที่จะศึกษาการประเมินสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ด้วยดัชนี Sigma metrics และ QGI โดยเปรียบเทียบการใช้ค่า %Bias จาก peer group และ EQA ของการทดสอบทางเคมีคลินิกในห้องปฏิบัติการหน่วยตรวจวิเคราะห์เคมีคลินิกและภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี จึงได้ทำการศึกษาวิจัยนี้ขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ประเมินค่า Sigma metrics และ QGI ของการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก 2) เปรียบเทียบความสอดคล้องของค่า Sigma metrics ที่คำนวณโดยใช้ค่า Bias จาก peer group เทียบกับ EQA และ 3) วิเคราะห์หาสาเหตุหลักของข้อผิดพลาดในรายการวิเคราะห์ที่มีสมรรถนะต่ำด้วยค่า QGI เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพอย่างตรงจุด ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะช่วยยืนยันยืนยันความเป็นไปได้ในการใช้ข้อมูล peer group เพื่อการเฝ้าระวังคุณภาพ

แบบ real-time อันจะนำไปสู่การยกระดับมาตรฐานการ
ตรวจวิเคราะห์ให้มีความแม่นยำสูงสุด เพื่อความปลอดภัย
ของผู้ป่วยมะเร็ง

วัสดุและวิธีการ

รูปแบบการวิจัยและประชากรศึกษา

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนาแบบ
ย้อนหลัง (retrospective cross-sectional quality
control study) เพื่อประเมินสมรรถนะเชิงวิเคราะห์
ของห้องปฏิบัติการ ดำเนินการ ณ หน่วยตรวจวิเคราะห์
เคมีคลินิก และภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก กลุ่มงานพยาธิ
วิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมะเร็ง
อุบลราชธานี ข้อมูลที่นำมาศึกษาเป็นข้อมูลทุติยภูมิ
(secondary data) จากการปฏิบัติงานประจำ โดย
เก็บรวบรวมข้อมูลการควบคุมคุณภาพภายใน (IQC)
และการประเมินคุณภาพภายนอก (EQA) ในช่วง
ระยะเวลา 6 เดือน (ตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน พ.ศ. 2568 ถึง
วันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2568) ข้อมูลที่ใช้ในการประเมิน
ประกอบด้วย รายการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก
จำนวน 21 รายการ โดยแต่ละรายการมีการทดสอบ
สารควบคุมคุณภาพ 3 ระดับความเข้มข้น (Level 1, 2
และ 3) ทำให้เกิดเป็นชุดข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์
สมรรถนะรวมทั้งสิ้น 63 ชุดข้อมูล (63 Datasets)

เครื่องมือ สารเคมี และวัสดุควบคุมคุณภาพ

การศึกษานี้ใช้เครื่องวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก
อัตโนมัติรุ่น Beckman Coulter DxC 700 AU
(Beckman Coulter, Inc., USA) ร่วมกับน้ำยาตรวจ
วิเคราะห์สำเร็จรูป (Beckman Coulter, Japan) ซึ่ง
เป็นน้ำยาเฉพาะสำหรับเครื่องวิเคราะห์รุ่นดังกล่าว โดย
ปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด
สำหรับการบันทึก ประมวลผลข้อมูลการควบคุมคุณภาพ
ภายใน (IQC) และดึงข้อมูลจากกลุ่มเปรียบเทียบ (peer
group) ดำเนินการผ่านโปรแกรม Unity Real Time®
(Bio-Rad Laboratories, USA)

วัสดุควบคุมคุณภาพที่ใช้ในการศึกษาเป็นวัสดุ
ควบคุมคุณภาพทางการค้าชนิดทราบค่า (assayed control
material) ที่มีซีรัมของมนุษย์เป็นองค์ประกอบหลัก

(Human serum-based) ผลิตภัณฑ์ Lyphochek®
Assayed Chemistry Control (Bio-Rad Labora-
tories, USA) หมายเลขรุ่น 46020 โดยครอบคลุมช่วง
ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ ระดับที่ 1 (ความเข้มข้นปกติ)
ระดับที่ 2 (ความเข้มข้นผิดปกติปานกลาง) และระดับที่ 3
(ความเข้มข้นผิดปกติสูง) ซึ่งทำการรันเพื่อตรวจวิเคราะห์
เป็นประจำทุกวันทำการ

รายการวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกที่นำมาศึกษา
ในครั้งนี้ จำนวน 21 รายการ ได้แก่ glucose, total
cholesterol, creatinine, lactate dehydrogenase
(LDH), albumin, alanine aminotransferase
(ALT), alkaline phosphatase (ALP), total
bilirubin, aspartate aminotransferase (AST),
chloride, blood urea nitrogen (BUN), calcium,
HDL-cholesterol, magnesium, potassium,
phosphorus, total protein, LDL-cholesterol,
sodium, triglycerides และ uric acid

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) รวบรวม
จากผล IQC รายวันสะสม 6 เดือน ส่วนค่าความเอนเอียง
(%Bias) เปรียบเทียบจาก 2 แหล่งข้อมูล ได้แก่
แหล่งที่ 1 (peer group) ดึงค่าเฉลี่ยจากกลุ่มเปรียบเทียบ
ที่ใช้เครื่องมือและน้ำยาชนิดเดียวกันในโปรแกรม URT
แหล่งที่ 2 (EQA) ใช้ข้อมูลจากโครงการประเมิน
คุณภาพภายนอก (EQA) ของคณะกรรมการแพทย
มหาวิทยาลัยมหิดล โดยใช้ข้อมูลรายงานผล EQA เฉพาะ
รอบการประเมินที่อยู่ในช่วงเวลา 6 เดือนเดียวกันกับ
ข้อมูล IQC เพื่อให้สามารถจับคู่ข้อมูลกันได้อย่างถูกต้อง
ทางเวลา (time-matched data) สำหรับค่าเป้าหมาย
(target value) ของ EQA นั้น อ้างอิงจากค่าเฉลี่ย
ของกลุ่มเปรียบเทียบ (consensus mean) ในรอบ
การประเมินนั้นๆ และเกณฑ์ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับ
ได้ (Total Allowable Error, TEa) อ้างอิงตามเกณฑ์
มาตรฐาน Clinical Laboratory Improvement
Amendments (CLIA), CLIA 2025⁽¹¹⁾ เป็นหลัก
สำหรับรายการทดสอบที่ CLIA 2025 กำหนดเกณฑ์
เป็นค่าความเข้มข้นสัมบูรณ์ (เช่น target value

± ค่าเฉพาะ) ได้ทำการแปลงค่าให้อยู่ในรูปของร้อยละ (%TEa) ดังสมการที่ 1

$$\%TEa = \frac{\text{ค่าเฉพาะ/ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น}}{\text{ในระดับนั้น}} \times 100 \quad (1)$$

เพื่อให้สามารถนำไปคำนวณในสมการระดับซิกมาได้ หากรายการใดไม่มีในเกณฑ์ CLIA จะใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูล biological variation หรือแนวทางของ European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) ตามความเหมาะสม

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis)

การคำนวณค่าตัวแปรพื้นฐานทางสถิติของแต่ละรายการวิเคราะห์ในแต่ละระดับความเข้มข้นของสารควบคุมคุณภาพ ประกอบด้วย การประเมินค่าความไม่เที่ยง (Imprecision) ในรูปของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนร้อยละ (%CV) ซึ่งคำนวณจากผลการควบคุมคุณภาพภายใน (IQC) รายวันสะสม 6 เดือน ดังสมการที่ 2

$$\%CV = (SD/Mean) \times 100 \quad (2)$$

ค่าความไม่แม่นยำ (Inaccuracy) ประเมินในรูปของค่าความเอนเอียงร้อยละ (%Bias) โดยแยกคำนวณค่า %Bias จาก 2 แหล่งข้อมูล ดังสมการที่ 3 และ 4

$$\%Bias \text{ (Peer)} = [(Mean \text{ of Lab} - Mean \text{ of peer group}) / Mean \text{ of peer group}] \times 100 \quad (3)$$

$$\%Bias \text{ (EQA)} = [(Mean \text{ of Lab} - Target \text{ Value of EQA}) / Target \text{ Value of EQA}] \times 100 \quad (4)$$

เกณฑ์ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (TEa) อ้างอิงเกณฑ์มาตรฐานตาม CLIA 2025 เป็นหลัก สำหรับรายการที่ไม่มีระบุในเกณฑ์ CLIA จะใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลความแปรปรวนทางชีวภาพ (Biological Variation) หรือแนวทางของ EFLM (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) ตามความเหมาะสม⁽¹¹⁾ การประเมินระดับสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ด้วยระดับซิกมา (Sigma metrics) ดังสมการที่ 5

$$Sigma \text{ Metric} = (\%TEa - \%Bias) / \%CV \quad (5)$$

จำแนกระดับสมรรถนะเป็น 5 ระดับ ได้แก่ ระดับโลก (World Class, Sigma ≥ 6) ดีเยี่ยม (Excellent, Sigma 5 ถึง < 6) ดี (Good, Sigma 4 ถึง < 5) พอใช้ (Marginal, Sigma 3 ถึง < 4) และระดับที่ไม่ยอมรับ (Unacceptable, Sigma < 3) รายการทดสอบที่มีค่าระดับซิกมาต่ำกว่า 5 (Sigma < 5) ถูกนำมาคำนวณดัชนีเป้าหมายคุณภาพ (Quality Goal Index, QGI) เพื่อวิเคราะห์หาสาเหตุหลักของข้อผิดพลาด ดังสมการที่ 6

$$QGI = | \%Bias | / (1.5 \times \%CV) \quad (6)$$

เกณฑ์การแปลผล แบ่งเป็น 3 กรณี คือ QGI < 0.8 หมายถึง ปัญหาหลักเกิดจากความไม่เที่ยง (Imprecision), QGI > 1.2 หมายถึง ปัญหาหลักเกิดจากความไม่แม่นยำ (Inaccuracy) และ $0.8 \leq QGI \leq 1.2$ หมายถึง มีปัญหาแบบผสมทั้งสองประการ (Mixed error)^(15,16)

การวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดดำเนินการด้วยโปรแกรม Microsoft excel ร่วมกับโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ STATA และโปรแกรม R โดยใช้สถิติเชิงพรรณนาเพื่อนำเสนอข้อมูลพื้นฐานในรูปค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) การทดสอบสมมติฐานเริ่มต้นด้วยการทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วยสถิติ Shapiro-Wilk จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย Sigma metrics ระหว่างชุดข้อมูล Sigma Peer และ Sigma EQA ด้วยสถิติ paired *t*-test และสำหรับการประเมินระดับความสอดคล้อง (agreement) ของค่าระดับซิกมาทั้งสองแหล่ง เลือกใช้สถิติ Intraclass Correlation Coefficient (ICC) แบบ Two-way mixed-effects model ร่วมกับสถิติสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient, r) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

จริยธรรมการวิจัย

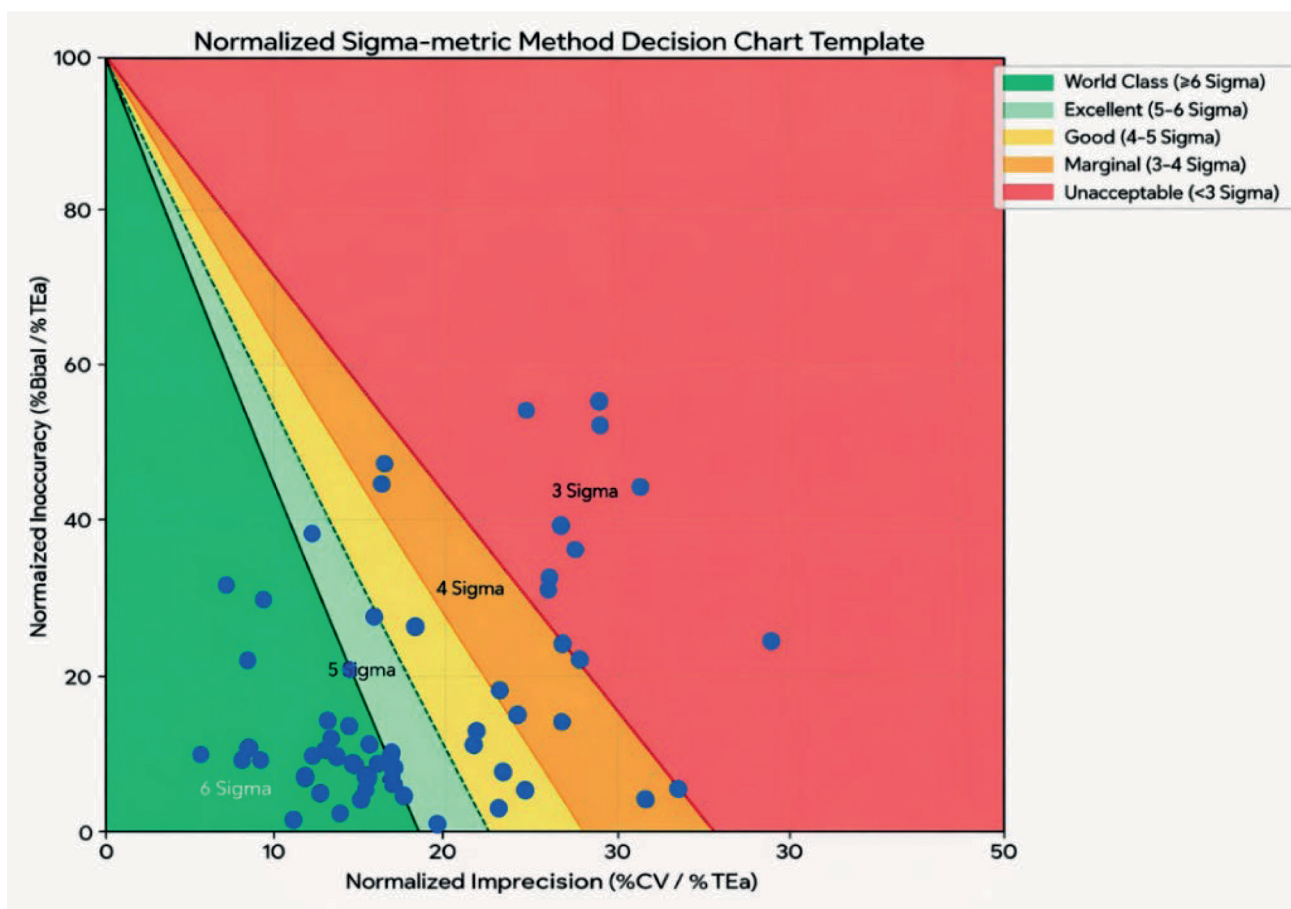
โครงการวิจัยนี้ได้รับการพิจารณาและรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี (รหัสโครงการ EC 017/2025) เมื่อวันที่ 28 พฤศจิกายน พ.ศ. 2568 โดยผู้วิจัยได้ดำเนินการตามหลักจริยธรรม

การวิจัยอย่างเคร่งครัด ข้อมูลที่นำมาศึกษาเป็นข้อมูลผลการตรวจสอบคุณภาพที่ไม่ระบุตัวตนของผู้ป่วย จึงไม่มีความเสี่ยงต่ออาสาสมัครหรือผู้ป่วย

ผล

ผลการประเมินระดับสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ด้วยดัชนี Sigma metrics จากการวิเคราะห์สมรรถนะเชิงวิเคราะห์ของพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก 21 รายการ ใน 3 ระดับความเข้มข้นสารควบคุมคุณภาพ (รวม 63 ชุดข้อมูล) โดยอ้างอิงเกณฑ์ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (TEa) ตามมาตรฐาน CLIA 2025 พบว่าชุดข้อมูลร้อยละ 58.73 มีสมรรถนะอยู่ในระดับดีเยี่ยมขึ้นไป ($\text{Sigma} \geq 5$) โดยแบ่งเป็นระดับ World Class

($\text{Sigma} \geq 6$) จำนวน 27 ชุดข้อมูล (ร้อยละ 42.86) และระดับ Excellent ($\text{Sigma} 5 \text{ ถึง } < 6$) จำนวน 10 ชุดข้อมูล (ร้อยละ 15.87) ในขณะที่กลุ่มสมรรถนะระดับ Good ($\text{Sigma} 4 \text{ ถึง } < 5$) พบจำนวน 7 ชุดข้อมูล (ร้อยละ 11.11) ระดับ Marginal ($\text{Sigma} 3 \text{ ถึง } < 4$) จำนวน 6 ชุดข้อมูล (ร้อยละ 9.52) และระดับ Unacceptable ($\text{Sigma} < 3$) พบจำนวน 13 ชุดข้อมูล (ร้อยละ 20.64) พารามิเตอร์ที่มีสมรรถนะระดับ World Class ครบทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ potassium, triglycerides, chloride และ calcium การกระจายตัวของพิกัดสมรรถนะ ดังแสดงในภาพที่ 1 มีรายละเอียดค่า %CV, %Bias และระดับ Sigma ของแต่ละรายการ ดังแสดงในตารางที่ 1 และสรุปจำนวนรายการแยกตามระดับสมรรถนะ ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 1 Normalized Sigma-metric method decision chart แสดงสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ของรายการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก จำนวน 21 รายการ ในสารควบคุมคุณภาพทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น (Level 1, 2 และ 3) โดยประเมินจากค่าความเอนเอียง (%Bias) ของกลุ่มเปรียบเทียบ (peer group) และอ้างอิงเกณฑ์ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (TEa) ตามมาตรฐาน CLIA 2025

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของสารควบคุมคุณภาพภายในระดับ 1, 2 และ 3 ค่าความเอนเอียง (%Bias) และค่าเฉลี่ยระดับซิกมา (Sigma) ที่ประเมินจากแหล่ง peer group และ EQA เปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน CLIA 2025 สำหรับรายการตรวจวิเคราะห์ จำนวน 21 รายการ

Parameter	%CV	%CV	%CV	%Bias	%Bias	Sigma	Sigma	TEa
	L1	L2	L3	(peer group)	(EQA)	Peer	EQA	(CLIA 2025)
Albumin	2.47	2.08	2.16	-3.06	-0.29	2.23	3.47	8
Alkaline Phosphatase	5.3	3.12	3.16	8.95	3.04	3.03	4.67	20
ALT (ALAT/GPT)	2.75	2.19	2.18	-0.6	0.21	6.12	6.31	15
AST (ASAT/GOT)	2.06	1.94	1.71	1.74	2.38	7.04	6.67	15
Bilirubin, Total/TBIL	6.46	2.35	1.73	1.53	-0.14	7.08	7.67	20
Calcium	1.36	1.19	1.17	0.52	0.91	8.72	8.72	TV ±1.0 mg/dL
Chloride	0.61	0.66	0.53	0.03	-1.17	8.24	6.44	5
Cholesterol, HDL	3.23	2.96	3.05	-2	-0.56	5.52	6.32	20
Cholesterol, LDL	2.37	2.28	2.14	2.04	1.56	7.56	8.16	20
Cholesterol, Total	2.21	1.39	1.61	-0.71	0.08	5.55	5.93	10
Creatinine	3.05	2.21	1.75	-1.33	-3.02	3.71	3.15	10
Glucose	1.65	1.24	1.12	-1.36	0.08	5.07	6.09	8
LD (Lactate Dehydrogenase)	3.8	3.49	2.51	1.14	1.15	4.2	4.38	15
Magnesium	2.42	1.86	1.88	-1.45	-6.31	6.67	4.3	15
Phosphorus	3.87	2.04	1.27	-1.49	0.21	4.45	5.01	10
Potassium	0.62	0.61	0.62	0.71	1	11.51	11.04	TV ±0.3 mmol/L
Protein, Total, Serum	2.19	2.1	2.02	-1.94	1.12	2.88	3.27	8
Sodium	0.82	0.74	0.56	0.32	1.08	3.88	2.73	TV ±4 mmol/L
Triglycerides	1.39	1.19	1.06	-4.05	0.56	9.13	12.05	15
Urea Nitrogen	2.2	2.56	2.56	-4.78	-3.64	1.74	2.21	9
Uric Acid	1.6	1.37	1.44	0.86	0.68	6.24	6.37	10

หมายเหตุ: L1, L2, L3 = Level 1, 2, 3 (ระดับความเข้มข้นที่ 1, 2, 3), CV = Coefficient of Variation (สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน), EQA = External Quality Assessment (โครงการประเมินคุณภาพภายนอก), TEa = Total Allowable Error (เกณฑ์ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้), TV = Target Value (ค่าเป้าหมาย) และ ค่าเฉลี่ย Sigma คำนวณจากการนำค่า Sigma ของแต่ละระดับความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ยรวมกัน

ตารางที่ 2 จำนวนและร้อยละของรายการวิเคราะห์จำแนกตามระดับสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ (Sigma metrics) ในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยใช้ค่าความเอนเอียง (%Bias) จากกลุ่มเปรียบเทียบ (n = 63 ชุดข้อมูล)

Lists Parameter	Performance level	ระดับ Sigma metric	n(%)
total cholesterol (L2), ALT (L2, L3), AST (L2, L3), total bilirubin (L2, L3), chloride (L1, L2, L3), calcium (L1, L2, L3), HDL-cholesterol (L2), magnesium (L2, L3), potassium (L1, L2, L3), phosphorus (L3), LDL-cholesterol (L2, L3), triglycerides (L1, L2, L3), uric acid (L2, L3)	World class	≥ 6	27(42.86)
glucose (L2, L3), total cholesterol (L3), LDH (L3), ALT (L1), AST (L1), HDL-cholesterol (L1), magnesium (L1), LDL-cholesterol (L1), uric acid (L1)	Excellent	5-6	10(15.87)

ตารางที่ 2 จำนวนและร้อยละของรายการวิเคราะห์จำแนกตามระดับสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ (Sigma metrics) ในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยใช้ค่าความเอนเอียง (%Bias) จากกลุ่มเปรียบเทียบ (n = 63 ชุดข้อมูล) (ต่อ)

Lists Parameter	Performance level	ระดับ Sigma metric	n(%)
glucose (L1), total cholesterol (L1), creatinine (L3), LDH (L2), HDL-cholesterol (L3), phosphorus (L2), sodium (L3)	Good	4-5	7(11.11)
creatinine (L1, L2), alkaline phosphatase (L2, L3), sodium (L1, L2)	Marginal	3-4	6(9.52)
LDH (L1), albumin (L1, L2, L3), alkaline phosphatase (L1), total bilirubin (L1), BUN (L1, L2, L3), phosphorus (L1), total protein (L1, L2, L3)	Unacceptable	< 3	13(20.64)
Total			63(100.00)

หมายเหตุ: L1, L2, L3 = Level 1, 2, 3 (ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมคุณภาพที่ 1, 2, 3)

ผลการเปรียบเทียบค่าระดับซิกมาระหว่าง Sigma Peer และ Sigma EQA ผลการทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วยสถิติ Shapiro-Wilk พบว่าค่าระดับซิกมาทั้งจากแหล่ง peer group และ EQA มีการแจกแจงแบบปกติ ($p > 0.05$) ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าค่าเฉลี่ยระดับซิกมาจากแหล่ง peer group เท่ากับ 5.74 ± 2.90 และจากแหล่ง EQA เท่ากับ 5.95 ± 3.03 เมื่อทดสอบด้วยสถิติ paired t-test เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับซิกมาจากทั้งสองแหล่งไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($t = -1.3508$, $p = 0.1817$) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์พบว่าค่าระดับซิกมาจากทั้งสองแหล่งมีความสอดคล้องกันในระดับสูงมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Pearson correlation coefficient, $r = 0.916$, $p < 0.001$)

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบค่าทางสถิติของ Sigma metrics ระหว่าง peer group และ EQA (n = 63)

ข้อมูลความเอนเอียง (Bias)	Mean±SD	Mean Difference	p-value (Paired t-test)	Correlation (r)
Sigma peer group	5.74±2.90	-0.21	0.1817	0.916 ($p < 0.001$)
Sigma EQA	5.95±3.03			

ผลการวิเคราะห์สาเหตุของข้อผิดพลาดด้วยดัชนีเป้าหมายคุณภาพ (QGI) สำหรับพารามิเตอร์ที่มีสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ต่ำกว่าเกณฑ์ระดับดีเยี่ยม ($\text{Sigma} < 5$) ได้นำมาวิเคราะห์ Root cause analysis ด้วยดัชนี QGI ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าสาเหตุหลักของข้อผิดพลาดมาจากปัญหาความไม่เที่ยง (Imprecision, $\text{QGI} < 0.8$) จำนวน 29 กรณี (ร้อยละ 55.77) ปัญหา

แบบผสม (Mixed Error, $\text{QGI} 0.8-1.2$) จำนวน 14 กรณี (ร้อยละ 26.92) และปัญหาความไม่แม่นยำ (Inaccuracy, $\text{QGI} > 1.2$) จำนวน 9 กรณี (ร้อยละ 17.31) โดยพารามิเตอร์ที่พบปัญหาความไม่แม่นยำเป็นปัจจัยหลัก ได้แก่ BUN, Magnesium, Alkaline Phosphatase และ Sodium ในบางระดับความเข้มข้น

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์สาเหตุของข้อผิดพลาดและแนวทางปรับปรุงคุณภาพตามดัชนีเป้าหมายคุณภาพ (QGI) สำหรับรายการตรวจที่มีระดับ Sigma metric < 5

ประเภท ข้อผิดพลาด	เกณฑ์ดัชนี QGI	จำนวน (ร้อยละ)	รายการวิเคราะห์ (Analytes)	แนวทางการปรับปรุง ที่แนะนำ
ความไม่แม่นยำ (Imprecision)	< 0.8	29 (55.77%)	glucose, LDH, total protein, phosphorus (L1, 2), total bilirubin (L1), creatinine (L1), total cholesterol (L1)	ตรวจสอบความเสถียรของน้ำยา, ระบบการดูดจ่ายสาร (Auto pipette) และการบำรุงรักษา เครื่องมือ (PM)
ความไม่ถูกต้อง (Inaccuracy)	> 1.2	9 (17.31%)	BUN (peer group), magnesium (EQA), ALP (L2, 3), sodium (L3 EQA)	ดำเนินการสอบเทียบใหม่ (Recalibration), ตรวจสอบ ความแตกต่างของน้ำยา แต่ละรุ่น และค่ามาตรฐาน (Traceability)
ปัญหาผสม (Mixed Error)	0.8–1.2	14 (26.92%)	sodium (EQA L1, 2), albumin (peer group), BUN (EQA), creatinine (L2, 3), ALP (L1 Peer)	ปรับปรุงความแม่นยำ (Precision) เป็นลำดับแรก เนื่องจากแก้ไขได้ง่ายกว่า แล้ว จึงตรวจสอบระบบการสอบเทียบ

วิจารณ์

การประเมินสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ด้วยดัชนี Sigma metrics และดัชนี QGI ในหน่วยตรวจเคมีคลินิก โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี เป็นการวิเคราะห์เชิงรุกโดยใช้เกณฑ์ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ตามมาตรฐาน CLIA 2025 ซึ่งมีความเข้มงวดสูงกว่าเกณฑ์เดิม^(1,11) ผลการศึกษาพบว่ารายการตรวจถึงร้อยละ 58.73 มีสมรรถนะอยู่ในระดับดีเยี่ยมขึ้นไป (Sigma ≥ 5) โดยเฉพาะกลุ่มรายการ potassium, triglycerides, chloride และ calcium ที่สามารถรักษาคุณภาพระดับ World Class (Sigma ≥ 6) ได้ในทุกระดับความเข้มข้น⁽³⁾ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Geto Z และคณะ⁽¹⁴⁾ Kumar BV และคณะ⁽¹³⁾ Luo Y และคณะ⁽¹⁷⁾ รวมถึง Panda CR และคณะ⁽¹⁸⁾ ที่ระบุว่าพารามิเตอร์ กลุ่มอิเล็กโทรไลต์ และไขมัน มักมีค่าสมรรถนะสูง เนื่องจากระบบการวิเคราะห์มีความเสถียรและมีค่าความแปรปรวนแบบสุ่ม (random error) ต่ำ การที่พารามิเตอร์มีสมรรถนะสูงเช่นนี้ ช่วยให้ห้องปฏิบัติการสามารถออกแบบกลยุทธ์การควบคุมคุณภาพที่เน้นความคุ้มค่า (cost-effective,

QC) โดยการปรับลดความถี่ในการรันสารควบคุมคุณภาพและเลือกใช้กฎเดียว 13s ซึ่งช่วยลดต้นทุนด้านน้ำยาและเวลาได้อย่างมีนัยสำคัญโดยไม่ลดทอนมาตรฐานความปลอดภัยของผู้ป่วย⁽¹⁵⁾

ประเด็นที่เป็นข้อค้นพบสำคัญของงานวิจัยนี้ คือ การพิสูจน์ทางสถิติเพื่อยืนยันว่าห้องปฏิบัติการสามารถใช้ข้อมูลค่าความเอนเอียง (%Bias) จากกลุ่มเปรียบเทียบ (peer group) แทนข้อมูลจากการประเมินคุณภาพภายนอก (EQA) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการวิเคราะห์ที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าเฉลี่ย Sigma Peer และ Sigma EQA ($p = 0.1817$) ประกอบกับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สอดคล้องกันในระดับที่สูงมาก ($r = 0.916$, $p < 0.001$) เป็นหลักฐานเชิงประจักษ์ที่สนับสนุนสมมติฐานที่ว่าข้อมูลจาก peer group ซึ่งมาจากกลุ่มผู้ใช้เครื่องวิเคราะห์ และน้ำยาชนิดเดียวกัน (homogeneity) มีความน่าเชื่อถือเพียงพอในการประเมินสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ประจำวัน⁽¹²⁾ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับหลักการประเมินคุณภาพที่กำหนดให้ห้องปฏิบัติการใช้ข้อมูลจากการควบคุมคุณภาพภายในและการประเมินคุณภาพภายนอกร่วมกัน โดย

Sciacovelli L และคณะ⁽¹⁶⁾ ระบุว่า EQA เป็นเครื่องมือสำคัญในการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการ และเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ แต่ผล EQA แต่ละรอบสะท้อนสมรรถนะ ณ ช่วงเวลาหนึ่ง และความทันเวลาของรายงานเป็นองค์ประกอบสำคัญที่กำหนดประโยชน์ของระบบ ดังนั้นการติดตามข้อมูลจาก peer group อย่างต่อเนื่องอาจช่วยสนับสนุนการเฝ้าระวังแนวโน้มความเอนเอียงระหว่างรอบการรายงานผล EQA และช่วยให้ห้องปฏิบัติการตรวจพบความผิดปกติและดำเนินการแก้ไขได้รวดเร็วยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม ข้อมูลจาก peer group ควรใช้เป็นข้อมูลเสริมร่วมกับ IQC และ EQA แต่ไม่ควรนำมาใช้ทดแทน EQA โดยสมบูรณ์

สำหรับการวิเคราะห์สาเหตุเพื่อยกระดับคุณภาพอย่างตรงจุด ในกลุ่มพารามิเตอร์ที่มีสมรรถนะต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับ ($\text{Sigma} < 5$) เช่น BUN, albumin และ total protein การวิเคราะห์ด้วยดัชนี QGI ช่วยให้เห็นทิศทางการแก้ไขได้อย่างเด่นชัด โดยพารามิเตอร์ BUN พบปัญหาหลักด้านความไม่แม่นยำ (Inaccuracy) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Goel P และคณะ⁽¹⁹⁾ และ Panchal KR และคณะ⁽²⁰⁾ ที่ระบุว่าความคลาดเคลื่อนเชิงระบบเช่นนี้มักเกิดจากความไม่เสถียรของระบบการสอบเทียบ (Calibration instability) หรือความแตกต่างของน้ำยาในแต่ละรุ่นผลิต (Lot-to-lot variation) ในบริบทของโรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี ความน่าเชื่อถือของผลตรวจ BUN, albumin และ total protein มีความสำคัญต่อการติดตามผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัด โดย BUN เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของไตที่ใช้ในทางคลินิก อย่างไรก็ตามค่านี้อาจได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับไต จึงควรแปลผลร่วมกับ serum creatinine, eGFR และข้อมูลทางคลินิกอื่น ส่วน albumin และ total protein สามารถสะท้อนความผิดปกติของโปรตีนในเลือดที่พบในผู้ป่วยระหว่างการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดได้ ดังนั้นการควบคุมความแม่นยำและความเที่ยงของผลการตรวจเหล่านี้จึงมีความสำคัญต่อความน่าเชื่อถือของผลตรวจและความปลอดภัยของผู้ป่วย^(21,22)

สรุป

การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ระดับซิกมา (Sigma metrics) ที่คำนวณจากค่าความเอนเอียงของกลุ่มเปรียบเทียบ (peer group) มีความสอดคล้องทางสถิติกับข้อมูลจากการประเมินคุณภาพภายนอก (EQA) ในรายการตรวจวิเคราะห์เคมีคลินิกส่วนใหญ่ ข้อมูลจาก peer group จึงอาจสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเสริมเพื่อสนับสนุนการเฝ้าระวังสมรรถนะเชิงวิเคราะห์แบบ near real-time ในช่วงระหว่างรอบการรายงานผลของโครงการ EQA ซึ่งช่วยให้ห้องปฏิบัติการสามารถตรวจจับแนวโน้มความคลาดเคลื่อนเชิงระบบได้รวดเร็วยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้มีข้อจำกัดเนื่องจากการศึกษา ณ ห้องปฏิบัติการเพียงแห่งเดียว ในระยะเวลาที่จำกัด และโครงสร้างข้อมูลบางส่วนมีความสัมพันธ์กัน จึงขอย้ำว่าข้อมูลจากกลุ่มเปรียบเทียบไม่ควรนำมาใช้ทดแทนการประเมินคุณภาพภายนอก (EQA) อย่างเบ็ดเสร็จ เนื่องจาก EQA ยังคงเป็นเครื่องมือมาตรฐานหลักในการยืนยันความแม่นยำ (Accuracy) และความสอดคล้องกับค่าความจริงสากล ห้องปฏิบัติการควรใช้ทั้งสองระบบควบคู่กันเพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการประกันคุณภาพและความปลอดภัยของผู้ป่วย

การใช้ปัญญาประดิษฐ์

ในการจัดเตรียมต้นฉบับบทความวิจัยฉบับนี้ได้มีการใช้เครื่องมือปัญญาประดิษฐ์ Gemini (Google, USA) และ ChatGPT (OpenAI, USA) เพื่อวัตถุประสงค์ในการช่วยขัดเกลาสำนวนภาษา ตรวจสอบความถูกต้องทางไวยากรณ์ และเรียบเรียงคำศัพท์เทคนิคให้มีความสละสลวยตามมาตรฐานสากล ทั้งนี้ขอยืนยันว่าปัญญาประดิษฐ์ไม่ได้ถูกนำมาใช้ในฐานะผู้นิพนธ์ร่วม และไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้างข้อมูลวิจัย การวิเคราะห์ผลทางสถิติ หรือการแปลผลการวิจัยแต่ประการใด ผู้นิพนธ์ได้ทำการทบทวนและตรวจสอบความถูกต้องของเนื้อหาทั้งหมดด้วยตนเอง รวมทั้งเป็นผู้รับผิดชอบต่อการถูกต้องและความสมบูรณ์ของบทความฉบับนี้แต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการโรงพยาบาลมะเร็ิง
อุบลราชธานี ที่สนับสนุนงบประมาณในการดำเนิน
โครงการวิจัย ขอขอบคุณ หัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยา
คลินิกและเทคนิคการแพทย์ สำหรับคำปรึกษาและ
ข้อเสนอแนะ ขอขอบคุณ บุคลากรในหน่วยตรวจวิเคราะห์
เคมีคลินิก และภูมิคุ้มกันทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการ
รวบรวมข้อมูล และขอขอบคุณ โครงการประเมินคุณภาพ
ภายนอก (EQA) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย
มหิดล และกลุ่มเปรียบเทียบ (peer group) สำหรับ
ข้อมูลคุณภาพที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. International Organization for Standardization. ISO 15189:2022 medical laboratories—requirements for quality and competence. Geneva: International Organization for Standardization; 2022.
2. Charuraks N. Quality control laboratory by multirule: basic level. Samut Prakan: L.T. Art Printing; 2008.
3. Westgard JO, Westgard SA. Establishing evidence-based statistical quality control practices. Am J Clin Pathol 2019; 151(4): 364–70.
4. Gruber L, Hausch A, Mueller T. Internal quality controls in the medical laboratory: a narrative review of the basic principles of an appropriate quality control plan. Diagnostics 2024; 14(19): 2223. (16 pages).
5. Satsuk C, Treebuphachatsakul W, Kongros K, Chuaychoo P, Tabklai U, Apiratmateekul N. Performance evaluations and costs for internal quality control of the hematology laboratories in regional hospitals by using sigma metrics. J Med Tech Assoc Thailand 2022; 50(2): 8136–56.

6. Sirithansakul T. Assessment of hematology and clinical chemistry laboratory performance by six sigma metric; department of medical technology, Trang Hospital. J Med Tech Assoc Thailand 2018; 46(1): 6349–74.
7. Bankluai C, Waree P. Quality control and assessment in clinical chemistry and clinical hematology laboratory using sigma metric. J Somdet Chaopraya Inst Psychiatry 2020; 14(2): 29–47.
8. Kumproa N, Vanavan S, Promnuch S, Srisawasdia P. Sigma metric as an essential tool for quality management: case study from serum total carbon-dioxide. J Med Tech Assoc Thailand 2019; 47(2): 7016–26.
9. Yanpanich V, Duangdee C, Kunsombat J. Application of sigma metrics for the assessment and modification of quality control in clinical chemistry laboratory of hospital for tropical diseases. Vajira Med J 2020; 64(6): 411–8.
10. Meekaewnoi Y. Quality control assessment of clinical chemistry laboratory competency by six sigma method at medical technology department, Samutprakan Hospital. J Singburi Hosp 2017; 26(2): 45–52.
11. Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS). Clinical laboratory improvement amendments of 1988 (CLIA) proficiency testing regulations related to analytes and acceptable performance. Fed Regist 2022; 87(131): 41194–242.
12. Çevlik T, Haklar G. Six Sigma evaluation of 17 biochemistry parameters using bias calculated from internal quality control and external quality assurance data. J Med Biochem 2024; 43(1): 43–9.

13. Kumar BV, Mohan T. Sigma metrics as a tool for evaluating the performance of internal quality control in a clinical chemistry laboratory. *J Lab Physicians* 2018; 10(2): 194-9.
14. Geto Z, Getahun T, Lejisa T, Tolcha Y, Bikila D, Bashea C, et al. Evaluation of sigma metrics and westgard rule selection and implementation of internal quality control in clinical chemistry reference laboratory, Ethiopian Public Health Institute. *Indian J Clin Biochem* 2022; 37(3): 285-93.
15. Westgard JO, Westgard SA. The quality of laboratory testing today: an assessment of sigma metrics for analytic quality using performance data from proficiency testing surveys and the CLIA criteria for acceptable performance. *Am J Clin Pathol* 2006; 125(3): 343-54.
16. Sciacovelli L, Secchiero S, Zardo L, Plebani M. The role of the external quality assessment. *Biochem Med* 2010; 20(2): 160-4.
17. Luo Y, Yan X, Xiao Q, Long Y, Pu J, Li Q, et al. Application of sigma metrics in the quality control strategies of immunology and protein analytes. *J Clin Lab Anal* 2021; 35(11): e24041. (8 pages).
18. Panda CR, Kumari S, Mangaraj M, Nayak S. The evaluation of the quality performance of biochemical analytes in clinical biochemistry laboratory using six sigma matrices. *Cureus* 2023; 15(12): e51386. (10 pages).
19. Goel P, Malik G, Prasad S, Rani I, Manhas S, Goel K. Analysis of performance of clinical biochemistry laboratory using Sigma metrics and Quality Goal Index. *Pract Lab Med* 2020; 23: e00195. (6 pages).
20. Panchal KR, Vaghasiya ND, Vasava SH, Patel DS. Achieving high standards in clinical biochemistry: integrating six sigma, quality goal index (QGI), and operating specifications (OPSspecs) for targeted quality enhancement. *Cureus* 2024; 16(11): e74693. (14 pages).
21. Griffin BR, Faubel S, Edelstein CL. Biomarkers of drug-induced kidney toxicity. *Ther Drug Monit* 2019; 41(2): 213-26
22. Abbasi B, Hayat A, Lyons M, Gupta A, Gupta S. Serum protein and electrolyte imbalances are associated with chemotherapy induced neutropenia. *Heliyon* 2022; 8(7): e09949. (13 pages).

Comparison of Sigma Metrics and Quality Goal Index (QGI) of Clinical Chemistry Tests Using Bias from Peer Group and External Quality Assessment (EQA)

Chaiya Kongduang and Piwan Jirawongviroj

*Department of Clinical Pathology and Medical Technology, Ubon Ratchathani Cancer Hospital,
Ubon Ratchathan 34000, Thailand*

ABSTRACT Medical laboratories are crucial in cancer patient care, requiring accurate and timely quality control. This retrospective descriptive study aimed to evaluate Sigma metrics and the quality goal index (QGI) by utilizing the coefficient of variation (%CV) derived from internal quality control (IQC) and percentage bias (%Bias) obtained from two sources: a peer group and an external quality assessment (EQA) program. The study encompassed 21 clinical chemistry parameters analyzed across 3 levels of quality control materials (totaling 63 datasets) at Ubon Ratchathani Cancer Hospital from April to September 2025. Sigma metrics were evaluated using CLIA 2025 total allowable error limits, and differences were analyzed using a paired t-test. Results indicated that 52.38% of parameters achieved excellent performance or higher ($\text{Sigma} \geq 5$). Potassium, triglycerides, and uric acid demonstrated world-class levels ($\text{Sigma} \geq 6$), whereas BUN, albumin, and total protein were unacceptable ($\text{Sigma} < 3$). Crucially, there was no statistically significant difference between the mean Sigma Peer (5.74 ± 2.90) and Sigma EQA (5.95 ± 3.03) ($p = 0.1817$). QGI analysis identified inaccuracy as the primary error source for BUN, and imprecision for glucose and LDH. These findings suggest that %Bias from a peer group may serve as a supplementary tool for near real-time analytical quality monitoring, potentially mitigating the reporting delays associated with EQA. Furthermore, integrating QGI facilitates precise root-cause analysis, enabling laboratories to develop tailored quality control strategies and elevate the safety standards of cancer patient care.

Keywords: Sigma metrics, Quality goal index, Peer group, External quality assessment, Clinical chemistry

การตรวจ NAT2-diplootyping ด้วยวิธี Real-time PCR

ทิพย์รัตน์ โพธิพิทักษ์¹ นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา² ปติดา ประครองทรัพย์¹ วิมาลา อินอุ่นโชติ¹
สุริศเมธ มหาศิริมงคล³ และ สุกัญญา วัฒนาโกคยกิจ¹

¹สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญาไท 11000

²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญาไท 11000

³สำนักโครงการพระราชดำริ โครงการเฉลิมพระเกียรติ และกิจกรรมพิเศษ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ถนนพญาไท 11000

บทคัดย่อ เอนไซม์ N-acetyltransferase 2 (NAT2) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อย Isoniazid ซึ่งเป็นยารักษาวัณโรค ผู้ที่มียีน NAT2 ที่มีการย่อยยาช้า (slow acetylator) มีโอกาสเกิดภาวะตับอักเสบจากการใช้ยาวัณโรคสูงกว่าผู้ที่มียีน NAT2 ในอัตราปกติ (intermediate acetylator) และย่อยยาเร็ว (rapid acetylator) ถึง 8.8 เท่า โดยความสามารถในการย่อยยาของยีน NAT2 นี้สามารถแปลผลได้จากการตรวจ NAT2-diplootyping และแพทย์สามารถใช้ผลเพื่อพิจารณาปรับขนาดยา Isoniazid การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจ NAT2-diplootyping จากวิธี PCR ที่เปิดให้บริการอยู่เป็นวิธี Real-time PCR คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา (optimization) ได้แก่ ความเข้มข้นไพรเมอร์และไพรเมอร์ อุณหภูมิ และเวลาการทำปฏิกิริยา โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบผล NAT2-diplootyping จากการทำ phase analysis จนได้วิธีการที่มีช่วงการตรวจดีเอ็นเอ (detection range) เท่ากับ 5–150 ng/μL ผลการเปรียบเทียบกับวิธี PCR โดยตรวจตัวอย่าง จำนวน 138 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลตรวจชนิดของ NAT2 haplotypes ในตัวอย่างทั้งหมด สอดคล้องกันร้อยละ 100 ดังนั้นการตรวจ NAT2-diplootyping ด้วยวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำมาใช้ทดแทนการตรวจด้วยวิธี PCR ได้ ทำให้ได้ผลการตรวจที่รวดเร็ว และสะดวกกับผู้ปฏิบัติงานมากขึ้น

คำสำคัญ: NAT2-diplootyping, ไอโซไนอาซิด, Real-time PCR, PCR, Acetylator

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

Received: 20 February 2026

Revised: 16 June 2026

Accepted: 22 June 2026

บทนำ

วัณโรคยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก⁽¹⁾ โดยยาไอโซไนอาซิด (Isoniazid: INH) ซึ่งเป็นยาหลักในการรักษาวัณโรค มีการเมแทบอลิซึมผ่านเอนไซม์ N-acetyltransferase 2 (NAT2) ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและมีความถี่แตกต่างกันในแต่ละประชากร⁽¹⁾ ความแปรผันทางพันธุกรรมของ NAT2 ส่งผลให้ผู้ป่วยมีความสามารถในการกำจัดยาแตกต่างกัน โดยแบ่งเป็นกลุ่มกำจัดยาช้า (slow acetylator: SA) กลุ่มกำจัดปานกลาง (intermediate acetylator: IA) และกลุ่มกำจัดยาเร็ว (rapid acetylator: RA)⁽²⁾ ผู้ป่วยกลุ่ม SA มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดภาวะตับอักเสบจากการใช้ยา (anti-tuberculosis drug-induced liver injury: AT-DILI) ขณะที่กลุ่ม RA อาจเสี่ยงต่อความล้มเหลวในการรักษาเนื่องจากระดับยาในเลือดไม่เพียงพอ^(3,4) ดังนั้นการตรวจหา NAT2-diplootype เพื่อใช้ประกอบการปรับขนาดยาแบบจำเพาะบุคคล (personalized medicine)⁽⁴⁾ จึงมีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิผลของการรักษาและลดอาการไม่พึงประสงค์⁽⁵⁾

ในปัจจุบันการตรวจจีโนไทป์ NAT2 มักใช้วิธีการทำนาย haplotype จากข้อมูล SNP ด้วยวิธีการทางสถิติ (indirect method) หรือใช้วิธีการหาลำดับเบส (sequencing) มีต้นทุนสูงและขั้นตอนซับซ้อนและต้องใช้ software ในการแยก haplotype ให้เป็น 2 ชุด⁽⁶⁾ ก่อนหน้านี้ Wichukchinda N และคณะ ได้พัฒนาวิธี Haplotype-specific PCR (HS-PCR) ซึ่งสามารถระบุ NAT2-diplootype ได้โดยตรงโดยไม่ต้องอาศัยการทำนายทางสถิติและให้ความแม่นยำสูงถึง 99.23% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี sequencing⁽⁷⁾ วิธีดังกล่าวต้องอาศัยการวิเคราะห์ผลด้วย gel electrophoresis ซึ่งเป็นขั้นตอนหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (post-PCR processing) ที่ใช้เวลานานต้องใช้แรงงานและมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน (contamination) จากการเปิดหลอดปฏิกิริยาอาจเป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้ในงานประจำทางคลินิกที่ต้องการความรวดเร็วและรองรับตัวอย่างจำนวนมาก⁽⁸⁾

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและต่อยอดวิธีตรวจ NAT2-diplootype จากระบบดั้งเดิมไปสู่วิธีตรวจ Real-time PCR โดยอาศัยชุด primer ของ Haplotype-specific PCR ที่ได้รับการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคนิค Real-time PCR ช่วยให้อ่านผลได้ทันทีผ่านสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) โดยไม่ต้องใช้ gel electrophoresis ทำให้ลดระยะเวลาในการตรวจ ลดความเสี่ยงในการปนเปื้อน และลดระยะเวลาในการรายงานผล (turnaround time)⁽⁹⁾ เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจชีวโมเลกุลทางเภสัชพันธุศาสตร์ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽¹⁰⁾

วัสดุและวิธีการ

การออกแบบไพรเมอร์และโพรบ (Probe-primer design)

การออกแบบไพรเมอร์และโพรบ (Bio Basic, Canada) อ้างอิงจากลำดับเบสของยีน NAT2 (NG_012246.1) บนโครโมโซมคู่ที่ 8 โดยเน้นตำแหน่ง single nucleotide polymorphisms (SNPs) ใน exon 2 ที่สำคัญ ได้แก่ ตำแหน่ง 282, 341, 481, 590, 803 และ 857 ซึ่งครอบคลุม haplotype หลักที่พบเป็นส่วนใหญ่ในประชากรไทย และมีผลต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ได้แก่ *4, *5B, *6A, *7B, *12A, และ *13A โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยนี้อ้างอิงจากงานวิจัยของ Wichukchinda N และคณะ⁽⁷⁾ และได้รับสิทธิบัตรเลขที่ 92597⁽¹¹⁾ ซึ่งใช้หลักการ Haplotype-specific PCR (HS-PCR) โดยออกแบบให้เบสตัวสุดท้ายที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง SNP ของแต่ละ haplotype เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเฉพาะเมื่อพบ haplotype เป้าหมายเท่านั้น และเพื่อให้สามารถตรวจสอบผลได้ในระบบ Real-time PCR คณะผู้วิจัยได้ออกแบบโพรบชนิด TaqMan (hydrolysis probe) เพิ่มเติม โดยพิจารณาตำแหน่งการจับของโพรบ (probe binding site) ให้สอดคล้องกับบริเวณที่เกิด

ผลิตภัณฑ์ PCR (amplicon) จากคู่ไพรเมอร์จำเพาะแต่ละคู่ โดยแบ่งการออกแบบเป็น 2 ส่วน เพื่อให้ครอบคลุมทุก haplotype ดังนี้

ไพรเมอร์ชุดที่ 1 ออกแบบให้จับบริเวณรอยต่อระหว่าง SNP 282 และ 341 เพื่อใช้ตรวจจับผลิตภัณฑ์ PCR ของกลุ่ม haplotype *NAT2*4* และ *NAT2*13A*

ไพรเมอร์ชุดที่ 2 ออกแบบให้จับบริเวณใกล้เคียง SNP 481 เพื่อใช้ตรวจจับผลิตภัณฑ์ PCR ของกลุ่ม

haplotype *NAT2*5B*, *NAT2*6A*, *NAT2*7B* และ *NAT2*12A*

ไพรเมอร์ทั้งสองชนิดถูกติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ FAM เพื่อให้สามารถอ่านสัญญาณได้ในช่องสัญญาณเดียวกันเมื่อเกิดปฏิกิริยาจำเพาะในแต่ละหลอดทดลอง ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยนี้อยู่ระหว่างยื่นขออนุสิทธิบัตร เลขที่คำขอ 2503001353 รายละเอียดลำดับเบสของไพรเมอร์และไพรบ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดลำดับเบสของไพรเมอร์และไพรบสำหรับ *NAT2* haplotype และ internal control

Target Haplotype	Primer/probe Name	Sequence (5' to 3')
<i>NAT2*4</i>	4F-282C	ggT TTT CAg ACC ACA ATg TTA ggA ggg TAT TTT gAC
	4R-803A	gg CAC gAg ATT TCT CCC CAA ggA AAT CTT AAA TAT ATg TT
<i>NAT2*5B</i>	5F-341C	CAT ggT TCA CCT TCT CCT gCA ggT gAC AAC
	5R-857g	TTT ATT TTg TTC CTT ATT CTA AAT AgT AAg ggC TC
<i>NAT2*6A</i>	6F-341T	ACC TTC TCC TgC Agg TgA CAA T
	6R-590A	TTC ATA gAC TCA AAA TCT TCA ATT ggT T
<i>NAT2*7B</i>	7F-481C	TT gAC AgA AgA gAg Agg AAT CTg gTC CC
	7R-857A	TTT ATT TTg TTC CTT ATT CTA AAT AgT AAg ggC TT
<i>NAT2*12A</i>	12F-481C	gAC AgA AgA gAg Agg AAT CTg gTC CC
	12R-803g	CAC gAg ATT TCT CCC CAA ggA AAT CTT AAA TAT ATg TC
<i>NAT2*13A-1</i> (หลอดที่ 1)	13F-282T	AgA CCA CAA TgT TA gAg ggT ATT TTg AT
	13R1-590g	TTC ATA gAC TCA AAA TCT TCA ATT ggT C
<i>NAT2*13A-2</i> (หลอดที่ 2)	13F-282T	AgA CCA CAA TgT TA gAg ggT ATT TTg AT
	13R2-857g	ggTT TAT TTT gTT CCT TAT TCT AAA TA gTAA ggg CTC
internal control	RT- <i>TIMP1</i> -Fw	gCC ATg gAg AgT gTC TgC ggA TAC TT
	RT- <i>TIMP1</i> -Rv	ggT gCC TCA CCA gCA ATg AgA AA
real-time probe	<i>NAT2</i> Fw1 p-FAM	ACC AAA TCA ggA gAg AgC AgT ATA TTA CAA
	<i>NAT2</i> Fw2 p-FAM	ACA AAT ACA gCA CTg gCA Tgg TTC AC
internal control probe	<i>TIMP1</i> p-CY5	ACA ggT CCC ACA ACC gCA gCg A

ตัวอย่างดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ ตัวอย่างสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอที่เหลือจากการวิเคราะห์ ได้แก่ ตัวอย่างจากโครงการสำรวจสุขภาพประชากรไทยครั้งที่ 3 (Third Thailand National Health Examination Survey Program) ซึ่งเป็นตัวอย่างของคนทั่วไป และตัวอย่างผู้ป่วยวัณโรคที่เหลือจากงานบริการตรวจวิเคราะห์ NAT2-diplootypes ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (leftover DNA sample) ในช่วงปี พ.ศ. 2559–2564

ตัวอย่างดีเอ็นเอดังกล่าวสกัดมาจากตัวอย่างเลือด EDTA ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ด้วยชุดสกัด QuickGene DNA whole blood kit S (Kurabo, Japan) โดยใช้เครื่องสกัดกึ่งอัตโนมัติ (รุ่น QuickGene-Mini80, Kurabo, Japan) ตามขั้นตอนมาตรฐานที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณสารพันธุกรรมด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers, Thermo Fisher Scientific, USA) ก่อนนำไปปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา Real-time PCR และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Haier Biomedical, Qingdao Haier Biomedical, China)

การหาค่าเหมาะสมของปฏิกิริยา (Optimization)

ดำเนินการหาค่าเหมาะสมของสภาวะต่างๆ ในปฏิกิริยา Real-time PCR ดังนี้

การหาค่าเหมาะสมของสภาวะปฏิกิริยา PCR (PCR condition optimization)

ทดสอบช่วงอุณหภูมิในการเกาะของไพรเมอร์ (annealing temperature) เพื่อให้ไพรเมอร์มีความจำเพาะต่ออัลลีสสูงที่สุดและลดการเกิดปฏิกิริยาข้าม และทดสอบระยะเวลาในขั้นตอน annealing/extension เพื่อให้เหมาะสมกับ PCR product ที่มีความยาวต่างกันในแต่ละหลอด และสามารถดำเนินปฏิกิริยาพร้อมกันทั้ง 7 หลอด ภายใต้สภาวะเดียวกันได้

สภาวะการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย ขั้นตอน initial denaturation ที่ 95°C นาน 3 นาที (จำนวน 1 รอบ) ตามด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 95°C นาน 20 วินาที และขั้นตอน annealing/extension โดยทำ

gradient ที่อุณหภูมิ 58.0–68.0°C นาน 60–80 วินาที จำนวน 35 รอบ โดยใช้น้ำยา KAPA PROBE FAST qPCR master mix (2×) (Kapa Biosystems, Cape Town, South Africa) เครื่อง Real-time PCR (รุ่น Bio-RAD CFX Opus 96 System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

การหาค่าเหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบ (primer and probe optimization)

หาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบของปฏิกิริยา (probe/primer condition) เริ่มจากความเข้มข้นของไพรเมอร์คู่หน้า-คู่หลัง (forward-reverse primer) ที่ 10 μ M และโพรบที่ 4 μ M สำหรับแต่ละ haplotype รวมถึงไพรเมอร์และโพรบสำหรับ TIMP1 ซึ่งใช้เป็น internal control จากนั้นปรับความเข้มข้นและปริมาตรของไพรเมอร์และโพรบให้เหมาะสมสำหรับแต่ละ haplotype เพื่อให้ค่าสัญญาณเรืองแสง (relative fluorescence units: RFU) และค่า cycle threshold (Ct) ของทุกเป้าหมายมีความสอดคล้องกันและสามารถแยกจากสัญญาณรบกวน (background noise) ได้ชัดเจน

สำหรับยีน TIMP1 ทำการปรับความเข้มข้นให้เหมาะสม เพื่อไม่ให้ไปแย่งสารปฏิกิริยา (competition) กับยีนเป้าหมายหลัก แต่ยังสามารถให้สัญญาณที่เสถียรเพื่อยืนยันคุณภาพการทดสอบได้

การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบผล NAT2-diplootype มาทำการเจือจางแบบ 2 เท่า (2-fold serial dilution) ด้วยบัฟเฟอร์ TE (low EDTA) (AppliChem, Germany) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นรวม 10 ระดับ ได้แก่ 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5, 0.75 และ 0.375 ng/ μ L ทำการทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 2 ซ้ำ (duplicate) และหาค่าเฉลี่ยจากทั้ง 2 ค่า

การตรวจ NAT2-diplootypes ด้วยวิธี Real-time PCR

การตรวจ NAT2-diplootypes ด้วยวิธี Real-time PCR โดยเตรียมปฏิกิริยา 7 หลอดต่อตัวอย่าง ในทุกปฏิกิริยา ปริมาตร 12 ไมโครลิตร

ประกอบด้วย 1X ready mix reagent (KAPA PROBE FAST qPCR master mix (2×), KAPA Biosystems, Cape Town, South Africa) ไพรเมอร์จำเพาะต่อ NAT2 ที่ 10–25 μM, ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน NAT2 ที่ 6 μM, ยีนควบคุมคุณภาพภายใน (Internal control) ไพรเมอร์ของยีน TIMP1 ที่ 10 μM, ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน TIMP1 ที่ 4 μM และ 10–50 ng ของดีเอ็นเอตัวอย่าง สภาวะการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย ขั้นตอน denaturation ที่ 95°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยทำปฏิกิริยา ที่ 95°C นาน 20 วินาที และ 64.5°C นาน 80 วินาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นอ่านค่าสัญญาณของยีน NAT2 แต่ละ haplotype คู่ควบกับยีน TIMP1

การตรวจสอบทางคลินิก (Clinical validation)

ดำเนินการทดสอบความแม่นยำกับตัวอย่าง ดีเอ็นเอ จำนวน 138 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่าง จากโครงการสำรวจสุขภาพประชากรไทยครั้งที่ 3 จำนวน 125 ตัวอย่าง และตัวอย่างผู้ป่วยวัณโรคที่เลื้อยจากงาน บริการตรวจวิเคราะห์ NAT2-diplotype ด้วยปฏิกิริยา พีซีอาร์ จำนวน 13 ตัวอย่าง ที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์ และทราบผล NAT2-diplotype แล้วด้วยวิธี PCR และ sequencing ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมาตรวจวิเคราะห์ เพื่อระบุ NAT2-diplotype ด้วยวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นในสภาวะที่เหมาะสม

เกณฑ์การตัดสินและการแปลผล (Interpretation criteria)

กำหนดเกณฑ์ค่าจุดตัด (cut-off value) สำหรับการอ่านผลที่สมบูรณ์ คือ ค่า Ct ของยีน TIMP1 ในทุกหลอดต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 25 และผลบวกของ NAT2 haplotype เป้าหมาย มีค่า Ct น้อยกว่า 30 กรณีที่ค่า Ct อยู่ระหว่าง 30–35 หรือตรวจไม่พบสัญญาณ (not detected) จะพิจารณาว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่นอกช่วงการตรวจวัดที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ (out of quantifiable/acceptable range)

ยีน NAT2 ถูกแบ่งกลุ่มตามการทำงานของเอนไซม์ ออกเป็น 2 แบบหลัก คือ fast acetylator haplotype ได้แก่ NAT2*4, NAT2*12A, NAT2*13A และ slow acetylator haplotype ได้แก่ NAT2*5B, NAT2*6A, NAT2*7B เนื่องจากการแสดงออกของยีนในแต่ละบุคคล ประกอบด้วย 2 haplotypes (diplotypes) ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ co-dominant การแปลผลฟีโนไทป์การย่อยสลายยา (acetylator phenotypes) จึงจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่มผู้ที่ย่อยยาเร็ว (rapid acetylators: RAs) กลุ่มผู้ที่ย่อยยาปานกลาง (intermediate acetylators: IAs) และกลุ่มผู้ที่ย่อยยาช้า (slow acetylators: SAs) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางการแปลผลฟีโนไทป์การย่อยสลายยา

กลุ่มผู้ที่ย่อยยาเร็ว (RAs)	กลุ่มผู้ที่ย่อยยาปานกลาง (IAs)	กลุ่มผู้ที่ย่อยยาช้า (SAs)
NAT2*4/*4	NAT2*4/*5B	NAT2*5B/*5B
NAT2*4/*12A	NAT2*4/*6A	NAT2*5B/*6A
NAT2*4/*13A	NAT2*4/*7B	NAT2*5B/*7B
NAT2*12A/*12A	NAT2*5B/*12A	NAT2*6A/*6A
NAT2*12A/*13A	NAT2*5B/*13A	NAT2*6A/*7B
NAT2*13A/*13A	NAT2*6A/*12A	NAT2*7B/*7B
	NAT2*6A/*13A	
	NAT2*7B/*12A	
	NAT2*7B/*13A	

จริยธรรมการวิจัย

การใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ ได้รับการรับรองจาก คณะกรรมการการศึกษาวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ รหัสโครงการวิจัย 10/2565 ลงวันที่ 24 พฤษภาคม พ.ศ. 2565

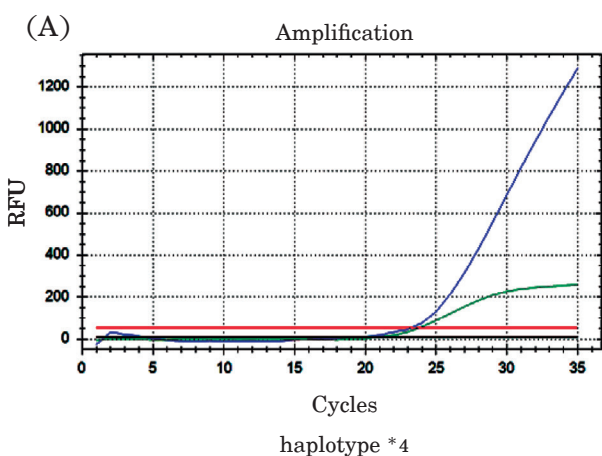
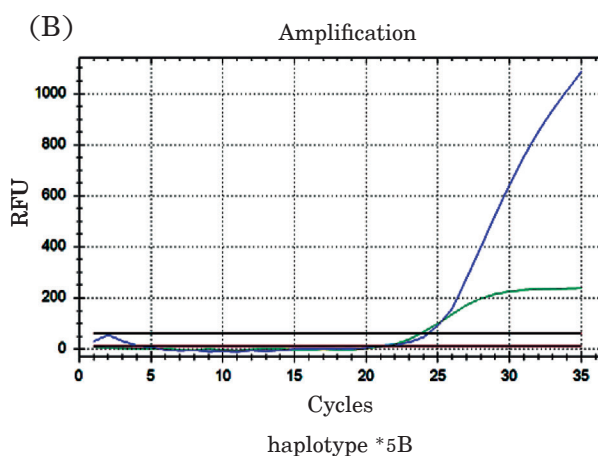
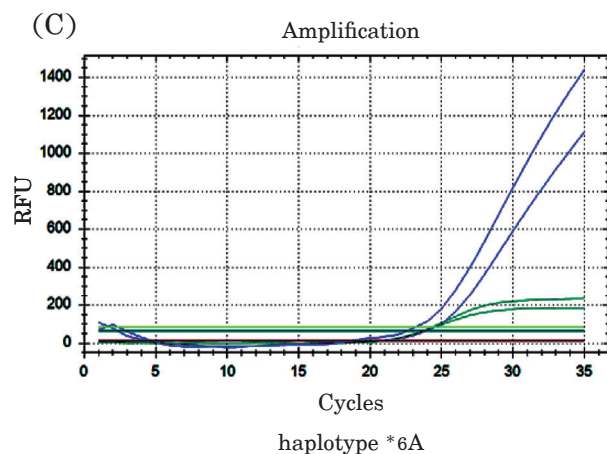
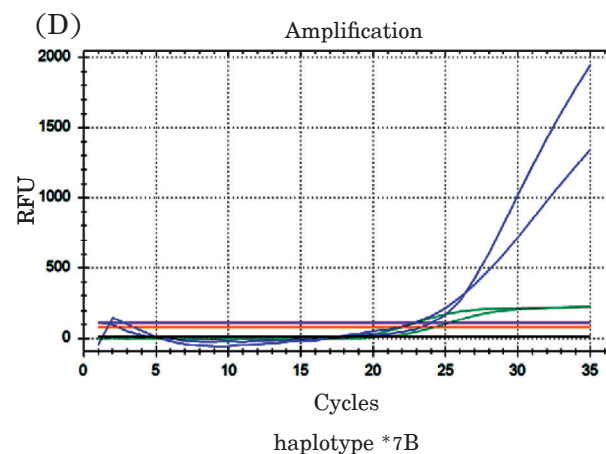
ผล

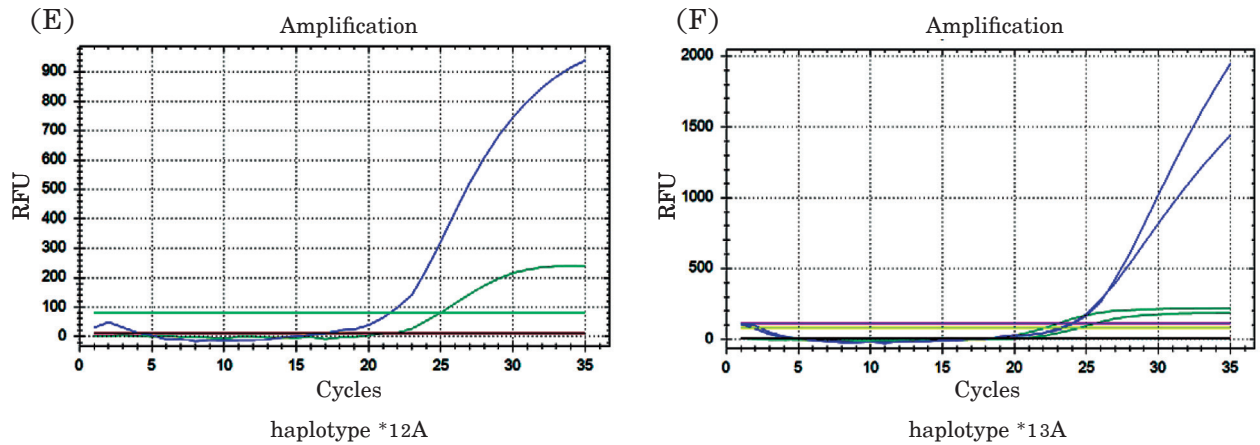
การหาค่าเหมาะสมของปฏิกิริยา (Optimization results)

จากการออกแบบและหาค่าสภาวะที่เหมาะสม สำหรับชุดไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อ NAT2 haplotype ทั้ง 6 รูปแบบ 7 ปฏิกิริยา ได้แก่ *4, *5B, *6A, *7B, *12A, *13A-1 และ *13A-2 พบว่าสามารถ

ดำเนินปฏิกิริยา Real-time PCR พร้อมกันได้ภายใต้ สภาวะเดียวกัน โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ประกอบด้วย ขั้นตอน Denaturation ที่ 95°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 95°C นาน 20 วินาที และขั้นตอน annealing/extension ที่ 64.5°C นาน 80 วินาที จำนวน 35 รอบ

กราฟ amplification plot แสดงสัญญาณการ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย NAT2 (สีน้ำเงิน) และยีนควบคุมคุณภาพ TIMP1 (สีเขียว) ที่มีความชัดเจนและแยกออกจากสัญญาณรบกวนพื้นฐาน (background noise) ได้อย่างเด่นชัด ภายใต้ความเข้มข้น และปริมาตรของไพรเมอร์และโพรบที่ผ่านการปรับให้ เหมาะสมแล้ว ดังแสดงในภาพที่ 1 และตารางที่ 3





ภาพที่ 1 (A)-(F) กราฟแสดง amplification plot ของผลบวกในแต่ละ haplotype ที่แสดงถึงการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *NAT2* (ยีนเป้าหมาย, สีน้ำเงิน) และยีน *TIMP1* (ยีนควบคุมคุณภาพ, สีเขียว) ด้วยความเข้มข้นและปริมาตรของไพรเมอร์และโพรบ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 โดยใช้ PCR condition ดังนี้ [95°C นาน 3 นาที] × 1 รอบ [95°C นาน 20 วินาที 64.5°C นาน 80 วินาที] × 35 รอบ

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นและปริมาตรของไพรเมอร์และโพรบแต่ละคู่ของ *NAT2*-*4, *NAT2*-*5B, *NAT2*-*6A, *NAT2*-*7B, *NAT2*-*12A, *NAT2*-*13A-1 และ *NAT2*-*13A-2 ต่อ 1 ปฏิบัติการ

primer/probe name	*4 (μL)	*5B (μL)	*6A (μL)	*7B (μL)	*12 (μL)	*13A-1 (μL)	*13A-2 (μL)
10 μM RT- <i>TIMP1</i> Fw	0.12	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
10 μM RT- <i>TIMP1</i> Rv	0.12	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
10 μM <i>NAT2</i> -4 Fw	0.40						
10 μM <i>NAT2</i> -4 Rv	0.40						
10 μM <i>NAT2</i> -5B Fw		0.35					
10 μM <i>NAT2</i> -5B Rv		0.35					
10 μM <i>NAT2</i> -6A Fw			0.50				
10 μM <i>NAT2</i> -6A Rv			0.50				
25 μM <i>NAT2</i> -7B Fw				0.55			
25 μM <i>NAT2</i> -7B Rv				0.55			
10 μM <i>NAT2</i> -12A Fw					0.30		
10 μM <i>NAT2</i> -12A Rv					0.30		
25 μM <i>NAT2</i> -13A Fw						0.40	
25 μM <i>NAT2</i> -13A-1 Rv						0.40	
10 μM <i>NAT2</i> -13A Fw							0.60
10 μM <i>NAT2</i> -13A-2 Rv							0.60
6 μM FAM <i>NAT2</i> Fw1		0.20	0.35	0.45	0.20		
6 μM FAM <i>NAT2</i> Fw2	0.30					0.40	0.35
4 μM Cy5 <i>TIMP1</i> -P	0.08	0.08	0.10	0.10	0.08	0.08	0.10

ช่วงการตรวจจับและความไวเชิงวิเคราะห์ (Range of detection and sensitivity)

ผลการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอในช่วง 0.375–200 ng/ μ L จำนวน 10 ระดับความเข้มข้น พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบสัญญาณได้ในทุกระดับความเข้มข้น เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์การอ่านผล (C_t cut-off < 30) พบว่ามี 7 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 3.125 – 200 ng/ μ L ที่ให้ผลบวกที่สมบูรณ์ ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำ 0.375–1.5 ng/ μ L แม้จะปรากฏสัญญาณเรืองแสง แต่มีค่า C_t > 30 จึงแปลผลเป็นลบตามเกณฑ์ที่กำหนด

สำหรับ haplotype *4 และ *6A ที่ไม่สามารถตรวจพบสัญญาณที่ความเข้มข้นสูงสุด 200 ng/ μ L ซึ่งอาจเกิดจากผลของความเข้มข้นดีเอ็นเอที่สูงเกินไปต่อประสิทธิภาพของปฏิกิริยา (PCR inhibition) ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมในระดับความเข้มข้น 5, 125 และ 150 ng/ μ L เพื่อระบุช่วงการทำงานที่ให้ผลน่าเชื่อถือสูงสุด (working range) ผลพบว่าสามารถตรวจพบยีนเป้าหมาย NAT2 ได้ครบทุก haplotypes ผู้วิจัยจึงกำหนดช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่อยู่ในช่วง 5–150 ng/ μ L

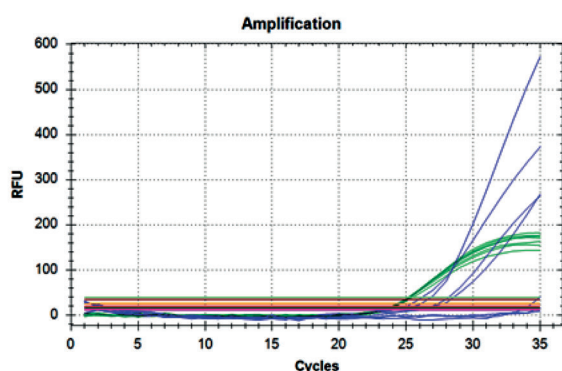
การตรวจ NAT2-diplootypes ด้วยวิธี Real-time PCR

ผลการตรวจ NAT2-diplotype ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ กราฟแสดงการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (amplifica-

tion plot) ยืนยันถึงความจำเพาะของปฏิกิริยา โดยเส้นกราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของสัญญาณแบบทวีคูณ (exponential phase) ที่ชัดเจนและแยกออกจากสัญญาณรบกวนพื้นฐาน (background noise) ได้อย่างเด่นชัด ดังแสดงในภาพที่ 2(A)

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลดิบของตัวอย่างทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 2(B) ผ่านตารางแสดงค่า C_t พบว่ายีน *TIMP1* ซึ่งเป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ที่ติดฉลากด้วยสี Cy5 ในทุกหลอดปฏิกิริยามีค่า C_t อยู่ระหว่าง 23.46–24.03 ซึ่งผ่านเกณฑ์คุณภาพที่กำหนดไว้ ($C_t \leq 25$) ยืนยันว่ากระบวนการสกัดดีเอ็นเอและการทำปฏิกิริยามีความสมบูรณ์ ไม่พบตัวยับยั้งปฏิกิริยา (PCR inhibitors)

สำหรับการอ่านผลยีนเป้าหมาย NAT2 แต่ละ haplotype ที่ติดฉลากด้วยสี FAM จะใช้เกณฑ์ค่าจุดตัดที่ $C_t < 30$ ในการตัดสินผลบวก จากตัวอย่างทดสอบในภาพที่ 2(B) พบสัญญาณการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ให้ค่า C_t ต่ำกว่า 30 ในหลอดเป้าหมาย NAT2*6A ($C_t = 26.13$), NAT2*7B ($C_t = 26.41$), NAT2*13A-1 ($C_t = 26.83$) และ NAT2*13A-2 ($C_t = 24.05$) ในขณะที่เป้าหมาย NAT2*5B ให้ค่า C_t เท่ากับ 34.07 ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดจึงแปลผลเป็นลบ (Negative) และเป้าหมาย NAT2*4 กับ NAT2*12A ไม่ปรากฏสัญญาณ (N/A) ทำให้สามารถนำข้อมูลค่า C_t เหล่านี้ไปแปลผล NAT2-diplotype ของตัวอย่างดังกล่าว คือ NAT2*6A/*7B ได้อย่างแม่นยำตามตารางผลการอ่านผล NAT2 haplotype (ตารางที่ 5) ที่ได้กำหนดไว้



(A)

Well	Fluor	Target	Content	Sample	C _t
A06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.72
B06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.63
C06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.69
D06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.46
E06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.71
F06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	24.03
G06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.68
A06	FAM	*4-NAT2	Unkn	6/7	N/A
B06	FAM	*5-NAT2	Unkn	6/7	34.07
C06	FAM	*6-NAT2	Unkn	6/7	26.13
D06	FAM	*7-NAT2	Unkn	6/7	26.41
E06	FAM	*12-NAT2	Unkn	6/7	N/A
F06	FAM	*13.1-NAT2	Unkn	6/7	26.83
G06	FAM	*13.2-NAT2	Unkn	6/7	24.05

(B)

ภาพที่ 2 (A) กราฟ amplification plot ของปฏิกิริยา Real-time PCR แสดงการเพิ่มสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของยีนเป้าหมาย NAT2 แต่ละ haplotype (สีน้ำเงิน) คู่ขนานไปกับยีนควบคุมภายใน *TIMP1* (สีเขียว) (B) ตารางแสดงข้อมูลค่า cycle threshold (C_t) ของตัวอย่างทดสอบจำแนกตามหลอดปฏิกิริยา (well) ชนิดของสารเรืองแสง (fluor) และยีนเป้าหมาย (target)

ผลการตรวจสอบทางคลินิก (Clinical validation results)

จากการประเมินประสิทธิภาพด้วยตัวอย่างทางคลินิก จำนวน 138 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับวิธี PCR พบว่าวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 100 โดยผลการตรวจชนิด haplotype ในทุกตัวอย่างมีความสอดคล้องกันอย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในตารางที่ 4

เมื่อนำผลไดโพลไทป์ (diplotype) แปลผลเป็นฟีโนไทป์ (phenotype) การย่อยสลายยา (acetylator phenotypes) พบว่ามีความสอดคล้องกับวิธี PCR ร้อยละ 100 โดยจำแนกเป็นกลุ่มผู้ที่ย่อยยาเร็ว (rapid acetylator) 28 ราย กลุ่มผู้ที่ย่อยยาปานกลาง (intermediate acetylator) 58 ราย และกลุ่มผู้ที่ย่อยยาช้า (slow acetylator) 52 ราย ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยสามารถอ่านผลของ haplotype ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 4 ตารางเปรียบเทียบผล NAT2 diplotype ระหว่างวิธี PCR กับวิธี Real-time PCR

NAT2- diplotype	PCR (No. of sample)	Real-time PCR (No. of sample)	NAT2- diplotype	PCR (No. of sample)	Real-time PCR (No. of sample)
*4/*4	18	18	*5B/*13A	1	1
*4/*5B	6	6	*6A/*6A	5	5
*4/*6A	23	23	*6A/*7B	14	14
*4/*7B	20	20	*6A/*12A	2	2
*4/*12A	6	6	*6A/*13A	2	2
*4/*13A	3	3	*7B/*7B	9	9
*5B/*5B	1	1	*7B/*12A	3	3
*5B/*6A	18	18	*7B/*13A	1	1
*5B/*7B	5	5	*12A/*13A	1	1

ตารางที่ 5 ตารางเปรียบเทียบผล NAT2 Acetylator ระหว่างวิธี PCR กับวิธี Real-time PCR

การตรวจ NAT2-diplotypes ด้วยวิธี Real-time PCR	Acetylator	การตรวจ NAT2-diplotypes ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์			
		Rapid	Intermediate	Slow	รวม
	Rapid	28	0	0	28
	Intermediate	0	58	0	58
	Slow	0	0	52	52
	รวม	28	58	52	138

ตารางที่ 6 ตารางแสดงการอ่านผล NAT2 haplotype

NAT2 haplotype reaction						
*4 (Ct)	*5B (Ct)	*6A (Ct)	*7B (Ct)	*12A (Ct)	*13A	
					*13A-1(Ct)	*13A-2(Ct)
< 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30
Not detected หรือ Ct > 30	< 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30
Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	< 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	< 30
Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	< 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30
Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	< 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30
Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	< 30	< 30

TAMP1
(Ct)NAT2 haplotype
interpreted

*4

*5B

*6A

*7B

*12A

*13A

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีการตรวจ NAT2-diployping ด้วย Real-time PCR ในการศึกษาี้แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการเพิ่มประสิทธิภาพและความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการ PCR แบบเดิม โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหา NAT2 haplotypes สำคัญได้ครอบคลุม 6 รูปแบบหลัก ผ่านปฏิกิริยาย่อย 7 ปฏิกิริยา ได้แก่ *4, *5B, *6A, *7B, *12A, *13A-1 และ *13A-2 ภายใต้สภาวะปฏิกิริยาร่วมกัน ส่งผลให้ลดความซับซ้อนของกระบวนการทดสอบ ลดขั้นตอนหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และลดระยะเวลาในการรายงานผลได้อย่างมีนัยสำคัญ⁽¹²⁾ ประเด็นสำคัญที่ส่งผลต่อความแม่นยำของการทดสอบ คือ ปริมาณสารพันธุกรรมเริ่มต้น (input DNA concentration) จากการทดสอบช่วงการตรวจจับ (detection range) พบว่าช่วงความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมและให้ผลแม่นยำที่สุดอยู่ที่ 5–150 ng/μL อย่างไรก็ตามการใช้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นของสูงเกินไป เช่น 200 ng/μL อาจก่อให้เกิดปรากฏการณ์ยับยั้งปฏิกิริยา (PCR inhibition) หรือเกิดสัญญาณรบกวน (background noise) จนบดบังสัญญาณจริง โดยเฉพาะใน Haplotype *4 และ *6A ดังนั้นการควบคุมคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอให้อยู่ในช่วงที่กำหนดจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อป้องกันผลลบปลอม (false negative) และรับประกันความถูกต้องของการรายงานผล⁽⁹⁾ ในด้านการนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการอื่นจำเป็นต้องพิจารณาถึงปัจจัยด้านเครื่องมือ (instrumentation variability) เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสม (optimized condition) ในการศึกษาี้ถูกกำหนดโดยใช้เครื่อง Bio-RAD CFX Opus 96 System การเปลี่ยนไปใช้เครื่อง Real-time PCR รุ่นหรือยี่ห้ออื่นที่มีคุณสมบัติทางกายภาพต่างกัน เช่น อัตราการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (ramp rate) หรือระบบตรวจวัดสัญญาณแสง (optical system) อาจส่งผลกระทบต่อค่า Ct และรูปร่างของกราฟเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมได้⁽¹³⁾ ดังนั้นห้องปฏิบัติการปลายทางควรตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method verification/ method validation) หรือปรับสภาวะการทดลอง (re-optimization) เล็กน้อย

โดยเฉพาะอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอน annealing เพื่อให้ได้สัญญาณที่มีคุณภาพ มีความถูกต้อง แม่นยำและมีประสิทธิภาพ⁽¹⁴⁾

อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดใน เรื่อง ความครอบคลุมของสายพันธุ์พันธุกรรม (genetic coverage) เนื่องจากไพรเมอร์ถูกออกแบบมาให้จำเพาะต่อ haplotypes ที่พบบ่อยในประชากรไทย 6 รูปแบบหลักเท่านั้น หากตัวอย่างทดสอบมี haplotypes ที่พบได้น้อย (uncommon haplotypes) หรืออยู่นอกเหนือขอบเขตการตรวจ เช่น NAT2*5C, *7C หรือ *11A ซึ่งมีรายงานพบในประชากรไทย⁽¹⁵⁾ อาจส่งผลให้ชุดตรวจไม่สามารถระบุชนิดได้หรือเกิดการจับกับดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (mispriming/non-specific binding) นำไปสู่ความคลาดเคลื่อนในการแปลผล (discrepancy) ดังที่เคยมีรายงานโดย Wichukchinda N และคณะ⁽⁷⁾ กรณีที่พบผลการทดสอบที่มีรูปแบบสัญญาณกำกวมหรือไม่สามารถสรุปผลได้ (indeterminate result) ควรพิจารณาส่งตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐาน DNA sequencing⁽⁷⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคโนโลยีสมัยใหม่ เช่น Long-read sequencing วิธีการ Real-time PCR นี้ยังมีข้อจำกัดทางเทคนิคที่ต้องใช้หลายปฏิกิริยาต่อหนึ่งตัวอย่าง และในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อการใช้งานในอนาคต ควรคำนึงถึงตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่อาจอยู่ใกล้กับจุดจับของไพรเมอร์ ซึ่งอาจรบกวนการอ่านผลยืนยันด้วยวิธี Sanger sequencing⁽¹⁶⁾ ได้นอกจากประสิทธิภาพทางเทคนิคแล้ว การพิจารณาความคุ้มค่าของการตรวจยืนยัน NAT2 ในบริบทระบบสาธารณสุขถือเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง ข้อมูลจากการศึกษาของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการประชุมคณะทำงานกำหนดอัตราค่าใช้จ่ายเพื่อบริการสาธารณสุขสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ เมื่อวันที่ 29 มกราคม พ.ศ. 2569 ชี้ให้เห็นว่าการนำการตรวจยืนยัน NAT2 ไปใช้ทางคลินิกมีผลลัพธ์ที่จับต้องได้และมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์อย่างชัดเจน โดยพบว่าในผู้ป่วยวัณโรค 10,000 ราย การตรวจยืนยันนี้สามารถป้องกันการเกิดภาวะดื้อยาได้ถึง 1,157 ราย และลดจำนวนผู้เสียชีวิตลงได้ 95 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่มีการตรวจ ยิ่งกว่านั้นการประเมินความคุ้มค่าซึ่งพิจารณา

ถึงความเต็มใจจ่ายที่ 160,000 บาทต่อปีสุขภาพ ยืนยันว่า การตรวจยีน NAT2 มีความคุ้มค่าในมุมมองของ สังคมและรัฐบาลไทย โดยมีค่า ICER (Incremental Cost-Effectiveness Ratio) อยู่ที่ 6,720 บาทต่อปี สุขภาพเท่านั้น ความคุ้มค่านี้ยังคงชัดเจนแม้จะมีการ วิเคราะห์ภายใต้สถานการณ์ความเสี่ยงต่างๆ (scenario analysis) เช่น ปัจจัยร่วมอื่นที่ทำให้ตับอักเสบ ต้นทุน ค่ายารักษาโรค หรือสัดส่วนการปรับยาไอโซไนอาซิด

จากข้อมูลเชิงประจักษ์จากการประชุมการแลกเปลี่ยน เรียนรู้ การใช้ผลตรวจยีน NAT2 ประกอบการรักษา ผู้ป่วยวัณโรคด้วยยา isoniazid^(17,18) เมื่อวันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2568 สะท้อนให้เห็นถึงประโยชน์และ ผลกระทบเชิงบวกของการนำผลตรวจ NAT2 ไปประยุกต์ ใช้จริงในสถานพยาบาลหลายระดับ การรายงานผล ที่รวดเร็วช่วยให้บุคลากรทางการแพทย์สามารถเฝ้าระวัง และปรับลดขนาดยาไอโซไนอาซิด (ประมาณ 2.5–3.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน) ในผู้ป่วยกลุ่ม SA ได้ตั้งแต่วินิจฉัยเริ่มต้น ช่วยลดอุบัติการณ์ตับอักเสบ (Anti-tuberculosis drug-induced liver injury: AT-DILI) ได้อย่างเป็นรูปธรรมโดยไม่กระทบต่อประสิทธิภาพ การรักษา⁽²⁾ นอกจากนี้การประเมินผล NAT2 ร่วมกับ ตัวทำนายทางคลินิก (clinical predictors)⁽¹⁷⁾ เช่น น้ำหนักตัวที่ลดลง ระดับอัลบูมิน ภาวะซีด หรือ การติดเชื้อร่วม ในรูปแบบคะแนนความเสี่ยง (clinical risk score) จะยิ่งเพิ่มความแม่นยำใน การคัดกรองผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงสูงที่ควรได้รับการปรับ ขนาดยาโดยเฉพาะในโรงพยาบาลที่มีข้อจำกัดจาก การใช้ยารักษาสูตรผสมเม็ดเดียว (fixed-dose combination)

อย่างไรก็ตามแม้ผลการวิจัยนี้จะสนับสนุน ศักยภาพของวิธี Real-time PCR ในการเป็นเครื่องมือ ตรวจคัดกรองที่รวดเร็วและเข้าถึงได้ง่าย แต่บริบท การทำงานและแนวทางการดูแลผู้ป่วยของแต่ละสถาน พยาบาลยังคงมีความแตกต่างกัน งานวิจัยและก้าวต่อไป ที่สำคัญ (future perspective) คือ การผลักดันข้อมูล เชิงประจักษ์ทางเภสัชพันธุศาสตร์เหล่านี้ เพื่อนำไปสู่ การจัดทำแนวทางปฏิบัติทางคลินิก (clinical practice

guideline) ระดับประเทศที่ชัดเจนว่าด้วยการนำผล ตรวจยีน NAT2 และปัจจัยเสี่ยงทางคลินิกไปประยุกต์ ใช้ในการปรับขนาดยาไอโซไนอาซิด โดยสรุปผลการ ศึกษาข้างต้นวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความ สอดคล้องกับวิธี PCR ร้อยละ 100 สะท้อนให้เห็นถึง ศักยภาพและความพร้อมในการนำไปประยุกต์ใช้เป็น งานประจำในห้องปฏิบัติการทางคลินิก เพื่อสนับสนุน การแพทย์แม่นยำ (precision medicine) ซึ่งเมื่อผนวก กับแนวทางปฏิบัติทางคลินิกที่ได้มาตรฐานจะช่วยเพิ่ม ความมั่นใจให้แก่แพทย์ผู้รักษา ลดความเสี่ยงต่อการ ไม่พึงประสงค์ และยกระดับประสิทธิภาพและ ความปลอดภัยในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคได้อย่างยั่งยืน

สรุป

การศึกษานี้พัฒนาและประเมินวิธีตรวจ NAT2-diplotype ด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งให้ผล สอดคล้องกับวิธี PCR ร้อยละ 100 วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถ ตรวจหา NAT2 haplotypes สำคัญ จำนวน 6 รูปแบบ ที่พบได้บ่อยในประเทศไทย และมีช่วงความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์อยู่ที่ 5–150 ng/μL นอกจากนี้วิธีดังกล่าวยังช่วยลดระยะเวลา ในการวิเคราะห์และลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนใน ห้องปฏิบัติการ เนื่องจากไม่ต้องมีขั้นตอนหลังการเพิ่ม ปริมาณสารพันธุกรรม (post-PCR handling) ข้อมูลที่ ได้จึงยืนยันว่าวิธี Real-time PCR มีศักยภาพ และความ พร้อมสำหรับนำไปใช้เป็นเครื่องมือทางเภสัชพันธุศาสตร์ ในการสนับสนุนการปรับขนาดยาไอโซไนอาซิดแบบ จำเพาะบุคคล เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและประสิทธิภาพ ในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคในงานบริการทางคลินิกต่อไป

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ผู้เขียนได้มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ Gemini pro เพื่อตรวจสอบภาษาในส่วนเนื้อเรื่อง และจัดรูปแบบ เอกสารอ้างอิง ทั้งนี้ผู้เขียนได้ตรวจสอบและรับรอง ความถูกต้องของเนื้อหาดังกล่าวแล้ว

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนเงินยารับจากการดำเนินงานวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์และการสาธารณสุข ประจำปี พ.ศ. 2565 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023.
2. Azuma J, Ohno M, Kubota R, Yokota S, Nagai T, Tsuyuguchi K, et al. *NAT2* genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure in the 6-month four-drug standard treatment of tuberculosis: a randomized controlled trial for pharmacogenetics-based therapy. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69(5): 1091-101.
3. Surarak T, Chumnumwat S, Nosoongnoen W, Tragulpiankit P. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of isoniazid affected by *NAT2* polymorphisms in patients with tuberculosis: a systematic review. *Clin Transl Sci* 2024; 17(4): e13795. (13 pages).
4. Schiuma M, Dinegro S, Battini V, Torre A, Covizzi A, Civati A, et al. *NAT2* acetylation status predicts hepatotoxicity during anti-tuberculosis therapy: cumulative risk analysis of a multiethnic cohort. *Int J Mol Sci* 2025; 26(8): 3881. (13 pages).
5. Thanyanuch S, Charoen C, Surakameth M, Sukanya W. *NAT2* genotype-guided INH dosage to reduce drug-induced liver injury in Thai patients. *Syst Rev Pharm* 2021; 12(9): 523-7.
6. Hein DW. N-acetyltransferase SNPs: emerging concepts serve as a paradigm for understanding complexities of personalized medicine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5(4): 353-66.
7. Wichukchinda N, Pakdee J, Kunhapan P, Imunchot W, Toyo-Oka L, Tokunaga K, et al. Haplotype-specific PCR for *NAT2* diplotyping. *Hum Genome Var* 2020; 7: 13. (6 pages).
8. Valones MA, Guimarães RL, Brandão LA, de Souza PR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol* 2009; 40(1): 1-11.
9. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004; 15(3): 155-66.
10. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol* 2017; 8: 108. (9 pages).
11. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ชุดไพรเมอร์ (Primer set) สำหรับการตรวจหาพันธุ-ไตโพลีไทป์ (*NAT2*-diplotypes). สิทธิบัตรการประดิษฐ์ไทย เลขที่ 92597; 2566.
12. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5(2): 209-19.
13. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611-22.
14. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(3): 550-76.
15. Wattanapokayakit S, Mushiroda T, Yanai H, Wichukchinda N, Chuchottawon C, Nedsuwan S, et al. *NAT2* slow acetylator associated with anti-tuberculosis drug-induced liver injury in Thai patients. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016; 20(10): 1364-9.

16. Stadhouders R, Pas SD, Anber J, Steyn A, Mes TH, Schutten M. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagn* 2010; 12(1): 109-17.
17. วีระวุฒิ มิ่งขวัญ. การบรรยายเรื่อง Usefulness of *NAT2* accompanied by clinical predictors among tuberculosis patients treatment. เอกสารการประชุมการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ การใช้ผลตรวจยีน *NAT2* ประกอบการรักษาผู้ป่วยวัณโรคด้วยยา isoniazid; วันที่ 30 มกราคม 2568. กรุงเทพฯ: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2568.
18. มิ่งขวัญ มงคลสินธุ์, อินทรา สิมะพิเชฐ, วนิดา แสนเมือง. การอภิปรายเรื่องรูปแบบ/แนวทางการใช้ผลตรวจยีน *NAT2* เพื่อลดความเสี่ยงการเกิดดื้อยา และ การเสียชีวิตของผู้ป่วยวัณโรคจากการได้รับยา Isoniazid. เอกสารการประชุมการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ การใช้ผลตรวจยีน *NAT2* ประกอบการรักษาผู้ป่วยวัณโรคด้วยยา isoniazid; วันที่ 30 มกราคม 2568. กรุงเทพฯ: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2568.

NAT2-diplotyping by Real-time PCR

Tiparat Potipitak¹, Nuanjun Wichukchinda², Pathida Prakongsup¹, Wimala Inunchot¹, Surakameth Mahasirimongkol³, and Sukanya Wattanapokayakit¹

¹Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

²Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

³Bureau of Royal Initiative, Commemoration and Special Projects, Office of Permanent Secretary, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT N-acetyltransferase 2 enzyme (NAT2) plays an important role in the metabolizing of Isoniazid, an antituberculosis drug. Individuals having a slow acetylator phenotype were found 8.8 times more at risk to be TB drug-induced liver injury compared to intermediate and fast acetylator ones. The acetylator phenotype can be interpreted from NAT2-diplotyping and used for Isoniazid-dose adjustment. This study aimed to develop a Real-time PCR for NAT2-diplotyping to replace the previous PCR for routine service. Optimization of primer/probe concentration and temperature/time condition was done with known phase-analysis NAT2-diplotyping DNA samples. The DNA detection range of this new method was 5–150 ng/μL. Method verification of the Real-time PCR for NAT2-diplotyping by comparing it with the PCR method in 138 samples. The result has shown that NAT2-diplotype in all samples from both methods was 100% consistent. In conclusion, the novel real-time NAT2-diplotyping which provides faster results and is more convenient, can replace the previous PCR for clinical routine service.

Keywords: NAT2-diplotyping, Isoniazid, Real-time PCR, PCR, Acetylator

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารอีทีฟอนตกค้างในผลไม้ด้วยเทคนิค Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry

จิระพงศ์ เหลืองชัยพร ธรณิศวร ไซยมงคล และ วีรวิทย์ วิทยานันท์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ อีทีฟอน (ethephon) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นิยมใช้หลังการเก็บเกี่ยวเพื่อเร่งการสุกของผลไม้ โดยผลไม้เขตร้อนที่ศึกษา ได้แก่ กัลลวย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน และผลไม้เขตอบอุ่น ได้แก่ แอปเปิล เชอร์รี่ และ สตรอว์เบอร์รี่ การใช้ที่ไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดการตกค้างส่งผลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนตกค้างในผลไม้โดยอาศัยการสลายตัวของอีทีฟอนภายใต้สภาวะต่างให้เกิดแก๊สเอทิลีน และ ตรวจวัดด้วยเทคนิค headspace–gas chromatography–mass spectrometry (HS–GC–MS) ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่ามีความจำเพาะสูง โดยเอทิลีนมีค่า retention time เท่ากับ 2.45 นาที มีไอออนลักษณะเฉพาะที่ m/z 27, 26 และ 28 ไม่พบสัญญาณรบกวนใน method blank ขณะที่ matrix blank ของผลไม้ทุกชนิดตรวจพบเอทิลีนตามธรรมชาติในระดับต่ำกว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) การหาปริมาณใช้กราฟมาตรฐานภายนอก เนื่องจาก matrix effect อยู่ในระดับต่ำและไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ กราฟมาตรฐานช่วง 0.1–4.0 ไมโครกรัมของอีทีฟอน ให้ค่า R^2 เท่ากับ 1.0000 และช่วงการวิเคราะห์ในตัวอย่างผลไม้ให้ค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.9986–0.9998 วิธีมีค่า LOD และค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) สำหรับผลไม้เขตร้อนเท่ากับ 0.10 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสำหรับผลไม้เขตอบอุ่นเท่ากับ 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ผลไม้เขตร้อนให้ค่าการคืนกลับ 81.4–119.0% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.5–16.0 ขณะที่ผลไม้เขตอบอุ่นให้ค่าการคืนกลับ 89.8–120.0% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.9–13.9 โดยสรุป วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้อง เชื่อถือได้ เหมาะสมสำหรับการตรวจยืนยันการตกค้างของอีทีฟอนในผลไม้

คำสำคัญ: สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง, อีทีฟอน, เอทิลีน, ผลไม้, แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

Corresponding author E-mail: jirapong.luangchaiyaporn@gmail.com

Received: 4 March 2026

Revised: 19 June 2026

Accepted: 20 July 2026

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีภูมิอากาศเขตร้อนชื้น เหมาะสมต่อการเพาะปลูกผลไม้เศรษฐกิจหลากหลายชนิด เช่น ทูเรียน มะม่วง สับปะรด และกล้วย ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ และเป็นสินค้าส่งออกหลักในภาคเกษตรกรรม ข้อมูลจากสำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้า กระทรวงพาณิชย์ ระบุว่าในปี พ.ศ. 2567 ประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกผลไม้รวมทั้งในรูปแบบสดและแปรรูปสูงถึง 6,510.6 ล้านดอลลาร์สหรัฐ โดยเฉพาะผลไม้สดมีมูลค่าการส่งออก 5,149.4 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ทั้งนี้ทูเรียนเป็นผลไม้สดที่มีมูลค่าการส่งออกสูงสุด มีปริมาณการส่งออก 859,183 ตัน คิดเป็นมูลค่า 3,755.7 ล้านดอลลาร์สหรัฐ หรือร้อยละ 72.9 ของมูลค่าการส่งออกผลไม้สดทั้งหมดของประเทศ และมีตลาดส่งออกหลัก ได้แก่ จีน ฮองกง เกาหลีใต้ มาเลเซีย และสหรัฐอเมริกา⁽¹⁾ แนวโน้มดังกล่าวสะท้อนถึงบทบาทสำคัญของผลไม้ไทยในระบบเศรษฐกิจโลก และมีความจำเป็นในการรักษามาตรฐานด้านคุณภาพและความปลอดภัยอาหารเพื่อสร้างความเชื่อมั่นแก่ผู้บริโภคในตลาดสากล อย่างไรก็ตามแม้ประเทศไทยจะมีศักยภาพสูงด้านการผลิตและการส่งออกผลไม้ แต่พฤติกรรมผู้บริโภคผักและผลไม้ของประชาชนภายในประเทศยังคงต่ำกว่าเกณฑ์ที่องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) แนะนำ โดยผลการสำรวจระดับประเทศของสถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งดำเนินการเก็บข้อมูลในช่วงปี พ.ศ. 2561–2562 และเผยแพร่รายงานในปี พ.ศ. 2565 ชี้ให้เห็นว่าการบริโภคผักและผลไม้ของคนไทยส่วนใหญ่ยังไม่ถึงระดับอย่างน้อย 400 กรัมต่อวัน ซึ่งเป็นปริมาณที่ WHO แนะนำเพื่อช่วยลดความเสี่ยงของโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (non-communicable diseases; NCDs)^(2,3) สถานการณ์ดังกล่าวเน้นย้ำถึงความจำเป็นในการส่งเสริมการบริโภคผลไม้ที่มีคุณภาพและปลอดภัยจากสารเคมีตกค้าง เพื่อคุ้มครองสุขภาพผู้บริโภคควบคู่ไปกับการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยอาหารของประเทศ

อีทีฟอน (ethephon; 2-chloroethylphosphonic acid) จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต

ของพืช (plant growth regulator) ที่สามารถสลายตัวภายใต้สภาวะต่างให้เกิดแก๊สเอทิลีน ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชตามธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเจริญเติบโตและการสุกของผลไม้^(4,5) โดยในช่วงก่อนการเก็บเกี่ยว (pre-harvest) นิยมใช้เพื่อกระตุ้นการออกดอกให้เกิดพร้อมกัน ขณะที่ในช่วงหลังการเก็บเกี่ยว (post-harvest) ใช้เพื่อเร่งและควบคุมการสุกของผลไม้ให้มีความสม่ำเสมอ^(6,7) ผลไม้ที่มีการใช้อีทีฟอนอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ได้แก่ ทูเรียน มะม่วง และกล้วย อย่างไรก็ตามแม้อีทีฟอนจะมีประโยชน์ต่อการจัดการผลผลิตทางการเกษตร แต่การใช้ที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลให้เกิดสารตกค้างในผลผลิตและก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อผู้บริโภค โดยมีรายงานว่า การได้รับอีทีฟอนในปริมาณสูงอาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบทางเดินอาหาร ส่งผลต่อระบบประสาท และอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ ซึ่งสัมพันธ์กับคุณสมบัติทางพิษวิทยาของสารดังกล่าว^(8,9) ด้วยเหตุนี้ประเทศไทยจึงกำหนดมาตรการควบคุมด้านความปลอดภัยอาหารโดยประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 460) พ.ศ. 2568 ซึ่งออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ได้กำหนดเกณฑ์ค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุด (maximum residue limit; MRL) แตกต่างกันตามชนิดของผลไม้ ได้แก่ กล้วยและลูกผสม 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทูเรียน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มะม่วง 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สับปะรด 1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่มเชอร์รี่ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และองุ่นรวมถึงแอปเปิลกำหนดค่า MRL เท่ากับ 0.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ในระดับสากลคณะกรรมการโคเด็กซ์ (Codex Alimentarius Commission) ได้กำหนดค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุดของอีทีฟอนในผลไม้หลายชนิดในช่วง 0.8–5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขึ้นกับชนิดของผลไม้⁽¹¹⁾ และยังมีการรายงานเหตุการณ์ที่ผลไม้ไทยถูกตรวจพบสารตกค้างเกินค่ามาตรฐานในต่างประเทศ ซึ่งส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์ของประเทศและการค้าระหว่างประเทศอย่างมีนัยสำคัญ⁽¹²⁾

แม้จะมีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานทางกฎหมายที่ชัดเจน แต่การเฝ้าระวังสารตกค้างของ ethephon ยังคงเผชิญข้อจำกัดด้านการตรวจวิเคราะห์ ปัจจุบัน

มีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีหลายวิธีในการวิเคราะห์สารอีทีฟอนในผลไม้ ได้แก่ high-performance liquid chromatography (HPLC-UV), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), ion chromatography-mass spectrometry (IC-MS/MS) และ gas chromatography (GC)⁽¹³⁻¹⁷⁾ โดยเทคนิค LC-MS/MS สามารถวิเคราะห์อีทีฟอนในรูปเดิมได้โดยตรง มีความไวและความจำเพาะสูง เหมาะสำหรับการตรวจวัดสารตกค้างในระดับต่ำในผลไม้หลายชนิด^(13,15,16,18) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน และอาจได้รับผลกระทบจาก matrix effect ขององค์ประกอบที่ซับซ้อนของเนื้อผลไม้ ซึ่งอาจส่งผลต่อความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของผลการวิเคราะห์^(13,15,18,19) ส่วนการวิเคราะห์ด้วย GC โดยตรวจสารอีทีฟอนโดยตรงเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากอีทีฟอนเป็นสารที่มีขี้สูง ละลายน้ำได้ดี และระเหยยาก จึงมักต้องอาศัยการสลายตัวภายใต้สภาวะต่างให้เกิดแก๊สเอทิลีนก่อนตรวจวัดด้วยเทคนิค headspace GC^(14,17,20) ดังนั้นเทคนิค headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) ซึ่งอาศัยการตรวจวัดแก๊สเอทิลีนในเฟสไอเหนือผิวตัวอย่าง จึงมีข้อได้เปรียบด้านการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ซับซ้อน ให้สัญญาณที่มีเสถียรภาพ และช่วยลดการรบกวนจากเมทริกซ์ของผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เป็นอีกทางเลือกที่มีศักยภาพสำหรับการวิเคราะห์สารอีทีฟอนในผลไม้^(14,17)

เพื่อสนับสนุนการดำเนินงานด้านการเฝ้าระวังคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์อีทีฟอนในรูปแบบ single residue method ที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง และความเชื่อถือได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและประเมินความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนด้วยเทคนิค HS-GC-MS สำหรับการตรวจวิเคราะห์ในผลไม้ เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในด้านการขยายขอบข่ายการตรวจสอบให้สอดคล้องกับกฎหมายอาหาร ประกาศกระทรวงสาธารณสุข และมาตรฐานคณะกรรมการอาหารระหว่าง

ประเทศ (Codex) ตลอดจนการรองรับการค้าระหว่างประเทศ โดยเฉพาะผลไม้ส่งออก นอกจากนี้ผลการตรวจวิเคราะห์ยังสามารถนำไปใช้ในการประเมินสถานการณ์สารตกค้างในระดับประเทศ สนับสนุนการประเมินความปลอดภัยอาหาร และใช้เป็นข้อมูลประกอบการเตือนภัยเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค รวมถึงการวางแผนป้องกันและแก้ไขปัญหาเชิงรุกอย่างเหมาะสมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา คือ อีทีฟอนมาตรฐาน (ethephon standard) ความบริสุทธิ์ $\geq 97\%$ เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง (certified reference material; CRM) (Dr. Ehrenstorfer, LGC Standards, Germany)

สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ เมทานอล (methanol, gradient grade for LC) (LiChrosolv[®], Supelco, Merck, Germany) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ซึ่งเตรียมจากกรด HCl 37% (EMSURE[®], Supelco, Merck, Germany) น้ำบริสุทธิ์ DI water (Type I, resistivity $> 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) โซเดียมไฮดรอกไซด์อิ่มตัว (saturated NaOH) ซึ่งเตรียมโดยเติม NaOH (EMSURE[®], Supelco, Merck, Germany) จนถึงจุดอิ่มตัวและมีผลึกตกค้าง รวมถึงเฮกเซน (n-hexane) และอะซีโตน (acetone) (B&J Brand[™], Honeywell Burdick & Jackson, USA)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียม stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารอีทีฟอนน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ ≤ -18 องศาเซลเซียส และมีอายุการใช้งานไม่เกิน 3 เดือน

เตรียม intermediate standard solution โดยเจือจาง stock standard solution ด้วยสารละลาย MeOH:HCl อัตราส่วน 6:4 โดยปริมาตร ให้ได้

ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารมาตรฐานระดับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเจือจางต่ออีก 10 เท่า ทั้งสองระดับนี้ใช้สำหรับเตรียม working standard solution

เตรียม working standard solutions ในช่วงความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 ไมโครกรัม ในขวด headspace ขนาด 20 มิลลิลิตร โดยเตรียมก่อนใช้งานทันที หรือสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ≤ -18 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 1 สัปดาห์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า (รุ่น LP620S, Sartorius, Germany) ความละเอียด 0.001 กรัม สำหรับชั่งน้ำหนักตัวอย่างผลไม้ และเครื่องชั่งไฟฟ้า (รุ่น MC 210S, Sartorius, Germany) ความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม สำหรับชั่งสารมาตรฐาน เครื่องบดปั่นอาหาร (รุ่น Original 4000, RONIC, Poland) สำหรับทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเนียนสม่ำเสมอ เครื่องหมุนปั่นผสม

สารละลายแบบ vortex (รุ่น G560E Vortex-2 Genie, Scientific Industries, USA) หลอดเซนตริฟิวจ์กันแหลม (conical centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร (JET BIOFIL, China) สำหรับเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ และตู้แช่แข็ง (รุ่น 3552-1, Thermo Scientific, USA) อุณหภูมิ ≤ -18 องศาเซลเซียส สำหรับเก็บรักษาสารมาตรฐานและตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

การตรวจวัดแก๊สเอทิลีนใช้เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) (รุ่น TRACE™ 1610, Thermo Scientific, USA) เชื่อมต่อกับเครื่องวิเคราะห์มวลสาร ISQ™ 7610 Single Quadrupole พร้อมระบบฉีดตัวอย่างอัตโนมัติแบบ headspace TriPlus™ RSH (HS) (รุ่น 365L2321-SM, Thermo Scientific, USA) โดยควบคุมการทำงานและเก็บข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Chromeleon™ 7 โดยสภาวะการทำงานที่ได้รับการคัดเลือกสำหรับการวิเคราะห์แก๊สเอทิลีนด้วยเทคนิค HS-GC-MS ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะการทำงานของเครื่อง HS-GC-MS สำหรับการตรวจวัดแก๊สเอทิลีน

Category	Parameter	Condition
Headspace	Vial size	20 mL headspace vial
	Injection volume	2 mL (headspace injection)
Gas Chromatography	Inlet conditions	Inlet temperature 180°C; split mode; split ratio 20:1; septum purge flow 15 mL/min
	Column	PLOT/Q fused silica capillary column, 30 m $\times$ 0.32 mm i.d., film thickness 20 μ m
	Carrier gas and flow rate	Helium, constant flow at 2.5 mL/min 40°C
	Oven temperature program	(4 min) $\rightarrow$ ramp from 40 to 240°C at 30°C/min $\rightarrow$ hold at 240°C for 5 min
Mass Spectrometry	Ionization mode	Electron ionization (EI, 70 eV)
	Acquisition mode	Selected ion monitoring (SIM)
	Target ions (ethylene)	m/z 27 (quantifier), 26 and 28 (qualifiers)
	Ion source temperature	200°C
	Transfer line temperature	250°C

อุปกรณ์ที่ใช้ ได้แก่ micropipette ขนาด 2–20, 20–200 และ 100–1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Germany) พร้อมหัว tip ปลอดสารปนเปื้อน ขวดแก้ว headspace vial ปริมาตร 20 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิดอลูมิเนียม และ septum ทนความร้อน และ volumetric

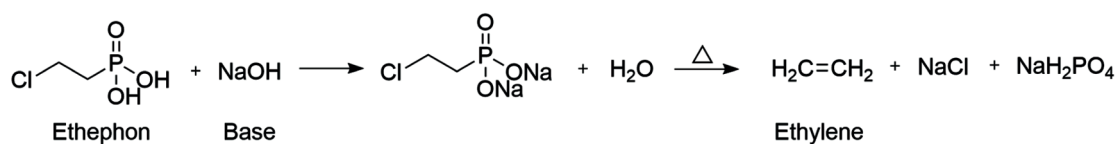
flask สำหรับเตรียมสารละลาย เครื่องแก้วทุกชนิดทำความสะอาดโดยล้างด้วย acetone 2 ครั้ง และ n-hexane 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งก่อนใช้งาน เพื่อหลีกเลี่ยงความปนเปื้อนจากสารระเหยหรือคราบอินทรีย์

การพัฒนาวิธีการฉีดตัวอย่างด้วยเทคนิค headspace

ทดลองปรับพารามิเตอร์การฉีดตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง HS-GC-MS โดยเปรียบเทียบสภาวะการฉีดตัวอย่างแบบ split ระหว่าง split ratio ที่ 1:15 และ 1:20 เปรียบเทียบอุณหภูมิของ inlet temperature ระหว่าง 180 และ 220 องศาเซลเซียส และปริมาตรการฉีดระหว่าง 1.0 และ 2.0 มิลลิลิตร เพื่อคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ทำการทดลองแต่ละสภาวะจำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบ response signal เฉลี่ยที่ได้ และคัดเลือกสภาวะที่ให้สัญญาณสูงร่วมกับมี peak shape ที่มีความสมมาตร คมชัด ฐานแคบ และตั้งอยู่บนเส้นฐานที่ราบเรียบมากที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป

ปฏิกิริยาการเกิดแก๊สเอทิลีน

เมื่อเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นในขวด headspace ที่มีสารอีทีฟอน อีทีฟอนจะเกิดการสลายตัวภายใต้สภาวะต่างร่วมกับการเร่งปฏิกิริยา



สมการที่ 1

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ประกอบด้วย ผลไม้เขตร้อน (tropical fruits) ได้แก่ กล้วย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน และผลไม้เขตอบอุ่น (temperate fruits) ได้แก่ แอปเปิล เชอร์รี่ และสตรอว์เบอร์รี่

เตรียม matrix blank โดยใช้ตัวอย่างที่ไม่พบสารที่สนใจ (analyte-free sample) โดยใช้ตัวอย่างทั้งหมดหากมีน้ำหนักไม่เกิน 1 กิโลกรัม หรือสับตัวอย่างด้วยวิธี quartering และเลือกใช้ส่วนตรงข้ามกันของผลหากมีน้ำหนักมากกว่า 1 กิโลกรัม จากนั้นตัดทิ้งเฉพาะส่วนที่ไม่บริโภค ได้แก่ เมล็ด ก้าน และจุกสับปะรด และใช้เฉพาะส่วนที่บริโภคได้ตามชนิดของผลไม้ เตรียมตัวอย่างไม่น้อยกว่า 500 กรัม ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน และแบ่งเป็น

ด้วยความร้อน ส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยแก๊สเอทิลีน ดังสมการที่ 1 เอทิลีนที่เกิดขึ้นเป็นสารระเหยง่ายและสามารถกระจายเข้าสู่เฟสแก๊สในบริเวณ headspace ได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นระบบหัวฉีดอัตโนมัติจะดูดส่วนของ headspace และส่งผ่านท่อส่งที่ควบคุมอุณหภูมิเข้าสู่คอลัมน์ชนิด PLOT/Q เพื่อแยกแก๊สเอทิลีนออกจากสารระเหยอื่นที่อาจมีอยู่ในเมทริกซ์ของตัวอย่าง ผลไม้ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดมวลสารแบบ single quadrupole ซึ่งใช้ตัวกรองมวลชนิดควอดรูโพลหนึ่งชุดในการคัดเลือกไอออนตามอัตราส่วนมวลต่อประจุ (m/z) โดยอาศัยสนามไฟฟ้ากระแสตรงร่วมกับสนามไฟฟ้ากระแสสลับความถี่วิทยุ การทำงานในโหมด selected ion monitoring (SIM) ช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะของการตรวจวัดโดยติดตามเฉพาะไอออนเป้าหมายและลดสัญญาณรบกวนจากเมทริกซ์ ส่งผลให้วิธีวิเคราะห์มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารอีทีฟอนในตัวอย่างอาหารที่มีเมทริกซ์ซับซ้อนได้อย่างถูกต้องและเชื่อถือได้

analytical portion และ reserved portion โดยเก็บที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า เพื่อป้องกันการลดลงหรือเพิ่มขึ้นของสารตกค้าง^(21,22)

การสกัดตัวอย่าง

ก่อนการเตรียมตัวอย่างต้องทำความสะอาดเครื่องแก้วทุกชิ้นโดยล้างด้วย acetone และ n-hexane แล้วคว่ำให้แห้ง เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่อาจส่งผลต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์ ตัวอย่างผลไม้ที่ผ่านการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน จำนวน 5.0 ± 0.1 กรัม นำมาซึ่งใส่ขวด headspace ขนาด 20 มิลลิลิตร แล้วเติมเมทานอลอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร และสารละลาย saturated NaOH อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตรลงในขวด จากนั้น

ปิดผนึกด้วย aluminum crimp seal ทันทีในขณะที่สารละลายยังมีอุณหภูมิต่ำ เพื่อลดการสูญเสียแก๊สที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างถูกผสมด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที ก่อนนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเร่งให้เกิดการสลายตัวของอีทีฟอนเป็นแก๊สเอทิลีน จากนั้นนำไป sonication เป็นเวลา 2 นาที เพื่อช่วยจัดฟองอากาศและช่วยให้เข้าสู่ภาวะสมดุลระหว่างเฟสของเนื้อผลไม้และเฟสแก๊สใน headspace แก๊สเอทิลีนที่เกิดขึ้นจะถูกดูดเข้าสู่เครื่อง GC-MS ด้วยเทคนิค headspace injection เพื่อให้ได้การตรวจวัดที่มีความไวและความจำเพาะสูง

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity)

ความจำเพาะของวิธีประเมินโดยการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อตรวจสอบค่า retention time (RT) โดยกำหนดเกณฑ์ยอมรับเป็น ± 0.1 นาที รวมถึงตรวจสอบ quantification ion และ qualification ions จากนั้นทำการวิเคราะห์ method blank ซึ่ง chromatogram ต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่า RT และ/หรือค่า m/z ตรงกับสารมาตรฐาน และวิเคราะห์ matrix blank ของตัวอย่างผลไม้ทุกชนิดตามวิธีที่กำหนด โดยต้องไม่พบสัญญาณของสารเป้าหมายหรือหากพบสัญญาณ ปริมาณของสารต้องต่ำกว่าค่าขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection; LOD) ของเครื่องมือ

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve)

ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยการฉีดสารมาตรฐานอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น โดยระดับต่ำสุดต้องเท่ากับหรือต่ำกว่าค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (x-axis) กับ peak area หรือ intensity/response (y-axis) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับ $R^2 \geq 0.99$

การประเมินผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix effect)

ทำการศึกษาผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix effect) ในกลุ่มผลไม้เขตร้อน ซึ่งเป็นเมทริกซ์ที่มีสัญญาณพื้นหลัง (background) สูง และอาจส่งผลกระทบต่อ การตรวจวิเคราะห์ได้ ดำเนินการโดยเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้จากเมทริกซ์ของผลไม้กับค่าที่ได้จากสารละลายมาตรฐานในเมทานอล (MeOH) ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน โดยใช้การวิเคราะห์สมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression)^(23,24) ระหว่างค่าที่ได้จากเมทริกซ์และจาก MeOH ตามสมการ $C_{\text{matrix}} = aC_{\text{MeOH}} + b$ รายงานค่า slope และ intercept พร้อมช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (95% CI) โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับว่าผลของเมทริกซ์อยู่ในระดับที่ยอมรับได้เมื่อ 95% CI ของ slope ครอบคลุมค่า 1 และของ intercept ครอบคลุมค่า 0 ความเป็นเส้นตรงของสมการประเมินจากค่า R^2 โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับที่ $R^2 \geq 0.99$ นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบ paired t-test แบบ two-tailed เพื่อสนับสนุนการประเมินเชิงสถิติ โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับเมื่อค่า $p\text{-value} > 0.05$ ($n = 6$, $df = 5$, $\alpha = 0.05$)

ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOD and LOQ)

การหาค่า LOD และ LOQ ดำเนินการโดยใช้ 2 แนวทาง ได้แก่ 1) ใช้ target LOD โดยการพิจารณาจากอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio; S/N) โดยกำหนดค่า LOD เป็นระดับความเข้มข้นที่ให้ค่า $S/N > 3$ และค่า LOQ เป็นระดับความเข้มข้นที่ให้ค่า $S/N > 10$ และ 2) คำนวณจากระดับพื้นหลังของเอทิลีนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในเมทริกซ์ โดยทำการวิเคราะห์ matrix blank เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และคำนวณค่า LOD ตามสมการ $LOD = \text{Mean (blank)} + 3SD$ ⁽²⁵⁾ จากนั้นทำการยืนยันค่า LOD โดยการเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ทุกชนิด ตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้นของ LOD จำนวน 10 ซ้ำ โดย S/N ต้องให้ค่ามากกว่า 3 ในทุกตัวอย่าง และมีอัตราส่วนความเข้มข้นสัญญาณของ confirmation ion

อยู่ภายใน $\pm 30\%$ ของสารมาตรฐาน สำหรับการยืนยันค่า LOQ ทำการเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้นของ LOQ จำนวน 10 ซ้ำ และประเมินค่าร้อยละการคืนกลับเฉลี่ย (mean %recovery) และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับของ %recovery อยู่ในช่วง 70–120% และ %RSD ไม่เกิน 20%

ความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision)

ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ประเมินโดยการเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ของตัวอย่างผลไม้ โดยกำหนดระดับความเข้มข้นในผลไม้เซตร้อน ได้แก่ กล้วย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน ที่ระดับความเข้มข้น 0.30, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนผลไม้เขตอบอุ่น ได้แก่ แอปเปิล เชอร์รี่ และสตรอว์เบอร์รี่ ทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.30 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่พิสูจน์แล้วว่ามีความเป็นเส้นตรงโดยวิเคราะห์ตัวอย่างในแต่ละระดับจำนวน 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) และค่า %RSD เพื่อประเมินสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 70–120% และค่า %RSD ไม่เกิน 20% ตามแนวทาง SANTE/11312/2021 v2026⁽²⁶⁾

ช่วงการวิเคราะห์และความเป็นเส้นตรง (working range and linearity)

ยืนยันช่วงการวิเคราะห์ (Range) โดยการเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ของผลไม้เซตร้อน ได้แก่ กล้วย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน อย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น ภายในช่วงกราฟมาตรฐานที่พิสูจน์แล้วว่าเป็นเส้นตรง โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธี ระดับละ 3 ซ้ำ และประเมินความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ซึ่งต้องไม่น้อยกว่า 0.99 สำหรับเมทริกซ์ของผลไม้เขตอบอุ่นไม่ได้ทำการประเมินช่วงการวิเคราะห์ เนื่องจากช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการประเมินความแม่นยำและความเที่ยงครอบคลุมช่วงที่วิธีวิเคราะห์แสดงความเป็นเส้นตรงได้อย่างเหมาะสม

ความไม่แน่นอนของการวัด (measurement uncertainty)

ประเมินตามแนวทาง EURACHEM และ ISO GUM โดยพิจารณาแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ ได้แก่ การชั่งน้ำหนัก การเตรียมสารมาตรฐานและ working solution การเจือจาง การเตรียมตัวอย่าง ความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำ ความเที่ยง และความแปรผันของเครื่องมือ จากนั้นคำนวณค่า combined standard uncertainty และขยายค่าด้วย coverage factor $k = 2$ เพื่อให้ได้ค่าความไม่แน่นอนแบบขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดสอบความชำนาญ (proficiency testing)

เพื่อยืนยันสมรรถนะของวิธี ห้องปฏิบัติการได้เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญของ FAPAS® 19436 (Apple Purée) โดยดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธี HS-GC-MS ที่พัฒนาขึ้นภายใต้สภาวะเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง เพื่อยืนยันความถูกต้องและความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล

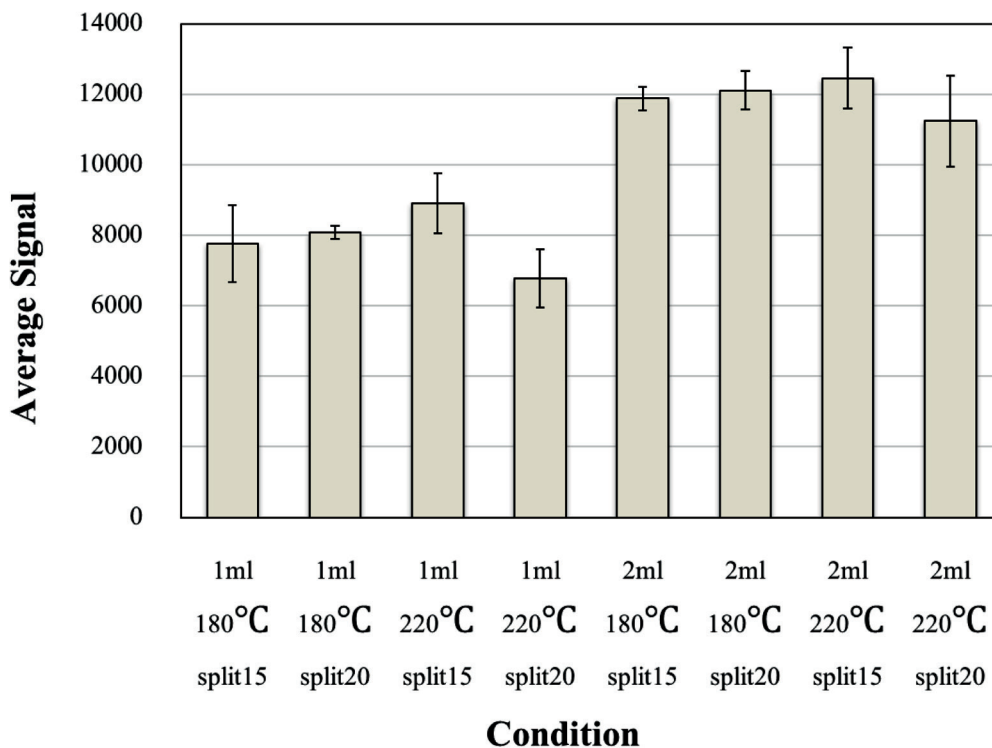
ผล

การพัฒนาวิธีการฉีดตัวอย่างด้วยเทคนิค headspace

เมื่อเปรียบเทียบปริมาตรการฉีดตัวอย่าง (injection volume) ระหว่าง 1 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร โดยทำการทดลองแต่ละสภาวะ จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าเมื่อใช้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้สัญญาณเฉลี่ยสูงกว่าการใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในทุกสภาวะ เมื่อพิจารณาเฉพาะสภาวะที่ใช้ 2 มิลลิลิตร พบว่าสภาวะที่ใช้ inlet temperature 220 องศาเซลเซียส และ split ratio 1:15 ให้สัญญาณเฉลี่ยสูงสุด (average signal = 12,450) รองลงมา คือ สภาวะ 2 มิลลิลิตร inlet temperature 180 องศาเซลเซียส split ratio 1:20 (average signal = 12,110) และสภาวะ 2 มิลลิลิตร inlet temperature 180 องศาเซลเซียส split ratio 1:15 (average signal = 11,883) ขณะที่สภาวะ 2 มิลลิลิตร inlet temperature 220 องศาเซลเซียส split ratio 1:20 ให้สัญญาณเฉลี่ยต่ำที่สุดในกลุ่ม 2 มิลลิลิตร (average signal = 11,238)

โดยสภาวะ 2 มิลลิลิตร inlet temperature 180 องศาเซลเซียส split ratio 1:15 มีค่า SD ต่ำที่สุด (331) และสภาวะ 2 มิลลิลิตร inlet temperature 220 องศาเซลเซียส split ratio 1:20 มีค่า SD สูงที่สุด (1,290) ในกลุ่มเดียวกัน ในการศึกษานี้เลือกใช้สภาวะ 2 มิลลิลิตร

inlet temperature 180 องศาเซลเซียส split ratio 1:20 เนื่องจากให้ sensitivity ที่ดี ใช้อุณหภูมิต่ำโดยไม่ทำลายตัวอย่าง และ split ratio สูงทำให้ได้ peak shape ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์มากกว่า



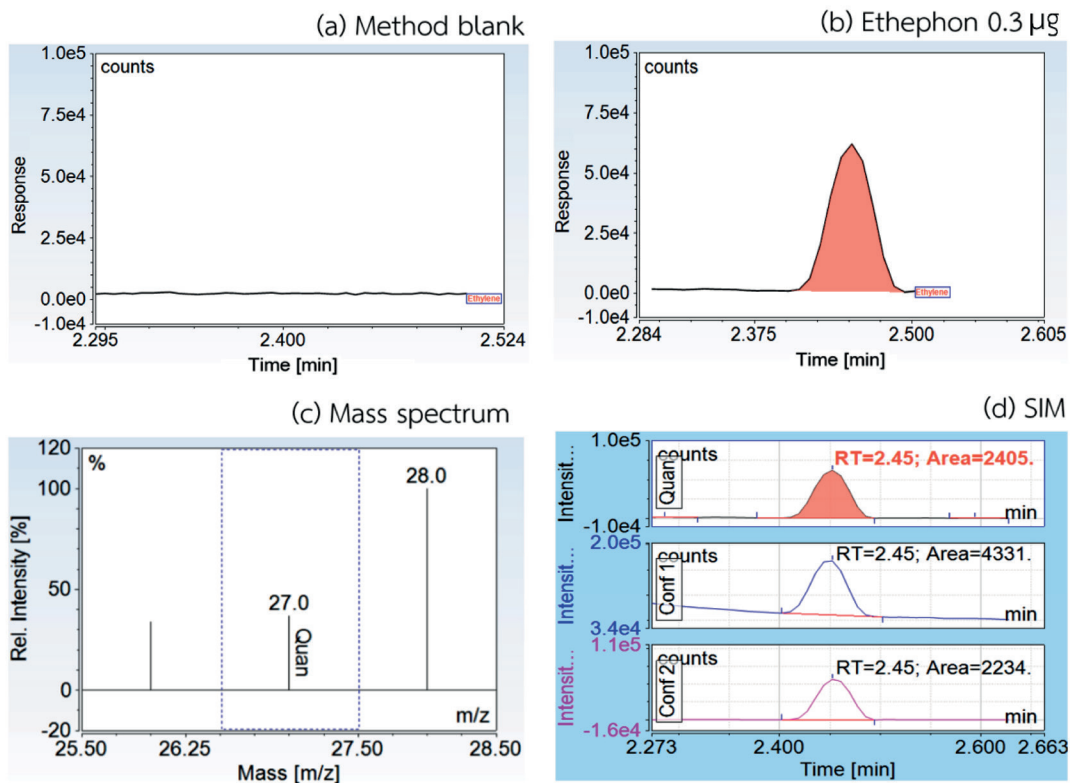
ภาพที่ 1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบสภาวะการฉีดตัวอย่างต่อสัญญาณเฉลี่ย

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation results)

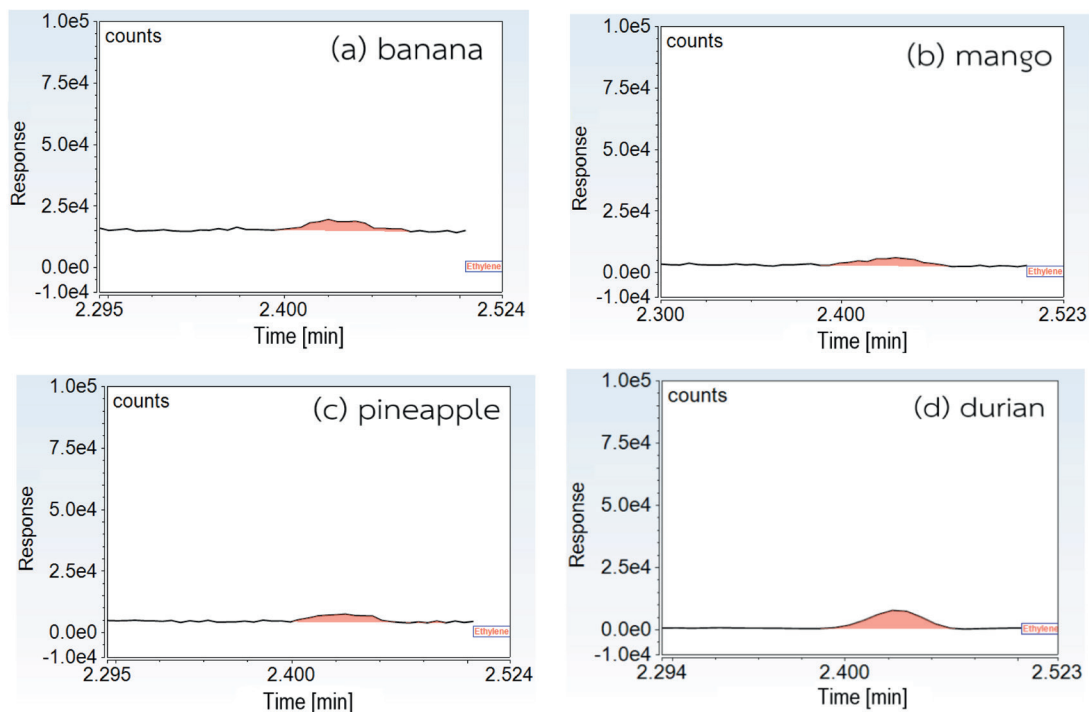
ความจำเพาะของวิธี

การประเมินความจำเพาะของวิธีดำเนินการโดยการฉีดสารมาตรฐานเอทิลีนที่ได้จากการสลายตัวของอีทีฟอน จำนวน 3 ครั้งต่อแต่ละระดับความเข้มข้นเพื่อตรวจสอบ retention time (RT) และสัดส่วนของไอออน โดยกำหนด m/z 27 เป็น quantifier ion และ m/z 26 และ 28 เป็น qualifier ions ผลการทดลองแสดงว่าเอทิลีนมีค่า RT คงที่ที่ 2.45 ± 0.0 นาที ในทุกระดับความเข้มข้นที่ศึกษา ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 μg และอัตราส่วนของไอออน

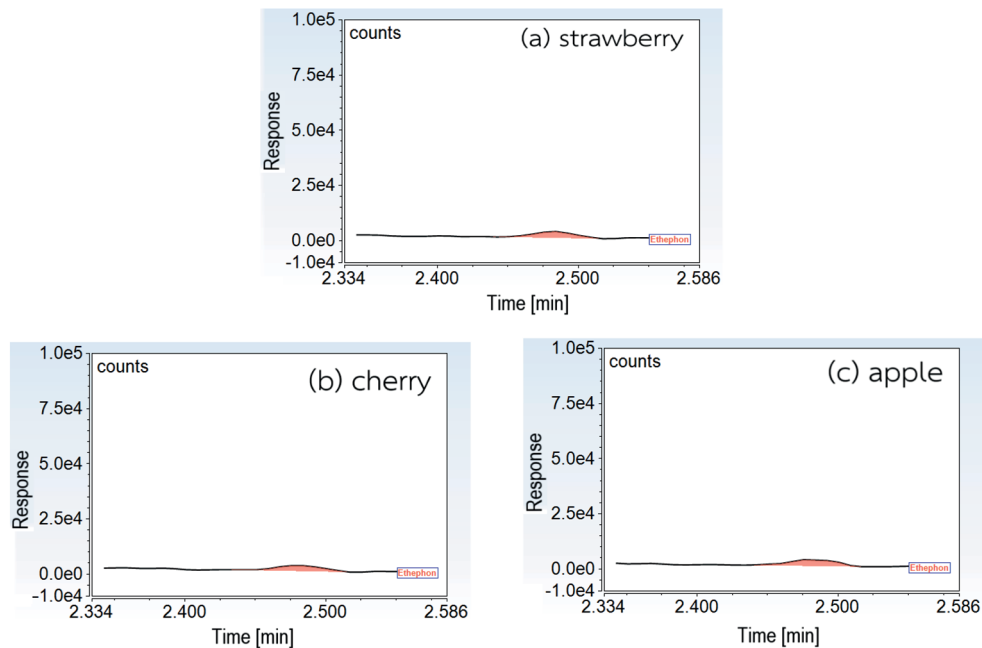
ทั้งสามตัวสอดคล้องกับสารมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 2 พบว่า method blank ไม่ปรากฏพีคที่ RT 2.45 นาที ขณะที่ตัวอย่างอีทีฟอนความเข้มข้น 0.3 μg หลังการสลายตัวอย่างได้สภาวะต่างให้พีคที่ตำแหน่งเดียวกัน โดย mass spectrum ของพีคดังกล่าวแสดงไอออนที่ m/z 26, 27 และ 28 และโครมาโทแกรมแบบ SIM ของ m/z 26, 27 และ 28 แสดงพีคที่ RT = 2.45 นาที นอกจากนี้การวิเคราะห์ matrix ของทุกชนิดตัวอย่างพบสัญญาณเอทิลีนตามธรรมชาติ แต่เมื่อคำนวณเป็นปริมาณที่พบในตัวอย่างแล้ว พบว่าปริมาณต่ำกว่า LOD ทุกชนิดตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมจากเครื่อง GC-MS แสดง (a) method blank, (b) ตัวอย่างอีทีฟอน 0.3 µg หลังการสลายตัวภายใต้สภาวะต่าง, (c) mass spectrum ของเอทิลีน (m/z 26, 27 และ 28) และ (d) extracted ion chromatograms (SIM) ของ m/z 26, 27 และ 28 ที่ $RT = 2.45$ นาที



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมจากเครื่อง GC-MS ของเอทิลีนที่ตรวจวัดได้ในเมทริกซ์ผลไม้เขตร้อน ได้แก่ (a) กัลย (banana), (b) มะม่วง (mango), (c) สับปะรด (pineapple) และ (d) ทุเรียน (durian)

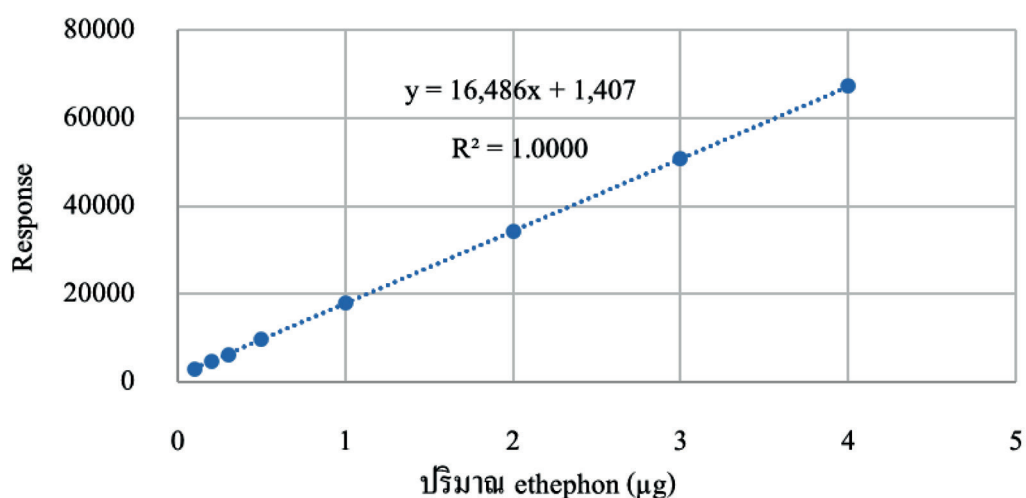


ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมจากเครื่อง GC-MS ของเอทิลินที่ตรวจวัดได้ในเมทริกซ์ผลไม้เชตอบอุ่น ได้แก่ (a) สตอร์วเบอร์รี่ (strawberry), (b) เชอร์รี่ (cherry) และ (c) แอปเปิล (apple)

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve)

ทำการสร้างกราฟมาตรฐานแบบ external calibration ครอบคลุมช่วงความเข้มข้น 0.1–4.0 ไมโครกรัม (0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 ไมโครกรัม) โดยวิเคราะห์ซ้ำระดับละ 3 ครั้ง และใช้ค่าเฉลี่ยของ response ในแต่ละระดับความเข้มข้น

ผลการพล็อตความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารอีทีฟอนและพื้นที่พีคของเอทิลินให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 1.0000 ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ($R^2 \geq 0.99$) แสดงให้เห็นถึงความเป็นเส้นตรงของวิธีที่ดีเยี่ยมตลอดช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ethephon (μg) กับ analyte peak area (response)

ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ผลการประเมิน matrix effect ด้วยวิธี linear regression^(23,24) ระหว่างความเข้มข้นที่ได้จากเมทริกซ์ของผลไม้เซตร้อน ได้แก่ มะม่วง สับปะรด ทูเรียน และกล้วย กับความเข้มข้นจากสารละลายมาตรฐานใน MeOH ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าเมทริกซ์ทุกชนิดให้ผลการถดถอยที่มีความเป็นเส้นตรงสูง มีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.9987–0.9997 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด ค่า slope อยู่ในช่วง 1.024–1.044 โดยทูเรียนและสับปะรดมีช่วง

ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ slope ครอบคลุมค่า 1 ขณะที่มะม่วงและกล้วยให้ค่า slope สูงกว่า 1 เล็กน้อย นอกจากนี้ค่า intercept ของทุกเมทริกซ์มีค่าต่ำและช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (95% CI) ครอบคลุมศูนย์ ผลจากการทดสอบ paired t-test แบบ two-tailed ($n = 6$, $df = 5$, $\alpha = 0.05$) พบว่าเมทริกซ์ทุกชนิดให้ค่า p -value มากกว่า 0.05 สำหรับเมทริกซ์ของผลไม้เซตตอบอุ่นไม่ได้ทำการประเมิน matrix effect เนื่องจาก background ที่ตรวจพบอยู่ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้เซตร้อน

ตารางที่ 2 ผลการประเมินผลกระทบจากเมทริกซ์ของผลไม้โดยวิธี linear regression และ paired t-test

Matrix	Slope	95% CI (Slope)	Intercept	95% CI (Intercept)	R^2	t	p-value
มะม่วง	1.042	1.007 to 1.078	-0.009	-0.089 to 0.071	0.9994	2.267	0.073
สับปะรด	1.030	0.979 to 1.082	-0.024	-0.139 to 0.092	0.9987	1.099	0.322
ทูเรียน	1.024	0.998 to 1.050	-0.011	-0.069 to 0.048	0.9997	1.418	0.216
กล้วย	1.044	1.014 to 1.074	-0.019	-0.087 to 0.049	0.9996	2.112	0.088

หมายเหตุ: 1) Linear regression คำนวณจากสมการ $C_{\text{matrix}} = aC_{\text{MeOH}} + b$ โดยใช้ MeOH เป็นตัวแปรอิสระ
2) ค่า t และ p-value ได้จากการทดสอบ paired t-test แบบ two-tailed
3) Paired t-test ใช้จำนวนคู่ข้อมูล $n = 6$, $df = 5$ และกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$

การทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)

การทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจพบในผลไม้เซตร้อน ได้แก่ กล้วย มะม่วง สับปะรด และทูเรียน ดำเนินการโดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ พบว่าค่าอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N ratio) อยู่ในช่วง 147–399, 182–412, 88–158 และ 108–299 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สำหรับผลไม้เซตตอบอุ่น ได้แก่ แอปเปิล เชอร์รี่ และสตรอว์เบอร์รี่ คำนวณค่า LOD จากการวิเคราะห์ matrix blank จำนวน 10 ซ้ำ โดยใช้สมการ $LOD = \text{Mean}(\text{blank}) + 3SD$ พบว่าค่า

LOD ที่คำนวณได้ของแอปเปิลและสตรอว์เบอร์รี่เท่ากับ 0.011 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเชอร์รี่เท่ากับ 0.007 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ตามเพื่อความเหมาะสมในการใช้งานจริง จึงกำหนดค่า LOD สำหรับผลไม้เซตตอบอุ่นเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยันโดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับดังกล่าว จำนวน 10 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ตามวิธี พบว่าค่า S/N ratio ของแอปเปิล เชอร์รี่ และสตรอว์เบอร์รี่ อยู่ในช่วง 6–39, 20–36 และ 11–41 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีสามารถตรวจพบอีทีฟอนได้อย่างเหมาะสมที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว ผลการทดสอบ LOD ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) ของวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนในตัวอย่างผลไม้แต่ละชนิด

กลุ่มตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	LOD ที่คำนวณได้ (mg/kg)	LOD ที่ยืนยันได้ (mg/kg)	S/N ratio at LOD*
ผลไม้เขตร้อน	กล้วย	–	0.10	147–399
	มะม่วง			182–412
	สับปะรด			88–158
	ทุเรียน			108–299
ผลไม้เขตอบอุ่น	แอปเปิล	0.011	0.02	6–39
	เชอร์รี่	0.007		20–36
	สตรอว์เบอร์รี่	0.011		11–41

หมายเหตุ: ค่า S/N ratio ที่ระดับ LOD จากการทดสอบ 10 ซ้ำ, ยืนยันค่า LOD ที่ 0.10 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในผลไม้เขตร้อนและผลไม้เขตอบอุ่น ตามลำดับ

การทดสอบค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ความแม่นยำ (%recovery) และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD)

การทดสอบค่าขีดจำกัดเชิงปริมาณ ความแม่นยำ และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนในตัวอย่างผลไม้ดำเนินการโดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ผลไม้เขตร้อน (กล้วย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน) และผลไม้เขตอบอุ่น (แอปเปิล เชอร์รี่ และสตรอว์เบอร์รี่) โดยผลไม้เขตร้อนมีค่า LOQ เท่ากับ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ผลไม้เขตอบอุ่นมีค่า LOQ ต่ำกว่าคือ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับผลการทดสอบในผลไม้เขตร้อนที่ระดับความเข้มข้น 0.30, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (n = 10) ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า กล้วยมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 105.7–112.6% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 7.3–16.0% ขณะที่มะม่วงมีค่า

%recovery 113.0–115.9% และ %RSD 1.5–6.4% สับปะรดมีค่า %recovery 108.3–119.0% และ %RSD 5.6–9.3% ส่วนทุเรียนมีค่า %recovery 81.4–105.5% และ %RSD 5.6–8.5% ในส่วนของผลไม้เขตอบอุ่น ผลทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.30 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (n = 10) พบว่าแอปเปิลมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 98.6–120.0% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.9–11.1% ขณะที่เชอร์รี่มีค่า %recovery 89.8–98.2% และ %RSD 7.2–13.9% และสตรอว์เบอร์รี่มีค่า %recovery 90.0–97.1% และ %RSD 5.4–9.6% โดยรวม ผลการประเมินทั้งหมดพบว่าวิธีวิเคราะห์ให้ค่าความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของ SANTE/11312/2021 v2026⁽²⁶⁾ สำหรับการวิเคราะห์สารตกค้างในอาหาร

ตารางที่ 4 ผลการประเมินค่า LOQ ความแม่นยำ และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนในตัวอย่างผลไม้

กลุ่มตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ระดับที่เติมสารมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	%Recovery	%RSD
ผลไม้เขตร้อน	กล้วย	0.30 (LOQ)	105.7	16.0
		1.00	112.6	7.3
		2.00	109.8	15.9

ตารางที่ 4 ผลการประเมินค่า LOQ ความแม่นยำ และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์หีฟอนในตัวอย่างผลไม้ (ต่อ)

กลุ่มตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ระดับที่เติมสารมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	%Recovery	%RSD
ผลไม้เขตร้อน	มะม่วง	0.30 (LOQ)	113.0	6.4
		1.00	115.8	1.5
		2.00	115.9	4.5
	สับปะรด	0.30 (LOQ)	108.3	9.3
		1.00	119.0	6.0
		2.00	112.4	5.6
	ทุเรียน	0.30 (LOQ)	91.8	5.6
		1.00	81.4	8.5
		2.00	105.5	7.3
ผลไม้เขตอบอุ่น	แอปเปิล	0.05 (LOQ)	120.0	5.6
		0.30	101.6	2.9
		1.00	98.6	11.1
	เชอร์รี่	0.05 (LOQ)	98.2	7.2
		0.30	89.8	11.8
		1.00	92.8	13.9
	สตรอว์เบอร์รี่	0.05 (LOQ)	97.1	5.4
		0.30	96.6	6.1
		1.00	90.0	9.6

หมายเหตุ: ผลไม้เขตร้อนกำหนด LOQ ที่ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และผลไม้เขตอบอุ่นกำหนด LOQ ที่ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการทดสอบ 10 ซ้ำ

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ (linearity of working range)

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ประเมินเฉพาะในเมทริกซ์ของผลไม้เขตร้อน โดยเติมสารมาตรฐานอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.30, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 และ 4.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และวิเคราะห์ซ้ำระดับละ 3 ครั้ง ผลการประเมินพบว่าสมการกราฟมาตรฐานของแต่ละเมทริกซ์มีความเป็นเส้นตรง

ที่ดี โดยค่าที่ตรวจวัดได้ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) อยู่ในช่วง 0.9986–0.9998 สำหรับทุกเมทริกซ์ ซึ่งรายละเอียดสมการเชิงเส้นและค่า R^2 ดังแสดงในตารางที่ 5 สำหรับเมทริกซ์ผลไม้เขตอบอุ่นไม่ได้ทำการประเมินช่วงการวิเคราะห์เพิ่มเติม เนื่องจากมีสัญญาณพื้นหลังของเอทิลีนและผลกระทบจากเมทริกซ์อยู่ในระดับต่ำ โดยช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบครอบคลุมช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ได้อย่างเหมาะสม

ตารางที่ 5 สมการกราฟมาตรฐานและค่า R^2 ของช่วงการวิเคราะห์

เมทริกซ์	สมการเชิงเส้น (calibration equation)	R^2
มะม่วง	$y = 1.0453x + 0.0057$	0.9994
สับปะรด	$y = 1.0272x - 0.0137$	0.9986
ทุเรียน	$y = 0.9651x + 0.0022$	0.9995
กล้วย	$y = 1.0412x - 0.0092$	0.9998

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (measurement uncertainty; MU)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดสำหรับวิธีวิเคราะห์สารอีทีฟอนด้วยเทคนิค HS-GC-MS ดำเนินการตามแนวทางของ EURACHEM Guide และ ISO GUM (Bottom-up approach)⁽²⁷⁾ โดยคำนวณค่า individual standard uncertainty (u_i) จากแหล่งที่มาที่เกี่ยวข้องในทุกขั้นตอนของกระบวนการวิเคราะห์ และนำมารวมเพื่อหาค่า combined standard uncertainty ตามหลักการรวมกำลังสอง ผลการแจกแจงสัดส่วนความไม่แน่นอนแสดงให้เห็นว่า method precision (repeatability) เป็นแหล่งที่มีอิทธิพลต่อค่าความไม่แน่นอนมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 59.03 รองลงมา คือ standard concentration และขั้นตอน

การเจือจาง ร้อยละ 12.97, sample volume (pipette + temperature) ร้อยละ 10.24, sample weight ร้อยละ 6.82, bias (recovery) ร้อยละ 6.66 และ calibration curve (C_0) ร้อยละ 4.27 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อรวมแหล่งที่มาทั้งหมดแล้วคิดเป็น 100% ของความไม่แน่นอนรวม โดยค่า combined relative standard uncertainty (u_c) มีค่าเท่ากับ 0.10534 เมื่อนำไปคำนวณกับผลการวิเคราะห์ที่ระดับ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะได้ค่า $u(x)$ เท่ากับ 0.0316 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อขยายค่าความไม่แน่นอนด้วย coverage factor ($k = 2$) ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95% จะได้ค่า expanded uncertainty (U) เท่ากับ 0.0632 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สรุปลองค์ประกอบความไม่แน่นอนและค่าที่คำนวณได้ของวิธี HS-GC-MS

แหล่งที่มาความไม่แน่นอน	$U(x)/x$	% Contribution
Sample weight	0.01155	6.82
Sample volume (pipette + temperature)	0.01735	10.24
Calibration curve (C_0)	0.00724	4.27
Standard concentration + dilution	0.02198	12.97
Method precision (repeatability)	0.10000	59.03
Bias (recovery)	0.01129	6.66
Total	0.1694	100.0
Combined standard uncertainty (relative)	$u_c = \sqrt{\sum (u(x)/x)^2} = 0.10534$	
Combined standard uncertainty (สำหรับ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	$u(x) = 0.10534 \times 0.30 = 0.0316$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	
Expanded uncertainty (95%, $k = 2$)	$U = 2 \times 0.0316 = 0.063$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	

การทดสอบความชำนาญ (proficiency test)

เข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญ FAPAS[®] 19436 (Apple Purée)⁽²⁸⁾ ซึ่งมีห้องปฏิบัติการรายงานผลการวิเคราะห์อีทีฟอนทั้งสิ้น 50 แห่ง โดย 45 แห่ง ได้รับการประเมินเป็นค่า z-score ส่วนอีก 5 แห่ง รายงานผลเป็นขีดจำกัดการหาปริมาณ (<LOQ) จึงไม่ถูกนำมาคำนวณ z-score เมื่อพิจารณาหลักการวิเคราะห์ (method principle) ที่เปิดเผยใน Appendix I พบว่ามีการระบุเพียง

17 แห่ง ได้แก่ การใช้เทคนิค GC จำนวน 1 แห่ง (ร้อยละ 2.0) และ LC จำนวน 16 แห่ง (ร้อยละ 32.0) ส่วนอีก 33 แห่ง (ร้อยละ 66.0) ไม่ได้ระบุข้อมูลดังกล่าว ทั้งนี้ค่ากำหนด (assigned value) ของอีทีฟอนเท่ากับ 38.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย ซึ่งเป็นห้องเดียวที่ใช้เทคนิค GC รายงานค่าอีทีฟอนเท่ากับ 39.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า z-score เท่ากับ 0.2 ในเกณฑ์ยอมรับ ($|z| \leq 2$) เมื่อเปรียบเทียบ

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ห้องปฏิบัติการ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร (สคอ.) ใช้การแปรสภาพสารในระบบ headspace ภายใต้สภาวะต่างโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและไม่มีขั้นตอน clean-up ขณะที่ห้องปฏิบัติการอื่นใช้วิธีเตรียมตัวอย่างที่หลากหลาย ได้แก่ QuEChERS, QuPPE, solvent extraction และ liquid-liquid extraction โดยบางห้องปฏิบัติการมีการปรับค่า pH และมีขั้นตอน clean-up เพิ่มเติมสำหรับการคำนวณผล ห้องปฏิบัติการ สคอ. ใช้ external calibration curve ในขณะที่ห้องปฏิบัติการอื่นใช้ทั้ง external calibration, matrix-matched calibration และ standard-addition calibration และพบทั้งกรณีที่ใช้และไม่ใช้ internal standard

วิจารณ์

ผลการทดลองการเปรียบเทียบระหว่างปริมาตรและสภาวะการฉีดตัวอย่างต่อสัญญาณตอบสนองที่ได้จากเครื่องมือแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาตรการฉีดจาก 1 มิลลิลิตร เป็น 2 มิลลิลิตร ส่งผลให้ได้สัญญาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทุกสภาวะ เนื่องจากมีปริมาณสารเข้าสู่ระบบมากขึ้น เมื่อพิจารณาเฉพาะสภาวะที่ใช้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พบว่าสภาวะที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส และ split ratio 1:15 ให้สัญญาณสูงที่สุดแต่มีความแปรปรวนของสัญญาณมากกว่า ขณะที่สภาวะ 180 องศาเซลเซียส ให้สัญญาณในระดับสูงและมีความเสถียรของสัญญาณดีกว่าโดยรวมสำหรับสภาวะ 2 มิลลิลิตร split ratio 1:20 ให้สัญญาณตอบสนองในระดับสูงพร้อมค่าความแปรปรวนที่ยอมรับได้แสดงถึงความสมดุลระหว่างความไวและความเสถียรของการวิเคราะห์ จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้งานวิเคราะห์และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป ผลการศึกษานี้ยืนยันว่าเทคนิค HS-GC-MS ที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารอีทีฟอนในผลไม้โดยอาศัยหลักการสลายตัวของอีทีฟอนภายใต้สภาวะต่างให้เกิดแก๊สเอทิลีนซึ่งเป็นสารระเหยง่าย และตรวจวัดในเฟสแก๊สด้วยระบบ GC-MS ในโหมด SIM ซึ่งช่วยเพิ่มทั้งความจำเพาะและความไวของการตรวจวัด แนวทางการวิเคราะห์เป็นการวิเคราะห์

ทางอ้อมโดยตรวจวัดอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถแก้ไขข้อจำกัดของการวิเคราะห์อีทีฟอนโดยตรงซึ่งเป็นสารที่มีขั้วสูง ระเหยยาก และไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วย GC ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารอีทีฟอนด้วยเทคนิค HS-GC-MS แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีสมรรถนะที่เหมาะสมและสอดคล้องกับหลักการการเกิดปฏิกิริยาเคมีและการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือในทุกพารามิเตอร์ที่ทำการทดสอบ โดยเริ่มจากความจำเพาะของวิธี พบว่าแก๊สเอทิลีนซึ่งเกิดจากการสลายตัวของสารอีทีฟอนสามารถตรวจวัดได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยให้ค่า retention time คงที่ที่ 2.45 นาที ทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ (0.1–4.0 ไมโครกรัม) และมีอัตราส่วนของไอออน m/z 27 (quantifier) ร่วมกับ m/z 26 และ 28 (qualifiers) ที่สอดคล้องกับสารมาตรฐานในทุกระดับความเข้มข้นที่ยืนยันความถูกต้องเชิงโครงสร้างของสัญญาณที่ตรวจวัดได้อย่างชัดเจน ผลดังกล่าวมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการวิเคราะห์แก๊สเอทิลีนซึ่งเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กและมี fragmentation pattern จำกัด ทั้งนี้ประสิทธิภาพที่ได้สะท้อนถึงความเหมาะสมของคอลัมน์ชนิด PLOT/Q ในการแยกสารก๊าซโมเลกุลขนาดเล็ก รวมถึงความสามารถของระบบตรวจวัดมวลสารแบบ single quadrupole ในการคัดเลือกไอออนเป้าหมายได้อย่างจำเพาะภายใต้โหมด SIM

การไม่พบพีคของเอทิลีนใน method blank แสดงว่าระบบปราศจากสารปนเปื้อนและมีความเหมาะสมของขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ขณะที่การตรวจพบเอทิลีนใน matrix blank ของทั้งผลไม้เขตร้อนและผลไม้เขตอบอุ่น เป็นไปตามธรรมชาติของผลไม้ซึ่งสามารถผลิตเอทิลีนได้เอง โดย matrix blank ของผลไม้เขตร้อน ได้แก่ กัลย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน ให้สัญญาณเอทิลีนต่ำกว่า LOD ทั้งหมด ในขณะที่ผลไม้เขตอบอุ่น ได้แก่ แอปเปิล เชอร์รี่ และสตรอว์เบอร์รี่ ตรวจพบสัญญาณเอทิลีนในระดับที่ให้ค่า S/N อยู่ในช่วง 6–41 อย่างไรก็ตามสัญญาณดังกล่าวยังคงต่ำกว่า LOD ที่กำหนด และไม่ก่อให้เกิดการรบกวนในระบบโครมาโทกราฟีหรือผลกระทบต่อการระบุชนิดสารและการคำนวณเชิงปริมาณภายใต้เงื่อนไขของวิธีที่ใช้

จึงสะท้อนให้เห็นว่าวิธีสามารถแยกเอทิลีนที่เกิดจากอีทีฟอนออกจากเอทิลีน background ของเมทริกซ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความจำเพาะเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ในเมทริกซ์ผลไม้ที่หลากหลายได้ ในด้านการวิเคราะห์เชิงปริมาณ การสร้างกราฟมาตรฐานแบบ external calibration ในช่วงความเข้มข้น 0.1–4.0 ไมโครกรัม ให้ค่า R^2 เท่ากับ 1.0000 เมื่อพิจารณาถึงลักษณะของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งอาศัยการแปรสภาพทางเคมีของสารก่อนการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการสลายตัวของอีทีฟอนให้เกิดแก๊สเอทิลีนเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณสารตั้งต้นตลอดช่วงที่ศึกษา และสะท้อนถึงความสม่ำเสมอของกระบวนการนำส่งเอทิลีนเข้าสู่เฟสแก๊สและการตรวจวัดด้วย HS-GC-MS เมื่อพิจารณาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ในเมทริกซ์ของผลไม้เขตร้อน พบว่าค่า R^2 ของแต่ละเมทริกซ์ยังคงอยู่ในระดับสูงมาก ได้แก่กล้วย 0.9998 มะม่วง 0.9994 ทูเรียน 0.9995 และสับปะรด 0.9986 แม้ว่าความชันของสมการเชิงเส้นจะอยู่ในช่วง 0.9651–1.0453 ซึ่งแตกต่างกันเล็กน้อย ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าความแปรผันของสัญญาณที่สังเกตพบมีความสัมพันธ์กับลักษณะของเมทริกซ์ที่ส่งผลต่อความไวของการตรวจวัดมากกว่าการลดลงของความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ ทั้งนี้ผลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความทน (robust) ต่ออิทธิพลของเมทริกซ์ และสามารถรองรับผลของ matrix effect ได้ในระดับที่ยอมรับได้

ผลการประเมิน matrix effect พบว่าเมทริกซ์ของผลไม้เขตร้อนทุกชนิดให้ความเป็นเส้นตรงของสัญญาณอยู่ในระดับสูง ($R^2 = 0.9987–0.9997$) โดยค่า slope อยู่ใกล้เคียงค่าอุดมคติ (1.024–1.044) แม้ว่ามะม่วงและกล้วยจะมีช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของค่า slope ไม่ครอบคลุมค่า 1 ซึ่งสะท้อนถึงแนวโน้มของ matrix enhancement effect เล็กน้อย แต่ผลการทดสอบ paired t-test ให้ค่า p -value มากกว่า 0.05 สำหรับทุกเมทริกซ์ แสดงว่าความแตกต่างระหว่างสัญญาณจากเมทริกซ์และสารมาตรฐานใน MeOH ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สับปะรดและทูเรียนมีช่วงความเชื่อมั่น

ของค่า slope ครอบคลุมค่า 1 แสดงว่าไม่พบผลของเมทริกซ์อย่างชัดเจน นอกจากนี้ค่า intercept ของทุกเมทริกซ์มีค่าต่ำและช่วงความเชื่อมั่นครอบคลุมศูนย์ บ่งชี้ว่าไม่พบสัญญาณรบกวนพื้นฐานจากเมทริกซ์สำหรับผลไม้เขตอบอุ่นไม่ได้ทำการประเมิน matrix effect เนื่องจากสัญญาณพื้นหลังอยู่ในระดับต่ำ และการคำนวณผลใช้สารมาตรฐานใน MeOH สำหรับสร้าง calibration curve ซึ่งเพียงพอและไม่ส่งผลต่อความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ โดยสรุป matrix effect โดยรวมอยู่ในระดับต่ำ และวิธี HS-GC-MS สามารถใช้สารมาตรฐานใน MeOH สำหรับการคำนวณได้อย่างเหมาะสมโดยไม่ต้องใช้ matrix-matched calibration ภายใต้ช่วงความเข้มข้นและเงื่อนไขที่ศึกษา

การประเมินค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างเมทริกซ์ของผลไม้เขตร้อนและผลไม้เขตอบอุ่น สำหรับผลไม้เขตร้อนกำหนดค่า LOD ที่ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อหลีกเลี่ยงสัญญาณรบกวนจาก ethylene ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติของผลไม้เขตร้อน โดยอ้างอิงเกณฑ์อัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio: S/N) > 3 ซึ่งให้ค่า S/N อยู่ในช่วง 147–399 สำหรับกล้วย, 182–412 สำหรับมะม่วง, 88–158 สำหรับสับปะรด และ 108–299 สำหรับทูเรียน ซึ่งสะท้อนถึงความแตกต่างของโครงสร้างเนื้อเยื่อ ปริมาณน้ำ และองค์ประกอบของสารอินทรีย์ระเหยง่ายในผลไม้แต่ละชนิดรวมถึงปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ขณะที่ผลไม้เขตอบอุ่นตรวจพบเอทิลีนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติใน matrix blank ในระดับต่ำกว่าผลไม้เขตร้อนอย่างชัดเจน จึงประเมินค่า LOD โดยใช้แนวคิด $\text{Mean}(\text{blank}) + 3\text{SD}$ จากการวิเคราะห์ matrix blank จำนวน 10 ซ้ำ เพื่อประเมินปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งให้ค่า LOD ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.011 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับแอปเปิลและสตอร์เบอร์รี่ และ 0.007 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับเชอร์รี่ ทั้งนี้เพื่อให้เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้งานจริงและลดผลกระทบจากความแปรปรวนของสัญญาณพื้นหลัง จึงกำหนดค่า LOD เชิงปฏิบัติสำหรับผลไม้เขตอบอุ่นที่ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยันค่า LOD

ดังกล่าวโดยการเติมอีทีฟอนที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank ของผลไม้เซตอบอุ่นแล้วประเมินค่า S/N อีกครั้ง ซึ่งให้ค่า S/N อยู่ในช่วง 6–39 สำหรับแอปเปิล, 20–36 สำหรับเชอร์รี่ และ 11–41 สำหรับสตรอว์เบอร์รี่ โดยทุกกรณีมีค่า S/N > 3 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ผลการทดสอบ LOQ ความแม่นยำ (%recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนในผลไม้ทั้งเซตร้อนและเซตอบอุ่น แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีสมรรถนะอยู่ในเกณฑ์ยอมรับสำหรับการวิเคราะห์สารตกค้างในอาหาร โดยให้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 81.4–120.0% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.5–16.0% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ SANTE/11312/2021 v2026⁽²⁶⁾ อย่างไรก็ตามผลไม้เซตร้อนมีแนวโน้มให้ค่า %recovery สูงและมีความแปรปรวนมากกว่าผลไม้เซตอบอุ่น โดยมะม่วงและสับปะรดให้ค่า %recovery สูงกว่า 110% ในหลายระดับความเข้มข้น ซึ่งอาจเกิดจาก matrix enhancement effect จากองค์ประกอบของเมทริกซ์ เช่น น้ำตาล แป้ง และสารอินทรีย์ ที่ส่งเสริมการตอบสนองของสัญญาณ ขณะที่ทุเรียนให้ค่า %recovery ต่ำที่สุด (81.4%) และกล้วยให้ค่า %RSD สูงที่สุด (16.0%) สะท้อนถึงผลกระทบของเมทริกซ์ต่อประสิทธิภาพการสกัดและความสม่ำเสมอของผลการวิเคราะห์ นอกจากนี้ปริมาณเส้นใยและองค์ประกอบของเมทริกซ์จากทั้งเนื้อและเปลือกในผลไม้บางชนิดอาจรบกวนประสิทธิภาพของปฏิกิริยา derivatization ทำให้การเกิดอนุพันธ์ของอีทีฟอนไม่สมบูรณ์และเพิ่มความแปรปรวนของสัญญาณ สอดคล้องกับผลการประเมินค่า LOD และ LOQ ที่พบว่าผลไม้เซตร้อนมีค่า LOD และ LOQ สูงกว่าผลไม้เซตอบอุ่น โดยมีค่าเท่ากับ 0.10 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เนื่องจากผลไม้เซตร้อนหลายชนิด เช่น กล้วย มะม่วง และทุเรียน เป็นผลไม้ประเภท climacteric ซึ่งมีการผลิตเอทิลีนตามธรรมชาติในปริมาณสูงระหว่างกระบวนการสุก จึงทำให้ตรวจพบสัญญาณพื้นหลังของเอทิลีนได้มากกว่า อย่างไรก็ตามค่า LOQ ดังกล่าวยังต่ำกว่าค่า MRL ของอีทีฟอนในผลไม้เซตร้อน เช่น กล้วย มะม่วง และสับปะรด ที่ 0.5, 2 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁰⁾ แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความไวเพียงพอสำหรับ

การตรวจติดตามสารตกค้างในผลไม้กลุ่มนี้ สำหรับผลไม้เซตอบอุ่นให้ค่า %recovery และ %RSD ที่สม่ำเสมอกว่า โดยมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 89.8–120.0% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.9–13.9% แสดงถึงผลกระทบของเมทริกซ์ที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้เซตร้อน แม้ว่าแอปเปิลที่ระดับ LOQ จะให้ค่า %recovery สูงถึง 120.0% และเชอร์รี่ที่ระดับ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะให้ค่า %RSD เท่ากับ 13.9% แต่ยังคงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ที่กำหนด อีกทั้งผลไม้เซตอบอุ่นมีการประเมินค่า LOD และ LOQ ที่ 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่า MRL ของอีทีฟอนในแอปเปิลและเชอร์รี่ที่กำหนด 0.8 และ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ⁽¹⁰⁾ สะท้อนให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์อีทีฟอนตกค้างในผลไม้ที่มีความแตกต่างของเมทริกซ์ทั้งสองกลุ่มได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดสำหรับวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนด้วยเทคนิค HS-GC-MS ตามแนวทางของ EURACHEM Guide และ ISO GUM (bottom-up approach) แสดงให้เห็นว่าแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนรวมมีที่มาจากสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ (method performance) โดยเฉพาะความเที่ยงของวิธี (method precision/repeatability) มีสัดส่วนสูงที่สุด ซึ่งสะท้อนว่าความแปรปรวนของผลการวัดมีที่มาจากกระบวนการวิเคราะห์โดยรวมมากกว่าความไม่แน่นอนขององค์ประกอบเชิงระบบ (systematic sources) ในขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐาน การเจือจาง ปริมาตร และน้ำหนักตัวอย่าง รวมถึง calibration และ bias จาก recovery มีบทบาทรองลงมา แสดงให้เห็นว่าการควบคุมขั้นตอนเชิงปริมาณและระบบการสอบเทียบอยู่ในระดับที่เหมาะสมและไม่เป็นตัวกำหนดหลักของความไม่แน่นอนของวิธี โดยค่าระดับความไม่แน่นอนที่ได้มีความเหมาะสมต่อการรายงานผลการวิเคราะห์อีทีฟอนในเมทริกซ์อาหารภายใต้สภาวะการใช้งานจริง และสอดคล้องกับเกณฑ์ความเหมาะสมต่อวัตถุประสงค์ (fitness for purpose) สำหรับการวิเคราะห์สารตกค้าง ผลการเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญเป็นหลักฐานจากภายนอกที่มี

น้ำหนักในการยืนยันความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยจากข้อมูลการทดสอบความชำนาญ FAPAS® 19436 พบว่าห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยเป็นเพียงห้องปฏิบัติการเดียวที่มีการระบุการใช้เทคนิค GC ในการวิเคราะห์อียิปทอน ในขณะที่ผู้เข้าร่วมรายอื่นส่วนใหญ่ระบุเทคนิค LC หรือไม่ได้ระบุรายละเอียดของเครื่องมือที่ใช้ ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยรายงานผลการวิเคราะห์อียิปทอนเท่ากับ 39.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งใกล้เคียงกับค่า assigned value ที่กำหนดไว้เท่ากับ 38.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และให้ค่า z-score เท่ากับ 0.2 ซึ่งอยู่ใกล้ศูนย์และอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ผลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าแม้เทคนิค GC จะเป็นกลุ่มส่วนน้อยในบริบทของการทดสอบความชำนาญครั้งนี้ แต่สามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับในระดับสากลได้ ในทางตรงกันข้ามผลการเปรียบเทียบดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ในกลุ่ม LC มีความสัมพันธ์กับความหลากหลายของขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง รูปแบบการสอบเทียบ และการจัดการ matrix effect เมื่อพิจารณาในบริบทนี้ วิธี HS-GC-MS ซึ่งอาศัยการแปรสภาพสารและการตรวจวัดในเฟสแก๊ส จึงมีข้อได้เปรียบในด้านการลดความซับซ้อนของเมทริกซ์ ความสม่ำเสมอของขั้นตอนปฏิบัติ และความสามารถในการให้ผลการวิเคราะห์ที่ทำได้ดี โดยภาพรวมผลการทดสอบความชำนาญเมื่อร่วมกับผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสนับสนุนว่าวิธี HS-GC-MS ที่พัฒนาขึ้น เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือในเชิงประจักษ์ สามารถรองรับการวิเคราะห์อียิปทอนในผลไม้หลากหลายเมทริกซ์ตามที่ได้ตรวจสอบความใช้ได้ไว้ และเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในงานตรวจยืนยัน การควบคุมคุณภาพ และการเฝ้าระวังด้านความปลอดภัยอาหารภายใต้ระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการในระดับสากล

จากผลการทดสอบความชำนาญที่พบว่าห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่เลือกใช้เทคนิค LC ขณะที่วิธี HS-GC-MS ให้ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับค่าอ้างอิงในระดับสากล งานวิจัยในอนาคตสามารถต่อยอดโดยออกแบบการศึกษาเปรียบเทียบสมรรถนะของทั้งสองเทคนิคอย่างเป็นระบบภายใต้เมทริกซ์เดียวกัน

โดยประเมินพารามิเตอร์ของการวิเคราะห์ที่สำคัญ ได้แก่ ความไว/ความจำเพาะ ความแม่นยำ ความเที่ยง และความแปรปรวนระหว่างเมทริกซ์ การศึกษาในลักษณะนี้ จะมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับผลไม้เขตร้อน ซึ่งมีองค์ประกอบซับซ้อนและอาจส่งผลกระทบต่อสมรรถนะของวิธีแตกต่างกันในแต่ละเทคนิค นอกจากนี้แม้ว่าวิธี HS-GC-MS จะสามารถลดผลกระทบจากสารไม่ระเหยในเมทริกซ์ได้ดี แต่ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าผลไม้แต่ละชนิดให้ค่า LOD และ LOQ แตกต่างกันอย่างชัดเจน งานในอนาคตจึงควรศึกษาผลขององค์ประกอบเมทริกซ์ต่อการตอบสนองของสัญญาณอย่างเป็นระบบ โดยพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเพกติน น้ำตาล เส้นใย และสารระเหยพื้นหลัง กับประสิทธิภาพการสลายตัวของอียิปทอนและการปลดปล่อยเอทิลีนในระบบ headspace ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อการจัดกลุ่มเมทริกซ์หรือการกำหนดเงื่อนไขการวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับผลไม้แต่ละประเภท ในด้านการควบคุมคุณภาพ การศึกษาความคงตัวของสารมาตรฐานและสารละลายมาตรฐานทำงานภายใต้สภาวะต่างๆ จะช่วยลดความแปรปรวนระหว่างการวิเคราะห์ในแต่ละ batch และเพิ่มความเชื่อมั่นของผลการวิเคราะห์ในระยะยาว โดยเฉพาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่นำวิธีไปใช้ในงานตรวจวิเคราะห์ประจำ สำหรับการประยุกต์ใช้วิธี HS-GC-MS โดยการนำไปใช้ในงานเฝ้าระวังสารตกค้าง และงานบริการตรวจวิเคราะห์ เช่น การตรวจสอบอียิปทอนในผลไม้ส่งออกหรือการตรวจยืนยันเชิงกฎหมาย งานในอนาคตควรประเมินความเหมาะสมของวิธีในด้านต้นทุนเวลาในการวิเคราะห์ และจำนวนตัวอย่างที่สามารถรองรับได้ต่อวัน เพื่อสนับสนุนการนำไปใช้ในระดับปฏิบัติการ นอกจากนี้หลักการสลายตัวของสารให้เกิดเอทิลีนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ยังสามารถต่อยอดไปสู่การวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือสารกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่นที่มีกลไกการสลายตัวคล้ายกัน เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์เฉพาะกลุ่ม (class-specific methods) ในอนาคต ผลจากการทดสอบความชำนาญที่แสดงความสอดคล้องกับค่ากำหนดสามารถนำไปต่อยอดสู่การจัดทำแนวทางหรือวิธีปฏิบัติงานมาตรฐาน (standard operating procedure; SOP) สำหรับการวิเคราะห์อียิปทอนด้วย

เทคนิค HS-GC-MS เพื่อสนับสนุนการนำวิธีไปใช้ในห้องปฏิบัติการอื่นและลดความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ

สรุป

ผลการศึกษานี้ยืนยันว่าเทคนิค HS-GC-MS ที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์อีทีฟอนตกค้างในผลไม้ โดยอาศัยการสลายตัวของอีทีฟอนภายใต้สภาวะต่างให้เกิดแก๊สเอทิลีนและตรวจวัดด้วย GC-MS ในโหมด SIM ซึ่งช่วยแก้ข้อจำกัดของการวิเคราะห์อีทีฟอนโดยตรง เนื่องจากเป็นสารที่มีขั้วสูงและระเหยได้ยาก ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแสดงให้เห็นว่าวิธีมีความจำเพาะสูง มีความเป็นเส้นตรง ความไวเหมาะสม และได้รับผลกระทบจากเมทริกซ์ในระดับต่ำ จึงสามารถใช้สารมาตรฐานใน solvent สำหรับการคำนวณได้โดยไม่ต้องใช้ matrix-matched calibration วิธีดังกล่าวสามารถแยกเอทิลีนที่เกิดจากอีทีฟอนออกจากเอทิลีนตามธรรมชาติของผลไม้ได้อย่างชัดเจน แม้ว่าผลไม้เขตร้อนจะมีค่า LOD และ LOQ สูงกว่าผลไม้เขตอบอุ่นจากการมีสัญญาณพื้นหลังของเอทิลีนสูงกว่า แต่ค่าที่ได้ทั้งหมดต่ำกว่าค่า MRL ของอีทีฟอนและเหมาะสมสำหรับการตรวจติดตามสารตกค้างในผลไม้ นอกจากนี้ผลการประเมินความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์ SANTE/11312/2021 v2026 รวมถึงผลการประเมินความไม่แน่นอนของการวัดและการเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญยังยืนยันถึงความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธี โดยสรุปวิธีที่พัฒนาขึ้นมีศักยภาพเหมาะสมสำหรับการตรวจยืนยันการควบคุมคุณภาพและการเฝ้าระวังอีทีฟอนตกค้างในผลไม้ภายใต้ระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

บทความนี้เป็นผลงานที่จัดทำขึ้นด้วยตนเองทั้งหมดและไม่ได้ใช้ระบบปัญญาประดิษฐ์ (AI) ในการสร้างข้อความหรือเนื้อหาทางวิชาการ ผู้เขียนรับผิดชอบต่อความถูกต้องของเนื้อหาทั้งหมดแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวสิริลักษณ์ ชัยรินทร์ สำหรับการช่วยรวบรวมและจัดเตรียมข้อมูลผลการวิเคราะห์ รวมถึงการสนับสนุนการจัดหาสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้า กระทรวงพาณิชย์. พาณิชย์เผยผลไม้ไทยขึ้นแท่นสินค้าเกษตรส่งออกสูงสุด [ออนไลน์]. 2568; [สืบค้น 25 ธ.ค. 2568]; เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.tpsa.go.th/news/2503-0000000006>.
2. สถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล. รายงานโครงการศึกษาสถานการณ์การบริโภคผักและผลไม้ของคนไทย (ระดับประเทศ). นครปฐม: มหาวิทยาลัยมหิดล; 2565.
3. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. WHO technical report series 916. Geneva: World Health Organization; 2003.
4. Biddle E, Kerfoot DG, Kho YH, Russell KE. Kinetic studies of the thermal decomposition of 2-chloroethylphosphonic acid in aqueous solution. *Plant Physiol* 1976; 58(5): 700-2.
5. Yang SF. Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Plant Physiol* 1969; 44(8): 1203-4.
6. Kender WJ. Ethephon-induced flowering in apple seedlings. *HortScience* 1974; 9(5): 444-5.
7. Cui Y, Zhai Y, Flaishman M, Li J, Chen S, Zheng C, et al. Ethephon induces coordinated ripening acceleration and divergent coloration responses in fig (*Ficus carica* L.) flowers and receptacles. *Plant Mol Biol* 2021; 105(4-5): 347-64.

8. European Food Safety Authority. Review of the existing maximum residue levels (MRLs) for ethephon. EFSA J 2009; 7(10): 1347. (44 pages).
9. European Food Safety Authority, Alvarez F, Arena M, Auteri D, Binaglia M, Castoldi AF, et al. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance ethephon. EFSA J 2023; 21(1): 7742. (28 pages).
10. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 460) พ.ศ. 2568 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 142 ตอนพิเศษ 240 ง (วันที่ 7 กรกฎาคม 2568).
11. Codex Alimentarius. Pesticide database search: 106-Ethephon. [online]. 2016; [cited 2025 Dec 25]. Available from: URL: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=106.
12. พืชรพงษ์ แสงวานวงศ์กุล, ยุพิน อ่อนศิริ, เจริญ ขุนพรม. สารเอทีฟอนตกค้างในผลทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ภายหลังเก็บรักษาในสภาพจำลองการส่งออกทางเรือ. ว วิทยาศาสตร์เกษตร 2560; 48(3 พิเศษ): 193-6.
13. Marín JM, Pozo OJ, Beltrán J, Hernández F. An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables. Rapid Commun Mass Spectrom 2006; 20(3): 419-26.
14. Dong JN, Ma YQ, Liu FM, Jiang NW, Jian Q. Dissipation and residue of ethephon in maize field. J Integr Agric 2015; 14(1): 106-13.
15. Hussein MA, El-Zemaity MS, Ryad L, Halawa EM. A rapid and sensitive single residual method for determination of ethephon in grape, tomato and lentil. Middle East J Appl Sci 2015; 5(2): 439-44.
16. Chamkasem N. Determination of glyphosate, maleic hydrazide, fosetyl aluminum, and ethephon in grapes by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J Agric Food Chem 2017; 65(34): 7535-41.
17. Pereira L, Pujol M, Garcia-Mas J, Phillips MA. Non-invasive quantification of ethylene in attached fruit headspace at 1 ppb by gas chromatography-mass spectrometry. Plant J 2017; 91(1): 172-83.
18. Pham KP, Luu TH, Le MQC, Luu D. Research method for determining ethephon residues in fruit (bananas) on a high-pressure liquid chromatograph with MS/MS detector-LC/MS/MS when using ethephon as a ripening agent. Int J Food Sci Agric 2021; 5(1): 26-32.
19. Farczádi L, Moldovan H, Duca RC, Imre S. A quick, simple, sensitive and selective LC-MS/MS method used for the screening of ethephon, glyphosate and aminomethylphosphonic acid from water and food samples. Acta Biol Marisiensis 2022; 5(1): 41-54.
20. Tseng SH, Chang PC, Chou SS. A rapid and simple method for the determination of ethephon residue in agricultural products by GC with headspace sampling. J Food Drug Anal 2000; 8(3): 213-17.
21. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Pesticide residues in food: report 2024-Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. [online]. 2025; [cited 2025 Dec 25]. Available from: URL: <https://doi.org/10.4060/cd5918en>.
22. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9045-1-2568 การจัดหมวดหมู่สินค้าเกษตร เล่ม 1: พืช. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ; 2568.
23. Miller JN, Miller JC, Miller RD. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 7th ed. Harlow: Pearson Education Limited; 2018.

24. Sonamit K, Wittchaiwutthiwong S, Hantawiwatsap Y. Method validation for determination of sucralose in soft beverages by UPLC-ELSD. *J Dept Med Sci* 2019; 61(3): 107–20.
25. Cantwell H, editor. Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods—a laboratory guide to method validation and related topics. 3rd ed. [online]. 2025; [cited 2025 Dec 25]. Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_3rd_ed_V1_EN.pdf.
26. European Commission. SANTE/11312/2021 v2026. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Brussels: European Commission; 2026.
27. Ellison SLR, Williams A, editors. Eurachem/CITAC guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. [online]. 2012; [cited 2025 Dec 25]. Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf.
28. Fera Science Ltd. Fapas[®] Food Chemistry Proficiency Test Report 19436. York: Fera Science Ltd; 2025.

Development and Method Validation for the Analysis of Ethephon Residues in Fruits Using Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry

Jirapong Luangchaiyaporn, Thoranit Chaimongkol, and Weerawut Wittayanan

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

ABSTRACT Ethephon is a plant growth regulator widely used during postharvest handling to accelerate fruit ripening. In this study, tropical fruits including banana, mango, pineapple, and durian, as well as temperate fruits including apple, cherry, and strawberry, were investigated. Improper use of ethephon may result in residue contamination and potential risks to consumer safety. This study aimed to develop and validate a method for the determination of ethephon residues in fruits based on the alkaline decomposition of ethephon to generate ethylene gas, followed by analysis using headspace–gas chromatography–mass spectrometry (HS–GC–MS). The developed method demonstrated high selectivity, with ethylene detected at a retention time of 2.45 min and characteristic ions at m/z 27, 26, and 28. No interfering peaks were observed in the method blank, while naturally occurring ethylene in all fruit matrix blanks was detected below the limit of detection (LOD). Quantification was performed using external calibration because matrix effects were low and statistically insignificant. Linearity was achieved within the range of 0.1–4.0 μg ($R^2 = 1.0000$), while matrix calibration curves showed R^2 values of 0.9986–0.9998. The LOD and limit of quantitation (LOQ) values for tropical fruits were 0.10 and 0.30 mg/kg, respectively, whereas those for temperate fruits were 0.02 and 0.05 mg/kg, respectively. Tropical fruits showed recoveries of 81.4–119.0% with %RSD values of 1.5–16.0, while temperate fruits showed recoveries of 89.8–120.0% with %RSD values of 2.9–13.9. Overall, the developed HS–GC–MS method was accurate, reliable, and suitable for confirmatory determination of ethephon residues in fruits.

Keywords: Pesticide residues, Ethephon, Ethylene, Fruits, Gas chromatography–mass spectrometry

การคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกจากอาหาร

รัชฎาพร สุวรรณรัตน์ นันธิดา ดาว พัสกุล และ นพพร แจ่มใส

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากอาหาร ได้แก่ ผักสด อาหารหมักและผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค จำนวน 70 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน และรูปร่างกลมได้ 100 โคโลนี ระบุชนิดด้วยวิธีมาตรฐานร่วมกับการยืนยันชนิดโดย 16S rRNA gene sequencing และ BD Phoenix™ M50 จากนั้นประเมินคุณสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ การสร้างเอนไซม์อะไมเลส การย่อยเม็ดเลือดแดง ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน การทนกรด (pH 3.0) การทนเกลือ น้ำดี ความไวต่อ ยาปฏิชีวนะ และการยับยั้งเชื้อก่อโรค ผลการศึกษาพบว่าโคโลนีที่มีคุณสมบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 346 ได้แก่ *Lactiplantibacillus plantarum* 21 โคโลนี *Lactocaseibacillus paracasei* 2 โคโลนี และ *Enterococcus faecium* 4 โคโลนี โดย *L. plantarum* และ *L. paracasei* มีความไวต่อยาปฏิชีวนะและแสดงศักยภาพในการยับยั้ง เชื้อก่อโรค ขณะที่ *E. faecium* ต่อยาปฏิชีวนะและไม่แสดงคุณสมบัติดังกล่าว จึงคัดเลือก *L. plantarum* 2 ไอโซเลต (P10/3 และ P46/2) และ *L. paracasei* 1 โคโลนี (P62/2) เพื่อศึกษาคุณสมบัติ ความปลอดภัย และเอกลักษณ์ในระดับที่รองรับ การขึ้นทะเบียนโพรไบโอติก ทั้งนี้สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกได้ถูกฝากเก็บในธนาคารชีวภาพเพื่อเป็นฐานข้อมูลโพรไบโอติกของ ประเทศไทย ผลการศึกษาสะท้อนว่าอาหารหมักเป็นแหล่งสำคัญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีศักยภาพ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ ยังเป็นการประเมินในระดับห้องปฏิบัติการ ควรมีการศึกษาระดับจีโนม คุณสมบัติ และความปลอดภัย เพื่อสนับสนุน การพัฒนาและการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

คำสำคัญ: โพรไบโอติก, แลกติกแอซิดแบคทีเรีย, อาหารหมัก

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

Received: 20 April 2026

Revised: 25 July 2026

Accepted: 31 July 2026

บทนำ

โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ชนิดดีที่มีชีวิต พบได้ตามธรรมชาติในระบบทางเดินอาหาร ลำไส้ใหญ่ และร่างกายมนุษย์ ช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ เสริมภูมิคุ้มกัน ย่อยอาหาร การขับถ่าย และป้องกันโรคในลำไส้ สามารถพบได้ในอาหารหมักดอง เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว กิมจิ นัตโตะ⁽¹⁾ ตัวอย่างของโพรไบโอติก ได้แก่ แบคทีเรียประจำถิ่น ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์และมนุษย์ เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis* และ *B. longum* เป็นต้น⁽²⁾ คุณสมบัติของโพรไบโอติกที่ดีควรเป็นแบคทีเรียที่ไม่ทำให้เกิดโรคต่อผู้บริโภค ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากมีความสามารถทนต่อการย่อยของน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบและสามารถทนต่อกลืนน้ำดีรวมถึงกรดในกระเพาะอาหารได้ดี⁽³⁾ เพื่อให้โพรไบโอติกสามารถผ่านกระเพาะอาหารซึ่งมีสภาวะกรดสูงได้ โพรไบโอติกสามารถสร้างกรดเพื่อช่วยปรับสภาวะทางเดินอาหารทำให้แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก โพรไบโอติกควรเพิ่มจำนวนได้เร็วและมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชั่วโมง และมีอัตราการรอดชีวิตสูง⁽⁴⁾ สามารถเจริญแข่งขันกับเชื้อโรคในลำไส้ที่โดยปกติจะเข้าเกาะผนังลำไส้และต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ระหว่างการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น การเกาะเคลื่อนของโพรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารจะช่วยให้การเคลื่อนของอาหารเป็นไปได้ดี เกิดการย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ โพรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* ยังมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์โดยสามารถกระตุ้นการสร้างแกมมาโกลบูลิน แกมมาอินเทอเฟรอน และส่งเสริมกิจกรรมของมาโครฟาจที่ช่วยกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกายและแย่งอาหารของแบคทีเรียก่อโรค⁽⁵⁾

โพรไบโอติกถูกนำมาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ จากการศึกษาของ Mach T⁽⁶⁾ พบว่าโพรไบโอติกสามารถช่วยบรรเทาอาการอักเสบของลำไส้ได้ และอาหารที่มีการผสมโพรไบโอติกสามารถป้องกันการเกิดท้องร่วง

เฉียบพลันในผู้ใหญ่ที่เกิดจาก *Escherichia coli* รวมทั้งยังช่วยป้องกันและรักษาผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วง⁽⁷⁾ และการศึกษาของ Reid G⁽⁸⁾ พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียช่วยบรรเทาอาการไม่ทนต่อน้ำตาลแลคโตส เนื่องจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสเป็นกรดแลคติกได้นอกจากนั้นนมที่มีการหมักด้วยโพรไบโอติกถูกนำมาเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ เพื่อรักษาความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร โรคภูมิแพ้ ยับยั้งเซลล์มะเร็ง รวมทั้งเป็นอาหารของทารกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง^(9,10)

จากประโยชน์ของโพรไบโอติกทำให้ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติก โดยกฎหมายไทยอ้างอิงจาก The International Dairy Federation (IDF) กำหนดให้ผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติก ต้องมีแบคทีเรียที่มีชีวิตอย่างน้อยที่สุด 10^6 โคโลนีต่อมิลลิกรัม⁽¹¹⁾ ก่อนวันหมดอายุ สาเหตุเพราะโพรไบโอติกให้ประโยชน์แก่ร่างกายผู้บริโภคเมื่อได้รับโพรไบโอติกในขณะที่เซลล์ยังมีชีวิต เพื่อสามารถแสดงประสิทธิภาพได้มากที่สุด แต่เนื่องจากภายในกระเพาะอาหารมีสภาพความเป็นกรดสูงและประกอบไปด้วยกลืนน้ำดี ความเข้มข้นสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่ทำให้เซลล์โพรไบโอติกบาดเจ็บและตาย ส่งผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหารทำให้ประสิทธิภาพของโพรไบโอติกลดลง การเพิ่มอัตราการอยู่รอดของโพรไบโอติกจึงสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารอาหารได้มากขึ้นและเป็นไปตามข้อกำหนดของ IDF โดยโพรไบโอติกที่มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจะทำให้มีประสิทธิภาพการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบย่อยอาหาร จึงช่วยป้องกันร่างกายจากจุลินทรีย์อื่นๆ ในระบบย่อยอาหารที่ทำให้เกิดอันตรายแก่ร่างกาย

การพิจารณาขึ้นทะเบียนจุลินทรีย์โพรไบโอติกในประเทศไทย ประกอบด้วย ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่แสดงให้เห็นถึงอัตลักษณ์ของสายพันธุ์ (strain identity) ความปลอดภัย (safety) และประสิทธิผล (efficacy) ของจุลินทรีย์อย่างครบถ้วน โดยการระบุชนิดและสายพันธุ์ควรดำเนินการด้วยเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง เช่น การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA การวิเคราะห์

ลำดับจีโนมทั้งหมด (Whole Genome Sequencing; WGS) หรือวิธีทางอณูชีววิทยาอื่นที่ได้รับการยอมรับเพื่อยืนยันความถูกต้องของสายพันธุ์และตรวจสอบการมีถิ่นที่่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคหรือการดื้อยาต้านจุลชีพที่สามารถถ่ายทอดได้ นอกจากนี้การประเมินความปลอดภัยควรครอบคลุมการทดสอบการสร้างสารพิษ การเกิดฮีโมไลซิส ความไวต่อยาต้านจุลชีพตามเกณฑ์มาตรฐาน การไม่สร้างสารเมแทบอลิต์ที่เป็นอันตราย เช่น ไบโอดีเจนามีน รวมถึงการประเมินความปลอดภัยจากข้อมูลการศึกษาในห้องปฏิบัติการและข้อมูลการใช้ในมนุษย์ สำหรับการประเมินคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก ควรประกอบด้วยการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดภายใต้สภาวะกรดของกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิว ลำไส้หรือการยึดเกาะกับเมือก (mucin adhesion) การสร้างสารต้านจุลชีพ การยับยั้งเชื้อก่อโรค การคงสภาพการมีชีวิตตลอดอายุการเก็บรักษา และการแสดงผลเชิงหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพ เช่น การปรับสมดุลจุลชีพในลำไส้ การเสริมสร้างการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน หรือการลดความเสี่ยงของโรค ซึ่งต้องได้รับการสนับสนุนจากหลักฐานเชิงประจักษ์ ทั้งการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) การศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และโดยเฉพาะการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ที่ออกแบบอย่างเหมาะสม ทั้งนี้การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในประเทศไทยตามข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ภายใต้พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ซึ่งสอดคล้องกับหลักวิทยาศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

โพรไบโอติกนอกจากจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพแล้วยังสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจมหาศาล ดังนั้นการคัดแยกโพรไบโอติกที่เป็นสายพันธุ์ไทยจึงมีความสำคัญที่ส่งผลต่อการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมและคัดแยกโพรไบโอติก แลกดัก แอซิดแบคทีเรียจากอาหารในประเทศไทย ทำการทดสอบคุณสมบัติตามเกณฑ์กำหนดของมาตรฐานของการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก เพื่อนำไปขึ้นทะเบียนเป็นโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยในอนาคต ลดการนำเข้าจากต่างประเทศ เพิ่มประโยชน์และมูลค่าให้กับอาหารไทย

วัสดุและวิธีการ

จุลินทรีย์มาตรฐาน

จุลินทรีย์มาตรฐาน *Escherichia coli* (DMST 4212), *Listeria monocytogenes* (DMST 17303), *Staphylococcus aureus* (DMST 8840), *Clostridium perfringens* (DMST 16637), *Salmonella Typhimurium* (DMST 562), *Bacillus coagulans* (DMST 78664), *Enterococcus faecalis* (DMST 4736), *Enterococcus faecium* (DMST 4743), *Lactiplantibacillus plantarum* (DMST 75672) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และ *Lacticaseibacillus paracasei* (BCC 42359) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80°C (DW-86L 728D, Haier, China) อุณหภูมิต่ำกว่า 70°C *Lacticaseibacillus rhamnosus* TRBC 374 และ *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 334 ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Brain heart infusion broth (BHI broth) (Oxoid, England), Tryptic Soy Agar (TSA agar) (Scharlau, Spain), Tryptic soy broth (TSB broth) (Scharlau, Spain), Buffered Peptone Water (BPW) (Scharlau, Spain), Levine eosin methylene blue (L-EMB agar) (Scharlau, Spain), Baird-Parker (BP agar) (Scharlau, Spain), with EDTA (BBL, USA), Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar) (Scharlau, Spain), *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA agar) (Scharlau, Spain), Blood agar (Oxoid, England), de Man, Rogosa and Sharpe (MRS agar) (Scharlau, Spain), de Man, Rogosa and Sharpe (MRS broth) (Scharlau, Spain), Bacteriocin screening medium (BSM agar) (Merck, Germany), KF Streptococcus Agar (KF agar) (BD, USA), *Bacillus coagulans* agar

(BCA agar) (HiMedia, India), Yeast extract (Merck, Germany), Pepsin (Sigma, USA), Bile salts (Oxoid, England) และ Pancreatin (Merck, Germany)

น้ำยาและสารเคมี

Crystal violet (Biotech, Thailand), Safranin-O (Biotech, Thailand), สารละลาย Iodine (Biotech, Thailand), แอลกอฮอล์ 95% (Biotech, Thailand), Kovacs' reagent (Scharlau, Spain), Hydrogen Peroxide (QReC™, New Zealand), สารละลายสำหรับเจือจาง 0.1% peptone water (Oxoid, England), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Merck, Germany) และ Sodium chloride (NaCl) (Carlo erba, Italy)

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (GE L600, Getinge getting group, Sweden) เครื่องนับโคโลนี (3328, Leica, USA), ตู้บเพาะเชื้อ $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (MIR 522, SANYO, Japan), ตู้บเพาะเชื้อ $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ (MIR 252, SANYO, Japan) ตู้บเพาะเชื้อ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ (MIR 553, SANYO, Japan), ตู้บเพาะเชื้อ $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ (MIR 153, SANYO, Japan), กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา (Leica, Germany), อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ $41.5\pm 1^{\circ}\text{C}$ (MEMMERT, Germany), อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ $47\pm 2^{\circ}\text{C}$ (MEMMERT, Germany), เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.01–0.1 กรัม (BP2100, Sartorius, Germany), เครื่องผสม vortex mixer (VX100, LABNET, USA), เครื่องให้ความร้อนพร้อมกวนด้วยแม่เหล็ก (Stuart, USA), เครื่อง BD Phoenix™ M50 automated Microbiology system (BD, USA), Anaerobic jar (Oxoid, England), Indicator strip (Merck, Germany), Cotton swab (Bio cotton, Thailand), หลอดทดลอง (Kimble, Mexico), จานเพาะเชื้อ (Micro QA, China), ปิเปต 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร (Witeg, Germany), ห่วงถ่ายเชื้อ (Citotest, China), เข็มเขี่ยเชื้อ (Citotest, China),

แผ่นสไลด์แก้ว (Sail, China) และทิป (Axygen, China)

ตัวอย่างอาหาร

เก็บตัวอย่างอาหาร จำนวน 70 ตัวอย่าง ช่วงเดือน มกราคม พ.ศ. 2567 ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2568 โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะต้องไม่มีเลขสารบบอาหาร ประกอบด้วย ผักสด อาหารหมักและผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค จัดเก็บจากตลาดสด ภาคกลาง (กรุงเทพมหานคร นนทบุรี) ภาคใต้ (นครศรีธรรมราช ชุมพร) และภาคเหนือ (เชียงใหม่ เชียงราย) ของไทย นำตัวอย่างอาหารมาแยกและคัดเลือกเชื้อหลังได้รับตัวอย่างทันทีหรือดำเนินการในวันถัดไป โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $5-8^{\circ}\text{C}$ ก่อนนำมาใช้

การแยกแลกดิกแอซิดแบคทีเรียจากอาหาร

ตัวอย่างอาหารถูกนำมาแยกและคัดเลือกเชื้อหลังได้รับตัวอย่าง การแยกแลกดิกแอซิดแบคทีเรียดำเนินการภายใต้เทคนิคปราศจากเชื้อ โดยชั่งตัวอย่างน้ำหนักรวมแต่ละตัวอย่าง 100 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน สุ่มตัวอย่าง 50 กรัม เติมสารละลายสำหรับเจือจาง 0.1% peptone water ปริมาตร 450 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่าง 10 เท่า ใส่สารละลายเจือจาง 90 มิลลิลิตร จนถึงระดับความเจือจาง $10^{-1}-10^{-10}$ ตามลำดับ โดยแต่ละระดับความเจือจางดูด 1 มิลลิลิตร ลงใส่ในแต่จานเพาะเชื้อ จำนวน 6 เพลทสำหรับการหาเชื้อ 3 กลุ่ม เทอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดประมาณ 12–15 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้แข็งบ่มตามเวลาและอุณหภูมิของแต่ละวิธี คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar สำหรับการวิเคราะห์หาเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* spp. (ISO 15214:1998)⁽¹²⁾ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่สภาวะ anaerobe อาหารเลี้ยงเชื้อ KF agar สำหรับการวิเคราะห์เชื้อกลุ่ม Enterococci (APHA: 2015; Chapter 10)⁽¹³⁾ บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะ aerobe และ BCA agar สำหรับการวิเคราะห์เชื้อกลุ่ม *Bacillus coagulans* (USPC: 2023)⁽¹⁴⁾ บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะ aerobe เมื่อครบเวลาอ่านผลสุ่ม 10 โคโลนีของแต่ละวิธี ไปตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย

การตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก การทดสอบการติดสีแกรมและลักษณะของเซลล์ (cell shape and gram staining)

นำเชื้อที่แยกได้มาคัดเลือกโดยการย้อมสีแกรมและดูรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยนำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด 10 โคโลนี มาเกลี่ย (smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบาง ๆ และปล่อยให้แห้ง ทำการตรึงแบคทีเรียบนสไลด์แล้วหยดด้วยสาร crystal violet ให้ทั่วรอยเกลี่ยของเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารทิ้ง จากนั้นหยดสารละลาย iodine บนรอยเกลี่ยของเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วหยดสาร safranin-o บนรอยเกลี่ยทิ้งไว้ประมาณ 15–30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง ตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์และการจัดเรียงตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อนและรูปร่างกลม

การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test)

การวิเคราะห์คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คะตะเลส นำห้วงถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน และรูปร่างกลมป้ายลงแผ่นสไลด์แก้ว หยดสารละลาย 3% (v/v) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และตรวจสอบผลโดยสังเกตการเกิดฟอง ผลบวกจะแสดงการเกิดฟองก๊าซ และผลลบไม่มีฟองเกิดขึ้น⁽¹⁵⁾ คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ให้ผล catalase ลบ สำหรับ *Lactobacillus* spp. และ Enterococci ส่วน *B. coagulans* ให้ผลบวก

การทดสอบความสามารถในการเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ streak บนอาหาร MRS agar 2 เพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่สภาวะ aerobe 1 เพลท และอีก 1 เพลท ภายใต้สภาวะ anaerobe ผลบวกมีโคโลนีเจริญบนอาหาร MRS agar⁽¹⁶⁾ คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้ง aerobe และ anaerobe

การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ streak บนอาหาร blood agar base ที่มีเลือดแกะผสมอยู่ 5% และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใช้ *Staphylococcus aureus* เป็นตัวควบคุม อ่านผล ถ้าแบคทีเรียทดสอบสามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้จะเกิดโซนใสรอบ ๆ รอย streak ของแบคทีเรียทดสอบที่มีการเจริญ ซึ่งผลการย่อยเม็ดเลือดแดง แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ ได้แก่ การย่อยเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ (Beta-hemolysis) โดยมีโซนใสเกิดขึ้นรอบเชื้อแบคทีเรีย การย่อยเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์ (Alpha-hemolysis) มีลักษณะโซนสีเขียว ๆ รอบเชื้อแบคทีเรีย และการไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง (Gamma-hemolysis) ไม่มีโซนรอบ ๆ เกิดขึ้นรอบเชื้อแบคทีเรีย โดยตรวจผลการทดสอบที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่พบการย่อยเม็ดเลือดแดง โดยไม่มีโซนรอบ ๆ เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยเม็ดเลือดแดงได้แบบไม่สมบูรณ์ที่มีลักษณะโซนสีเขียว ๆ รอบเชื้อแบคทีเรีย⁽¹⁷⁾

การตรวจยืนยันเพื่อระบุเอกลักษณ์ของสกุล (genus) ชนิด (species) สายพันธุ์ (strain)

การตรวจยืนยันเพื่อระบุเอกลักษณ์แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน catalase ลบ ตรวจยืนยันด้วยวิธีการหาลำดับเบส 16S rRNA sequencing services โดยหน่วยงานที่ให้บริการ จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้รับมาเปรียบเทียบกับชนิดของแบคทีเรียฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank⁽¹⁸⁾ และแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม catalase ลบ ตรวจยืนยันด้วยเครื่อง BD Phoenix™ M50 automated Microbiology system⁽¹⁹⁾ และนำผลที่ได้มาพิจารณาคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ตรงตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 346⁽¹¹⁾

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic susceptibility)

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะใช้วิธี Minimum inhibitory concentration (MIC) (ISO 10932:2010)⁽²⁰⁾ โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก streak บน MRS agar บ่มในสภาวะ

anaerobe ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบแบบ direct colony suspension โดยใช้ cotton swab ปราสจากเชื้อแต่ละโคโลนีเดี่ยว ใส่ลงในสารละลาย 0.85% NaCl และปรับความขุ่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อทดสอบเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 เตรียมยาปฏิชีวนะทดสอบให้ได้ความเข้มข้นเป็น 2 เท่าจากความเข้มข้นทดสอบตั้งต้นและเจือจางความเข้มข้นให้ได้ในช่วงทดสอบของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในไมโครเพลท โดยเว้น 2 แถวสุดท้ายเป็นชุดควบคุมผลบวก (positive control) และชุดควบคุมผลลบ (negative control) จากนั้นเติมแบคทีเรียทดสอบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบยกเว้นชุดควบคุมผลลบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ

37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ *Lactocaseibacillus paracasei* ATCC 334 เป็นเชื้อควบคุม เมื่อครบเวลาบ่ม อ่านค่า MIC โดยดูความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ ยืนยันผลทดสอบด้วยชุดควบคุมผลลบซึ่งจะต้องไม่มีการเจริญ จากนั้นนำค่าความเข้มข้นที่ตรวจได้ไปเปรียบเทียบกับตารางแปรผลตามตารางค่า Microbiological cut-off value ใน Guidance on the characterization of micro-organism used as feed additives or as production organisms ของ European Food Safety Authority (2018)⁽²¹⁾ ว่าจัดอยู่ในเกณฑ์ของเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (resistant) หรือเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (susceptible) ดังแสดงในภาพที่ 1

การทดสอบความทนต่อสภาวะความเป็นกรดใน

	Ampicillin	Vancomycin	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Erythromycin	Clindamycin	Tetracycline	Chloramphenicol	Tylosin	Ciprofloxacin	Colistin	Fosfomycin
<i>Lactobacillus</i> obligate homofermentative ^(a)	2	2	16	16	16	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	64	16	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus</i> obligate heterofermentative ^(b)	2	n.r.	16	64	64	1	4	8 ^(c)	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	4	32	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative ^(d)	4	n.r.	16	64	64	1	4	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	4	32	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	4	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Pediococcus</i>	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Leuconostoc</i>	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	n.r.	64	2	2	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Bacillus</i>	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Enterococcus faecium</i>	2	4	32	1,024	128	4	4	4	16	4	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Corynebacterium</i> and other Gram-positive	1	4	4	16	8	1	4	2	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Enterobacteriaceae</i>	8	n.r.	2	8	16	n.r.	n.r.	8	n.r.	n.r.	0.06	2	8

n.r.: not required.

(a): Including *L. delbrueckii*, *L. helveticus*.

(b): Including *L. fermentum*.

(c): For *L. buchneri* the cut-off for tetracycline is 128.

(d): Including the homofermentative species *L. salivarius*.

ภาพที่ 1 ค่ามาตรฐานการแปรผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (ที่มา: European Food Safety Authority (EFSA))⁽²¹⁾

กระเพาะอาหาร (resistance to gastric acidity)

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายแบคทีเรียลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ทำการปรับความเป็นกรดด้วย กรดไฮโดรคลอริก (8M HCL) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (5N NaOH) ที่ระดับ pH 3 โดยแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลอง ปริมาณ 10^6 CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่ระยะเวลา 0 นาที และ 180 นาที ด้วยวิธี pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต⁽²²⁾ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียระหว่างระยะเวลาที่ 0 นาที กับ 180 นาที ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = (N_T/N_0) \times 100$$

N_0 แทน ค่าเฉลี่ยของ Log10 ของปริมาณเชื้อทดสอบที่เวลา 0 นาที (CFU/mL)

N_T แทน ค่าเฉลี่ยของ Log10 ของปริมาณเชื้อทดสอบที่เวลา 180 นาที (CFU/mL)

การทดสอบความทนต่อเกลือน้ำดีของสภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็ก (bile salt tolerance to simulated small intestinal fluid)

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเตรียม MRS broth ให้มีค่า pH ใกล้เคียงกับลำไส้เล็ก คือ pH 8 แบ่งอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH ดังกล่าว ให้มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี (bile salts) 0.3% โดยให้มีแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลองปริมาณ 10^6 CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่ระยะเวลา 0 นาที และ 180 นาที ด้วยวิธี pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต⁽²²⁾ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรีย

ระหว่างระยะเวลาที่ 0 นาที กับ 180 นาที ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = (N_T/N_0) \times 100$$

N_0 แทน ค่าเฉลี่ยของ Log10 ของปริมาณเชื้อทดสอบที่เวลา 0 นาที (CFU/mL)

N_T แทน ค่าเฉลี่ยของ Log10 ของปริมาณเชื้อทดสอบที่เวลา 180 นาที (CFU/mL)

การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรค (antipathogen activity)

นำโคโลนีของแบคทีเรียที่จะทำการทดสอบ เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการ spot เชื้อปริมาตร 20 μ L บนอาหาร BSM agar บ่มที่ 30°C สภาวะไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่จะทำการทดสอบ ประกอบด้วย เชื้อ *E. coli* DMST 4212, *L. monocytogenes* DMST 17303, *S. aureus* DMST 8840, *S. Typhimurium* DMST 562, *S. epidermidis* DMST 15505 เลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิของเชื้อก่อโรคนั้น ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ทดสอบ 10 μ L ลงในหลอดอาหาร TSA soft agar 5 mL ทำการ vortex และเทลงบนเพลทอาหาร BSM agar บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งโดยการวัดโซนใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี⁽²³⁾ และบันทึกผลการทดสอบ อ่านผลโดยการดูโซนใส คัดเลือกแบคทีเรียเฉพาะชนิดที่ให้โซนใสอย่างน้อย 10 มิลลิเมตร

ผล

การคัดแยกแลกดิกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากอาหารพื้นเมืองของไทย ได้แก่ ผักสด อาหารหมักและผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค จำนวน 70 ตัวอย่าง ตามวิธีมาตรฐาน ISO 15214:1998⁽¹²⁾, APHA: 2015; Chapter 10⁽¹³⁾ และ USPC: 2023⁽¹⁴⁾ สามารถระบุสกุลแบคทีเรียที่ทำการแยกได้ คือ *Lactobacillus* spp., Enterococci และ *B. coagulans* ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียมาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น โดยตรวจสอบการติดสีแกรมและลักษณะเซลล์ พิจารณา

คัดเลือกเฉพาะเชื้อแกรมบวก รูปท่อนและกลม การผลิตเอนไซม์ catalase ที่ให้ผลลบ ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ Enterococci ส่วน *B. coagulans* ให้ผลบวก การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ การตรวจสอบความสามารถในการเจริญทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน จากกระบวนการแยกเชื้อและทดสอบ

คุณสมบัติเบื้องต้น สามารถแยกเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้ 100 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียรูปร่างท่อน จำนวน 48 ชนิดตัวอย่าง และรูปร่างกลม จำนวน 52 ชนิดตัวอย่าง มาตรวจสอบยืนยันยีนสกุลและชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วย 16S rRNA gene sequencing และ BD Phoenix™ M50 ตามลำดับ สามารถจำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้ 14 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้น

ลำดับ	รูปร่างแบคทีเรีย	สกุลและชนิด	จำนวนไอโซเลท
1	รูปร่างท่อน	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	21
2		<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	2
3		<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	12
4		<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	8
5		<i>Lactobacillus brevis</i>	3
6		<i>Lactobacillus odoratitofui</i>	1
7		<i>Bacillus cereus</i>	1
รวม			48
8	รูปร่างกลม	<i>Enterococcus faecium</i>	9
9		<i>Enterococcus faecalis</i>	4
10		<i>Pediococcus acidilactici</i>	24
11		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	9
12		<i>Pediococcus parvulus</i>	4
13		<i>Stutzerimonas stutzeri</i>	1
14		<i>Lactococcus garvieae</i>	1
รวม			52
รวมทั้งหมด			100

เมื่อนำผลการคัดเลือกมาพิจารณาเฉพาะสกุลและชนิดที่ตรงตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 346 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร (ฉบับที่ 2) ลงวันที่ 27 มิถุนายน พ.ศ. 2554 และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 346) พ.ศ. 2555⁽¹¹⁾ พบเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ควรนำไปทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก และความปลอดภัยเบื้องต้นของแบคทีเรีย

L. plantarum จำนวน 21 ไอโซเลท *L. paracasei* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *E. faecium* จำนวน 9 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติตามข้อกำหนดขั้นต่ำ (minimum requirement) และหลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัย การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร⁽²⁴⁾ ตามคำแนะนำคณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร ผลการ

ทดสอบความทนกรด pH 3.0 พบว่า *L. plantarum* จำนวน 12 ไอโซเลต, *L. paracasei* จำนวน 1 ไอโซเลต และ *E. faecium* จำนวน 2 ไอโซเลต สามารถทนกรดที่ pH 3.0 และพบเชื้อ *L. plantarum* จำนวน 11 ไอโซเลต *L. paracasei* จำนวน 1 ไอโซเลต และ *E. faecium* จำนวน 2 ไอโซเลต สามารถทนเกลือ น้ำดี pH 3.0 ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่า *L. plantarum* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *L. paracasei* จำนวน 1 ไอโซเลต ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ในขณะที่ *E. faecium* ทุกไอโซเลตให้ผลดื้อยาปฏิชีวนะ และเมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค 5 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* และ *S. epidermidis* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *L. paracasei* จำนวน 1 ไอโซเลต

แสดงผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้นจึงคัดเลือกแบคทีเรีย ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ *L. plantarum* ไอโซเลตที่ 1 (P10/3 แยกจากถั่วเน่าแผ่นแห้ง) *L. plantarum* ไอโซเลตที่ 2 (P46/2 แยกจากกิมจิผักกาดขาว) และ *L. paracasei* 1 ไอโซเลต (P62/2 แยกจากถั่วเน่าเมะ) ที่มีคุณสมบัติความปลอดภัยเบื้องต้น สำหรับนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบคุณสมบัติความปลอดภัยโพรไบโอติก โดยศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย นอกจากนี้ แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีโอกาสเป็นโพรไบโอติก สายพันธุ์ไทยที่แยกได้เบื้องต้น จำนวน 100 ไอโซเลต ได้ถูกจัดเก็บเข้าระบบในคลังเชื้อมาตรฐานสากล ณ ธนาคารชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

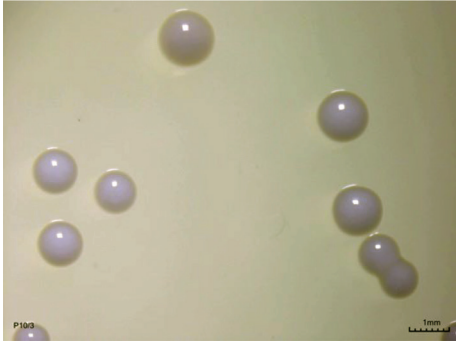
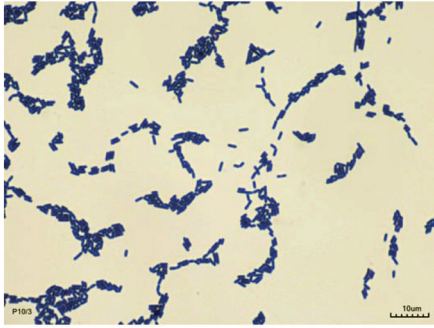
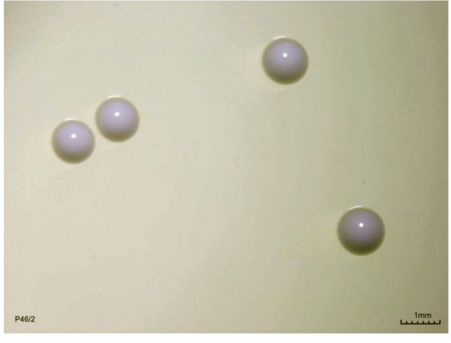
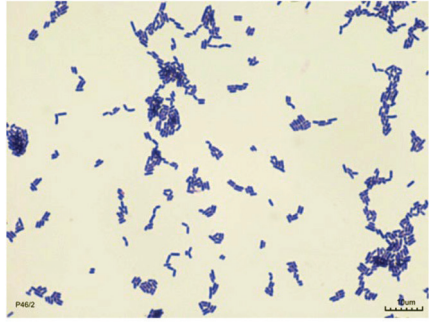
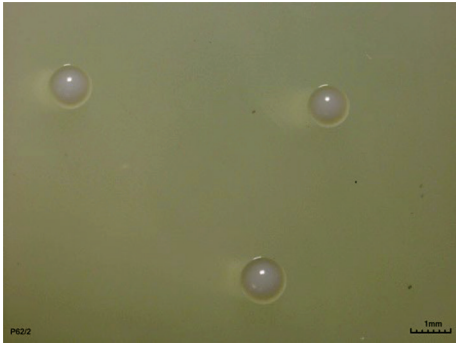
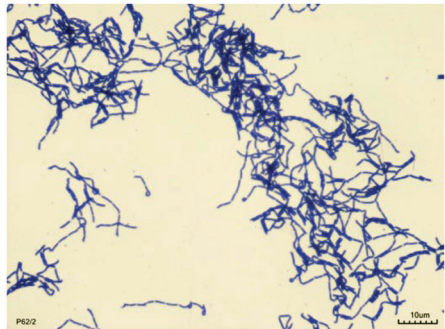
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติและความปลอดภัยต่อความเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นและจำนวนสายพันธุ์ ที่คัดเลือกตรงตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 346

การทดสอบ	จำนวนแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจำแนกตามสายพันธุ์		
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>E. faecium</i>
จำนวนเชื้อที่ทำการทดสอบเริ่มต้น	21	2	3
1) การทนกรด pH 3.0	12	1	2
2) การทนเกลือ น้ำดี pH 3.0	11	1	2
3) ความไวต่อยาปฏิชีวนะ	2	1	0
4) การยับยั้งเชื้อก่อโรค	2	1	0

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย P10/3, P46/2 และ P62/2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ลักษณะโคโลนีทั้ง 3 สายพันธุ์ มีลักษณะกลมขอบเรียบ ผิวหนานูน สีขาวทึบแสงมันวาว

การติดสีย้อมแกรม รูปร่าง และขนาดเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าติดสีม่วงของ crystal violet จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 3

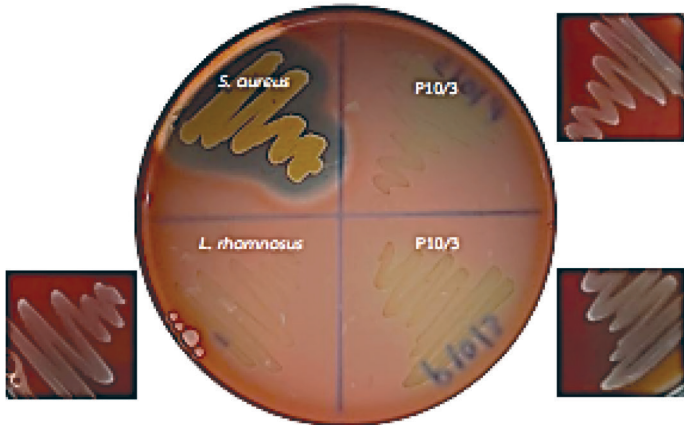
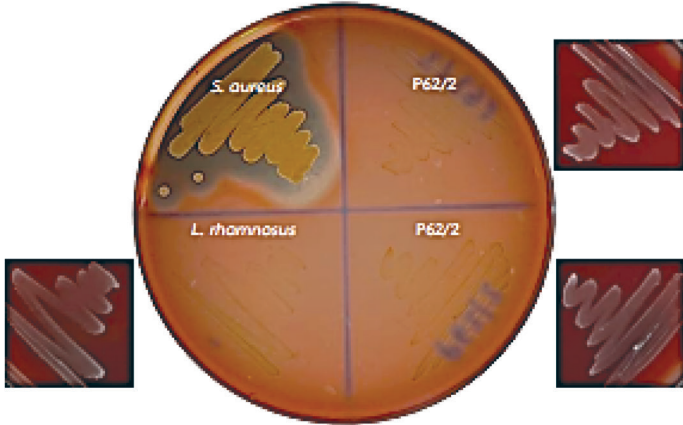
ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแลกดิกแอซิดแบคทีเรีย

สายพันธุ์	ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS	ลักษณะการติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
P10/3	 <p>ลักษณะโคโลนี กลม ขอบเรียบ ผิวหนานูน สีขาวทึบแสง มันวาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 1.25 ± 0.09 มิลลิเมตร</p>	 <p>เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง ต่อกันเป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม ขนาดเซลล์เท่ากับ 0.67×1.96 ไมโครเมตร</p>
P46/2	 <p>ลักษณะโคโลนี กลม ขอบเรียบ ผิวหนานูน สีขาวทึบแสง มันวาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 1.27 ± 0.07 มิลลิเมตร</p>	 <p>เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง ต่อกันเป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม ขนาดเซลล์เท่ากับ 0.67×1.96 ไมโครเมตร</p>
P62/2	 <p>ลักษณะโคโลนี กลม ขอบเรียบ ผิวหนานูน สีขาวทึบแสง มันวาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 1.08 ± 0.09 มิลลิเมตร</p>	 <p>เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง ต่อกันเป็นคู่หรือลายสั้นๆ ขนาดเซลล์เท่ากับ 0.65×2.27 ไมโครเมตร</p>

หมายเหตุ: ที่มาของภาพศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดงของ P10/3, P46/2 และ P62/2 บนอาหาร Sheep Blood agar พบว่าสายพันธุ์ P10/3 และ P46/2 ให้ผลแบบ Alpha-hemolysis คือ มีโซนสีเขียวรอบรอยที่แบคทีเรียเจริญซึ่งเป็นการย่อยเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์

ส่วน P62/2 ให้ผลแบบ Gamma-hemolysis ซึ่งไม่มีโซนรอบรอยการเจริญของแบคทีเรียแสดงถึงการไม่ย่อยเม็ดเลือดบนอาหาร blood agar ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่นำมาใช้พิจารณาคุณสมบัติของโพรไบโอติก ดังแสดงในภาพที่ 2

สายพันธุ์	ผลการทดสอบ	Hemolysis activity
P10/3		Alpha-hemolysis
P46/2		Alpha-hemolysis
P62/2		Gamma-hemolysis

ภาพที่ 2 การย่อยเม็ดเลือดแดง (ที่มา: ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร)

ผลการศึกษาการทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร P10/3, P46/2 และ P62/2 ในอาหาร MRS broth ที่ทำการปรับความเป็นกรดต่างที่ระดับ pH 3 โดยให้มีแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลอง ปริมาณ 10^6 CFU/mL ตรวจนับปริมาณเซลล์ที่ระยะเวลา 0 และ 180 นาที โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียระหว่างระยะเวลาที่ 0 นาที กับ 180 นาที พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่

นำมาใช้พิจารณาการนำแบคทีเรียมาใช้เป็นโพรไบโอติก และผลการศึกษาการทนต่อเกลือแร่ของสภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็ก (bile salt tolerance to simulated small intestinal fluid) P10/3, P46/2 และ P62/2 ในอาหารที่มีค่า pH ใกล้เคียงกับลำไส้เล็ก คือ มีค่า pH 8 และมีความเข้มข้นของเกลือแร่ (bile salts) 0.3% โดยให้มีแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลอง ปริมาณ 10^6 CFU/mL ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่ระยะเวลา 0 นาที และ 180 นาที โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ มีผลการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและการทนต่อเกลือแร่ของสภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็ก

สายพันธุ์	ปริมาณแบคทีเรีย (log CFU/mL)		การอยู่รอดของแบคทีเรีย นาทีที่ 180(%)
	นาทีที่ 0	นาทีที่ 180	
การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร			
P10/3	9.54	7.73	81.02
P46/2	8.08	7.83	96.87
P62/2	7.52	6.56	87.20
การทนต่อเกลือน้ำดีของสภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็ก			
P10/3	7.57	6.60	87.23
P46/2	7.86	7.75	98.54
P62/2	7.97	7.89	99.04

การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ ตามมาตรฐาน ISO 10932⁽²⁰⁾ โดยการหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ใช้ *L. paracasei* ATCC 334 เป็นแบคทีเรียควบคุมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ P10/3 และ P46/2 ผลการทดสอบพบว่าสายพันธุ์ P10/3 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (sensitive) 6 ชนิด ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Ampicillin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Tetracycline และ Gentamicin แต่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Kanamycin และสายพันธุ์ P46/2 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (sensitive) 7 ชนิด ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Ampicillin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Kanamycin, Tetracycline และ

Gentamicin ดังแสดงในตารางที่ 5 ในขณะที่สายพันธุ์ P62/2 จัดจำแนกอยู่ในชนิด *Lacticaseibacillus paracasei* สำหรับแบคทีเรีย *L. casei/paracasei* ใน Guidance on the characterization of microorganism used as feed additives or as production organisms ของ European Food Safety Authority (2018)⁽²¹⁾ กำหนดว่าไม่ต้องทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ Vancomycin พบว่าสายพันธุ์ P62/2 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (sensitive) 8 ชนิด ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Ampicillin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Kanamycin, Streptomycin, Tetracycline และ Gentamicin ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *L. plantarum* P10/3 และ *L. plantarum* P46/2

Antibiotics	Test range (mg/L)	<i>L. plantarum</i> P10/3			<i>L. plantarum</i> P46/2		<i>L. paracasei</i> ATCC 334		
		cut off	MIC	Inter-pretation	MIC	Inter-pretation	Valid range of control strain (mg/L)	MIC	Inter-pretation
Ampicillin	0.032–16	2	0.063	S	0.125	S	0.5–2	1	V
Chloramphenicol	0.125–64	8	2	S	2	S	2–8	4	V
Clindamycin	0.032–16	4	0.063	S	0.125	S	0.06–0.25	0.125	V
Erythromycin	0.016–8	1	0.5	S	0.5	S	0.06–0.5	0.25	V
Kanamycin	2–1024	64	256	R	64	S	16–64	32	V
Streptomycin	0.5–256	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	8–32	32	V
Tetracycline	0.125–64	32	16	S	16	S	1–4	2	V
Gentamicin	0.5–256	16	4	S	2	S	1–4	2	V

หมายเหตุ: n.r.: not required, S: susceptible, R: resistance, V: valid, IV: invalid

n.r.: ไม่ต้องการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ Streptomycin และ Vancomycin ในกลุ่ม *L. plantarum/pentosus* (Guidance on the characterization of microorganism used as feed additives or as production organisms ของ European Food Safety Authority (2018)⁽²¹⁾)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *L. paracasei* P62/2

Antibiotics	Test range (mg/L)	<i>L. paracasei</i> P62/2			<i>L. paracasei</i> ATCC 334		
		cut off	MIC	Inter-pretation	Valid range of control strain (mg/L)	MIC	Inter-pretation
Ampicillin	0.032–16	4	0.125	S	0.5–2	1	V
Chloramphenicol	0.125–64	4	2	S	2–8	4	V
Clindamycin	0.032–16	4	0.063	S	0.06–0.25	0.125	V
Erythromycin	0.016–8	1	0.063	S	0.06–0.5	0.25	V
Kanamycin	2–1024	64	16	S	16–64	32	V
Streptomycin	0.5–256	64	16	S	8–32	32	V
Tetracycline	0.125–64	4	1	S	1–4	2	V
Gentamicin	0.5–256	32	2	S	1–4	2	V

หมายเหตุ: S: susceptible, R: resistance, V: valid, IV: invalid

วิจารณ์

การศึกษานี้ได้แยกและคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหาร จำนวน 70 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีมาตรฐานสากล ได้แก่ ISO 15214:1998⁽¹²⁾ สำหรับ *Lactobacillus* spp., APHA:2015; Chapter 10⁽¹³⁾ สำหรับ Enterococci ซึ่งเป็นวิธีการที่ห้องปฏิบัติการได้รับรองมาตรฐาน ISO 17025:2017⁽²⁵⁾ และ USPC: 2023⁽¹⁴⁾ สำหรับ *B. coagulans* มีการทวนสอบวิธีตาม ISO: 16140-3⁽²⁶⁾ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึง

ความหลากหลายของแบคทีเรีย โดยสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลท ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรีย 14 ชนิด สะท้อนถึงความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหารหมักพื้นเมืองไทยในฐานะแหล่งทรัพยากรจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ

ตรวจพบแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในสกุล *Lactobacillus* และ *Pediococcus* spp. ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในกระบวนการหมักอาหาร พบว่า *L. plantarum* เป็น

สายพันธุ์เด่นในกลุ่มรูปร่างท่อน ขณะที่ *P. acidilactici* เป็นสายพันธุ์เด่นในกลุ่มรูปร่างกลม ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่ระบุว่า *L. plantarum* เป็นสายพันธุ์ที่พบได้ทั่วไปในอาหารหมักจากพืชและมีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะกรดและเกลือสูงได้ดี^(27,28) ขณะที่ *P. acidilactici* มีบทบาทสำคัญในการผลิตกรดแลกดิกและสารต้านจุลชีพ เช่น แบคเทอริโอซิน⁽²⁹⁾ อย่างไรก็ตามการตรวจพบจุลินทรีย์ที่อาจเกี่ยวข้องกับความปลอดภัย เช่น *B. cereus* และ *S. stutzeri* แม้ในปริมาณต่ำ สะท้อนถึงความเป็นไปได้ของการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมหรือกระบวนการผลิต ซึ่งควรได้รับการควบคุมอย่างเข้มงวดในกระบวนการคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับการใช้งานในอาหาร⁽³⁰⁾ เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์ของประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 346⁽¹¹⁾ พบว่าสายพันธุ์ที่เข้าเกณฑ์เบื้องต้น ได้แก่ *L. plantarum*, *L. paracasei* และ *E. faecium* ซึ่งถูกนำไปทดสอบคุณสมบัติด้านโพรไบโอติกเพิ่มเติมโดยผลการทดสอบแสดงให้เห็นถึงการคัดเลือกที่เข้มงวด โดยจำนวนไอโซเลทลดลงอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละขั้นตอน โดยเฉพาะการทดสอบความทนกรด (pH 3) และความทนเกลือ น้ำดี ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญของจุลินทรีย์ที่สามารถรอดผ่านระบบทางเดินอาหาร⁽³¹⁾ ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่า *E. faecium* มีลักษณะดื้อยาทุกไอโซเลทที่แยกได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ระบุถึงความเสี่ยงของการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแบคทีเรียสกุลนี้ จึงไม่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นโพรไบโอติกในอาหาร⁽³²⁾ ขณะที่ *L. plantarum* และ *L. paracasei* แสดงความไวต่อยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่และมีเพียงบางไอโซเลทที่ไม่ดื้อยา สะท้อนถึงศักยภาพด้านความปลอดภัยที่ดีกว่า การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคพบว่า *L. plantarum* (P10/3, P46/2) และ *L. paracasei* (P62/2) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอินทรีย์หรือสารต้านจุลชีพ เช่น แบคเทอริโอซิน สอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่า *L. plantarum* มีศักยภาพสูงในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารและระบบทางเดินอาหาร

ในด้านความปลอดภัย การทดสอบ hemolysis พบว่าสายพันธุ์ *L. paracasei* (P62/2) ไม่ก่อให้เกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง (γ -hemolysis) ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นโพรไบโอติก ในขณะที่ *L. plantarum* (P10/3 และ P46/2) แสดง α -hemolysis ซึ่งควรพิจารณาเพิ่มเติมในด้านความปลอดภัย ผลการทดสอบ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ตามแนวทางของ European Food Safety Authority (EFSA, 2018)⁽²¹⁾ ยืนยันว่าจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกมีความไวต่อยาปฏิชีวนะในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยเฉพาะสายพันธุ์ P46/2 และ P62/2 ซึ่งมีแนวโน้มเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเชิงอุตสาหกรรม โดยภาพรวมการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของอาหารในฐานะแหล่งของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นที่เหมาะสมทั้งด้านการอยู่รอดในสภาวะทางเดินอาหาร ความปลอดภัยและฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามการพัฒนาต่อยอดแบคทีเรียที่แยกได้จากการศึกษานี้ไปใช้ประโยชน์เป็นโพรไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องมีการศึกษาระดับจีโนมและการทดสอบ *in vivo* เพื่อยืนยันประสิทธิภาพและความปลอดภัยในระยะยาว รวมถึงต้องมีการศึกษาเชิงประจักษ์ที่ชัดเจนและครบถ้วนตามข้อกำหนดขั้นต่ำและหลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัยการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร⁽²⁴⁾ และต้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 346 พ.ศ. 2555 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารฉบับที่ 2⁽¹¹⁾ ซึ่งเมื่อผลการทดสอบทั้งหมดดังกล่าวผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าวข้างต้น จึงจะสามารถขอการรับรองจากคณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารเพื่อขึ้นทะเบียนโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารไทยได้ในอนาคตต่อไป

สรุป

การศึกษานี้สามารถคัดแยกจุลินทรีย์แลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารได้ จำนวน 100 ไอโซเลท ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรีย 14 ชนิด และได้ดำเนินการจัดเก็บในธนาคารชีวภาพ ที่มีรหัสบ่งชี้ตามหลักมาตรฐานสากล ผลการศึกษาเบื้องต้นพบแลคติกแอซิดแบคทีเรียเด่น ได้แก่ *L. plantarum* และ *P. acidilactici* สะท้อนถึงความหลากหลายและศักยภาพของแหล่งอาหารหมักไทย เมื่อผ่านกระบวนการคัดเลือกตามเกณฑ์ด้านโปรไบโอติกและความปลอดภัย พบว่าสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูง ได้แก่ *L. plantarum* (P10/3 และ P46/2 แยกจากถั่วเน่าแผ่นแห้งและกิมจิผักกาดขาว) และ *L. paracasei* (P62/2 แยกจากถั่วเน่าเมอะ) ซึ่งมีคุณสมบัติทนเกลือ น้ำดี ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ และสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ โดยเฉพาะ P62/2 ที่ไม่แสดง hemolysis จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำไปศึกษาเพิ่มเติมและพัฒนาต่อยอดเป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ไทย ซึ่งจุลินทรีย์แลคติกแอซิดแบคทีเรียรวมถึงข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษานี้ จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการพัฒนาเชิงประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารและสุขภาพ สนับสนุนการใช้ทรัพยากรชีวภาพในประเทศอย่างยั่งยืน โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวอาจสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพในอนาคต และใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการ

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์การใช้ภาษา

บทความนี้มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ ChatGPT (OpenAI, USA) ช่วยตรวจสอบไวยากรณ์บทความย่อภาษาอังกฤษช่วยตรวจสอบคำที่พิมพ์ไม่ถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณสมภพ วัฒนมณี ข้าราชการบำนาญ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รศ.ดร.อดิสร เสวติวิวัฒน์ ข้าราชการบำนาญ สถาบัน

พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำปรึกษาในการวางแผนการทดสอบ และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหารทุก ๆ ท่าน ที่ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. มาลัย ทวีโชติภัทร์. โปรไบโอติกและการติดเชื้อในทางเดินอาหาร. ว มหวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2553; 2(4): 25-38.
2. Slover CM. Danziger L. Lactobacillus: a review. Clin Microbiol Newsl 2008; 30(4): 23-7.
3. Gupta R, Jeevaratnam K, Fatima A. Lactic acid bacteria: probiotic characteristic, selection criteria, and its role in human health (a review). J Emerg Technol Innov Res 2018; 5(10): 411-24.
4. นวลจันทร์ พารักษา. สารแนรู้เกี่ยวกับโปรไบโอติก. สุกรสารัน 2533; 16(63): 5-8.
5. Fuller R. Probiotic food: current use and future development. Int Food Ingred 1993; 3: 23-6.
6. Mach T. Clinical usefulness of probiotics in inflammatory bowel diseases. J Physiol Pharmacol 2006; 57(Suppl 9): 23-33.
7. Yan F, Polk DB. Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2006; 9(6): 717-21.
8. Reid G. Probiotics and prebiotics-progress and challenges. Int Dairy J 2008; 18 (10-11): 969-75.
9. Guzel-Seydim Z, Seydim AC, Greene AK. Organic acid and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. J Dairy Sci 2000; 83(2): 275-7.
10. Beshkova DM, Simova ED, Simov ZI, Frengova GI, Spasov ZN. Pure cultures for making kefir. Food Microbiol 2002; 19(5): 537-44.
11. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 346 พ.ศ. 2555 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร ฉบับที่ 2. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 129 ตอนพิเศษ 189 ง (วันที่ 18 ธันวาคม 2555).

12. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria—Colony-count technique at 30°C (ISO 15214:1998). Geneva, Switzerland: ISO; 1998.
13. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th ed. Washington, DC: APHA; 2015.
14. United States Pharmacopeia. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP–NF). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2023.
15. Thongwai N, Futui W, Ladpala N, Sirichai B, Weechan A, Kanklai J, et al. Characterization of bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter maltaceti* P285 isolated from contaminated honey wine. Microorganisms 2022; 10(3): 528 (18 pages).
16. Cappuccino JG, Sherman N. Microbiology: a laboratory manual. 11th ed. New York: Pearson; 2017.
17. Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Blandino G, Stefani S. A novel δ -hemolysis screening method for detecting heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-intermediate *S. aureus*. J Clin Microbiol 2012; 50(5): 1742–4.
18. National Center for Biotechnology Information. GenBank: NIH genetic sequence database. Bethesda, MD: National Library of Medicine; 2023.
19. BD Diagnostics. BD Phoenix™ M50 automated microbiology system: operator's manual. Sparks, MD: Becton, Dickinson and Company; 2021.
20. International Organization for Standardization. Milk and milk products—Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB) (ISO 10932:2010). Geneva, Switzerland: ISO; 2010.
21. European Food Safety Authority. Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms. EFSA J. [serial online] 2018; [cited 2026 Apr 14]; 16(3): e05206. [24 screens]. Available from: URL: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2018.5206>.
22. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. J Appl Microbiol 1998; 84(5): 759–68.
23. Kazemipoor M, Wan Mohamed Radzi CWJ, Begum K, Yaze I. Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables against food borne pathogens. Archives des Sciences 2012; 65(6): 1–10.
24. คณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร, ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. ข้อกำหนดขั้นต่ำและหลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัยการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร. ปทุมธานี: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ; 2565.
25. International Organization for Standardization. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: ISO; 2017.
26. International Organization for Standardization. ISO 16140-3:2021. Microbiology of the food chain—Method validation—Part 3: protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Geneva, Switzerland: ISO; 2021.

27. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, editors. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd ed. New York: CRC Press; 2004. p. 1-66.
 28. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41(2): 85-101.
 29. Papagianni M, Anastasiadou S. Pediocins: the bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb Cell Fact* 2009; 8: 3. (16 pages).
 30. Granum PE, Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 157(2): 223-8.
 31. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: FAO/WHO; 2002.
 32. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006; 106(1): 1-24.
-

Selection of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Properties from Foods

Ratchadaporn Suwannarat, Nunthidadao Phatsakul, and Nopporn Jamsai

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

ABSTRACT This study aimed to isolate and screen lactic acid bacteria (LAB) with probiotic potential from 70 food samples, including fresh vegetables, fermented foods, and ready to eat products. A total of 100 Gram positive rod and coccus shaped bacterial colonies were isolated and identified using conventional microbiological methods, followed by species confirmation through 16S rRNA gene sequencing and the BD Phoenix™ M50 automated identification system. The isolates were subsequently evaluated for preliminary probiotic characteristics, including catalase activity, hemolytic activity, growth under aerobic and anaerobic conditions, acid tolerance (pH 3.0), bile salt tolerance, antimicrobial susceptibility, and antagonistic activity against foodborne pathogens. The results showed that isolates meeting the criteria specified in the Thai Ministry of Public Health Notification No. 346 comprised 21 isolates of *Lactiplantibacillus plantarum*, two isolates of *Lacticaseibacillus paracasei*, and four isolates of *Enterococcus faecium*. *L. plantarum* and *L. paracasei* were susceptible to the tested antimicrobial agents and exhibited antagonistic activity against pathogenic bacteria, whereas *E. faecium* showed antimicrobial resistance and lacked antagonistic activity. Consequently, two *L. plantarum* isolates (P10/3 and P46/2) and one *L. paracasei* isolate (P62/2) were selected for further characterization of their probiotic properties, safety, and strain identity to support probiotic strain registration. The selected strains were deposited in a biological resource repository to establish a national probiotic strain database for Thailand. These findings indicate that fermented foods are an important source of LAB with probiotic potential. However, this study represents only a preliminary laboratory-based evaluation. Further investigations, including whole genome analysis and comprehensive assessments of probiotic functionality and safety, are required to support probiotic strain registration and facilitate future applications in the functional food industry.

Keywords : Probiotics, Lactic acid bacteria, Fermented foods

การวิเคราะห์ข้อบกพร่องและแนวทางการพัฒนาระบบงาน หน่วยรับรองของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017

เสาวนีย์ อารมย์สุข¹ ธนวัฒน์ ศรีดาพันธ์² และ สิริพรรณ แสงอรุณ³

¹สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²17/10 ถนนบางขุนนนท์ซอย 5 แขวงบางขุนนนท์ เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร 10700

³สำนักผู้ทรงคุณวุฒิกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ การรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการเป็นกลไกสำคัญในการพัฒนาโครงสร้างพื้นฐานทางคุณภาพของประเทศ และช่วยเสริมสร้างความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบและการตรวจวิเคราะห์ในระดับสากล สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในฐานะหน่วยรับรองระบบงานของประเทศตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 ได้เข้าร่วม ข้อตกลงการยอมรับร่วมกับ Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC) และ International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) ซึ่งกำหนดให้ต้องผ่านการตรวจประเมินเพื่อต่ออายุทุก 4 ปี การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์แนวทางการแก้ไขและปรับปรุงข้อบกพร่องจากการตรวจประเมินของ APAC ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 ควบคู่กับการวิเคราะห์ผลการตรวจติดตามคุณภาพภายในระหว่างปีงบประมาณ พ.ศ. 2566-2568 เพื่อวางแผนป้องกันการ เกิดข้อบกพร่องซ้ำในประเด็นเดียวกัน โดยรวบรวมข้อมูลรายงานผลการตรวจประเมินของ APAC และรายงานการตรวจ ติดตามคุณภาพภายในและวิเคราะห์ข้อบกพร่องและข้อเสนอแนะตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 ผลการ ศึกษาพบว่าผลการตรวจประเมินของ APAC พบข้อบกพร่อง 8 ข้อ และข้อเสนอแนะ 4 ข้อ โดยข้อกำหนดที่ 7 ด้านกระบวนการ เป็นข้อบกพร่องและข้อเสนอแนะที่ตรวจพบมากที่สุด สอดคล้องกับผลจากการตรวจติดตามคุณภาพภายในระหว่างปีงบประมาณ พ.ศ. 2566-2568 ซึ่งพบข้อบกพร่องในข้อกำหนดดังกล่าวอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลา 3 ปี นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ ผลการตรวจประเมินจาก APAC และการตรวจติดตามคุณภาพภายในร่วมกัน พบข้อกำหนดที่พบร่วมกัน 4 ประเด็น ได้แก่ ข้อกำหนด 7.4, 7.6, 7.9 และ 7.11 ผลการศึกษาสะท้อนให้เห็นประเด็นข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 ที่ต้องได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและเป็นระบบ เพื่อเสริมสร้างประสิทธิภาพและยกระดับระบบงานหน่วยรับรองให้สอดคล้อง กับมาตรฐานสากลอย่างยั่งยืน และเพิ่มความพร้อมสำหรับการตรวจประเมินในรอบถัดไปได้โดยมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ, หน่วยรับรอง, การวิเคราะห์ข้อบกพร่อง, ISO/IEC 17011:2017

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

Received: 3 February 2026

Revised: 14 April 2026

Accepted: 5 May 2026

บทนำ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดำเนินงานภายใต้วิสัยทัศน์ในการก้าวสู่การเป็นองค์กรชั้นนำด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข 1 ใน 3 ของเอเชียภายในปี พ.ศ. 2570⁽¹⁾ โดยเป็นหน่วยงานหลักที่มีการดำเนินการตามพันธกิจด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุขของประเทศที่สามารถตอบสนองต่อนโยบายรัฐบาล ยุทธศาสตร์ระยะ 20 ปี และยุทธศาสตร์ไทยแลนด์ 4.0 บทบาทสำคัญของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการสนับสนุนระบบสุขภาพของประเทศอาศัยองค์ความรู้หลัก 3 ด้าน ได้แก่ 1) การพัฒนานวัตกรรมด้านสุขภาพ (innovation) ผ่านการส่งเสริมการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อเสริมสร้างสุขภาพและส่งเสริมความสามารถในการแข่งขันของประเทศ 2) การสนับสนุนระบบบริการสุขภาพ (technology support) โดยการดำเนินงานด้านห้องปฏิบัติการอ้างอิงและการกำกับดูแลมาตรฐานห้องปฏิบัติการ และ 3) การคุ้มครองผู้บริโภค (consumer protection) เพื่อสนับสนุนและเสริมสร้างระบบการคุ้มครองผู้บริโภคด้านสุขภาพให้มีความยั่งยืน สอดรับกับแผนขับเคลื่อนกลยุทธ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2570⁽²⁾ มุ่งเน้นผลสัมฤทธิ์ในการยกระดับคุณภาพและศักยภาพห้องปฏิบัติการให้เป็นไปตามมาตรฐานระดับชาติและมาตรฐานระดับสากล ควบคู่ไปกับการพัฒนาองค์กรสู่ความเป็นองค์กรสมรรถนะสูง ทั้งนี้การพัฒนาห้องปฏิบัติการให้มีความสามารถดังกล่าว จำเป็นต้องอาศัยกลไกการรับรองระบบงานเป็นเครื่องมือสำคัญในการกำกับ ติดตาม และยกระดับคุณภาพการดำเนินงาน เพื่อสร้างความเชื่อมั่นในผลการตรวจวิเคราะห์และสนับสนุนระบบสาธารณสุขของประเทศอย่างมีประสิทธิภาพ⁽²⁾

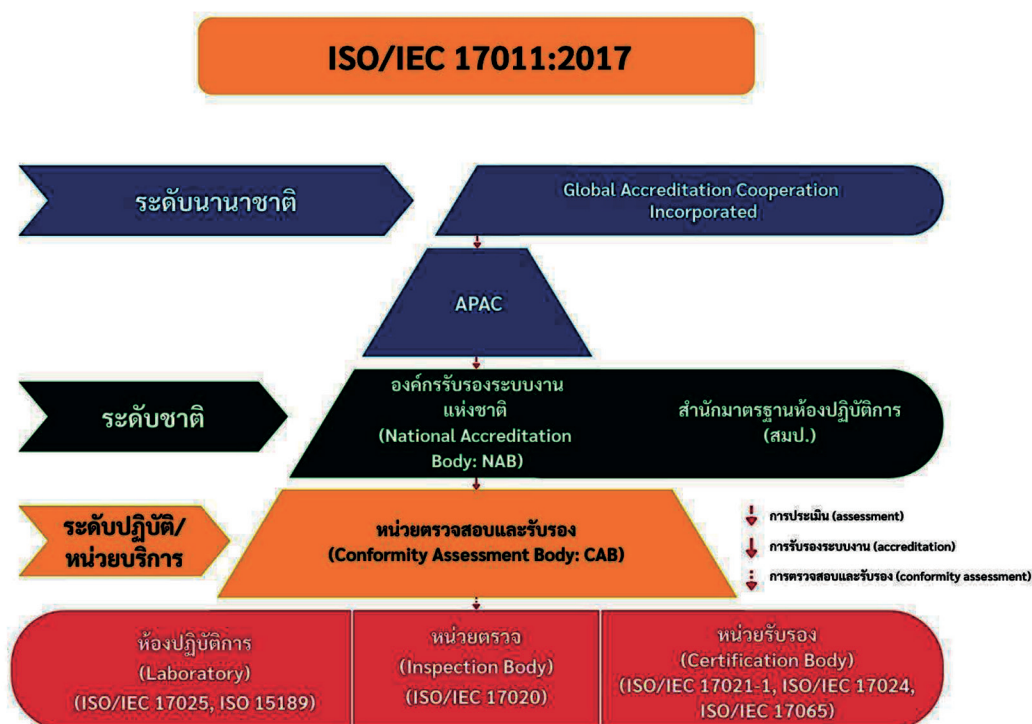
สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ เป็นหน่วยงานในสังกัดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีบทบาทสำคัญในการเป็นหน่วยรับรองของประเทศ (Accreditation Body: AB) มีอำนาจหน้าที่ตามพระราชบัญญัติการมาตรฐานแห่งชาติ พ.ศ. 2551⁽³⁾ ในการให้การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบด้านการแพทย์และสาธารณสุข ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 และ

ISO 15189 หน่วยผลิตและจัดเตรียมวัสดุอ้างอิงทางการแพทย์และสาธารณสุข ตามมาตรฐาน ISO 17034 และห้องปฏิบัติการธนาคารทรัพยากรชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข ตามมาตรฐาน ISO 20387 ให้กับห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนทั้งในระดับประเทศและระดับนานาชาติ⁽⁴⁾ การดำเนินบทบาทดังกล่าวอยู่ภายใต้การยอมรับในระดับสากล โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้รับการลงนามความตกลงการยอมรับร่วม (Mutual Recognition Agreement: MRA) กับองค์กรระหว่างประเทศว่าด้วยการรับรองห้องปฏิบัติการ (Global Accreditation Cooperation Incorporated) เดิมใช้ชื่อว่า International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) มีหน้าที่บริหารข้อตกลงเกี่ยวกับการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการและองค์การภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกว่าด้วยการรับรองห้องปฏิบัติการ (Asia Pacific Accreditation Cooperation: APAC) มีหน้าที่กำกับดูแลและบริหารระบบการรับรองในระดับภูมิภาค⁽⁵⁾ โดยการดำเนินงานของหน่วยรับรองดังกล่าวเป็นไปตามข้อกำหนดตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17011⁽⁶⁾ รวมถึงเอกสารข้อกำหนดที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ APAC MRA-001⁽⁷⁾ และ APAC FMRA-001⁽⁸⁾ ในการสร้างความเชื่อมั่นต่อระบบการรับรองและการยอมรับผลการตรวจวิเคราะห์ในระดับนานาชาติ

การรับรองระบบงานเป็นการประเมินความสามารถของหน่วยตรวจสอบและรับรอง (Conformity Assessment Body: CAB) โดยหน่วยรับรองที่มีเอกภาพในการตรวจสอบ ยืนยัน และออกใบรับรองว่าผลิตภัณฑ์/บริการ/ระบบ มีคุณสมบัติเป็นไปตามมาตรฐาน ข้อกำหนด เพื่อสร้างความเชื่อมั่นและยอมรับในระดับสากล^(9,10) จึงเกิดโครงสร้างการรับรองความสามารถ (accreditation infrastructure) ที่เชื่อมโยงระหว่างหน่วยรับรองและมาตรฐานที่นำมาใช้ โดยมาตรฐานหลักที่หน่วยรับรองทุกแห่งต้องปฏิบัติตามคือ ISO/IEC 17011:2017⁽⁶⁾ ซึ่งครอบคลุมด้านความเป็นอิสระและความเป็นกลาง ความสามารถทางเทคนิค ระบบบริหารจัดการ กระบวนการรับรองและการตัดสินใจ มาตรฐานนี้ถูกนำไปใช้โดยองค์กรระหว่างประเทศว่าด้วย

การรับรองห้องปฏิบัติการ ในการประเมินความสามารถของหน่วยรับรองก่อนการลงนามยอมรับร่วม ทั้งนี้ การดำเนินการดังกล่าวได้มีการดำเนินงานในระดับภูมิภาค เพื่อการบริหารจัดการที่ครอบคลุมและมีประสิทธิภาพ จึงมีองค์กรความร่วมมือระดับภูมิภาคที่เป็นที่ยอมรับ ได้แก่ European co-operation for Accreditation (EA) ในยุโรป, Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC) ในเอเชียแปซิฟิก, Inter-American Accreditation

Cooperation (IAAC) ในอเมริกา, African Accreditation Cooperation (AFRAC) ในแอฟริกา, Arab Accreditation Cooperation (ARAC) ในภูมิภาคอาหรับ และ Southern African Development Community Cooperation in Accreditation (SADCA) ในแอฟริกาใต้ สำหรับประเทศไทยอยู่ภายใต้การกำกับ ติดตามของ APAC⁽¹¹⁾ ความสัมพันธ์เชิงระบบของโครงสร้างการรับรองความสามารถระหว่างหน่วยรับรองและมาตรฐานที่นำมาใช้ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์เชิงระบบของโครงสร้างการรับรองความสามารถระหว่างหน่วยรับรองและมาตรฐานที่นำมาใช้ (ดัดแปลงจากสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ)⁽¹⁰⁾

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการในฐานะหน่วยรับรองของประเทศจะทำการตรวจประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์และสาธารณสุขตามมาตรฐานสากล ได้แก่ ISO/IEC 17025 และ ISO 15189 โดยใช้ข้อกำหนดในมาตรฐานเป็นตัวชี้บ่งถึงการดำเนินการที่สอดคล้องตามมาตรฐานที่เกี่ยวข้อง⁽¹²⁾ ดังนั้นเพื่อยืนยันถึงความสามารถ (competence) การปฏิบัติงานที่สอดคล้องและสม่ำเสมอ (consistent operation) และมีความเป็นกลาง (impartiality) ใน

การให้การรับรอง หน่วยรับรองต้องปฏิบัติตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017⁽⁶⁾ ซึ่งเป็นเสมือนรัฐธรรมนูญที่องค์กรรับรองทั่วโลกใช้เพื่อรักษาสถานภาพการเป็นสมาชิกการลงนามยอมรับร่วม การดำเนินการดังกล่าวจะถูกตรวจติดตามทุก 4 ปี โดยองค์กรระหว่างประเทศว่าด้วยการรับรองห้องปฏิบัติการ และองค์กรภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกว่าด้วยการรับรองห้องปฏิบัติการ (APAC) หากพบข้อบกพร่อง (Nonconformity: NC) หรือข้อแนะนำ (Comment: CM)⁽⁷⁾ ต้องดำเนินการแก้ไข

ภายใน 1 เดือน เพื่อคงสถานะการเป็นหน่วยรับรอง อย่างไรก็ตามการตรวจประเมินดังกล่าวที่มีระยะห่างถึง 4 ปี ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อในการรักษาความต่อเนื่องของระบบคุณภาพ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการจึงจัดให้มีการตรวจติดตามคุณภาพภายใน (internal quality audit) ทุกปี เพื่อประเมินความสอดคล้องกับมาตรฐาน สืบหาและบ่งชี้ต้นเหตุของปัญหาในระบบ เพื่อรักษาระบบคุณภาพ และเกิดการพัฒนายอย่างต่อเนื่อง การตรวจติดตามคุณภาพภายในดำเนินการโดยผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์ในกระบวนการรับรอง หรือเป็นผู้ตรวจประเมินตามมาตรฐานสากลนั้น ๆ โดยทำการตรวจประเมินตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17011:2017 ครอบคลุมข้อกำหนดทั้งด้านบริหารจัดการและด้านวิชาการ⁽¹³⁾

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์แนวทางการดำเนินการแก้ไขและปรับปรุงระบบบริหารคุณภาพของหน่วยรับรองสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ภายหลังการรับรองประเมินโดยผู้ตรวจประเมินจาก APAC ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 โดยมุ่งเน้นการดำเนินการที่ต่อเนื่อง และยกระดับกระบวนการ (process escalation) ให้เกิดการเสริมสร้างประสิทธิภาพของกระบวนการรับรอง และผลจากการตรวจติดตามคุณภาพภายใน ภายหลังการตรวจติดตามจาก APAC ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2566-2568 โดยผู้ตรวจติดตามคุณภาพภายในที่แต่งตั้งโดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการที่มีความรู้ความเข้าใจในระบบการทำงานของหน่วยรับรอง เพื่อเป็นแนวทางการป้องกันข้อบกพร่องเดิมซ้ำและวางแผนการพัฒนาปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง (continuous improvement) โดยเฉพาะข้อบกพร่องที่พบในข้อกำหนดที่ 7 ด้านกระบวนการ ทั้งจากการตรวจประเมินของ APAC และการตรวจติดตามคุณภาพภายใน โดยมีเป้าหมายเพื่อการพัฒนากระบวนการเป็นหน่วยรับรองระบบงานให้สอดคล้องตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 อย่างมีประสิทธิภาพ และเตรียมความพร้อมในการตรวจประเมินจาก APAC ครั้งต่อไปในปี พ.ศ. 2569

วัสดุและวิธีการ

การรวบรวมข้อมูล

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive research) โดยใช้รูปแบบการศึกษาเฉพาะกรณี (case study) ดำเนินการภายใต้แนวคิดการพัฒนางานประจำสู่งานวิจัย (routine to research: R2R) โดยทำการเก็บรวบรวมข้อมูลจากผลการแก้ไขและปรับปรุงข้อบกพร่องที่ตรวจพบจากการตรวจประเมินของ APAC ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 ซึ่งเป็นการประเมินเพื่อพิจารณาต่ออายุการรับรองในรอบ 4 ปี ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ประกอบด้วย ข้อบกพร่องและข้อเสนอแนะ และผลการแก้ไขปรับปรุงที่ต้องมีการดำเนินการอย่างต่อเนื่อง เพื่อรักษาสถานภาพการเป็นหน่วยรับรองระบบงานของประเทศ รวมถึงผลการตรวจติดตามคุณภาพภายในที่สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการดำเนินการเป็นประจำทุกปีตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2566-2568 โดยแต่งตั้งคณะผู้ตรวจติดตามคุณภาพภายในทำหน้าที่ตรวจติดตามเพื่อตรวจสอบความสอดคล้องระบบบริหารคุณภาพหน่วยรับรองสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 ได้แก่ ข้อกำหนดที่ 4 ข้อกำหนดทั่วไป (General requirements) ข้อกำหนดที่ 5 ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง (Structural requirements) ข้อกำหนดที่ 6 ข้อกำหนดด้านทรัพยากร (Resource requirements) ข้อกำหนดที่ 7 ข้อกำหนดด้านกระบวนการ (Process requirements) ข้อกำหนดที่ 8 ข้อกำหนดด้านข้อมูล (Information requirements) และข้อกำหนดที่ 9 ข้อกำหนดด้านระบบการบริหาร (Management system requirements)

ส่วนที่ 1 สิ่งที่พบ (findings) จากการตรวจประเมินตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 ถูกจำแนกออกเป็น 2 ประเภทหลัก ตามเกณฑ์กำหนดของ APAC MRA 001 (Procedures for Establishing and Maintaining Mutual Recognition) ประกอบด้วยรหัส NC คือ ข้อบกพร่องที่เป็นเงื่อนไข (Nonconformity: NC) หมายถึง ข้อบกพร่องที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานการรับรองหรือระบบบริหารคุณภาพหน่วยรับรองอย่างมีนัยสำคัญ อาจส่งผลให้การดำเนินการ

รับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข ชาติความน่าเชื่อถือ และ รหัส CM คือ ข้อเสนอแนะ (Comment: CM) หมายถึง ประเด็นที่มีโอกาสก่อให้เกิด ปัญหาในอนาคต หรือเป็นข้อเสนอแนะจากผู้ตรวจประเมิน ที่พบว่ายังไม่เป็นข้อบกพร่องตามข้อกำหนด ISO/IEC 17011:2017 ซึ่งควรได้รับการปรับปรุงเพื่อป้องกันการ เกิดข้อบกพร่องในอนาคต จึงได้วิเคราะห์แนวทางการแก้ไขสิ่งที่พบจากผลการตรวจประเมินของ APAC ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 ระหว่างวันที่ 21-25 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565 และวันที่ 21-23 มีนาคม พ.ศ. 2565 มอบหมายผู้รับผิดชอบดำเนินการแก้ไข วางแผน การปรับปรุงเพื่อการยกระดับกระบวนการ (process escalation) และกระบวนการสื่อสารให้ผู้เกี่ยวข้อง

ส่วนที่ 2 วิเคราะห์แนวโน้มและเปรียบเทียบ ข้อบกพร่องและข้อเสนอแนะจากผลการตรวจติดตาม คุณภาพภายในสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2566-2568 ร่วมกับผลการตรวจ

ประเมินจาก APAC เพื่อระบุประเด็นที่พบซ้ำและ นำไปสู่การวางแผนแนวทางการปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง (continuous improvement) อย่างเป็นระบบ

ผล

ผลการศึกษาในส่วนที่ 1 เพื่อวิเคราะห์แนวทางการแก้ไขจากผลการตรวจประเมินของ APAC ระหว่างวันที่ 21-25 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565 และวันที่ 21-23 มีนาคม พ.ศ. 2565 พบข้อบกพร่อง (NC) จำนวน 8 ข้อ และ ข้อเสนอแนะ (CM) จำนวน 4 ข้อ ภายหลังการตรวจประเมิน สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้ดำเนินการแก้ไขตาม ข้อกำหนดครบถ้วน และผ่านการต่ออายุการรับรอง จาก APAC ในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2565 สรุปผลการแก้ไขข้อบกพร่องและข้อเสนอแนะภายหลังการตรวจ ประเมิน รวมถึงรายการปรับปรุงเพื่อยกระดับกระบวนการ รับรอง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการดำเนินการเพิ่มเติมภายหลังการแก้ไขข้อบกพร่องและข้อเสนอแนะจากการตรวจประเมินของ APAC ภายใต้มาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017

ข้อกำหนด/ NC หรือ CM	รายละเอียด	การแก้ไข	การยกระดับกระบวนการ	การสื่อสารให้ผู้เกี่ยวข้อง
4.3.4/NC Use of accreditation symbols and other claims of accreditation	การใช้สัญลักษณ์รับรองใน ใบรายงานผลการทดสอบ ของห้องปฏิบัติการที่ได้รับ การรับรองไม่ปรากฏ มาตรฐานที่ได้รับการรับรอง	เพิ่มวิธีปฏิบัติเรื่องการระบุ มาตรฐานที่ได้รับการรับรอง ในใบรายงานผลให้ชัดเจน เพื่อการบ่งชี้มาตรฐานที่ ได้รับการรับรอง	ปรับการดำเนินการให้ชัดเจน ยิ่งขึ้น โดยแก้ไขวิธีปฏิบัติ เรื่อง การระบุมาตรฐานที่ ได้รับการรับรองให้ระบุ ได้ตราสัญลักษณ์รับรอง	สื่อสารลูกค้า ผู้ตรวจประเมิน และคณะกรรมการ ถึงวิธี ปฏิบัติทางจดหมาย และ ประกาศหน้าเว็บไซต์ โดย กำหนดให้ดำเนินการแล้ว เสร็จภายในวันที่ 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2568
4.4/CM Impartiality requirements	คู่มือคุณภาพไม่ถูกทบทวน ให้เป็นปัจจุบัน โดยพบ หน่วยงานการทดสอบความ ชำนาญอยู่ภายใต้สำนัก มาตรฐานห้องปฏิบัติการ ซึ่งส่งผลต่อการรักษาความ เป็นกลาง	ปรับคู่มือคุณภาพให้เป็น ปัจจุบันตามที่ได้มีการ แยกภารกิจของหน่วยงาน การทดสอบความชำนาญ ออกจากสำนักมาตรฐาน ห้องปฏิบัติการตั้งแต่ปี พ.ศ. 2563	ทบทวนความเป็นกลาง ของกระบวนการรับรองใน เอกสารเงื่อนไข เรื่อง ความ เป็นกลาง และนโยบายการ รักษาความเป็นกลาง	สื่อสารนโยบายการรักษา ความเป็นกลางหน้าเว็บไซต์
4.6.3/NC Establishing accreditation schemes	ไม่ได้กำหนดนโยบายและ ขั้นตอนการปฏิบัติงานการ ทบทวนความเหมาะสมของ โปรแกรมการรับรองเมื่อ ต้องมีการเปิดโปรแกรมการ รับรองใหม่	กำหนดนโยบายและเพิ่ม วิธีปฏิบัติ เรื่อง การทบทวน ความเหมาะสมของ โปรแกรมการรับรอง เมื่อ ต้องมีการเปิดโปรแกรม ใหม่ ประกอบด้วย	มีการเปิดโปรแกรมให้การ รับรอง biobank ตาม มาตรฐาน ISO 20387 จึง ได้ดำเนินการตามวิธีปฏิบัติ ที่กำหนดไว้ และเพิ่มขั้น ตอนการประเมินความ พร้อมก่อนเปิดให้บริการ	สื่อสารให้เจ้าหน้าที่หน่วย รับรองและคณะกรรมการที่ ปรึกษาทราบถึงขั้นตอนการ ปฏิบัติงาน

ตารางที่ 1 ผลการดำเนินการเพิ่มเติมภายหลังการแก้ไขข้อบกพร่องและข้อเสนอแนะจากการตรวจประเมินของ APAC ภายใต้อนุสัญญา ISO/IEC 17011:2017 (ต่อ)

ข้อกำหนด/ NC หรือ CM	รายละเอียด	การแก้ไข	การยกระดับกระบวนการ	การสื่อสารให้ผู้เกี่ยวข้อง
		1) การสอบถามความคิดเห็นผู้มีส่วนได้ส่วนเสียในการออกข้อกำหนด 2) การสอบถามเพื่อประเมินผล การดำเนินการรับรอง 3) การแต่งตั้งคณะทำงานวิชาการเฉพาะด้านเพื่อทบทวนข้อกำหนดเฉพาะด้านต่าง ๆ 4) การทบทวนความเหมาะสมของโปรแกรมถึงความสอดคล้องกับข้อกำหนดอื่นๆ และกฎหมายที่เกี่ยวข้อง 5) คณะกรรมการที่ปรึกษาพิจารณาความเหมาะสมของโปรแกรมและให้คำแนะนำในการปรับปรุง	การทบทวนความเหมาะสมของโปรแกรมการรับรอง	
6.1/CM Competence of personnel	ผู้ตรวจประเมินไม่ได้สังเกตเห็นมาตรฐานที่ไม่ตรงกันใบรับรองวัสดุอ้างอิงที่มีการอ้างอิง ISO ที่ยกเลิกร่วมกับ ISO ฉบับปัจจุบัน	แจ้งหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิงออกใบรับรองวัสดุอ้างอิงให้ถูกต้อง	จัดฟื้นฟูความรู้ผู้ตรวจประเมิน คณะกรรมการและเจ้าหน้าที่รับรองเน้นการตรวจสอบความถูกต้องใบรับรองวัสดุอ้างอิง เมื่อพิจารณาให้การรับรองโดยคณะกรรมการรับรองหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง	มีการประชุมและสื่อสารกับผู้ตรวจประเมินในการตรวจประเมินต้องพิจารณาและตรวจสอบหลักฐานอย่างถี่ถ้วนและให้ละเอียดเพียงพอ โดยเฉพาะการตรวจสอบใบรับรองที่เกิดขึ้น
6.1/CM Competence of personnel	ไม่พบบันทึกความเชี่ยวชาญเฉพาะด้านการตรวจวิเคราะห์ในประวัติของผู้ตรวจประเมิน ISO 15189 บางท่าน	ทบทวนขั้นตอนการปฏิบัติงาน โดยระบุประวัติให้ชัดเจนถึงประสบการณ์เกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์	สร้างความตระหนักถึงความสำคัญที่ต้องมีหลักฐานเพื่อแสดงถึงความสามารถ และขอความร่วมมือเพื่อจัดทำประวัติให้ครบถ้วน	1) สื่อสารผู้ตรวจประเมินให้เข้าใจถึงการบันทึกข้อมูลความเชี่ยวชาญเฉพาะด้านใน CV 2) สื่อสารเจ้าหน้าที่หน่วยรับรองที่รับผิดชอบตรวจสอบหลักฐาน CV ในทุกหัวข้อให้ครบถ้วน
6.1/CM Competence of personnel	ไม่พบการประเมินสมรรถนะผู้ตรวจประเมินเพิ่มเติมจากที่กำหนด (3 ปีครั้ง) กรณีที่มีการทบทวนให้ออกตรวจความถี่สูงกว่าผู้ตรวจประเมินท่านอื่น อาจเกิดความถี่สูงต่อกิจกรรมที่ดำเนินการ	กำหนดมาตรการแต่งตั้งผู้ตรวจประเมินคนเดิมตรวจไม่เกิน 2 ครั้งต่อเดือน และกำหนดให้มีการเฝ้าระวังโดยประเมินสมรรถนะผู้ตรวจประเมินเพิ่มเติม กรณีตรวจประเมินมากกว่า 2 ครั้งต่อเดือน	สร้างระบบการประเมินผลความสามารถของผู้ตรวจประเมินให้มีความถี่ที่เหมาะสมเพิ่มเติม ดังนี้ - ตรวจประเมินน้อยกว่า 5 ครั้งต่อปี และรายการทดสอบมีความเสี่ยงต่ำประเมิน 1 ครั้ง ใน 3 ปี	สื่อสารทำความเข้าใจกับเจ้าหน้าที่หน่วยรับรองในการเชิญผู้ตรวจประเมินและการประเมินผลผู้ตรวจประเมินตามวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การเลือก พัฒนา และอบรมผู้ตรวจประเมิน

ตารางที่ 1 ผลการดำเนินการเพิ่มเติมภายหลังการแก้ไขข้อบกพร่องและข้อเสนอแนะจากการตรวจประเมินของ APAC ภายใต้อาณัติมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 (ต่อ)

ข้อกำหนด/ NC หรือ CM	รายละเอียด	การแก้ไข	การยกระดับกระบวนการ	การสื่อสารให้ผู้เกี่ยวข้อง
			ตรวจประเมินน้อยกว่า 5 ครั้งต่อปี แต่รายการทดสอบมีความเสี่ยงสูง ประเมิน 2 ครั้ง ใน 3 ปี - ตรวจประเมินมากกว่าหรือเท่ากับ 5 ครั้งต่อปี ประเมิน 2 ครั้ง ใน 3 ปี - ผู้ตรวจประเมินที่ไม่ได้รับมอบหมายให้ไปตรวจประเมินในรอบ 3 ปี เมื่อได้รับมอบหมายให้ทำการประเมินทันที	
7.4/NC Preparation for assessment	แผนการตรวจประเมินไม่ครอบคลุมกิจกรรมสถานที่และการทดสอบที่ถูกรวบรวม	จัดทำแบบฟอร์มแผนการตรวจประเมิน (Assessment plan) ให้มีรายละเอียดจำนวนรายการทดสอบที่ถูกรวบรวม ตรวจสอบรายการทดสอบที่ถูกรวบรวม ชื่อผู้ตรวจประเมินในแต่ละรายการทดสอบ และสถานที่เก็บตัวอย่างที่ถูกรวบรวม เพื่อแสดงถึงตัวแทนของสิ่งที่ถูกรวบรวมที่ทำการตรวจประเมิน	ปรับปรุงแบบฟอร์มใหม่ โดยรวมกำหนดการและแผนการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการ ที่มีการระบุรายการทดสอบ และข้อกำหนดที่ต้องตรวจประเมินไว้ด้วยกัน เพื่อไม่ต้องมีแบบฟอร์มที่ซ้ำซ้อนกัน	สื่อสารทำความเข้าใจกับเจ้าหน้าที่หน่วยรับรองในการจัดทำแผนการตรวจประเมินต้องส่งพร้อมทั้งคำขอรับรองและข้อมูลจำเพาะของห้องปฏิบัติการทดสอบที่มีชื่อผู้ตรวจประเมินตามรายการทดสอบที่รับผิดชอบ
7.6/NC	รายงานการตรวจประเมินขาดความครบถ้วน ดังนี้ 1) รายงานการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการไม่มีรายละเอียดข้อบกพร่องที่ถูกรวบรวม 2) รายงานการตรวจประเมินหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิงไม่มีรายละเอียดว่าเป็นวัสดุอ้างอิงหรือวัสดุอ้างอิงรับรอง	1) เพิ่มข้อบกพร่องที่ถูกรวบรวมในรายงานการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการ 2) ระบุประเภทของวัสดุอ้างอิงว่าเป็นวัสดุอ้างอิงหรือวัสดุอ้างอิงรับรอง	ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในรายงานการตรวจประเมินว่าได้มีการระบุตามที่กำหนดไว้หรือไม่ หากไม่ระบุให้ทำความเข้าใจกับหัวหน้าผู้ตรวจประเมินอีกครั้ง เนื่องจากขั้นตอนนี้เป็นการทำงานแบบขยายให้ผู้ตรวจประเมินด้านวิชาการรับผิดชอบในแต่ละคน	สื่อสารหัวหน้าผู้ตรวจประเมินในการจัดทำรายงานการตรวจประเมินต้องเพิ่มการระบุข้อบกพร่องที่รับผิดชอบและประเภทของวัสดุอ้างอิงสำหรับการตรวจประเมินหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง
7.8/NC Accreditation information	ใบรับรองความสามารถของหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิงไม่ได้รับวิธีการที่ใช้ในการกำหนดค่าของวัสดุอ้างอิง	เพิ่มรายละเอียดวิธีการที่ใช้ในการกำหนดค่าของวัสดุอ้างอิงในวิธีการปฏิบัติงาน เรื่อง การจัดทำใบรับรอง	นำเข้าประชุมกับคณะกรรมการรับรองและคณะกรรมการที่ปรึกษา เพื่อให้ข้อคิดเห็นถึงการดำเนินการ	สื่อสารกับห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่หน่วยรับรองในการออกใบรับรองต้องมีการระบุให้ครบถ้วน
7.9/NC Accreditation cycle	โปรแกรมการตรวจประเมินตามวงรอบการรับรองไม่ถูกนำไปประยุกต์ใช้ครบถ้วนตามข้อกำหนด	เพิ่มการลงบันทึกข้อมูลรายการทดสอบที่ถูกรวบรวม ประเมินรายชื่อห้องปฏิบัติการและสถานที่เก็บ	ดำเนินการทุกครั้งที่เมื่อวงรอบของใบรับรองเปลี่ยนแปลง	สื่อสารเจ้าหน้าที่หน่วยรับรองต้องดำเนินการทันทีเมื่อวงรอบของใบรับรองเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะ

ตารางที่ 1 ผลการดำเนินการเพิ่มเติมภายหลังการแก้ไขข้อบกพร่องและข้อแนะนำจากการตรวจประเมินของ APAC ภายใต้อนุสัญญา ISO/IEC 17011:2017 (ต่อ)

ข้อกำหนด/ NC หรือ CM	รายละเอียด	การแก้ไข	การยกระดับกระบวนการ	การสื่อสารให้ผู้เกี่ยวข้อง
		ตัวอย่างที่ถูกรวบรวม ตรวจสอบและตรวจสอบ การต่ออายุในโปรแกรมการ ตรวจประเมิน (WS 07 15 007/02)		ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการ รับรองครั้งแรก
7.11/NC Suspending, with- drawing or reducing accreditation	ไม่พบขั้นตอนการยกเลิก การรับรองการรับรอง	เพิ่มขั้นตอนการยกเลิกการ รับรองการรับรองและคืน สถานะการรับรอง (lifting) ทันทีเมื่อห้องปฏิบัติการ ได้แก้ไขและได้ปฏิบัติตาม นโยบายการรับรองเป็นที่ เรียบร้อยแล้ว	เพิ่มระยะเวลาการระงับ ชั่วคราวให้มีความชัดเจน ยิ่งขึ้น คือ 90 วันต่อครั้ง โดย ต้องไม่เกินวันหมดอายุของ ใบรับรองในวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การระงับการรับรอง	สื่อสารห้องปฏิบัติการและ เจ้าหน้าที่หน่วยรับรองใน การดำเนินการ
8.2/NC Publicly available information	ข้อมูลห้องปฏิบัติการที่ถูก ระงับและถูกเพิกถอนที่ เผยแพร่บนเว็บไซต์ยังขาด รายละเอียด วันที่ และ ข้อบ่งชี้ที่ถูกระงับและ ถูกเพิกถอน	แก้ไขเว็บไซต์โดยเพิ่ม รายละเอียดวันที่ถูกระงับ ประเภทการระงับ ข้อบ่งชี้ ที่ถูกระงับ	ทบทวนขั้นตอนการ ดำเนินงาน พบว่ามีบาง ห้องปฏิบัติการที่ถูกระงับ เฉพาะบางรายการทดสอบ จึงได้กำหนดให้ระบุแสดง หน้าเว็บไซต์เป็น 2 ส่วน ดังนี้ - All scope (ทุกรายการทดสอบ) - Partial scope (บางรายการทดสอบ)	สื่อสารทำความเข้าใจ ร่วมกันระหว่างเจ้าหน้าที่ หน่วยรับรองกรณีมีการ ระงับบางรายการทดสอบ กับทุกรายการทดสอบ เมื่อ วันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2569 ให้ดำเนินการให้เป็นแนวทาง เดียวกันในการเผยแพร่ หน้าเว็บไซต์
8.2/CM Publicly available information	ข้อมูลห้องปฏิบัติการที่ ถูกระงับและเผยแพร่ บนเว็บไซต์ ระบุสถานะ 3 สถานะ คือ ได้รับการ รับรอง ถูกระงับ และอยู่ ระหว่างดำเนินการ ทำให้ เกิดความสับสนว่าข้อมูลใด จะอยู่ในรายชื่อข้อมูล ห้องปฏิบัติการที่ถูกระงับ	ปรับปรุงเว็บไซต์ โดย ยกเลิกสถานะได้รับการ รับรอง และอยู่ระหว่าง ดำเนินการคงเหลือเฉพาะ ถูกระงับ กำหนดให้มีวันที่ และข้อบ่งชี้ที่ถูกระงับ และ จะปรากฏหน้าเว็บไซต์ เป็นเวลา 8 ปี	เนื่องจากมีการประชุม ของ APAC General Assembly เมื่อวันที่ 17 กรกฎาคม พ.ศ. 2567 ให้หน่วยรับรองแต่ละแห่ง ทบทวนการระบุระยะเวลา ที่แสดงหน้าเว็บไซต์กรณี การระงับและเพิกถอนให้ เหมาะสม ไม่ให้กระทบกับ ห้องปฏิบัติการที่ถูกระงับ หรือเพิกถอน จึงปรับจาก 8 ปี เหลือเพียง 6 เดือน	สื่อสารเจ้าหน้าที่หน่วย รับรองในการบันทึกข้อมูล หน้าเว็บไซต์ต้องตรวจสอบ และนำออกตามระยะเวลา ที่กำหนด

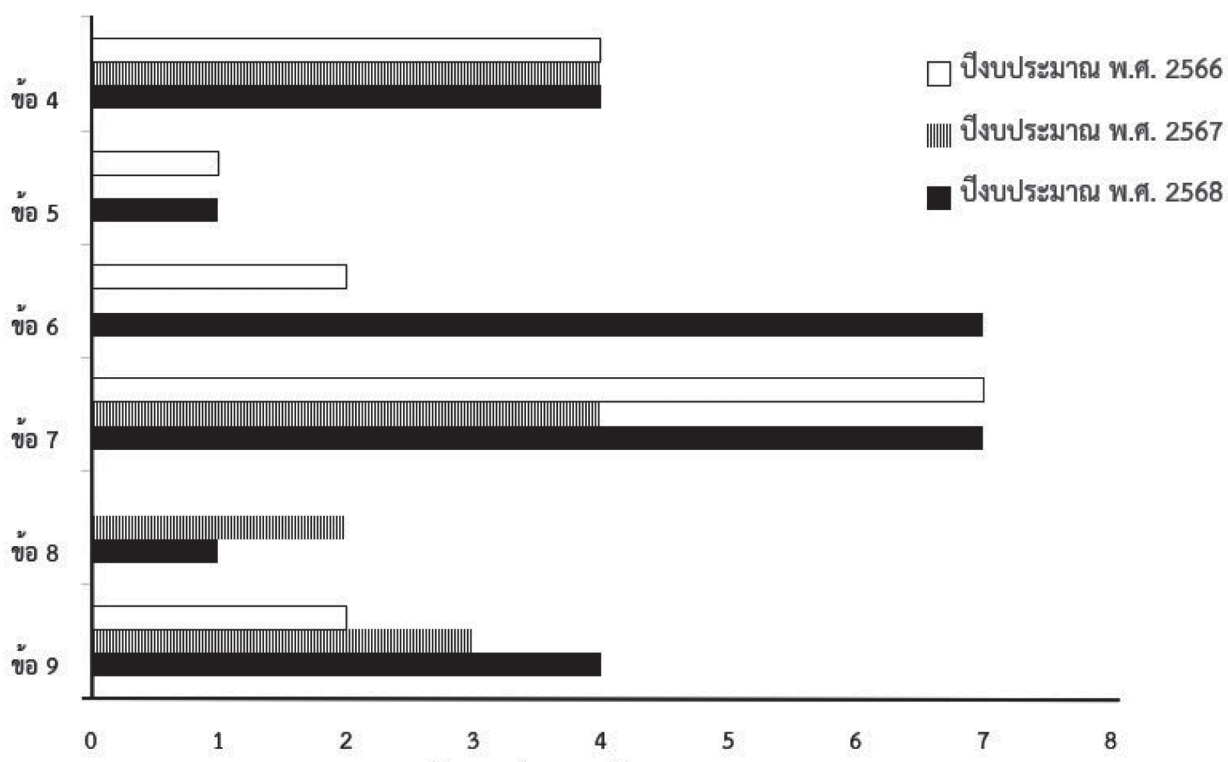
ผลการตรวจประเมินของผู้เชี่ยวชาญจากองค์กร
รับรองระดับนานาชาติพบข้อบกพร่องและข้อแนะนำ
ที่ตรวจพบมากที่สุดอยู่ในข้อกำหนดข้อที่ 7 ด้าน
กระบวนการ (Process requirements) ดังแสดงใน
ตารางที่ 1 โดยจำแนกสิ่งที่ตรวจพบเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1) การดำเนินการที่ยังไม่ครบถ้วน จำนวน 3 ข้อ คือ
ข้อ 7.4 แผนการตรวจประเมินไม่ครอบคลุมกิจกรรมการ
ทดสอบ ข้อ 7.6 รายงานการตรวจประเมินขาดการระบุ
ข้อบ่งชี้ และข้อ 7.8 ใบรับรองไม่ได้อ้างอิงวิธีการในการ
กำหนดค่าของวัสดุอ้างอิง และ 2) สิ่งที่ตรวจพบว่ายังไม่มี

ในกระบวนการรับรอง จำนวน 2 ข้อ คือ ข้อ 7.9 ไม่พบโปรแกรมการตรวจประเมินตามวงรอบการรับรอง และ ข้อ 7.11 ไม่พบขั้นตอนการคืนสถานะการรับรองสำหรับห้องปฏิบัติการที่ถูกระงับการรับรอง ส่วนข้อกำหนดข้อที่ 4 ข้อกำหนดทั่วไป (General requirements) และข้อกำหนดข้อที่ 6 ข้อกำหนดด้านทรัพยากร (Resource requirements) เป็นข้อบกพร่องและข้อแนะนำที่ตรวจพบรองลงมา โดยข้อกำหนดข้อที่ 4 พบประเด็นที่เกี่ยวข้องกับการใช้สัญลักษณ์รับรองและการระบุมาตรฐานที่ได้รับการรับรองในใบรายงานผลการทดสอบ ขณะที่ข้อกำหนดข้อที่ 6 พบเฉพาะข้อแนะนำ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการประเมินสมรรถนะและการระบุความเชี่ยวชาญของผู้ตรวจประเมินในประวัติผู้ตรวจประเมิน

ผลการศึกษาในส่วนที่ 2 เพื่อวิเคราะห์แนวโน้มและเปรียบเทียบข้อบกพร่องและข้อแนะนำจากผลการตรวจติดตามคุณภาพภายในสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการระหว่างปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2568 โดยพบว่าจำนวนข้อบกพร่องและข้อแนะนำตามมาตรฐาน ISO/IEC

17011:2017 มีความแตกต่างกันในแต่ละปี ดังแสดงในภาพที่ 2 ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 พบข้อบกพร่องจำนวน 13 ข้อ และข้อแนะนำ จำนวน 3 ข้อ รวมทั้งสิ้น 16 ข้อ โดยจำแนกตามข้อกำหนด ได้แก่ ข้อกำหนดข้อที่ 4 จำนวน 4 ข้อ ข้อกำหนดข้อที่ 5 จำนวน 1 ข้อ ข้อกำหนดข้อที่ 6 จำนวน 2 ข้อ ข้อกำหนดข้อที่ 7 จำนวน 7 ข้อ และข้อกำหนดข้อที่ 9 จำนวน 2 ข้อ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 พบข้อบกพร่องจำนวน 6 ข้อ และข้อแนะนำ จำนวน 7 ข้อ รวม 13 ข้อ โดยพบในข้อกำหนดข้อที่ 4 จำนวน 4 ข้อ ข้อกำหนดข้อที่ 7 จำนวน 4 ข้อ ข้อกำหนดข้อที่ 8 จำนวน 2 ข้อ และข้อกำหนดข้อที่ 9 จำนวน 3 ข้อ ส่วนปีงบประมาณ พ.ศ. 2568 พบข้อบกพร่อง จำนวน 6 ข้อ และข้อแนะนำจำนวน 18 ข้อ รวม 24 ข้อ โดยจำแนกเป็นข้อกำหนดข้อที่ 4 จำนวน 4 ข้อ ข้อกำหนดข้อที่ 5 จำนวน 1 ข้อ ข้อกำหนดข้อที่ 6 จำนวน 7 ข้อ ข้อกำหนดข้อที่ 7 จำนวน 7 ข้อ ข้อกำหนดข้อที่ 8 จำนวน 1 ข้อ และข้อกำหนดข้อที่ 9 จำนวน 4 ข้อ



ภาพที่ 2 จำนวนข้อบกพร่องและข้อแนะนำที่ตรวจพบจากการตรวจติดตามคุณภาพภายในตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 ในช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2568

จากข้อมูลการตรวจติดตามคุณภาพภายใน ดังแสดงในภาพที่ 2 พบว่าข้อบกพร่องและข้อแนะนำที่ตรวจพบมากที่สุดและต่อเนื่องในช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2568 อยู่ในข้อกำหนดข้อที่ 7 ด้านกระบวนการ (Process requirements) เมื่อจำแนกตามข้อกำหนดย่อยของข้อ 7 พบว่าปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 ตรวจพบข้อกำหนดย่อยข้อ 7.4 จำนวน 3 ข้อ ข้อ 7.6 จำนวน 2 ข้อ ข้อ 7.7 จำนวน 1 ข้อ และข้อ 7.11 จำนวน 1 ข้อ รวม 7 ข้อ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 ตรวจพบข้อกำหนดย่อยข้อ 7.2 จำนวน 1 ข้อ ข้อ 7.6 จำนวน 2 ข้อ และข้อ 7.9 จำนวน 1 ข้อ รวม 4 ข้อ และปีงบประมาณ พ.ศ. 2568 ตรวจพบข้อกำหนดย่อย

ข้อ 7.2 จำนวน 1 ข้อ ข้อ 7.4 จำนวน 3 ข้อ ข้อ 7.5 จำนวน 1 ข้อ ข้อ 7.6 จำนวน 1 ข้อ และข้อ 7.9 จำนวน 1 ข้อ รวม 7 ข้อ ข้อกำหนดย่อยที่ตรวจพบอย่างต่อเนื่องตลอด 3 ปี คือ ข้อ 7.6 การตรวจประเมิน ซึ่งเกี่ยวข้องกับผู้ตรวจประเมินและหน่วยรับรองที่ต้องดำเนินการให้สอดคล้องร่วมกันภายใต้ข้อกำหนดมาตรฐาน ISO/IEC 17011 นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจประเมินโดย APAC พบว่าข้อกำหนดข้อที่ 7 ด้านกระบวนการเป็นข้อที่ตรวจพบมากที่สุดเช่นเดียวกัน พบข้อกำหนดย่อยจำนวน 5 ข้อ ได้แก่ ข้อ 7.4, 7.6, 7.8, 7.9 และข้อ 7.11 รายละเอียดผลการเปรียบเทียบ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนข้อบกพร่องและข้อแนะนำข้อที่ 7 ด้านกระบวนการ (Process requirements) จากผลการตรวจประเมินของ APAC ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 และผลการตรวจติดตามคุณภาพภายในตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 ในช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2568

ข้อ	ISO/IEC 17011:2017 ข้อ 7 ข้อกำหนดด้านกระบวนการ	จำนวนข้อบกพร่องและข้อแนะนำ (ข้อ)			
		การตรวจประเมิน APAC		การตรวจติดตามคุณภาพภายใน	
		ปี พ.ศ.	ปี พ.ศ.	ปี พ.ศ.	ปี พ.ศ.
		2565	2566	2567	2568
7.1	ข้อกำหนดการตรวจสอบรับรอง	–	–	–	–
7.2	การสมัครขอการรับรอง	–	–	1	1
7.3	การทบทวนทรัพยากร	–	–	–	–
7.4	การเตรียมการก่อนการตรวจประเมิน	1	3	–	3
7.5	การทบทวนข้อมูลเอกสาร	–	–	–	1
7.6	การตรวจประเมิน	1	2	2	1
7.7	การตัดสินผลการรับรอง	–	1	–	–
7.8	ข้อมูลการรับรอง	1	–	–	–
7.9	วงรอบการรับรอง	1	–	1	1
7.10	การขยายขอบข่ายการรับรอง	–	–	–	–
7.11	การระงับชั่วคราว การเพิกถอน การลดขอบข่าย	1	1	–	–
7.12	การร้องเรียน	–	–	–	–
7.13	การอุทธรณ์	–	–	–	–
7.14	บันทึกของหน่วยงานที่ขอการรับรอง	–	–	–	–
รวมทั้งหมด		5	7	4	7

การวิเคราะห์ผลการตรวจประเมินของ APAC ร่วมกับผลการตรวจติดตามคุณภาพภายในของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ พบว่ามีข้อบกพร่องและ

ข้อแนะนำที่เป็นประเด็นเดียวกัน จำนวน 4 ข้อกำหนด ได้แก่ ข้อกำหนด 7.4, 7.6, 7.9 และ 7.11 ข้อกำหนดทั้ง 4 ข้อดังกล่าว ถูกนำมาวิเคราะห์ความสอดคล้องกับ

ข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 ซึ่งรายละเอียดผลการวิเคราะห์และการเปรียบเทียบ ดังนี้

ข้อกำหนด 7.4 เป็นข้อกำหนดด้านการเตรียมการก่อนการตรวจประเมิน (Preparation for assessment) ของหน่วยรับรอง ประกอบด้วย ข้อกำหนดย่อย จำนวน 9 ข้อ ได้แก่ ข้อ 7.4.1–7.4.9 ครอบคลุมขั้นตอนการดำเนินงานตั้งแต่การเตรียมทีมผู้ตรวจประเมิน การเตรียมความพร้อมด้านเอกสารและแผนการตรวจประเมิน แนวทางการปรับปรุงการดำเนินงานตามข้อกำหนด 7.4 มุ่งเน้นบทบาทของหน่วยรับรองในการจัดอบรมฟื้นฟูความรู้ให้แก่เจ้าหน้าที่หน่วยรับรองด้านการทวนสอบเอกสารข้อกำหนด โดยเฉพาะขั้นตอนการคัดเลือกทีมผู้ตรวจประเมิน ซึ่งเป็นกลไกสำคัญและทำหน้าที่เป็นผู้แทนของหน่วยรับรองในการดำเนินการตลอดกระบวนการตรวจประเมิน การดำเนินงานของหน่วยรับรองที่เกี่ยวข้องกับข้อกำหนด 7.4 อยู่ภายใต้เอกสารระบบงาน ได้แก่ SOP 07 15 001: SOP for laboratory accreditation, SOP 07 15 003: SOP for appointment of assessors, SOP 07 15 008: SOP for selection, development and training of assessors และ G 07 15 001: Guidelines for laboratory assessment

ข้อกำหนด 7.6 เป็นข้อกำหนดด้านการตรวจประเมิน (Assessment) ประกอบด้วย ข้อกำหนดย่อยจำนวน 9 ข้อ ได้แก่ ข้อ 7.6.1–7.6.9 ครอบคลุมกระบวนการตรวจประเมินตั้งแต่การดำเนินการตรวจประเมินในสถานที่จนถึงการรายงานผลและการติดตามการแก้ไขข้อบกพร่อง แนวทางการปรับปรุงการดำเนินงานตามข้อกำหนด 7.6 มุ่งเน้นปรับปรุงการดำเนินการควบคู่กันทั้งในระดับผู้ตรวจประเมินและหน่วยรับรอง โดยผู้ตรวจประเมินควรได้รับการฟื้นฟูความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับแนวทางการปฏิบัติในการตรวจประเมินอย่างสม่ำเสมอ ขณะที่หน่วยรับรองควรเพิ่มความเข้มข้นของมาตรการการกำกับติดตาม เช่น การสุ่มตรวจ เพื่อให้มั่นใจว่าการปฏิบัติงานเป็นไปตามวิธีการที่กำหนด มีการจัดเก็บหลักฐานได้ครบถ้วน และเพียงพอต่อการสอบกลับ การดำเนินงานของหน่วยรับรองที่เกี่ยวข้องกับข้อกำหนด 7.6 อยู่ภายใต้

เอกสารระบบงาน ได้แก่ SOP 07 15 001: SOP for laboratory accreditation, G 07 15 001: Guidelines for laboratory assessment และ G 07 15 015: Guidelines for laboratory accreditation process, reference material producers, and biobanking

ข้อกำหนด 7.9 เน้นที่หน่วยรับรองเป็นหลัก เป็นข้อกำหนดด้านวงรอบการรับรอง (Accreditation cycle) ครอบคลุมการวางแผนและบริหารจัดการการตรวจประเมินให้มีการต่ออายุตามวงรอบของใบรับรอง ประกอบด้วย ข้อกำหนดย่อย จำนวน 5 ข้อ ได้แก่ ข้อ 7.9.1–7.9.5 แนวทางการปรับปรุงการดำเนินงานตามข้อกำหนด 7.9 มุ่งเน้นการวางแผนให้การต่ออายุเป็นไปอย่างทันเวลา โดยกำหนดเป็นตัวชี้วัดในกำกับ ติดตาม ให้ห้องปฏิบัติการได้รับการต่ออายุการรับรองก่อนใบรับรองหมดอายุไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 การดำเนินงานของหน่วยรับรองที่เกี่ยวข้องกับข้อกำหนด 7.9 อยู่ภายใต้เอกสารระบบงาน ได้แก่ R 07 15 001: Policies, requirements and conditions for a medical and health laboratory accreditation, SOP 07 15 007: SOP for surveillance and reassessment of accredited CAB, SOP 07 15 020: SOP for medical laboratory sampling of sample collection sites and scope of testing, G 07 15 015: Guidelines for laboratory accreditation process, reference material producers, and biobanking, G 07 15 047: Guideline for selection of accreditation scope for laboratory competence assessment และ N 07 15 031: Supplement requirements for remote assessment

ข้อกำหนด 7.11 เป็นข้อกำหนดที่เกี่ยวข้องกับการระงับ การเพิกถอน หรือการลดขอบข่ายการรับรอง (Suspending, withdrawing or reducing accreditation) ซึ่งกำหนดบทบาทและความรับผิดชอบของหน่วยรับรองในการบริหารจัดการสถานะการรับรองของผู้รับบริการ ประกอบด้วย ข้อกำหนดย่อย จำนวน 3 ข้อ ได้แก่ ข้อ 7.11.1–7.11.3 แนวทางการปรับปรุงการดำเนินงานตามข้อกำหนด 7.11 มุ่งเน้นการกำกับ

ดูแลการปฏิบัติตามข้อกำหนดและเงื่อนไขของผู้รับบริการ โดยเฉพาะประเด็นการนำตราสัญลักษณ์การรับรองไปใช้อ้างอิงในใบรายงานผลการทดสอบ ซึ่งต้องอยู่ภายในขอบข่ายที่ได้รับการรับรองเท่านั้น แนวทางพัฒนารวมถึงการบังคับใช้มาตรการตามขั้นตอนในกรณีพบการกระทำผิด นอกจากนี้ การพัฒนาระบบ e-Accreditation เพื่อสนับสนุนการติดตามสถานะและการตัดสินใจในการระงับหรือการเพิกถอนการรับรอง การดำเนินงานของหน่วยรับรองที่เกี่ยวข้องกับข้อกำหนด 7.11 อยู่ภายใต้เอกสารระบบงาน ได้แก่ R 07 15 001: Policies, requirements and conditions for a medical and health laboratory accreditation และ SOP 07 15 005: SOP for suspending, withdrawal or reducing accreditation

วิจารณ์

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในฐานะหน่วยรับรองระดับประเทศ ที่เป็นสมาชิกและลงนามความร่วมมือกับ APAC และ ILAC ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545⁽⁵⁾ ซึ่งต้องผ่านกระบวนการตรวจประเมินเพื่อต่ออายุทุก 4 ปี เพื่อธำรงรักษาระบบคุณภาพผลการตรวจประเมินจาก APAC สะท้อนให้เห็นถึงความสำคัญในรายละเอียดของกระบวนการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 ที่มีการเปลี่ยนแปลงจากฉบับปี 2004 โดยเฉพาะใน 3 ประเด็นหลัก ได้แก่ ความเป็นกลาง การปฏิบัติการจัดการความเสี่ยงและโอกาส และการทบทวนความเหมาะสมของรูปแบบการตรวจสอบและรับรอง ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยซึ่งระบุว่าข้อบกพร่องส่วนหนึ่งเกิดจากข้อกำหนดใหม่ที่ไม่ปรากฏในมาตรฐานฉบับก่อนหน้า⁽¹⁴⁾ แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนผ่านของมาตรฐาน ISO/IEC 17011 ไม่เพียงเป็นการปรับปรุงเชิงเอกสาร แต่ส่งผลโดยตรงต่อสมรรถนะของระบบและบุคลากร จำเป็นต้องได้รับการพัฒนาอย่างเป็นระบบและต่อเนื่องเพื่อคงสถานะการยอมรับร่วมในระดับสากล

ผลการวิจัยในส่วนที่ 1 พบว่า NC และ CM จากการตรวจประเมินของ APAC ในปี พ.ศ. 2565 ได้รับ

การแก้ไขจนผ่านการต่ออายุการรับรองแล้ว อย่างไรก็ตาม การพัฒนาระบบการดำเนินงานให้มีความต่อเนื่องและยั่งยืนจะช่วยลดโอกาสการพบ NC เดิมซ้ำ และป้องกันไม่ให้ CM ถูกยกระดับเป็น NC ในการตรวจประเมินครั้งถัดไป โดยรายงานการแก้ไขจะถูกส่งไปยังประเทศสมาชิก APAC ประกอบด้วย สมาชิก Full members จำนวน 63 ประเทศ และ Economies จำนวน 33 ประเทศ⁽¹⁵⁾ ใช้ประกอบการลงคะแนนต่ออายุการรับรอง NC และ CM จึงมีผลกระทบต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดย NC สะท้อนถึงความไม่สอดคล้องที่ส่งผลกระทบต่อระบบที่มีผลกระทบต่อความน่าเชื่อถือของหน่วยรับรอง ในขณะที่ CM เป็นความเสี่ยงที่จะพัฒนาเป็นปัญหาในอนาคตหากไม่มีมาตรการป้องกันที่เหมาะสม ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าหน่วยรับรองต้องมีการทวนสอบและติดตาม CM อย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะข้อกำหนด 6.1 และ 8.2 โดยข้อกำหนด 6.1 ด้านความสามารถของบุคลากรมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากบุคลากรที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมการรับรองระบบงาน ได้แก่ ผู้ตรวจประเมิน เจ้าหน้าที่ของหน่วยรับรองระบบงาน คณะกรรมการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ และผู้ทบทวนรายงานการตรวจประเมิน ต้องมีความรู้และทักษะที่เหมาะสมได้แก่ 1) ความรู้ด้านการรับรองระบบงานตาม ISO/IEC 17011:2017 รวมถึงข้อกำหนดของ ILAC และ APAC ซึ่งถูกถอดสู่การปฏิบัติในรูปแบบข้อกำหนด (Requirement: R) เงื่อนไข (Notification: N) ระเบียบปฏิบัติงาน (Standard Operating Procedure: SOP) และแนวทางปฏิบัติ (Guideline: G) 2) ความรู้มาตรฐานที่ใช้ประเมินห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ISO/IEC 17025, ISO 15189, ISO 17034 และ ISO 20387 3) ความรู้ทางเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับขอบข่ายการรับรอง เช่น เคมี จุลชีววิทยา เคมีคลินิก จุลทรรศนศาสตร์คลินิก และ 4) ทักษะการตรวจประเมิน เช่น การสัมภาษณ์ ตั้งคำถาม การสังเกตและการรวบรวมหลักฐาน การประเมินหลักฐานอย่างเป็นกลาง เพื่อให้กระบวนการให้การรับรองมีความถูกต้องและเป็นธรรม ข้อกำหนด 8.2 เน้นเรื่องการเผยแพร่ข้อมูลสู่สาธารณะ สะท้อนบทบาทของหน่วยรับรองระบบงานในด้านความโปร่งใส โดยแสดงข้อมูลสถานะของห้องปฏิบัติการบนหน้าเว็บไซต์ให้เป็น

ปัจจุบันแบบ Real time เพื่อให้ผู้รับบริการเข้าถึงข้อมูลได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง โดยสถานะของห้องปฏิบัติการแบ่งเป็น 3 ประเภท คือ 1) Accredited คือ ได้รับการรับรอง 2) Temporary suspension คือ ระบุชั่วคราวและไม่สามารถใช้ตราสัญลักษณ์รับรองในใบรายงานผลการทดสอบได้ และ 3) Withdraw คือ เพิกถอนการรับรอง โดยการแยกข้อมูลดังกล่าวออกมาในหน้าเฉพาะ เป็นเวลา 6 เดือน ดังนั้นการบริหารจัดการข้อมูลสาธารณะอย่างเป็นระบบเป็นกลไกสำคัญในการเสริมสร้างความเชื่อมั่นและความรับผิดชอบต่อสาธารณะ ผลการวิจัยส่วนที่ 2 พบว่าข้อบกพร่องและข้อแนะนำจากการตรวจติดตามคุณภาพภายในที่พบมากที่สุดและต่อเนื่องทั้ง 3 ปี คือ ข้อกำหนดข้อ 7.6 เรื่องการตรวจประเมิน รองลงมา คือ ข้อกำหนดข้อ 4 ข้อกำหนดทั่วไป (General requirements) และ ข้อกำหนดข้อที่ 9 ด้านระบบการบริหาร (Management system requirements) โดยในข้อกำหนดข้อ 4 พบประเด็นหลักที่ข้อ 4.4 และ 4.6 โดยข้อกำหนด 4.4 เน้นเรื่องความเป็นกลางของหน่วยรับรองทั้งด้านนโยบายและการบริหารจัดการความเสี่ยง ส่วนข้อกำหนด 4.6 เกี่ยวข้องกับการกำหนดรูปแบบและการทบทวนความเหมาะสมของโปรแกรมการรับรอง ส่วนข้อกำหนดข้อ 9 ที่พบ คือ ข้อ 9.3 เรื่องการควบคุมเอกสาร โดยข้อบกพร่องส่วนใหญ่ คือ เอกสารไม่ครบถ้วน ขาดรายละเอียดที่สำคัญ และไม่เป็นปัจจุบัน ดังนั้นการทบทวนเอกสารกับมาตรฐานหรือข้อกำหนดที่องค์กรรับรองสากลกำหนดไว้อย่างสม่ำเสมอจะช่วยลดข้อบกพร่องและเพิ่มประสิทธิภาพของระบบบริหารได้

ข้อบกพร่องและข้อแนะนำที่พบซ้ำระหว่างการตรวจประเมินจาก APAC และการตรวจติดตามคุณภาพภายในในข้อกำหนด 4 ข้อ (7.4, 7.6, 7.9 และ 7.11) สะท้อนให้เห็นที่เป็นจุดอ่อนร่วมกันของระบบการรับรอง ดังนั้นเพื่อให้การวิเคราะห์มีความครบถ้วนจึงได้ขยายการวิเคราะห์ไปยังข้อกำหนดย่อยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ข้อ 7.8, 7.2, 7.5 และ 7.7 โดยข้อ 7.8 เรื่อง ข้อมูลการรับรอง แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการจัดทำเอกสารการรับรองให้มีความถูกต้องและครบถ้วน ข้อ 7.2 เรื่อง การสมัครยื่นขอการรับรอง โดย

เน้นย้ำถึงความจำเป็นในการสื่อสารที่ชัดเจนระหว่างหน่วยรับรองและผู้รับบริการ โดยเฉพาะการให้ข้อมูลที่ถูกต้องที่นำไปสู่การยุติกระบวนการยื่นขอการรับรอง ข้อ 7.5 เรื่อง การตรวจสอบเอกสาร แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของผู้ตรวจประเมินในการเตรียมความพร้อม โดยการศึกษาเอกสารของห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรองก่อนการตรวจประเมิน โดยเฉพาะการตรวจสอบความครบถ้วนของเอกสารและหลักฐานที่เกี่ยวข้อง และข้อสุดท้าย ข้อ 7.7 เรื่อง การพิจารณาตัดสินในการให้การรับรอง สะท้อนถึงความจำเป็นของหน่วยรับรองในการจัดทำรายงานที่มีข้อมูลครบถ้วนและชัดเจน นำเสนอต่อคณะกรรมการรับรองความสามารถ ห้องปฏิบัติการในการพิจารณาตัดสินการให้การรับรอง ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ข้อกำหนดย่อยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องชี้ให้เห็นว่าระบบการรับรองยังมีจุดที่บกพร่องในหลายมิติ เช่น การปรับปรุงระบบการรับรองควรครอบคลุมทั้งด้านการจัดทำเอกสาร การสื่อสารระหว่างหน่วยรับรองและผู้รับบริการ การตรวจสอบความถูกต้องและครบถ้วนของเอกสาร ไปจนถึงความครบถ้วนของรายงานเพื่อการตัดสินใจให้การรับรอง สะท้อนให้เห็นความจำเป็นในการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการรับรองที่มีความชัดเจนเป็นระบบในทุกขั้นตอนที่สร้างความน่าเชื่อถือและความโปร่งใสของระบบการรับรองห้องปฏิบัติการ

ทั้งนี้ผลการตรวจประเมินจาก APAC และการตรวจติดตามคุณภาพภายในมีความแตกต่างกันตามวัตถุประสงค์และบทบาทผู้ตรวจประเมิน โดยผู้ตรวจประเมินจาก APAC เป็นผู้ประเมินภายนอกระดับสากล (third party) หรือ Peer evaluators ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญจากหน่วยรับรองอื่นๆ ในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกที่ได้รับมอบหมายจาก APAC⁽⁷⁾ มีหน้าที่ตรวจประเมินตามข้อตกลงการยอมรับร่วม (MRA-Mutual Recognition Arrangement) เพื่อยืนยันว่าหน่วยรับรองได้มีการดำเนินการตามมาตรฐานสากล ผลการประเมินมีผลต่อการยอมรับในระดับนานาชาติ สำหรับการตรวจติดตามคุณภาพภายในเป็นการประเมินโดยบุคลากรภายในของหน่วยงานเอง (first party) ที่มีความเข้าใจบริบทขององค์กร มุ่งเน้นการตรวจเพื่อการปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง (continuous improvement) และเตรียมความพร้อม

ก่อนการตรวจจากภายนอก ดังนั้นผลลัพธ์การประเมินจาก APAC จะเน้นการควบคุมมาตรฐานระดับสากล ส่วนการตรวจติดตามคุณภาพภายในเน้นการพัฒนาและรักษาคุณภาพของระบบงานภายในเพื่อสร้างความมั่นใจว่าหน่วยรับรองยังคงรักษามาตรฐานได้อย่างมีคุณภาพ

สรุป

การยกระดับและธำรงรักษาระบบงานของหน่วยรับรองระบบงานของประเทศต้องอาศัยกลไกที่ครอบคลุมทั้งการตรวจติดตามคุณภาพภายใน และการตรวจประเมินโดยบุคคลที่สาม ป้องกันการเกิดซ้ำของข้อบกพร่องนั้นได้อย่างยั่งยืน อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ากลไกดังกล่าวยังไม่เพียงพอที่จะลดช่องว่างที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของข้อกำหนดมาตรฐานจาก ISO/IEC 17011:2004 สู่ ISO/IEC 17011:2017 ดังนั้นการนำเรื่องการปรับปรุงอย่างต่อเนื่องมาใช้ในการพัฒนาระบบจึงมีความจำเป็น โดยเริ่มจากการพัฒนาความสามารถของบุคลากร การเพิ่มพูนสมรรถนะของผู้ตรวจประเมินทั้งภายในและภายนอกของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ การพัฒนากระบวนการทำงานด้วยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี เช่น ปัญญาประดิษฐ์และหรือปรับปรุงระบบ e-Accreditation ควบคู่กับการใช้แนวคิด Lean management เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ลดระยะเวลา และยกระดับความทันสมัยของกระบวนการรับรอง นอกจากนี้การขยายขอบข่ายการรับรองให้ครอบคลุมมาตรฐานใหม่ เช่น มาตรฐาน ISO 20387 สำหรับ biobanking เป็นส่วนหนึ่งของการยกระดับสู่มาตรฐานสากล รวมถึงการสื่อสารเชิงรุกแก่ห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรอง มีบทบาทสำคัญในการลดความคลาดเคลื่อนในการตีความข้อกำหนด ทั้งนี้การศึกษาครั้งต่อไปควรให้ความสำคัญกับการวิเคราะห์ผลการประชุมทบทวนระบบบริหาร (Management Review) เพื่อประเมินความเหมาะสมและประสิทธิผลของการดำเนินงานตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 และสนับสนุนการพัฒนาของหน่วยรับรองระบบงานของประเทศให้บรรลุเป้าหมายอย่างยั่งยืนต่อไป

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

บทความฉบับนี้มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ ChatGPT (OpenAI, USA) ตรวจสอบคำผิดและแก้ไขไวยากรณ์ภาษาอังกฤษเพื่อปรับปรุงต้นฉบับบทความที่ผู้นิพนธ์ได้นิพนธ์ขึ้นแล้วให้มีความถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับการสนับสนุนข้อมูลรายงานผลการตรวจประเมินของ Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC) ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 และรายงานการตรวจติดตามภายในระหว่างปีงบประมาณ พ.ศ. 2566–2568 ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการวิเคราะห์และดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน และผู้เกี่ยวข้องในกระบวนการรับรองทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ อำนวยความสะดวก และให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินการศึกษาจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. วิสัยทัศน์ และนโยบาย. [ออนไลน์]. 2569; [สืบค้น 22 ม.ค. 2569]; เข้าถึงได้จาก: URL: <https://www.dmsc.moph.go.th/th/detailAll/579/dcio/107>.
2. กองแผนงานและวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แผนกลยุทธ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2566–2570. [ออนไลน์]. 2569; [สืบค้น 22 ม.ค. 2569]; [104 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: https://www.dmsc.moph.go.th/ckeditor/upload/files/id1/forweb_แผนกลยุทธ์กรมวิทยาศาสตร์ก.pdf.
3. พระราชบัญญัติการมาตรฐานแห่งชาติ พ.ศ. 2551. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนที่ 42 ก (วันที่ 4 มีนาคม 2551). หน้า 43.
4. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ. ลักษณะสำคัญขององค์การของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2568. [ออนไลน์]. 2569; [สืบค้น

- 22 ม.ค. 2569]; [51 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://blqs.dmhc.moph.go.th/th/download/3343/lar/2048>.
5. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. รายงานประจำปี 2558 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ. [ออนไลน์]. 2558; [สืบค้น 22 ม.ค. 2569]; [69 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://blqs.dmhc.moph.go.th/th/download/3219/yar/1930>.
 6. ISO/IEC 17011:2017. Conformity assessment—requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies. 2nd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
 7. Asia Pacific Accreditation Cooperation. APAC MRA-001 procedures for establishing maintaining mutual recognition Ver 1.3 (20190707). [online]. 2019; [cited 2026 Jan 22]; [44 screens]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/publications/mra-series/apac-mra-001-procedures-for-establishing-maintaining-mutual-recognition-ver-1-3-20190707>.
 8. Asia Pacific Accreditation Cooperation. APAC-FMRA-001-Endorsed-normative-documents-Ver-1.0. [online]. 2019; [cited 2026 Jan 22]; [14 screens]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/publications/mra-series/apac-fmra-001-endorsed-normative-documents-ver-1-0-2>.
 9. ดำรงค์ดี จันททัย, ถุณณ รักชาติเจริญ. แผนชาติสู่มาตรฐานคุณภาพแห่งชาติในประเทศกำลังพัฒนา: บทเรียนการวิเคราะห์ข้อมูลสู่พื้นฐานการปฏิบัติ. ว นิตยสาร รัฐศาสตร์ และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ 2564; 5(2): 1-20.
 10. สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ. สมุดปกขาวโครงสร้างพื้นฐานทางคุณภาพของประเทศ. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 22 ม.ค. 2569]; [42 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://mx.nimt.or.th/?p=6199>.
 11. International Laboratory Accreditation Cooperation. About ILAC. [online]. 2026; [cited 2026 Jan 22]; Available from: URL: <https://ilac.org/about-ilac>.
 12. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. การรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล. [ออนไลน์]. 2569; [สืบค้น 3 ม.ค. 2569]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://blqs.dmhc.moph.go.th/th/detailAll/3206/nwp/229>.
 13. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. รายงานประจำปี 2565 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ. [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 4 ม.ค. 2569]; [79 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://blqs.dmhc.moph.go.th/th/download/3226/yar/1937>.
 14. สิตไพสิฐ เอกะจัมปะกะ, ปิยะวรรณ ชัยณรงค์เกื้อกุล. การพัฒนาระบบบริหารคุณภาพหน่วยรับรองระบบงานสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017. ว กรมวิทย์ พ 2567; 66(2): 299-316.
 15. Asia Pacific Accreditation Cooperation. Members. [online]. 2026; [cited 2026 Jan 22]; Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/membership>.

Analysis of Non-conformities and Guidelines for Accreditation System Development of the Bureau of Laboratory Quality Standards Comply with ISO/IEC 17011:2017

Saovanee Aromsook¹, Thanawat Sridapan², and Siriphan Saeng-aroon³

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

²*17/10 Bang Khun Non Soi 5 Road, Bang Khun Non Sub-District, Bangkok Noi District, Bangkok 10700, Thailand*

³*Bureau of Expert Advisory Panels, Department of Medical Sciences, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

ABSTRACT Laboratory accreditation is vital for strengthening national quality infrastructure and enhancing the international credibility of testing results. The Bureau of Laboratory Quality Standards (BLQS), Department of Medical Sciences (DMSc), serves as the National Accreditation Body (AB) in accordance with ISO/IEC 17011:2017 and is a signatory to the Mutual Recognition Arrangements (MRA) of the Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC) and the International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC), requiring peer evaluation every four years to maintain its signatory status. This study aimed to analyze corrective and improvement approaches addressing nonconformities identified during the APAC peer evaluation alongside internal quality audit findings from fiscal years 2023–2025 to develop preventive strategies against recurrent nonconformities. Data were collected and analyzed from APAC evaluation and internal quality audit reports and categorized by ISO/IEC 17011:2017 requirements. The results showed that the APAC evaluation identified eight nonconformities and four recommendations, with clause 7 (process requirements) being the most frequently cited for both nonconformities and recommendations. This finding was consistent with the internal quality audit results for fiscal years 2023–2025, which revealed recurring nonconformities in the same clause over a three-year period. Furthermore, combined analysis of the APAC evaluation and internal quality audit findings identified four common areas of concern within clauses 7.4, 7.6, 7.9, and 7.11. These findings highlight areas within ISO/IEC 17011:2017 that require continuous and systematic improvement to enhance the management system's effectiveness of the accreditation body, ensure sustained compliance with international standards, and strengthen preparedness for future peer evaluations.

Keywords: Bureau of Laboratory Quality Standards (BLQS), Accreditation Body (AB), Non-conformity analysis, ISO/IEC 17011:2017

การวิเคราะห์การตรวจพบเชื้อไวรัสอาร์เอสวีจากตัวอย่างส่งตรวจในโรงพยาบาลรามาริบัติ ประเทศไทย: การศึกษาย้อนหลังช่วงปี พ.ศ. 2555-2565

กิงกาญจน์ รัชมณี¹ ตรวิวัฒน์ วัฒนโชคชัย¹ มนัสนันท์ บุญญานวัตร² สิริพิชญา พลายแก้ว² ประพันธ์ สุขสุดะ³ วอทันญ นครศรี⁴ วุฒิพงษ์ ใจหาญ⁵ ละออ ชัยลือกิจ⁶ และ พิเชฐ ยุทธนาการวิกรม¹

¹ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

³ห้องปฏิบัติการคลินิกเทคนิคการแพทย์ บริษัท แล็บเฮาส์ (ชลบุรี) จำกัด ชลบุรี 20000

⁴ธนาคารทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ปทุมธานี 12120

⁵ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี 12120

⁶ภาควิชาอายุรศาสตร์โรคต่อมไร้ท่อและเมแทบอลิซึม คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

บทคัดย่อ ไวรัสอาร์เอสวี (Respiratory Syncytial Virus; RSV) เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจในเด็กและผู้สูงอายุ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ของปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรค โดยทำการศึกษาข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ ระหว่าง 1 มกราคม พ.ศ. 2555 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2565 จำนวน 43,230 ราย มีผู้ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีจำนวน 3,273 ราย (7.57%) พบความชุกสูงในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึง กันยายน โดยเฉพาะเดือนสิงหาคมพบความชุกสูงสุด การติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีพบได้ทุกกลุ่มอายุ โดยเฉพาะในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 6 ปี และผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 60 ปี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ใหญ่ที่มีอายุ 18-60 ปี พบว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [(newborn: p -value = 0.022, OR = 2.69, 95% CI = 1.15-6.29), (infant: p -value < 0.001, OR = 4.59, 95% CI = 3.76-5.60), (toddler: p -value < 0.001, OR = 5.07, 95% CI = 4.19-6.14), (preschooler: p -value < 0.001, OR = 2.72, 95% CI = 2.18-3.42) และ (elderly p -value = 0.004, OR = 1.37, 95% CI = 1.10-1.69)] อัตราการตรวจพบเชื้อไวรัสอาร์เอสวีในช่วงก่อนการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 สูงกว่าช่วงหลังการระบาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.001, OR = 1.78, 95% CI = 1.43-2.21) จากข้อมูลการศึกษานี้สามารถนำมาใช้ในการเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์เพื่อรองรับการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสอาร์เอสวีที่อาจเกิดขึ้นในอนาคต

คำสำคัญ: การศึกษาข้อมูลย้อนหลัง, ไวรัสอาร์เอสวี, โรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ, โรงพยาบาลรามาริบัติ

Corresponding author E-mail: laor.cha@mahidol.ac.th

Received: 2 September 2025

Revised: 2 April 2026

Accepted: 10 April 2026

บทนำ

ไวรัสอาร์เอสวี (Respiratory Syncytial Virus; RSV) เป็นไวรัสชนิดหนึ่งที่มีพบว่าการติดเชื้อในทุกช่วงอายุ โดยเฉพาะในเด็กทารกที่อายุน้อยมีอัตราการเกิดโรคพบได้บ่อยที่สุดในเด็กทั่วโลก⁽¹⁾ และเป็นเชื้อโรคที่สำคัญที่พบในผู้สูงอายุก่อให้เกิดการติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนบน upper respiratory tract infections (URTI) และโรคหลอดลมอักเสบ (bronchiolitis) ในเด็กเล็ก นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง lower respiratory tract infections (LRTI) อาจนำไปสู่ภาวะปอดบวม หลอดลมอักเสบ^(2,3) ระบบหายใจล้มเหลว หดหายใจขณะหลับ และเสียชีวิตได้⁽²⁾ จากรายงานการศึกษาการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีพบว่าในผู้ป่วยเพศชายและทารกที่มีอายุต่ำกว่า 5 เดือนมีการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีมากที่สุด⁽⁴⁾ มีรายงานการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีในเด็กทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่มีรายได้ต่ำและปานกลาง (low-income and middle-income countries (LMICs) ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบมากที่สุด การประมาณการณ์ในปี พ.ศ. 2562 พบว่าการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี ซึ่งก่อให้เกิดการติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนล่างแบบเฉียบพลันประมาณ 33 ล้านรายทั่วโลก ในจำนวนนี้มีผู้เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลประมาณ 3.6 ล้านราย และมีผู้เสียชีวิตถึง 84,500-125,200 ราย⁽⁵⁾ รายงานการศึกษาในประเทศไทยพบว่าการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลที่เกี่ยวข้องกับไวรัสระบบทางเดินหายใจในเด็กหลังจากมีการลดมาตรการที่เกี่ยวข้องกับ coronavirus disease 2019 (COVID-19) เช่น การป้องกันส่วนบุคคล ล้างมือ การเว้นระยะห่างทางกายภาพ และมาตรการที่เกี่ยวข้องกับการเดินทาง ส่งผลให้มีการรักษาพยาบาลที่เกี่ยวข้องกับไวรัสอาร์เอสวีในเด็กอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ปี เพิ่มขึ้น⁽⁶⁾ และในหลายประเทศประสบปัญหาการกลับมาของเชื้อไวรัสอาร์เอสวีนอกฤดูกาลเพิ่มขึ้นด้วย⁽⁷⁾

แม้ในช่วงปี พ.ศ. 2563-2564 การระบาดของไวรัสอาร์เอสวีจะลดลงเป็นอย่างมาก ซึ่งเป็นผลมาจากมาตรการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

อย่างไรก็ตามการลดลงดังกล่าวอาจส่งผลให้เด็กเล็กจำนวนหนึ่งไม่ได้รับภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติจากการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีตามปกติ จึงทำให้เด็กกลุ่มนี้มีความเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีที่เพิ่มขึ้น เมื่อมีการผ่อนคลายมาตรการควบคุมโรคอาจนำไปสู่การระบาดของไวรัสที่เพิ่มขึ้นหรือเกิดการระบาดนอกฤดูกาลได้⁽⁸⁾ อุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง พบสูงสุดในเด็กเล็กช่วงอายุ 0-5 เดือน โดยมีอัตราการเกิดโรคประมาณ 7.35 ราย ต่อประชากร 100 คน ในระยะเวลา 1 ปี และลดลงในช่วงอายุ 6-11 ปี และ 1-23 ปี ตามลำดับ สะท้อนให้เห็นว่าเด็กทารกในช่วงอายุ 1 ปี เป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อสูงสุด⁽⁹⁾ การติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีอาจส่งผลให้เกิด acute respiratory illnesses (ARI) ส่งผลให้มีการเสียชีวิตขึ้นในผู้ป่วยเหล่านี้⁽¹⁰⁾ ในบริบทของประเทศไทยมีรายงานหลายฉบับแสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีเป็นปัญหาต่อระบบสาธารณสุขในเด็กเล็ก โดยเฉพาะในกลุ่มอายุต่ำกว่า 5 ปี การศึกษาข้อมูลพบว่า ช่วงปี พ.ศ. 2558-2563 จำนวนผู้เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลที่เกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจจากไวรัสอาร์เอสวีสูง โดยมีอัตราการปอดบวมเป็นสาเหตุหลักของการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล รองลงมาคือ หลอดลมอักเสบและหลอดลมอักเสบแบบเฉียบพลัน โดยพบการเกิดขึ้นสูงในช่วงฤดูฝนของไทย ในช่วงเดือนสิงหาคม ถึง ตุลาคม และพบอัตราการเสียชีวิตจากภาวะติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีที่ระบบทางเดินหายใจส่วนล่างมากในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 1 ปี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอายุที่มากกว่า และเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเสียชีวิต รวมถึงโรคหัวใจพิการแต่กำเนิด โรคมะเร็งโลหิต ภาวะทุพโภชนาการ และโรคระบบประสาทร่วมด้วย⁽¹¹⁾

การศึกษาทางระบาดวิทยาและลักษณะทางคลินิกจากโรงพยาบาลต่างๆ ในประเทศไทย พบปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี เช่น เด็กที่มีอายุน้อยกว่า 2 เดือน มีโอกาสสูงที่จะพัฒนาอาการปอดบวมรุนแรงและหลอดลมอักเสบเมื่อเปรียบเทียบกับเด็กที่มีอายุมากกว่า⁽¹²⁾ นอกจากนี้การเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลในช่วงสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรค COVID-19 พบว่าจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส

อาร์เอสวีลดลงอย่างมาก แต่ลักษณะทางคลินิกและรูปแบบฤดูกาลของการติดเชื้อเปลี่ยนแปลงไปด้วยเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับสถานการณ์ก่อนการแพร่ระบาดของโรค COVID-19⁽¹³⁾ การวิเคราะห์การตรวจพบเชื้อไวรัสอาร์เอสวีจากตัวอย่างส่งตรวจในโรงพยาบาลรามธิบดีมีวัตถุประสงค์เพื่อนำข้อมูลเหล่านี้มาใช้ประโยชน์สำหรับการเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขเมื่อเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสอาร์เอสวีได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

รูปแบบการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาข้อมูลเชิงสังเกตแบบย้อนหลัง (retrospective observational study) เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี จากผลการตรวจของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี โดยนำผลการตรวจเชื้อไวรัสอาร์เอสวีจากห้องปฏิบัติการมารวบรวมและวิเคราะห์ทางสถิติ

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา คือ ข้อมูลตัวอย่างส่งตรวจทั้งหมดที่แพทย์ส่งตรวจเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันและได้รับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอาร์เอสวีด้วยวิธี nucleic acid amplification test (NAAT) ระหว่างปี พ.ศ. 2555–2565 โดยไม่จำกัดเพศและอายุ ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ ประกอบด้วย ตัวอย่างการส่งตรวจทั้งหมด 43,230 รายการ ซึ่งรวมถึงผลตรวจที่ให้ผลบวกและลบ

ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา

ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ ประกอบด้วย เพศ กลุ่มอายุ ประเภทของสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ เดือนและปีที่ส่งตรวจ ตัวแปรทางเพศ ได้แก่ เพศชายและเพศหญิง ตัวแปรกลุ่มอายุ จำแนกออกเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ newborn (ทารกอายุน้อยกว่า 1 เดือน) infant (เด็กทารกอายุมากกว่า 1 เดือน ถึง 1 ปี) toddler (เด็กเล็กอายุมากกว่า 1 ปี ถึง 3 ปี) preschooler (เด็กประถมอายุมากกว่า 3 ปี ถึง 6 ปี) school-age child (เด็กนักเรียน

อายุมากกว่า 6 ปี ถึง 12 ปี) adolescent (วัยรุ่นอายุมากกว่า 12 ปี ถึง 18 ปี) adult (ผู้ใหญ่อายุมากกว่า 18 ปี ถึง 60 ปี) และ elderly (ผู้สูงอายุอายุมากกว่า 60 ปีขึ้นไป) ตัวแปรประเภทของสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ ได้แก่ nasal swab (NS), nasal wash (NW), nasopharyngeal aspirate (NPA), nasopharyngeal swab (NPS), nasopharyngeal wash (NPW) และ throat swab (TS)

เกณฑ์การพิจารณา

ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจจะถูกพิจารณาว่าเป็นผู้ป่วยต้องสงสัยติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ โดยมีอาการอย่างน้อย 1 ข้อ ได้แก่ ไข้ ไอ เจ็บคอ น้ำมูกไหล หอบหายใจลำบาก และได้รับการพิจารณาส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยแพทย์ผู้ดูแล

เกณฑ์การคัดเข้า (inclusion criteria) ข้อมูลผู้ป่วยทุกช่วงอายุที่มีกลุ่มอาการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ได้รับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอาร์เอสวีด้วยวิธี NAAT โดยใช้ชุดทดสอบ xTAG Respiratory Viral Panel (Luminex Corporation, USA) และ FTD Respiratory Pathogen 33 multiplex kit (Fast Track Diagnostic, Luxembourg)

เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) ผู้ป่วยที่ไม่มีข้อมูล การส่งตรวจซ้ำของผู้ป่วยรายเดียวกันภายในระยะเวลา 1 เดือน ผู้ป่วยรายเดียวกันที่มีการส่งตรวจมากกว่า 1 ชนิด ภายในช่วงเวลา 1 เดือน และผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอาร์เอสวี

การรวบรวมและเตรียมข้อมูล

ข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่เป็นข้อมูลดิบ (raw data) ถูกรวบรวมจากระบบสารสนเทศทางห้องปฏิบัติการ (laboratory information system; LIS) จากนั้นดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องและกำจัดข้อมูลซ้ำซ้อน รวมถึงการจัดการกรณีผู้ป่วยรายเดียวกันที่มีการส่งตรวจหลายครั้งในช่วงเวลาเดียวกัน เพื่อให้ได้ชุดข้อมูลสุดท้ายที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Microsoft Excel 2021 (Microsoft Corporation, 2021)

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

การวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) ใช้อธิบายลักษณะข้อมูลทั่วไป ได้แก่ ความถี่ (frequency) ร้อยละ (percentage) ค่าต่ำสุด (minimum) ค่าสูงสุด (maximum) และสัดส่วน (proportion)

การวิเคราะห์สถิติเชิงอนุมาน (Inferential statistics) ใช้ประเมินความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ กับการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี โดยใช้การทดสอบไคสแควร์ (chi-square test) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 และวิเคราะห์ logistic regression ทั้งแบบ univariable analysis และ multivariable analysis โดยใช้โปรแกรม Stata Version 18 SE (Stata Corp LLC, College Station, USA), R Version 4.3.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) และ RStudio version 2024.09.0-375 (RStudio, PBC, Boston, MA, USA)

การแปลผล logistic regression ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 หากค่า p -value น้อยกว่า 0.05 จะพิจารณาว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หากค่า p -value มากกว่าหรือเท่ากับ 0.05 จะถือว่าไม่มีความสัมพันธ์ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ logistic regression แสดงค่าความสัมพันธ์ในรูปแบบของ odds ratio (OR) พร้อมช่วงความเชื่อมั่น 95% (95% confidence interval; 95% CI) โดยค่า OR มากกว่า 1 หมายถึง ปัจจัยนั้นเพิ่มโอกาสในการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี ขณะที่ OR น้อยกว่า 1 หมายถึง ปัจจัยนั้นลดโอกาสในการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี

จริยธรรมการวิจัย

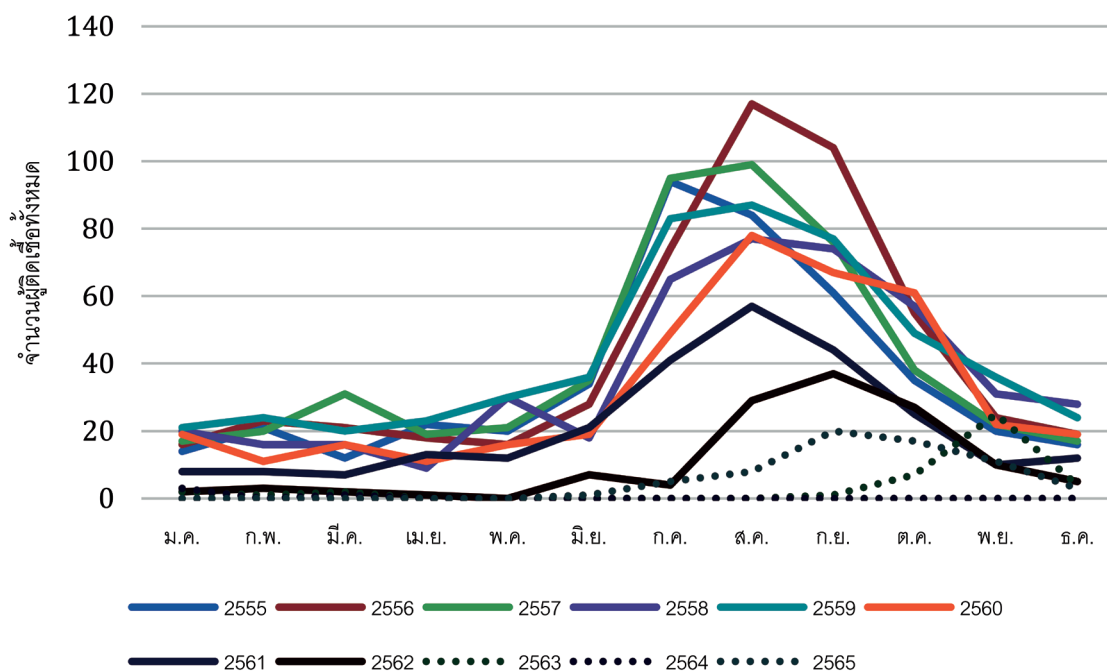
ได้รับการอนุมัติและรับรองด้านจริยธรรม เลขที่ COA.MURA 2023/257 จากคณะกรรมการจริยธรรมและการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อวันที่ 7 มีนาคม พ.ศ. 2566

ผล

จากการศึกษาข้อมูลของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ จำนวน 43,230 ราย พบผู้ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี จำนวน 3,273 ราย (7.57%) [โดยร้อยละ 7.57 คำนวณจากจำนวนผู้ติดเชื้ออาร์เอสวีทั้งหมดหารด้วยจำนวนตัวอย่างทั้งหมดตลอดช่วงการศึกษา ($3,273/43,230 \times 100$)] เมื่อพิจารณาแยกรายปี พบว่ามีผู้ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีในปี พ.ศ. 2555 จำนวน 433 ราย (14.85%) [โดยร้อยละ 14.85 คำนวณจากจำนวนผู้ติดเชื้ออาร์เอสวีในปี พ.ศ. 2555 หารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจทั้งหมดในปีเดียวกันและคูณด้วย 100 ($433/\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดในปี พ.ศ. 2555} \times 100$)] ซึ่งการคำนวณร้อยละในแต่ละปีตั้งแต่ พ.ศ. 2556 - 2565 ใช้หลักการเดียวกันทั้งหมด ได้แก่ จำนวนผู้ติดเชื้ออาร์เอสวีในปีนั้นหารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจในปีเดียวกัน

รายละเอียดจำนวนและร้อยละของผู้ติดเชื้ออาร์เอสวีในแต่ละปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556-2565 มีผู้ติดเชื้อจำนวน 515 ราย (11.55%), 490 ราย (10.06%), 441 ราย (7.36%), 510 ราย (6.17%), 388 ราย (5.80%), 258 ราย (6.88%), 127 ราย (4.56%), 42 ราย (2.70%), 4 ราย (0.47%) และ 65 ราย (6.00%) ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์การกระจายแบบรายเดือน พบว่าร้อยละของผู้ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีในแต่ละเดือน [คำนวณจากจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีในเดือนนั้นหารด้วยจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีทั้งหมดตลอดช่วงการศึกษา (3,273 ราย) และคูณด้วย 100] โดยพบผู้ติดเชื้อในเดือนมกราคม ถึง ธันวาคม จำนวน 122 ราย (3.23%), 127 ราย (3.50%), 128 ราย (3.57%), 116 ราย (3.99%), 145 ราย (4.92%), 199 ราย (6.16%), 510 ราย (13.02%), 636 ราย (15.02%), 561 ราย (13.44%), 371 ราย (9.81%), 211 ราย (5.95%) และ 147 ราย (4.20%) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 จำนวนผู้ติดเชื้ออาร์เอสวีทั้งหมดจำแนกเป็นรายเดือนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555–2565

ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี จำแนกตามเพศ กลุ่มอายุ และสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์จากข้อมูลจำแนกตามเพศ คิดเป็นร้อยละ 96.35 (41,653/43,230 ราย) ของข้อมูลเพศทั้งหมด พบความชุกของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับเชื้อไวรัสอาร์เอสวีในเพศหญิง ร้อยละ 7.41 (1,479/19,956 ราย) และเพศชาย เท่ากับร้อยละ 7.60 (1,650/21,697 ราย) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเพศ พบว่าปัจจัยด้านเพศไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี (Pearson chi-square: $\chi^2 = 0.56$, p -value = 0.454) เมื่อจำแนกข้อมูลตามกลุ่มอายุ คิดเป็น 64.30% (27,796/43,230 ราย) ของข้อมูลกลุ่มอายุทั้งหมด พบความชุกของการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีสูงสุดใน toddler เท่ากับ 13.07% (652/4,989 ราย) ลำดับถัดมาเป็น infant เท่ากับ 12.19% (481/3,946 ราย) และพบความชุกของการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีต่ำที่สุดในกลุ่ม adolescent เท่ากับ 2.17% (18/828 ราย) การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มอายุและการติดเชื้อพบว่าปัจจัยด้านอายุมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Pearson Chi-square: $\chi^2 = 827.34$, $p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 1

ข้อมูลสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ คิดเป็น 81.56% (35,258/43,230 ราย) ของข้อมูลตัวอย่างทั้งหมด พบความชุกของการตรวจพบเชื้อไวรัสอาร์เอสวีสูงในตัวอย่าง NPW เท่ากับ 12.00% (108/900 ราย) ลำดับถัดมาเป็นตัวอย่าง TS เท่ากับ 10.84% (299/2,759 ราย) และพบความชุกของการตรวจพบเชื้อไวรัสอาร์เอสวีต่ำที่สุดในตัวอย่าง NS เท่ากับ 6.84% (1,303/19,060 ราย) จากการศึกษาปัจจัยสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ พบว่ามีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อไวรัสอาร์เอสวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Pearson Chi-square: $\chi^2 = 89.59$, $p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ อัตราการตรวจพบเชื้อไวรัสอาร์เอสวีก่อนการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 สูงกว่าช่วงหลังการระบาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยในช่วงก่อนการระบาดพบผลบวกของเชื้อไวรัสอาร์เอสวี 7.96% (3,162/39,735) ซึ่งการตรวจในช่วงก่อนการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 มีโอกาสตรวจพบการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีสูงกว่าช่วงหลังการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 ประมาณ 1.78 เท่า

ตารางที่ 1 ปัจจัยที่ศึกษาและจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี

Factors	Age range (year)	Number	RSV detection		
			Positive (%)	p-value	OR (95% CI)
Sex (41,653)	Male	21,697 (52.09%)	1,650 (7.60)	0.337	0.95 (0.85,1.06)
	Female	19,956 (47.91%)	1,479 (7.41)		1 (ref)
Age (27,796)	Newborn	(< 0.08)	108 (0.39%)	8 (7.41)	0.022 2.69 (1.15,6.29)
	Infant	(< 1)	3,946 (14.20%)	481 (12.19)	< 0.001 4.59 (3.76,5.6)
	Toddler	(> 1-3)	4,989 (17.95%)	652 (13.07)	< 0.001 5.07 (4.19,6.14)
	Preschooler	(> 3-6)	3,029 (10.90%)	227 (7.49)	< 0.001 2.73 (2.18,3.42)
	School-aged child	(> 6-12)	1,908 (6.86%)	49 (2.57)	0.735 0.94 (0.66,1.34)
	Adolescent	(> 12-18)	828 (2.98%)	18 (2.17)	0.227 0.71 (0.41,1.24)
	Elderly	(> 60)	5,976 (21.50%)	173 (2.89)	0.004 1.37 (1.1,1.69)
	Adult	(> 18-60)	7,012 (25.23%)	264 (3.76)	1 (ref)
Specimen (35,258)	Nasal swab	(NS)	19,060 (54.06%)	1,303 (6.84)	0.175 0.73 (0.51,1.03)
	Nasal wash	(NW)	550 (1.56%)	58 (10.55)	0.547 1.16 (0.81,1.66)
	Nasopharyngeal aspirate	(NPA)	943 (2.67%)	69 (7.32)	0.075 1.09 (0.96,1.23)
	Nasopharyngeal wash	(NPW)	900 (2.55%)	108 (12.00)	0.425 1.12 (0.77,1.63)
	Throat swab	(TS)	2,759 (7.83%)	299 (10.84)	0.033 1.38 (1.03,1.85)
	Nasopharyngeal swab	(NPS)	11,046 (31.33%)	889 (8.05)	1 (ref)
Covid-19 (43,230)	Before		39,735 (91.92%)	3,162 (7.96)	< 0.001 1.78 (1.43,2.21)
	After		3,495 (8.08%)	111 (3.18)	1 (ref)

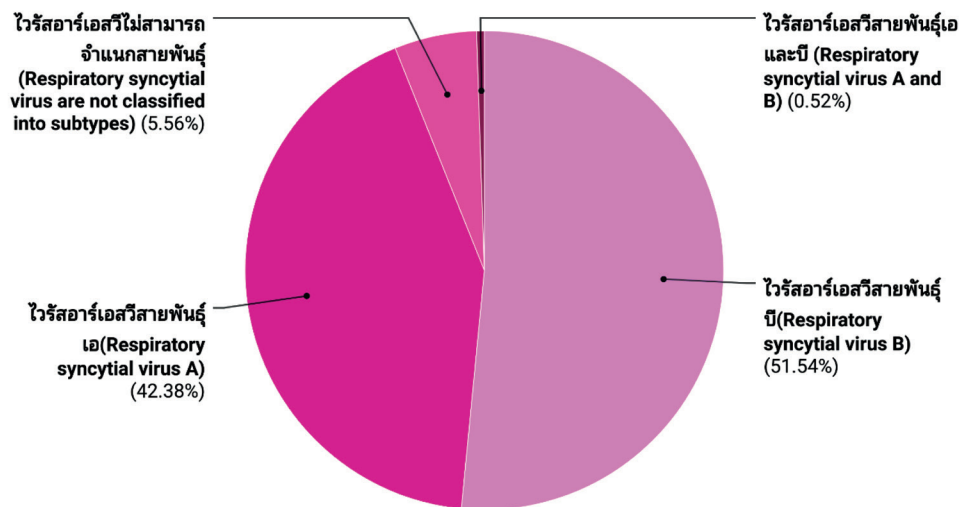
หมายเหตุ: 95% CI - 95% Confidence Interval, OR - Odds ratio, p-value - Probability value, % - Percentage, P - positive และ RSV - Respiratory syncytial virus

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบตัวแปรร่วม (multivariate analysis) ควาระหลายปัจจัย เพศชาย เมื่อเปรียบเทียบกับเพศหญิงไม่พบความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี ผู้ป่วยในกลุ่ม newborn, infant, toddler, preschooler และ elderly เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม adult พบว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.022, p<0.001, p<0.001, p<0.001$ และ $p=0.004$ ตามลำดับ) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ที่มีผลต่อความสามารถในการตรวจพบเชื้อไวรัสอาร์เอสวี พบว่าสิ่งส่งตรวจประเภท TS มีความสัมพันธ์กับอัตราการตรวจพบเชื้อไวรัสอาร์เอสวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีแนวโน้ม

หรือมีโอกาสในการตรวจพบเชื้อได้สูงกว่าสิ่งส่งตรวจประเภทอื่น และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างก่อนสถานการณ์แพร่ระบาดของเชื้อ COVID-19 พบว่ามีผู้ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีสูงกว่าหลังเกิดการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากข้อมูลผู้ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีจำนวน 3,273 ราย พบการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีสายพันธุ์เอจำนวน 1,387 ราย (42.38%) ไวรัสอาร์เอสวีสายพันธุ์บี จำนวน 1,687 ราย (51.54%) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีสายพันธุ์เอและบีร่วมกัน จำนวน 17 ราย (0.52%) และไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ จำนวน 182 ราย (5.56%) ดังแสดงในภาพที่ 2

สัดส่วนของไวรัสอาร์เอสวี (Respiratory Syncytial Virus)



Source: Virology Laboratory, Department of Pathology, Ramathibodi Hospital • Created with Datawrapper

ภาพที่ 2 สัดส่วนของไวรัสอาร์เอสวีสายพันธุ์ต่างๆ ที่ตรวจพบในโรงพยาบาลรามาธิบดี

ในการศึกษาเพิ่มเติมจากข้อมูลผู้ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี สายพันธุ์เอ 1,387 ราย พบข้อมูลผู้ติดเชื้อในการศึกษาปัจจัยทางเพศ 1,343 ราย เป็นผู้ป่วยเพศชาย 53.69% (721/1,343) และเพศหญิง 46.31% (622/1,343) การวิเคราะห์ปัจจัยด้านอายุจากข้อมูล 765 ราย พบสัดส่วนของผู้ติดเชื้อในกลุ่ม newborn 0.52% (4/765), infant 24.84% (190/765), toddler 36.34% (278/765), preschooler 12.81% (98/765), school-age child 2.35% (18/765), adolescent 0.92% (7/765), adult 10.20% (78/765) และ elderly 12.03% (92/765) และจากข้อมูลของผู้ติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี สายพันธุ์บี 1,687 ราย พบข้อมูลผู้ติดเชื้อในการศึกษาปัจจัยทางเพศ 1,621 ราย เป็นผู้ป่วยเพศชาย 51.88% (841/1,621) และเพศหญิง 48.18% (780/1,621) การวิเคราะห์ปัจจัยด้านอายุจากข้อมูล 963 ราย พบสัดส่วนของผู้ติดเชื้อในกลุ่ม newborn 0.21% (2/963), infant 25.56% (249/963), toddler 35.51% (342/963), preschooler 10.90% (105/963), school-age child 2.80% (27/963), adolescent 0.62% (6/963), adult 8.83% (85/963) และ elderly 15.26% (147/963)

วิจารณ์

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความชุกของการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีจากข้อมูลห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ปี พ.ศ. 2555–2565 อยู่ที่ 7.57% โดยพบแนวโน้มการลดลงอย่างชัดเจนในช่วงปี พ.ศ. 2563–2564 ซึ่งสอดคล้องกับช่วงเวลาการระบาดของโรค COVID-19 ที่มีอัตราการตรวจพบเชื้ออาร์เอสวีลดลงในช่วงเวลาดังกล่าว มีความเป็นไปได้ว่าเป็นผลมาจากมาตรการทางด้านสาธารณสุข เช่น การสวมหน้ากากอนามัย การเว้นระยะห่างทางสังคม การปิดสถานศึกษา มาตรการเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการลดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจหลายชนิด ซึ่งสอดคล้องกับประเทศอื่นๆ ที่พบรูปแบบการลดลงของเชื้อไวรัสอาร์เอสวีในช่วงการระบาดใหญ่ของโรค COVID-19⁽¹⁴⁾

การพบอัตราการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีที่สูงในกลุ่มทารกและเด็กเล็กสะท้อนถึงความเสี่ยงทางสุขภาพของกลุ่มอายุดังกล่าว ซึ่งอาจอธิบายด้วยหลายปัจจัยร่วมกัน ได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกันที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ การลดลงของภูมิคุ้มกันจากมารดาหลังคลอด และ

การตอบสนองต่อการอักเสบที่รุนแรงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเด็กโตและผู้ใหญ่ นอกจากนี้รูปแบบการสัมผัสใกล้ชิดกับผู้ดูแลและสมาชิกในครอบครัวเพิ่มโอกาสรับเชื้อในกลุ่มอายุดังกล่าว ผลการศึกษานี้จึงสนับสนุนหลักฐานเชิงระบาดวิทยาที่ชี้ว่าเด็กอายุต่ำกว่า 1 ปี เป็นกลุ่มที่มีภาระโรคจากเชื้อไวรัสอาร์เอสวีสูงที่สุด และมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรครุนแรงมากกว่ากลุ่มอายุอื่น⁽¹⁵⁾ ในด้านฤดูกาล การตรวจพบเชื้อไวรัสอาร์เอสวีสูงในช่วงเดือนกรกฎาคมถึง กันยายน โดยเฉพาะเดือนสิงหาคมซึ่งตรงกับฤดูฝนของประเทศไทย ลักษณะดังกล่าวสะท้อนอิทธิพลของปัจจัยด้านภูมิอากาศเขตร้อน ได้แก่ ความชื้นสูง อุณหภูมิแปรปรวน และพฤติกรรมการรวมกลุ่มในที่ปิด เอื้อต่อการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ผลลัพธ์นี้เน้นย้ำว่าการตีความรูปแบบฤดูกาลของการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี ควรพิจารณาในบริบททางภูมิศาสตร์และภูมิอากาศ ไม่ควรเปรียบเทียบประเทศไทยกับประเทศในเขตอบอุ่นหรือเขตหนาว ซึ่งมีการระบาดสูงในฤดูหนาว เช่น สหรัฐอเมริกาและประเทศในแถบยุโรป เนื่องจากมีความแตกต่างด้านฤดูกาลและสภาพแวดล้อม⁽¹⁶⁾

การไม่พบความแตกต่างของอัตราการติดเชื้อระหว่างเพศชายและเพศหญิงในงานวิจัยนี้ อาจบ่งชี้ว่าปัจจัยด้านอายุและสภาพภูมิคุ้มกันมีบทบาทและความสำคัญมากกว่าปัจจัยด้านเพศต่อการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี ผลลัพธ์ดังกล่าวสอดคล้องกับ Qiu W และคณะ⁽¹⁷⁾ ซึ่งไม่พบความแตกต่างทางสถิติของอัตราการติดเชื้อระหว่างเพศ อาจเกิดจากความแตกต่างของโครงสร้างประชากร วิธีการศึกษาและช่วงเวลาการเก็บข้อมูลประเด็นสำคัญอีกประการหนึ่ง การตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอาร์เอสวีจากตัวอย่าง TS สูงกว่า NPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สะท้อนถึงความเหมาะสมของชนิดตัวอย่างในการส่งตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสอาร์เอสวี เนื่องจากเชื้อมีการเพิ่มจำนวนในเยื่อบุทางเดินหายใจส่วนบน การใช้ TS อาจให้ประสิทธิภาพที่ดี ควบคู่กับการลดความเสี่ยงจากการบาดเจ็บในการเก็บตัวอย่าง โดยเฉพาะในทารกและเด็กเล็ก ผลการศึกษานี้จึงมีนัยสำคัญเชิงปฏิบัติในการปรับปรุงแนวทางการเก็บ

ตัวอย่างเพื่อการเฝ้าระวังและวินิจฉัยเชื้อไวรัสอาร์เอสวีในสถานพยาบาล

การศึกษานี้พบว่า 5.56% ของตัวอย่างเชื้อไวรัสอาร์เอสวีไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ ซึ่งอาจเกิดจากข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ ปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้ออยู่ในระดับต่ำ มีปริมาณเชื้อในสิ่งส่งตรวจน้อย การเก็บตัวอย่างไม่ได้คุณภาพ ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลไม่เพียงพอสำหรับการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม เช่น การย่อยสลายอนุภาคไวรัสในเซลล์มนุษย์⁽¹⁸⁾ และการเก็บรักษาสารพันธุกรรม⁽¹⁹⁾ รวมถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส อาจส่งผลให้ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสอาร์เอสวีได้ การศึกษาวิจัยนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีเฉพาะโรงพยาบาลรามาริบัติเพียงแห่งเดียว ทำให้มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ภาพรวมอาจไม่ครอบคลุมเพียงพอและขาดการศึกษาจากปัจจัยอื่น เช่น ลักษณะอาการทางคลินิก ข้อมูลด้านประชากรศาสตร์ ข้อมูลด้านสังคมศาสตร์และสิ่งแวดล้อม ซึ่งควรทำการศึกษาเพิ่มเติมจากขอบเขตของการศึกษานี้จะทำให้ผลการศึกษามีความถูกต้อง ครอบคลุมปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ และได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์เพิ่มมากขึ้น

สรุป

การศึกษานี้พบว่าเชื้อไวรัสอาร์เอสวีสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดทั้งปี โดยมีความชุกสูงในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน และพบมากที่สุดในเดือนสิงหาคม การติดเชื้อพบได้ในทุกเพศและทุกวัย โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างเพศแต่พบความชุกสูงในเด็กที่มีอายุมากกว่า 1 เดือน ถึง 3 ปี การใช้ตัวอย่าง TS แสดงถึงความเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสอาร์เอสวี อย่างไรก็ตาม เนื่องจากข้อมูลมาจากโรงพยาบาลเพียงแห่งเดียว ผลการศึกษานี้จึงสะท้อนรูปแบบการติดเชื้อในสถานพยาบาลเป็นหลัก การศึกษาต่อยอดในอนาคตควรขยายไปยังหลายพื้นที่และบูรณาการข้อมูลเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสอาร์เอสวีและการเฝ้าระวังโรคอย่างเหมาะสม

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ผู้วิจัยได้ใช้ปัญญาประดิษฐ์ ChatGPT (Open AI, USA) เพื่อช่วยในการตรวจสอบความถูกต้องของไวยากรณ์ ปรับปรุงโครงสร้างประโยค ไม่ได้ถูกนำมาใช้สร้างข้อมูลวิเคราะห์ผลทางสถิติ หรือมีส่วนในการตัดสินใจเชิงวิชาการ ข้อมูลทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา การวิเคราะห์ทางสถิติ การแปลผล และการสรุปผล ได้ดำเนินการ โดยผู้วิจัยโดยตรง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี กรุณาให้ข้อมูลและสถานที่ในการศึกษาวิจัย ขอขอบคุณ รศ.นพ.มงคล คุณากร รศ.ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค ดร.เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาพยาธิวิทยา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย ขอขอบคุณ รศ.ดร.ศศิวิมล รัตนสิรินางสาวศศิกรณ ลิทธิศร นายพงศ์สันต์ ฉัตรแสงเจริญ และ นางสาวณรดา รัตนไพบูลย์ ที่ได้ให้การช่วยเหลือและแนะนำการใช้งานโปรแกรมวิเคราะห์ทางด้านสถิติและผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความกรุณาและผลักดันจนงานวิจัยประสบผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

- Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* 2017; 390(10098): 946–58.
- Chamarthi S, Chamarthi VS, Daley SF. Respiratory syncytial virus infection in children. [Updated 2025 Dec 14]. In: StatPearls. [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026. [cited 2026 Oct 12]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459215>.
- Centers for Disease Control and Prevention. Respiratory syncytial virus infection (RSV) [online]. 2025; [cited 2026 Oct 12]. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/rsv/about/index.html>.
- Jia R, Lu L, Su L, Lin Z, Gao D, Lv H, et al. Resurgence of respiratory syncytial virus infection during COVID-19 pandemic among children in Shanghai, China. *Front Microbiol* 2022; 13: 938372. (9 pages).
- Li Y, Wang X, Blau DM, Caballero MT, Feikin DR, Gill CJ, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022; 399(10340): 2047–64.
- Noble M, Khan RA, Walker B, Bennett E, Gent N. Respiratory syncytial virus-associated hospitalisation in children aged ≤5 years: a scoping review of literature from 2009 to 2021. *ERJ Open Res* 2022; 8(2): 00593–2021.
- Billard MN, van de Ven PM, Baraldi B, Kragten-Tabatabaie L, Bont LJ, Wildenbeest JG. International changes in respiratory syncytial virus (RSV) epidemiology during the COVID-19 pandemic: association with school closures. *Influenza Other Respir Viruses* 2022; 16(5): 926–36.
- Bardsley M, Morbey RA, Hughes HE, Beck CR, Watson CH, Zhao H, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in England during the COVID-19 pandemic, measured by laboratory, clinical, and syndromic surveillance: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* 2023; 23(1): 56–66.
- Langley JM, Bianco V, Domachowske JB, Madhi SA, Stoszek SK, Zaman K, et al. Incidence of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections during the first 2 years of life: a prospective study across diverse

- global settings. *J Infect Dis* 2022; 226(3): 374-85.
10. Wongsurakiat P, Sunhapanit S, Muangman N. Respiratory syncytial virus-associated acute respiratory illness in adult non-immuno-compromised patients: outcomes, determinants of outcomes, and the effect of oral ribavirin treatment. *Influenza Other Respir Viruses* 2022; 16(4): 767-79.
 11. Sitthikarnkha P, Uppala R, Niamsanit S, Sutra S, Thepsuthammarat K, Techasatian L, et al. Burden of respiratory syncytial virus related acute lower respiratory tract infection in hospitalized Thai children: a 6-year national data analysis. *Children* 2022; 9(12): 1990. (10 pages).
 12. Bunjoungmanee P, Rotejaratpaisan A, Tangsathapornpong A. Epidemiology, clinical manifestation and risk factors of respiratory syncytial virus infection in children at Thammasat University Hospital. *Thammasat Med J* 2016; 16(3): 370-8.
 13. Chaiut W, Sapbamrer R, Dacha S, Sudjaritruk T, Parwati I, Sumarpo A, et al. Characteristics of respiratory syncytial virus infection in hospitalized children before and during the COVID-19 pandemic in Thailand. *J Prev Med Public Health* 2023; 56(3): 212-20.
 14. Hu XW, Zhou Y, Yi S, Zhang WX, Wang XR, Du J, et al. Epidemiological characteristics of respiratory syncytial virus infection among hospitalized children with acute respiratory tract infections from 2014 to 2022 in a hospital in Hubei province, China: longitudinal surveillance study. *JMIR Public Health Surveill* 2023; 9: e43941. (16 pages).
 15. Cong B, Dighero I, Zhang T, Chung A, Nair H, Li Y. Understanding the age spectrum of respiratory syncytial virus associated hospitalisation and mortality burden based on statistical modelling methods: a systematic analysis. *BMC Med* 2023; 21: 224. (13 pages).
 16. Wang L, Davis PB, Berger NA, Kaelber DC, Volkow ND, Xu R. Disruption in seasonality, patient characteristics and disparities of respiratory syncytial virus infection among young children in the US during and before the COVID-19 pandemic: 2010-2022. *medRxiv*. [Preprint]. [online]. 2022; [cited 2026 Oct 12]; [16 screens]. Available from: URL: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.11.29.22282887>.
 17. Qiu W, Zheng C, Huang S, Zhang Y, Chen Z. Epidemiological trend of RSV infection before and during COVID-19 pandemic: a three-year consecutive study in China. *Infect Drug Resist* 2022; 15: 6829-37.
 18. Watthanachockchai T, Rakmanee K. Lysis of host cells and viral particles in extracting viral nucleic acids from human samples. *Bull Dept Med Sci* 2025; 67(3): 541-56.
 19. Rakmanee K, Watthanachockchai T. Preservation of DNA and RNA for molecular biological diagnosis. *Bull Dept Med Sci* 2025; 67(3): 530-40.

Analysis of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infections from Clinical Specimens in Ramathibodi Hospital, Thailand: A Retrospective Study from 2012–2022

Kingkan Rakmanee¹, Treewat Watthanachockchai¹, Manutsanun Boonyanuwat², Sirapichaya Phlykaew², Praphan Suksudej³, Vorthunju Nakhonsri⁴, Wuttipong Jaihan⁵, La-or Chailurkit⁶, and Pichet Yutthanakarnwikom¹

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

²Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Molecular laboratory, Labhouse (Chonburi Co., Ltd.), Chonburi 20000, Thailand

⁴National Biobank of Thailand, National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani 12120, Thailand

⁵Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

⁶Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

ABSTRACT Respiratory Syncytial Virus (RSV) is a leading cause of respiratory infections in children and the elderly. This study investigated the relationship between risk factors and disease development. Data from the Virology Laboratory in the Department of Pathology at the Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital were analyzed from January 1, 2012, to December 31, 2022. A total of 43,230 individuals were included in the analysis. Of those, 3,273 individuals (7.57%) were found to be infected with RSV. The highest prevalence occurred during July–September, with August showing the highest prevalence. RSV infection occurred across all age groups. Specifically, a statistically significant association with RSV infection was found in children under 6 years of age and older adults over 60 years of age compared to adults aged 18–60 years: newborns (p -value = 0.022, odds ratio [OR] = 2.69, 95% confidence interval [CI] = 1.15–6.29); infants (p -value < 0.001, OR = 4.59, 95% CI = 3.76–5.60); toddlers (p -value < 0.001, OR = 5.07, 95% CI = 4.19–6.14); preschoolers (p -value < 0.001, OR = 2.72, 95% CI = 2.18–3.42); and

elderly (p -value = 0.004, OR = 1.37, 95% CI = 1.10-1.69). The detection rate of RSV virus before the COVID-19 pandemic was significantly higher than after (p -value < 0.001, OR = 1.78, 95% CI = 1.43-2.21). Data from this study can help prepare medical laboratories to cope with potential future RSV outbreaks.

Keywords: Retrospective study, Respiratory Syncytial Virus, Respiratory tract infection, Ramathibodi Hospital

การศึกษาข้อมูลย้อนหลังของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่มีสาเหตุมาจากฮิวแมนเมตาปневโมไวรัสในผู้ป่วยโรงพยาบาลรามธิบดีระหว่างปี พ.ศ. 2555-2565

ตรีวัฒน์ วัฒนะโชคชัย¹ กิ่งกาญจน์ รักษ์มณี¹ พิเชฐ ยุทธนาการวิกรม¹ มนัสนันท์ บุญญานุวัตร²
สิริพิชญา พลายแก้ว² ประพันธ์ สุขสุเดช³ วอทันยู นครศรี⁴ วุฒิพงษ์ ใจหาญ⁵ และ ละออ ชัยลือกิจ⁶

¹ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

³ห้องปฏิบัติการคลินิกเทคนิคการแพทย์ บริษัท แล็บแฮสส์ (ชลบุรี) จำกัด ชลบุรี 20000

⁴ธนาคารทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ปทุมธานี 12120

⁵ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี 12120

⁶ภาควิชาอายุรศาสตร์โรคต่อมไร้ท่อและเมแทบอลิซึม คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

บทคัดย่อ ฮิวแมนเมตาปневโมไวรัส (Human Metapneumovirus, hMPV) เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจพบได้ทั่วโลก การศึกษาข้อมูลผู้ป่วย จำนวน 41,261 ราย จากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2565 พบผู้ป่วยติดเชื้อ hMPV จำนวน 2,959 ราย (ร้อยละ 7.17) มีความชุกสูงสุดในปี พ.ศ. 2558 ช่วงเดือนกันยายน ถึง พฤศจิกายน โดยเฉพาะในเดือนกันยายน (ร้อยละ 11.46) เพศหญิงมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อสูงกว่าเพศชาย (p -value = 0.006, OR = 1.18, 95% CI = 1.05-1.33) เด็กก่อนวัยเรียนช่วงอายุ 3-6 ปี มีความชุกสูงสุด (ร้อยละ 10.52) ขณะที่วัยรุ่นช่วงอายุ 12-18 ปี มีความชุกต่ำสุด (ร้อยละ 1.47) ความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูงสุดพบในเด็กวัยหัดเดินอายุ 1 ถึง 3 ปี ($p < 0.001$, OR = 2.75, 95% CI = 2.26-3.34) สิ่งส่งตรวจ nasopharyngeal swab ตรวจพบเชื้อสูงกว่าสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น ($p < 0.001$, OR = 1.45, 95% CI = 1.27-1.65) ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า hMPV เป็นเชื้อที่พบได้ในทุกช่วงอายุ โดยเฉพาะในเด็กเล็กและข้อมูลนี้สามารถนำไปใช้ในการเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการ เช่น การจัดสรรกำลังคน วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือทางการแพทย์ เพื่อรองรับสถานการณ์แพร่ระบาดของเชื้อ hMPV ได้อย่างมีประสิทธิภาพและเพียงพอต่อการให้บริการทางการแพทย์

คำสำคัญ: ฮิวแมนเมตาปnevโมไวรัส, การศึกษาข้อมูลย้อนหลัง, การกระจายตามอายุ, ความผันแปรตามฤดูกาล

Corresponding author E-mail: laor.cha@mahidol.ac.th

Received: 10 September 2025

Revised: 7 April 2026

Accepted: 10 April 2026

บทนำ

ฮิวแมนเมตานิวโมไวรัส (Human metapneumovirus, hMPV) ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2544 ในประเทศเนเธอร์แลนด์⁽¹⁾ เป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอแบบเส้นเดี่ยวสายลบ (negative-sense single-stranded RNA virus) มีเปลือกหุ้ม (enveloped virus) จัดอยู่ในวงศ์ Pneumoviridae สกุล Metapneumovirus เป็นสาเหตุทั่วไปของการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจในเด็ก ผู้ใหญ่ ผู้สูงอายุ และผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง^(2,3) เชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัสสามารถติดเชื้อเซลล์เยื่อของระบบทางเดินหายใจ โดยอาศัยโปรตีนบนผิวไวรัสในการยึดเกาะและเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน จากนั้นกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบส่งผลให้เกิดการทำลายของเยื่อหลอดลมและถุงลมปอด กลไกดังกล่าวมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคหลอดลมอักเสบและปอดบวมโดยเฉพาะในเด็กเล็ก⁽⁴⁾ การติดเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัสสามารถแสดงอาการได้ตั้งแต่การติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนบนและการติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนล่างที่รุนแรง เช่น หลอดลมอักเสบและปอดบวม ซึ่งอาจจำเป็นต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล โดยกลุ่มเสี่ยงที่มีอาการรุนแรง ได้แก่ เด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีโรคประจำตัวหรือมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งการติดเชื้อซ้ำสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดชีวิต^(3,5) ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนหรือยาด้านไวรัสที่จำเพาะต่อเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัส การรักษาจึงเป็นการรักษาแบบประคับประคองตามอาการเป็นหลัก⁽⁶⁾

การศึกษาทางระบาดวิทยาตามภูมิคุ้มกันแสดงให้เห็นว่าเด็กทั่วโลกที่ติดเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัสส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุ 5 ปี⁽⁷⁾ โดยมีรายงานว่าผู้ติดเชื้อประมาณ 14.2 ล้านรายต่อปี เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล 643,000 ราย เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนล่างเฉียบพลัน (acute lower respiratory infections, ALRIs) ในเด็กและเสียชีวิตถึง 16,100 ราย ซึ่งการเสียชีวิตเกิดขึ้นในเด็กทารกที่อายุน้อยกว่า 6 เดือน สูงถึงร้อยละ 64⁽⁸⁾ ความชุกของการติดเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัสในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ทั่วโลก มีความแตกต่างกันอย่างมากตั้งแต่ร้อยละ

1.1–86 ซึ่งสะท้อนถึงอิทธิพลของปัจจัยด้านภูมิอากาศฤดูกาล บริบททางสังคมเศรษฐกิจ⁽⁹⁾ นอกจากนี้ภายหลังการยกเลิกมาตรการควบคุมการแพร่ระบาดอันเนื่องมาจากโรคติดเชื้อ Coronavirus disease 2019 (COVID-19) ได้มีการระบาดนอกฤดูกาลของเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัสเพิ่มขึ้นในหลายประเทศทั้งในผู้ใหญ่และเด็ก มีการแพร่ระบาดเป็นระลอกพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ไวรัส โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัสสายพันธุ์ A2.2.2⁽¹⁰⁾ โดยอัตราการแพร่ระบาดโดยรวมทั่วโลกของเชื้อ hMPV ในผู้ป่วยโรคติดเชื้อทางเดินหายใจ 2,236,820 ราย อยู่ที่ร้อยละ 5.3 การติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนล่างมีอัตราการแพร่ระบาดสูงสุด ร้อยละ 8.2 โดยพบหลอดลมฝอยอักเสบ ร้อยละ 7.0 และปอดอักเสบ ร้อยละ 5.5⁽¹¹⁾

การศึกษาทางระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัส แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของสายพันธุ์ที่หมุนเวียนในประชากร โดยเฉพาะสายพันธุ์ A2, B1 และ B2 พบการกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่องพบว่าสายพันธุ์ A2c มีการกลายพันธุ์จำนวนมากถึงประมาณ 277 ตำแหน่ง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการแพร่กระจายและความรุนแรงของโรค นอกจากนี้พบลักษณะเด่นของการกลายพันธุ์แบบ insertion โดยเฉพาะการเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์ จำนวน 111 ตำแหน่ง (111 – nt duplication) ในสายพันธุ์ A2.2.2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ย่อย A2c111nt – dup ที่กำลังแพร่ระบาดและมีสัดส่วนสูงประมาณร้อยละ 84 ในหลายพื้นที่^(12,13) และพบการติดเชื้อร่วมกับไวรัสสายพันธุ์อื่น (co-infection) เช่น Respiratory syncytial virus, Enterovirus, และ Rhinovirus ซึ่งอาจเพิ่มความรุนแรงของอาการทางคลินิก^(14–16) โดยการติดเชื้อสูงสุดอยู่ในช่วงฤดูหนาวมีการตรวจพบจีโนไทป์ A (ร้อยละ 81.25) โดยเฉพาะสายพันธุ์ A2.2.2 (ร้อยละ 92.31) รองลงมา คือ A2.2.1 (ร้อยละ 7.69) ส่วนจีโนไทป์ B ตามลำดับ⁽¹²⁾ สำหรับประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัสในเด็กที่เข้ารับการรักษาด้วยอาการติดเชื้อทางเดินหายใจเฉียบพลันอย่างต่อเนื่อง โดยพบการระบาดมากในช่วง

ปลายฤดูฝนต้นฤดูหนาว^(15,18) การศึกษาในประเทศไทย รายงานว่า เชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสเป็นหนึ่งในสาเหตุ สำคัญของการติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็กและ มักพบการติดเชื้อร่วมกับไวรัสชนิดอื่น ส่งผลให้ต้อง เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลทำให้มีค่าใช้จ่าย จำนวนมากและเพิ่มภาระค่าใช้จ่ายด้านสาธารณสุข^(17,18) ประเทศไทยมีรายงานการศึกษาทางระบาดวิทยาในเด็ก พบว่าฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ หมุนเวียน จากการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการจาก fusion glycoprotein gene พบว่าเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสที่ ตรวจพบ ได้แก่ สายพันธุ์ย่อย B1 (ร้อยละ 96.8), A2a (ร้อยละ 1.6) และ A2b (ร้อยละ 1.6) ตามลำดับ⁽¹⁹⁾ และลักษณะอาการทางคลินิกพบว่าเด็กที่ติดเชื้อส่วนใหญ่ จะมีอาการใกล้เคียงกับการติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวี เช่น ไข้ ไอ และหลอดลมฝอยอักเสบแบบเฉียบพลัน⁽²⁰⁾ และ ยังพบการติดเชื้อซ้ำได้ ร้อยละ 4.9 แสดงให้เห็นถึง ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อแบบไม่ถาวรและอาจส่งผลให้เกิดการ ระบาดซ้ำในเด็ก⁽²¹⁾

เชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสถูกค้นพบมานานกว่า ทศวรรษ แต่ยังไม่มียาวัคซีนหรือยาต้านไวรัสสำหรับใช้ ในการรักษาอย่างจำเพาะ ในการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพล ต่อการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัส ได้แก่ เพศและ กลุ่มอายุ รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ สิ่งส่งตรวจทางการแพทย์กับการตรวจพบสารพันธุกรรม ของเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัส และนำข้อมูลไป ใช้ประโยชน์ในการเตรียมความพร้อมการเกี่ยวกับการ ตรวจวิเคราะห์เชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสใน ห้องปฏิบัติการทางด้านการแพทย์ การศึกษาข้อมูล ทางระบาดวิทยาอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะบริบทของ ประเทศไทย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเฝ้าระวัง และป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโม ไวรัสที่อาจเกิดการแพร่ระบาดขึ้นในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

รูปแบบการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบย้อนหลังเชิง พรรณนา (Retrospective descriptive study) และ

เป็นการศึกษาเชิงสังเกต (Observational study) ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษารวบรวมจากผู้ป่วยในที่ถูกส่งตรวจ หาสารพันธุกรรมของเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัส ณ ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2555 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2565 โดยผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจ จะถูกพิจารณาว่าเป็นผู้ป่วยต้องสงสัยติดเชื้อทางเดิน หายใจเฉียบพลัน โดยมีอาการอย่างน้อยหนึ่งข้อ ได้แก่ ไข้ ไอ น้ำมูกไหล หายใจลำบาก โดยแพทย์ผู้ดูแลพิจารณา ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง (inclusion criteria)

ข้อมูลผู้ป่วยทุกช่วงอายุที่มีกลุ่มอาการติดเชื้อ ทางเดินหายใจเฉียบพลัน และได้รับการส่งตรวจหา สารพันธุกรรมของเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัส ด้วยวิธี Nucleic Acid Analysis Test (NAAT) โดยใช้ ชุดทดสอบ xTAG Respiratory Viral Panel (Luminex Corporation, USA) และ FTD Respiratory Pathogen 33 multiplex PCR kit (Fast Track Diagnostics, Luxembourg)

เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria)

ผู้ป่วยที่ไม่มีข้อมูล ผู้ป่วยที่มีข้อมูลการส่งตรวจซ้ำ ภายในช่วงเวลาเวลา 1 เดือน และผู้ป่วยรายเดียวกัน ที่มีการส่งตรวจด้วยตัวอย่างมากกว่า 1 ชนิด ในช่วงเวลา ภายในช่วง 1 เดือน รวมทั้งผู้ป่วยที่ไม่ได้ส่งตัวอย่าง เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโม ไวรัส

การรวบรวมและเตรียมข้อมูล

การศึกษานี้รวบรวมข้อมูล (raw data) จาก ระบบสารสนเทศของห้องปฏิบัติการ (Laboratory Information System, LIS) เพื่อเตรียมข้อมูลสำหรับ การวิเคราะห์ทางสถิติโดยดำเนินการกำจัดข้อมูลที่ซ้ำซ้อน และผู้ป่วยที่ไม่ใช่ข้อมูลออก ในขั้นตอนการเตรียมข้อมูล (data preparation) รวมทั้งในกรณีที่ผู้ป่วยรายเดียวกัน มีการส่งตรวจมากกว่า 1 ชนิด ภายในช่วงเวลาเดียวกัน

ข้อมูลตัวแปรพื้นฐาน ประกอบด้วย เพศ (sex) แบ่งเป็น เพศชาย (male) และเพศหญิง (female) และ

กลุ่มอายุ (age) แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ อายุต่ำกว่า 1 เดือน (newborn), อายุมากกว่า 1 เดือน ถึง 1 ปี (infant), อายุมากกว่า 1 ปี ถึง 3 ปี (toddler), อายุมากกว่า 3 ปี ถึง 6 ปี (preschooler), อายุมากกว่า 6 ปี ถึง 12 ปี (school-age child), อายุมากกว่า 12 ปี ถึง 18 ปี (adolescent), อายุมากกว่า 18 ปี ถึง 60 ปี (adult) และอายุมากกว่า 60 ปี (elderly)

ข้อมูลประเภทตัวอย่างการทางการแพทย์ (specimen type) ได้แก่ Nasal swab (NS), Nasal wash (NW), Nasopharyngeal aspirate (NPA), Nasopharyngeal swab (NPS), Nasopharyngeal wash (NPW) และ Throat swab (TS) ถูกนำมาวิเคราะห์ในฐานะตัวแปรร่วม (covariate) เพื่อสะท้อนถึงความแตกต่างในการเลือกชนิดตัวอย่างสำหรับการตรวจวินิจฉัยและให้บริการทางการแพทย์ ซึ่งไม่ได้ทำการประเมินคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการโดยตรง

นอกจากนี้ข้อมูลถูกแบ่งตามเดือนและปีของการตรวจตั้งแต่เดือนมกราคม ถึง ธันวาคม และในช่วงเวลาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555-2565 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์แนวโน้มตามฤดูกาล รวมทั้งจำแนกข้อมูลในช่วงก่อน-หลังสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรค COVID-19 (COVID-19 pandemic)

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

การวิเคราะห์ข้อมูลเป็นการศึกษาแบบย้อนหลังจากผลการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา โดยใช้วิธีการทางสถิติในการวิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปและหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ ในการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ทำการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนความถี่ (frequency) ร้อยละ (percentage) ค่าต่ำสุด (minimum) และค่าสูงสุด (maximum) ในขณะที่การวิเคราะห์เชิงอนุมาน (inferential statistics) จะมุ่งเน้นไปที่การหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัส โดยใช้การวิเคราะห์ไคสแควร์ (chi-square) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 และทำการวิเคราะห์ด้วย binary logistic regression ทั้งการวิเคราะห์แบบ

ตัวแปรเดียว (univariable analysis) เพื่อแสดงภาพรวมของความสัมพันธ์และการวิเคราะห์หลายตัวแปร (multivariable analysis) เพื่อปรับ confounding variable ที่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาความสัมพันธ์ โดยในการวิเคราะห์ที่ใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2021, Stata Version 18 SE (Stata Corp LLC, College Station, USA), R Version 4.3.2 (R Foundation for Statistical Computing, Austria) และ RStudio Version 2024.09.0-375 (Posit PBC, USA)

จริยธรรมการวิจัย

ได้รับการอนุมัติการรับรองด้านจริยธรรม (COA. MURA2023/253) จากคณะกรรมการจริยธรรมและการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อวันที่ 7 มีนาคม พ.ศ. 2566

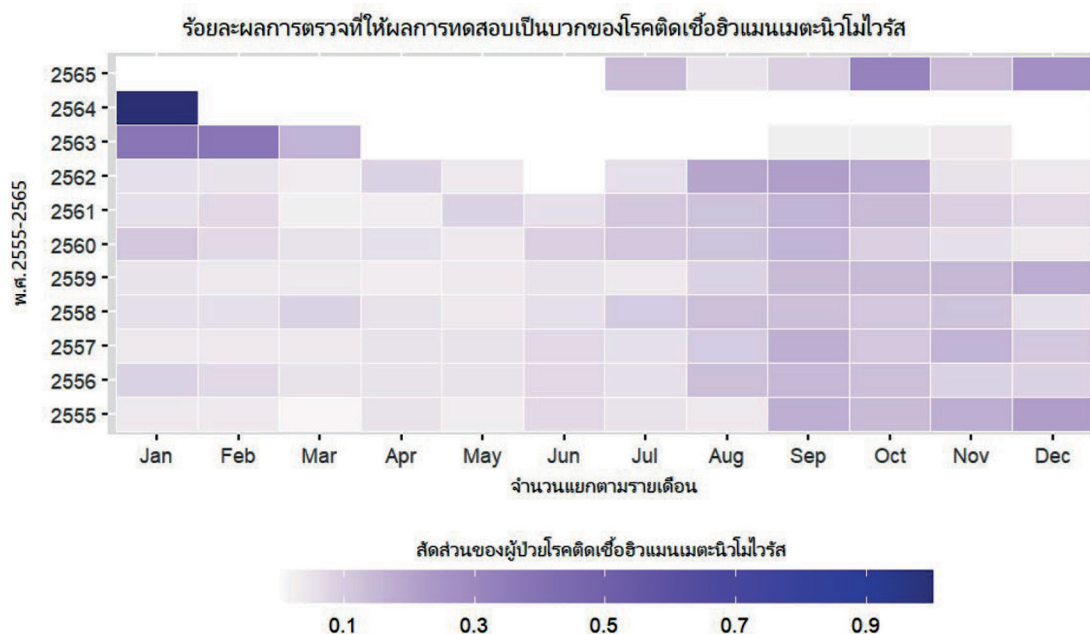
ผล

การศึกษาข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ ของผู้ป่วยจำนวน 41,261 ราย จากตัวอย่างของผู้ป่วยที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ พบผู้ติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัส ร้อยละ 7.17 (2,959/41,261) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555-2565 พบความชุกของผู้ติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสในแต่ละปี คิดเป็นร้อยละ 6.13 (169/2,757), 9.79 (417/4,261), 7.09 (330/4,655), 10.13 (573/5,657), 5.11 (401/7,844), 9.78 (606/6,194), 5.85 (209/3,575), 6.53 (186/2,847), 2.85 (45/1,580), 0.12 (1/831) และ 2.08 (22/1,060) ตามลำดับ

จากการศึกษาความถี่ของการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสในช่วงเดือนต่างๆ จากข้อมูลในปี พ.ศ. 2555-2565 พบความชุกของผู้ติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสในเดือนเดียวกันของแต่ละปี ตั้งแต่มกราคม ถึง ธันวาคม คิดเป็นร้อยละ 5.84 (217/3,716), 5.04 (179/3,550), 4.20 (145/3,449), 5.08 (141/2,775), 4.64 (129/2,780), 6.02 (186/3,088), 6.17 (230/3,727), 8.40 (339/4,038), 11.46 (455/3,969),

9.97 (358/3,589), 9.36 (311/3,321) และ 8.25 (269/3,259) ตามลำดับ ความถี่ของการตรวจพบเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัส พบจำนวนเพิ่มสูงขึ้นในช่วง พ.ศ. 2556-2560 และมีค่าสูงสุดในปี พ.ศ. 2558 การตรวจพบเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในช่วงเดือนกันยายนถึง พฤศจิกายน หลังจากนั้นการตรวจพบเชื้อลดลงในช่วง

พ.ศ. 2563-2564 ซึ่งอยู่ในช่วงการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในช่วงครึ่งปีหลังของปี พ.ศ. 2565 สัดส่วนของผลการตรวจพบเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสของเดือนเดียวกันในแต่ละปีในช่วงปี พ.ศ. 2555-2565 ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สัดส่วนของผู้ติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัส จำแนกเป็นรายเดือนระหว่างปี พ.ศ. 2555-2565

การวิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจหาเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสทั้งสิ้น 39,685 ราย พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงตรวจพบการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัส คิดเป็นร้อยละ 7.67 (19,064/39,685) และเพศชาย ร้อยละ 6.61 (20,621/39,685) การจำแนกข้อมูลตามกลุ่มอายุ พบว่ามีอัตราการตรวจพบการติดเชื้อสูงสุดในเด็กเล็ก (toddler) ร้อยละ 10.23 (479/4,682)

ขณะที่ตรวจพบการติดเชื้อในผู้สูงอายุอยู่ที่ร้อยละ 3.61 (233/6,456) โดยสิ่งส่งตรวจชนิด Nasopharyngeal aspirate มีอัตราการตรวจพบเชื้อสูงถึงร้อยละ 8.54 (79/925) ขณะที่ Nasal swab มีอัตราการตรวจพบเชื้ออยู่ที่ร้อยละ 5.82 (1,029/17,683) และมีค่า p -value สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด มีค่าน้อยกว่า 0.001 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแพร่กระจายของการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสจำแนกตามลักษณะประชากรและตัวอย่าง

Factors		Number	hMPV				<i>p</i> -value
			P	(%)	N	(%)	
Sex	Female	19,064 (48.04%)	1,462	7.67	17,602	92.33	< 0.001
	Male	20,621 (51.96%)	1,364	6.61	19,257	93.39	
Age	Newborn	135 (0.52%)	3	2.22	132	97.78	< 0.001
	Infant	3,737 (14.46%)	275	7.36	3,462	92.64	
	Toddler	4,682 (18.11%)	479	10.23	4,203	89.77	
	Preschooler	2,852 (11.03%)	300	10.52	2,552	89.48	

ตารางที่ 1 การแพร่กระจายของการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสจำแนกตามลักษณะประชากรและตัวอย่าง (ต่อ)

Factors		Number	hMPV				p-value
			P	(%)	N	(%)	
	School-aged child	1,792 (6.93%)	72	4.02	1,720	95.98	
	Adolescent	749 (2.90%)	11	1.47	738	98.53	
	Adult	5,444 (21.06%)	201	3.69	5,243	96.31	
	Elderly	6,456 (24.98%)	233	3.61	6,223	96.39	
Specimen	Nasopharyngeal aspirate	925 (2.75%)	79	8.54	846	91.46	< 0.001
	Nasopharyngeal swab	10,827 (32.33%)	975	9.01	9,852	90.99	
	Nasopharyngeal wash	896 (2.67%)	86	9.60	810	90.40	
	Nasal swab	17,683 (52.64%)	1,029	5.82	16,654	94.18	
	Nasal wash	518 (1.54%)	38	7.34	480	92.66	
	Throat swab	2,743 (8.17%)	216	7.87	2,527	92.13	
COVID-19 pandemic	After	3,471 (8.41%)	68	1.96	3,403	98.04	< 0.001
	Before	37,790 (91.58%)	2,891	7.65	34,899	92.35	

หมายเหตุ: hMPV = Human metapneumovirus, p-value = probability value, P = Positive และ N = Negative

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสแบบ univariable analysis พบว่าเพศหญิงมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสสูงกว่าในเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$, Odds Ratio (OR) = 1.17, 95% confidence interval (95% CI) = 1.09–1.27) เมื่อวิเคราะห์ตามกลุ่มอายุ โดยอ้างอิงกับกลุ่ม adult พบว่าในกลุ่ม infant ($p < 0.001$, OR = 2.07, 95% CI = 1.72–2.50), toddler ($p < 0.001$, OR = 2.97, 95% CI = 2.51–3.52) และ preschooler ($p < 0.001$, OR = 3.07, 95% CI = 2.55–3.69) มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสสูงกว่า adult อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลของชนิดสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์เพื่ออธิบายความแตกต่างของการตรวจพบเชื้อในบริบทของการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ เมื่ออ้างอิงกับ NS พบว่า NPA ($p = 0.001$, OR = 1.51, 95% CI = 1.19–1.92), NPS ($p < 0.001$, OR = 1.60, 95% CI = 1.46–1.75), NPW ($p < 0.001$, OR = 1.72, 95% CI = 1.36–2.16) และ TS ($p < 0.001$, OR = 1.38, 95% CI = 1.19–1.61) และช่วงก่อนสถานการณ์โรค COVID-19 พบว่ามีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$, OR = 1.42, 95% CI = 1.18–1.67) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสแบบ univariable analysis

Factors	Odds Ratio	95% CI	p-value
Sex	Male	1 (ref)	< 0.001
	Female	1.17	
Age	Adult	1 (ref)	< 0.001
	Newborn	0.59	
	Infant	2.07	
	Toddler	2.97	
	Preschooler	3.07	

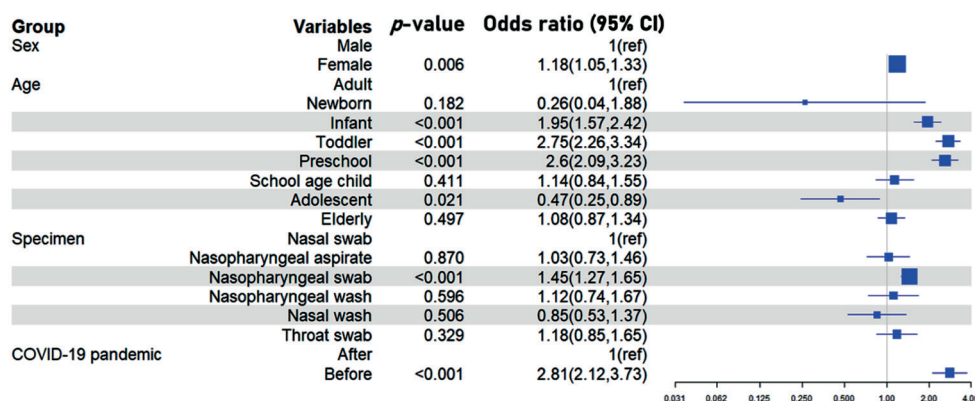
ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับการติดเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัสแบบ univariable analysis (ต่อ)

Factors	Odds Ratio	95% CI	p-value
School-aged child	1.09	0.83–1.44	0.530
Adolescent	0.39	0.21–0.72	0.002
Elderly	0.98	0.81–1.18	0.810
Specimen			
Nasal swab	1 (ref)		
Nasopharyngeal aspirate	1.51	1.19–1.92	0.001
Nasopharyngeal swab	1.60	1.46–1.75	< 0.001
Nasopharyngeal wash	1.72	1.36–2.16	< 0.001
Nasal wash	1.28	0.92–1.79	0.149
Throat swab	1.38	1.19–1.61	< 0.001
COVID-19 pandemic			
After	1 (ref)		
Before	1.42	1.18–1.67	< 0.001

หมายเหตุ: p-value = probability value และ 95% CI = 95% Confidence Interval

การวิเคราะห์แบบ multivariable analysis ได้คัดเลือกตัวแปรจากการวิเคราะห์แบบ univariable analysis โดยพิจารณาจากปัจจัยจากตัวแปรที่มีความสำคัญ ได้แก่ เพศชาย กลุ่มผู้ใหญ่ ตัวอย่าง NS และ ช่วงหลังการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 เพื่อควบคุมปัจจัยกวนที่อาจมีผลต่อการติดเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัส ผลการวิเคราะห์พบว่าเพศหญิงมีแนวโน้มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัสสูงกว่าเพศชาย (OR = 1.18, $p = 0.006$) แม้ว่าไม่ถึงระดับที่มีนัยสำคัญทางสถิติ การจำแนกตามกลุ่มอายุพบว่า กลุ่มเด็กเล็ก (Toddler) มีความเสี่ยงสูงกว่ากลุ่มอ้างอิง (OR = 2.75, $p < 0.001$) รองลงมา คือ กลุ่มเด็กวัยอนุบาล

(Preschooler) (OR = 2.60, $p < 0.001$) และกลุ่มเด็กทารก (Infant) (OR = 1.95, $p < 0.001$) ขณะที่กลุ่มผู้สูงอายุ มีความเสี่ยงน้อยกว่ากลุ่มอ้างอิง นอกจากนี้ เมื่อพิจารณา ผลกระทบของการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 โดยเปรียบเทียบช่วงเวลาก่อน และหลังสถานการณ์การแพร่ระบาดพบว่าช่วงก่อนการแพร่ระบาดพบความสัมพันธ์กับการตรวจพบ เชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัสสูงกว่าช่วงหลังการแพร่ระบาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR = 2.81, $p < 0.001$) รายละเอียดการวิเคราะห์แบบ multivariable analysis ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการติดเชื้อฮิวแมนเมตานิวโมไวรัสด้วย multivariable logistic regression model และ adjusted odds ratio

วิจารณ์

จากการศึกษาย้อนหลังในช่วงระยะเวลาเวลา 11 ปี ที่ผ่านมา ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555-2565 พบผู้ป่วยทั้งหมด 41,261 ราย และพบผู้ติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิโมไวรัส จำนวน 2,959 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.17 ซึ่งใกล้เคียงกับ รายงานของ Yahia S และคณะ⁽²²⁾ ที่พบความชุกโดยรวม ร้อยละ 8 (95% CI = 6.1-10.4) สะท้อนให้เห็นว่าความชุก ของเชื้อฮิวแมนเมเตนิโมไวรัสในผู้ป่วยระบบทางเดิน หายใจมีความใกล้เคียงกันในหลายประเทศ อย่างไรก็ตามความชุกที่ต่ำกว่าการศึกษาของ Lamichhane J และคณะ⁽²³⁾ ซึ่งรายงานถึงร้อยละ 13.3 อาจอธิบายได้ จากความแตกต่างด้านช่วงอายุของกลุ่มตัวอย่างที่เน้น ศึกษาการติดเชื้อทางเดินหายใจเฉียบพลันในเด็ก (acute respiratory infections, ARIs) เกณฑ์การคัดเลือก ผู้ป่วย รวมถึงบริบททางระบาดวิทยาและฤดูกาลของแต่ละประเทศ ซึ่งมีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส ระบบทางเดินหายใจ การที่พบความชุกสูงสุดในปี พ.ศ. 2558 และลดลงอย่างชัดเจนในช่วงที่มีการแพร่ระบาดของ โรค COVID-19 ระหว่างปี พ.ศ. 2563-2565 มีความเป็นไปได้ว่าเกิดจากมาตรการสาธารณสุข เช่น การสวมหน้ากากอนามัย การเว้นระยะห่างทางสังคม และการปิดสถานศึกษา ส่งผลต่อการลดการแพร่กระจาย ของไวรัสระบบทางเดินหายใจหลายชนิดไม่เฉพาะ ฮิวแมนเมเตนิโมไวรัสเท่านั้น สอดคล้องกับรายงาน การลดลงของเชื้อระบบทางเดินหายใจอื่นๆ ในช่วง การแพร่ระบาดของโรค COVID-19 ทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศ⁽²⁴⁾

การวิเคราะห์ความชุกของการติดเชื้อฮิวแมน เมเตนิโมไวรัสตามฤดูกาล พบความชุกของการติดเชื้อสูง ในช่วงเดือนกันยายน ถึง พฤศจิกายน ซึ่งเป็นช่วง ปลายฤดูฝนต้นฤดูหนาวของประเทศไทย แตกต่างจาก การศึกษาของ Lamichhane J และคณะ ที่พบ ความชุกสูงในช่วงปลายฤดูหนาว^(23,25) ซึ่งความแตกต่างนี้ อาจเกิดจากลักษณะภูมิอากาศ ลักษณะทางภูมิศาสตร์ และพฤติกรรมของประชากรที่ไม่เหมือนกัน ผลการ ศึกษาชี้ให้เห็นว่าเชื้อฮิวแมนเมเตนิโมไวรัส สามารถ แพร่ระบาดได้ตลอดทั้งปี มีช่วงความชุกสูงสุดและต่ำสุด แตกต่างกันในแต่ละประเทศ การศึกษานี้พบว่า

เพศหญิงมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคติดเชื้อฮิวแมน เมเตนิโมไวรัสสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yahia S และคณะ⁽²²⁾ รวมถึง การศึกษาในประเทศไทยจากคณะผู้วิจัยโรงพยาบาล ศิริราช และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่พบแนวโน้มของเชื้อ ไวรัสระบบทางเดินหายใจบางชนิดสูงในเพศหญิง^(19,20) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย อย่างไรก็ตามประเด็นนี้ ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเพื่ออธิบายความแตกต่าง ดังกล่าว ในด้านอายุพบว่ากลุ่มเด็กอายุ 3-6 ปี (preschooler) และ 1-3 ปี (toddler) มีความชุกใน การติดเชื้อสูงที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาทั้งในประเทศ และต่างประเทศที่รายงานว่าเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี เป็น กลุ่มเสี่ยงสำคัญต่อการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิโมไวรัส⁽²⁵⁻²⁷⁾ รวมถึงงานวิจัยในประเทศไทยที่รายงานการตรวจพบ เชื้อฮิวแมนเมเตนิโมไวรัสในเด็กเล็กที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันใน สัดส่วนที่สูง^(17,28,29) อาจอธิบายได้จากระบบภูมิคุ้มกัน ที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ การอยู่ร่วมกันในสถานรับเลี้ยง เด็กหรือโรงเรียนอนุบาล และการสัมผัสกันแบบใกล้ชิด ในขณะที่กลุ่มวัยรุ่นในช่วงอายุ 12-18 ปี (adolescent) พบความชุกต่ำที่สุด อาจสะท้อนถึงการมีภูมิคุ้มกันจาก การติดเชื้อในอดีต สำหรับตัวอย่าง NPS จะมีอัตรา การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสฮิวแมนเมเตนิ โมไวรัสที่สูงกว่าตัวอย่างชนิดอื่น และตรวจพบสาร พันธุกรรมได้น้อยที่สุดในตัวอย่าง NS อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่ได้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินหรือ เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิดหรือ เพื่อการเฝ้าระวังทางโมเลกุล (molecular surveillance) ดังนั้นผลการทดสอบที่ได้จึงเป็นการแปลผลการ ทดสอบภายใต้ขอบเขตของการศึกษาเท่านั้น

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าปัจจัย บางตัวมีนัยสำคัญในการวิเคราะห์แบบ univariable analysis แต่ไม่คงอยู่ใน multivariable analysis อาจเกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (confounding factors) โดยเฉพาะอายุและฤดูกาลที่มีความเชื่อมโยงกัน การใช้ multivariable analysis จึงช่วยสะท้อนแต่ละ ปัจจัยได้ดียิ่งขึ้น และความแตกต่างของผลลัพธ์ดังกล่าว ควรตีความว่าเป็นข้อจำกัดของการวิเคราะห์เชิงสถิติ

มากกว่าความขัดแย้งของผลการศึกษา การศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัดในเรื่องแหล่งข้อมูลได้มาจากแหล่งเดียวทำให้พบความชุกของการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสเฉพาะที่ศึกษาเท่านั้น หากมีการศึกษาข้อมูลจากหลายที่เพิ่มมากขึ้นจะช่วยเพิ่มความหลากหลายของข้อมูลทำให้สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสได้อย่างครอบคลุม มีความถูกต้อง และทราบถึงปัจจัยเสี่ยงกับเชื้อชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น

สรุป

จากข้อมูลการตรวจวิเคราะห์เชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี พบว่าการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสมีความชุกมากในช่วงเดือนตุลาคม ถึง พฤศจิกายน ซึ่งเป็นช่วงปลายฤดูฝนต้นฤดูหนาว เพศหญิงมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสสูงมากกว่าเพศชาย และกลุ่มอายุระหว่าง 1-6 ปี เป็นกลุ่มที่พบการติดเชื้อสูงกว่าช่วงอายุอื่น สะท้อนให้เห็นว่าเด็กเล็กเป็นกลุ่มเสี่ยงสำคัญต่อการติดเชื้อชนิดนี้ ข้อมูลจากการศึกษานี้ช่วยให้เข้าใจลักษณะทางระบาดวิทยาของการติดเชื้อฮิวแมนเมเตนิวโมไวรัสในด้านช่วงเวลา เพศ และอายุของผู้ป่วย สามารถนำข้อมูลไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับเตรียมความพร้อมทางด้านการแพทย์ และสาธารณสุขในการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจได้อย่างเหมาะสมยิ่งขึ้น

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ผู้วิจัยได้ใช้ปัญญาประดิษฐ์ ChatGPT (Open AI, USA) เพื่อช่วยในการตรวจสอบความถูกต้องของไวยากรณ์ ปรับปรุงโครงสร้างประโยค ไม่ได้นำมาใช้ในการสร้างข้อมูล ผลทดสอบ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ หรือมีส่วนในการตัดสินใจเชิงวิชาการ ข้อมูลทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา การวิเคราะห์ทางสถิติ การแปลผล และการสรุปผล ได้ดำเนินการโดยผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ขอขอบคุณ รศ.ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค ดร.เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาพยาธิวิทยา และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ส่งเสริมและสนับสนุนการศึกษานี้ ขอขอบคุณ รศ.ดร.ศศิวิมล รัตนสิรินางสาวศศิภรณ์ ลิทธิศร นายพงศ์สันต์ จักรแสงเจริญ และ นางสาวณรดา รัตนไพบูลย์ ที่ได้ให้การช่วยเหลือและแนะนำการใช้งานโปรแกรมวิเคราะห์ทางด้านสถิติ

เอกสารอ้างอิง

1. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7(6): 719-24.
2. Uddin S, Thomas M. Human metapneumovirus. [Updated 2023 Jul 17]. In: StatPearls. [online]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2026. [cited 2025 Aug 18]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560910>.
3. Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Int J Infect Dis* 2014; 25: 45-52.
4. Schildgen V, van den Hoogen B, Fouchier R, Tripp RA, Alvarez R, Manoha C, et al. Human metapneumovirus: lessons learned over the first decade. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24(4): 734-54.
5. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Côté S, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002; 186(9): 1330-4.

6. Haas LE, Thijsen SF, van Elden L, Heemstra KA. Human metapneumovirus in adults. *Viruses* 2013; 5(1): 87-110.
7. Shafagati N, Williams J. Human metapneumovirus-what we know now. *F1000Res* 2018; 7: 135. (11 pages).
8. Wang X, Li Y, Deloria-Knoll M, Madhi SA, Cohen C, Ali A, et al. Global burden of acute lower respiratory infection associated with human metapneumovirus in children under 5 years in 2018: a systematic review and modelling study. *Lancet Glob Health* 2021; 9(1): e33-e43.
9. Divarathna MVM, Rafeek RAM, Noordeen F. A review on epidemiology and impact of human metapneumovirus infections in children using TIAB search strategy on PubMed and PubMed Central articles. *Rev Med Virol* 2020; 30: e2090. (23 pages).
10. Zhao H, Feng Q, Feng Z, Zhu Y, Ai J, Xu B, et al. Clinical characteristics and molecular epidemiology of human metapneumovirus in children with acute lower respiratory tract infections in China, 2017 to 2019: a multicentre prospective observational study. *Virol Sin* 2022; 37(6): 874-82.
11. Khaled P, Razizadeh MH, Ghorbani S, Tameshkel FS, Saadati H, Vazirzadeh M, et al. The prevalence and role of human metapneumovirus in respiratory tract infections: a systematic review and meta-analysis of global data. *EClinicalMedicine* 2025; 88: 103480. (15 pages).
12. Mu T, Pei J, Wang J, Niu L, Wu Z. Epidemiology and genetic diversity of human metapneumovirus in patients with severe acute respiratory infection from 2023 to 2024 in Ningxia, China. *Diseases* 2025; 13(8): 255. (13 pages).
13. Min X, Wang Y, Dong X, Dong X, Wang N, Wang Z, et al. Epidemiological characteristics of human metapneumovirus among children in Nanjing, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2024; 43(7): 1445-52.
14. Kivit C, Groen K, Jongbloed M, Linssen C, van Loo A, van Gorp E, et al. An off-season outbreak of human metapneumovirus infections after ending of a COVID-19 lockdown. *J Infect* 2022; 84(5): 722-46.
15. Thongpan I, Suntronwong N, Vichaiwattana P, Wanlapakorn N, Vongpunswad S, Poovorawan Y. Respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and influenza virus infection in Bangkok, 2016-2017. *PeerJ* 2019; 7: e6748. (17 pages).
16. Esper F, Martinello RA, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged < 5 years. *J Infect Dis* 2004; 189(8): 1388-96.
17. Samransamruajkit R, Thanasugarn W, Prapphal N, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Human metapneumovirus in infants and young children in Thailand with lower respiratory tract infections; molecular characteristics and clinical presentations. *J Infect* 2006; 52(4): 254-63.
18. Davis CR, Stockmann C, Pavia AT, Byington CL, Blaschke AJ, Hersh AL, et al. Incidence, morbidity, and costs of human metapneumovirus infection in hospitalized children. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2016; 5(3): 303-11.
19. Horthongkham N, Athipanyasilp N, Sirijatuphat R, Assanasen S, Sutthent R. Prevalence and molecular characterization of human metapneumovirus in influenza a negative sample in Thailand. *J Clin Lab Anal* 2014; 28(5): 398-404.

20. Teeratakulpisarn J, Ekalaksananan T, Pientong C, Limwattananon C. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus detection in young children with acute bronchiolitis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2007; 25(2-3): 139-45.
21. Pavlin JA, Hickey AC, Ulbrandt N, Chan YP, Endy TP, Boukhvalova MS, et al. Human metapneumovirus reinfection among children in Thailand determined by ELISA using purified soluble fusion protein. *J Infect Dis* 2008; 198(6): 836-42.
22. Yahia S, Kandeel AY, Hammad E, El-Gilany AH. Human metapneumovirus (hMPV) in acute respiratory infection: a clinic-based study in Egypt. *Indian J Pediatr* 2012; 79(10): 1323-7.
23. Lamichhane J, Upreti M, Nepal K, Upadhyay BP, Maharjan U, Shrestha RK, et al. Burden of human metapneumovirus infections among children with acute respiratory tract infections attending a Tertiary Care Hospital, Kathmandu. *BMC Pediatr* 2023; 23(1): 388. (9 pages).
24. Jirapaiboonsuk S. Emerging viral respiratory tract infection: human metapneumovirus (hMPV). *Vajira Med J*. [serial online]. 2009; [cited 2025 Aug 18]; 53(1): 101-8. Available from: URL: <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/VMED/article/view/388/331>.
25. Rodriguez PE, Frutos MC, Adamo MP, Cuffini C, Cámara JA, Paglini MG, et al. Human metapneumovirus: epidemiology and genotype diversity in children and adult patients with respiratory infection in Córdoba, Argentina. *PLoS One* 2020; 15(12): e0244093. (12 pages).
26. Panasik A, Pancer K. Zakazenia metapneumowirusem człowieka (hMPV) u małych dzieci [Human metapneumovirus (HMPV) infections in young children]. *Przegl Epidemiol* 2009; 63(3): 369-74.
27. Jallow MM, Fall A, Kiori D, Sy S, Goudiaby D, Barry MA, et al. Epidemiological, clinical and genotypic features of human metapneumovirus in patients with influenza-like illness in Senegal, 2012 to 2016. *BMC Infect Dis* 2019; 19(1): 457. (9 pages).
28. ณัฐ ภมรประวัติ. Human metapneumovirus ในคนไข้ที่เป็น SARS. รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา ประจำสัปดาห์ 2546; 34(41): 770-1.
29. Rakmanee K, Watthanachockchai T, Yutthanakarnwikom P, Pasomsub E. A ten-year retrospective study on patterns of pathogens in acute respiratory tract infection at Ramathibodi Hospital, Thailand. *Bull Dept Med Sci*. 2025; 67(4): 611-24.

A Retrospective Study of Respiratory Tract Infections Caused by Human Metapneumovirus in Patients at Ramathibodi Hospital Between 2012-2022

Treewat Watthanachockchai¹, Kingkan Rakmanee¹, Pichet Yutthanakarnwikom¹,
Manutsanun Boonyanuwat², Sirapichaya Phlykaew², Praphan Suksudej³,
Vorthunju Nakhonsri⁴, Wuttipong Jaihan⁵, and La-or Chailurkit⁶

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

²Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Molecular laboratory, Labhouse (Chonburi Co., Ltd.), Chonburi 20000, Thailand

⁴National Biobank of Thailand, National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani 12120, Thailand

⁵Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

⁶Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

ABSTRACT Human metapneumovirus (hMPV) is a significant etiological agent of respiratory infections on a global scale. A study of 41,261 patients from the Virology Laboratory at the Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, conducted between 2012 and 2022, identified 2,959 cases of hMPV infection, representing a prevalence of 7.17%. The study found that the period between September and November 2015 exhibited the highest infection rates. A statistically significant disparity was observed in the infection rate between males and females, with females exhibiting a higher prevalence of infection (11.46%) compared to males (p -value = 0.006, OR = 1.18, 95% CI = 1.05-1.33). This difference was particularly pronounced in the month of September. Preschool children aged 3-6 years exhibited the highest prevalence (10.52%), while adolescents aged 12-18 years demonstrated the lowest prevalence (1.47%). The highest

risk of infection was identified in toddlers aged 1 to 3 years ($p < 0.001$, OR = 2.75, 95% CI = 2.26–3.34). Nasopharyngeal swabs exhibited a higher frequency of viral presence compared to other sample types ($p < 0.001$, OR = 1.45, 95% CI = 1.27–1.65). The study's findings suggest that hMPV is prevalent across all age groups, particularly among young children. This information can be utilized to optimize the operational readiness of medical laboratories. It can inform crucial decisions regarding the allocation of personnel, materials, equipment, and medical instruments, thereby facilitating the effective and adequate management of hMPV outbreaks and ensuring the provision of adequate medical services.

Keywords: Human metapneumovirus, Retrospective study, Age distribution, Seasonal variation

การศึกษาการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำในระบบเอกซเรย์ดิจิทัลในโรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี

ณัฐยา เหล่าศิริ

กลุ่มงานรังสีวินิจฉัยและเวชศาสตร์นิวเคลียร์ โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34000

บทคัดย่อ เอกซเรย์ทรวงอกเป็นการตรวจทางรังสีวินิจฉัยที่ทำบ่อยที่สุดอย่างหนึ่ง อย่างไรก็ตามการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำยังเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพการให้บริการ เพิ่มการได้รับรังสีโดยไม่จำเป็นแก่ผู้รับบริการ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาแนวทางลดอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำในระบบเอกซเรย์ดิจิทัล โดยศึกษาจากผู้รับบริการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอก โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี จำนวน 4,841 ราย ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2567 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2567 เก็บรวบรวมข้อมูลจากระบบ PACS (Picture Archiving and Communication System) ระบบ HIS (Hospital Information System) และระบบจัดเก็บข้อมูลของเครื่องเอกซเรย์ทั่วไประบบดิจิทัล ขนาด 1,000 mA ผลการศึกษาพบว่าการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำ 174 ครั้ง คิดเป็นร้อยละ 3.59 สาเหตุหลักเนื่องจากการหายใจเข้าไม่เต็มที่ 101 ครั้ง (ร้อยละ 58.05) สิ่งแปลกปลอมในภาพ 45 ครั้ง (ร้อยละ 25.86) และการจัดท่าไม่ถูกต้อง 18 ครั้ง (ร้อยละ 10.34) การวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าดัชนีมวลกาย เชื้อชาติ และประเภทผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่เพศและอายุพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ สรุปได้ว่าการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำส่วนใหญ่เกิดจากปัจจัยด้านกระบวนการทำงาน ได้แก่ การสื่อสารกับผู้ป่วย การเตรียมผู้ป่วย การตรวจสอบก่อนถ่ายภาพ และทักษะของนักรังสี การแพทย์ซึ่งสามารถปรับปรุงได้ การพัฒนากระบวนการทำงานและการติดตามการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำอย่างต่อเนื่องจะช่วยลดการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำ ลดการได้รับรังสีที่ไม่จำเป็น เพิ่มคุณภาพของภาพเอกซเรย์ และยกระดับคุณภาพมาตรฐานงานรังสีวินิจฉัย

คำสำคัญ: การถ่ายภาพรังสีทรวงอก, เอกซเรย์ดิจิทัล, การถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำ, อัตราการเกิดการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำ

Corresponding author E-mail: nattaya.laosiri@gmail.com

Received: 2 February 2026

Revised: 4 June 2026

Accepted: 9 June 2026

บทนำ

การเอกซเรย์ทรวงอก (chest X-ray) เป็นการตรวจทางรังสีวิทยาอย่างหนึ่งโดยถ่ายภาพทรวงอกด้วยรังสีเอกซ์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยภาวะต่างๆ เกี่ยวกับทรวงอก อวัยวะภายใน และโครงสร้างข้างเคียง การเอกซเรย์ทรวงอกเป็นการถ่ายภาพเอกซเรย์ที่ทำบ่อยที่สุดอย่างหนึ่งช่วยในการวินิจฉัยโรคและภาวะต่างๆ ได้อย่างรวดเร็วและมีต้นทุนที่ไม่สูง⁽¹⁾ ในปัจจุบันกลุ่มงานรังสีวินิจฉัยและเวชศาสตร์นิวเคลียร์ โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี ได้ใช้เทคโนโลยีการถ่ายภาพเอกซเรย์ดิจิทัล (Digital Radiography: DR) ซึ่งเป็นระบบที่มีการนำคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยในการสร้างภาพและส่งภาพทางการแพทย์ผ่านระบบ PACS (Picture Archiving and Communication System) การใช้ระบบดิจิทัลนี้มีข้อดีที่สำคัญ เช่น ลดปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยบริการได้รับเมื่อเปรียบเทียบกับภาพถ่ายเอกซเรย์แบบฟิล์ม และช่วยให้การดูภาพย้อนหลังสามารถทำได้ง่ายขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพในการให้บริการ อย่างไรก็ตาม การถ่ายภาพเอกซเรย์ดิจิทัลยังมีปัญหา คือ การถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำ (repeat X-ray) ซึ่งเกิดจากหลายปัจจัย เช่น การจัดท่าผู้ป่วยที่ไม่เหมาะสม การเคลื่อนไหวขณะถ่ายภาพ การตั้งค่าทางเทคนิคไม่เหมาะสม ความผิดพลาดจากอุปกรณ์ หรือแม้แต่พยาธิสภาพผู้ป่วยที่ทำให้ไม่สามารถให้ความร่วมมือในการตรวจได้ ทำให้ผู้ป่วยได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นโดยไม่จำเป็น ส่งผลกระทบต่อหลักการป้องกันอันตรายจากรังสี (radiation protection)⁽²⁾ และเพิ่มภาระงานให้กับบุคลากรทางการแพทย์ ตลอดจนทำให้เกิดความล่าช้าในการวินิจฉัย การศึกษาการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำจึงมีความสำคัญเพื่อระบุอัตราและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำ และเป็นแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพการบริการ

ผู้วิจัยเลือกที่จะศึกษาการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำในระบบเอกซเรย์ดิจิทัลในโรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี เนื่องจากพบว่าการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำมีจำนวนสูงที่สุดโดยในปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 (1 ตุลาคม พ.ศ. 2566 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2567)

มีผู้รับบริการเอกซเรย์ทั้งหมด 24,047 ราย เป็นการเอกซเรย์ทรวงอก 22,886 ราย รองลงมา คือ เอกซเรย์ช่องท้อง 833 ราย และการถ่ายภาพเอกซเรย์กระดูกสันหลัง 187 ราย ตามลำดับ มีการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำทั้งหมด 415 ครั้ง มีการเอกซเรย์ซ้ำในการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอก 340 ครั้ง ซึ่งการศึกษานี้จะช่วยค้นหาอัตราและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำในระบบเอกซเรย์ดิจิทัล รวมถึงการกำหนดแนวทางในการป้องกันและแก้ไข เพื่อลดความเสี่ยงจากการได้รับรังสีที่ไม่จำเป็น เพิ่มประสิทธิภาพการบริการและพัฒนาคุณภาพงานให้ดีขึ้นในระยะยาว การวิจัยนี้ยังจะช่วยในการระบุปัจจัยที่อาจมีผลต่อการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำ เช่น อายุ เพศ ดัชนีมวลกาย (BMI) หรือเชื้อชาติของผู้ป่วย ซึ่งอาจมีผลต่อการถ่ายภาพไม่ชัดเจน โดยจะสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาแนวทางที่เหมาะสมในการลดอัตราภาพถ่ายเอกซเรย์ซ้ำ และลดการได้รับรังสีเกินความจำเป็นของผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องและใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาแนวทางลดอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำในระบบเอกซเรย์ดิจิทัล โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนาย้อนหลัง (Retrospective descriptive study) กลุ่มตัวอย่าง คือ ผู้ป่วยที่เข้ารับการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกที่กลุ่มงานรังสีวินิจฉัยและเวชศาสตร์นิวเคลียร์ โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี ในระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2567 ถึง วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2567 จำนวน 4,841 ราย

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาและวัดผล

เก็บรวบรวมข้อมูลจากระบบ PACS (Picture Archiving and Communication System), ระบบ HIS (Hospital Information System) และระบบจัดเก็บข้อมูลของเครื่องเอกซเรย์ทั่วไประบบดิจิทัล

ขนาด 1,000 mA (ARCOMA) รุ่น INTUITION (Arcoma AB, Sweden) จำนวน 2 ห้อง ดังแสดงในภาพที่ 1 แบบบันทึกข้อมูลการถ่ายภาพเอกซเรย์

ทรวงอกซ้ำดังแสดงในภาพที่ 2 และโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ Microsoft Excel และ STATA



ภาพที่ 1 เครื่องเอกซเรย์ทั่วไประบบดิจิทัลขนาด 1,000 mA (ARCOMA, รุ่น INTUITION) จำนวน 2 ห้อง (ที่มา: โดยผู้วิจัยกลุ่มงานรังสีวินิจฉัยและเวชศาสตร์นิวเคลียร์ โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี)

ลำดับ	วันที่ตรวจ	Patient ID	เพศ	อายุ	BMI	ประเภทผู้ป่วย	เชื้อชาติ	Repeat (Y/N)	Reject Reason

ภาพที่ 2 แบบบันทึกข้อมูลการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ

วิธีการเก็บข้อมูล

การเก็บรวบรวมข้อมูลในการวิจัยนี้ได้ขออนุญาต และผ่านการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการจริยธรรม การวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี ก่อนดำเนินการวิจัย เก็บรวบรวมจำนวนครั้งของการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำและสาเหตุของการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ จากระบบจัดเก็บข้อมูลของเครื่องเอกซเรย์ทั่วไประบบดิจิทัลทั้ง 2 ห้อง สืบค้นและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องจากระบบ PACS และ HIS โดยข้อมูลที่เก็บรวบรวม ประกอบด้วย ข้อมูลประชากรของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย (body mass index: BMI)

เชื้อชาติ และประเภทผู้ป่วย ข้อมูลทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel และ STATA ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ความถี่ (frequency) และร้อยละ (percentage) เพื่ออธิบายอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำและสาเหตุการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำ รวมถึงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ทางสถิติ ได้แก่ เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย (BMI) เชื้อชาติ และประเภทผู้ป่วย กับอัตรา

การถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ โดยใช้การทดสอบไคสแควร์ (Chi-square test) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

จริยธรรมวิจัยในมนุษย์

การวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี เลขที่ EC 009/2025 ลงวันที่ 15 สิงหาคม พ.ศ. 2568

ตารางที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย ($n = 4,841$)

ข้อมูลทั่วไป	จำนวน (คน)	ร้อยละ
เพศ		
เพศชาย	1,547	31.95
เพศหญิง	3,294	68.05
กลุ่มอายุ		
< 15 ปี	0	-
15-44 ปี	1,262	26.07
45-64 ปี	2,084	43.05
≥ 65 ปี	1,495	30.88
อายุเฉลี่ย±SD	52.41±13.54 ปี	-
ดัชนีมวลกาย (BMI)		
< 18.5	535	11.05
18.5-22.9	2,152	44.45
23.0-24.9	817	16.88
≥ 25.0	1,337	27.62
เชื้อชาติ		
ไทย	4,520	93.37
อื่นๆ ได้แก่ กัมพูชา ลาว ยุโรป เป็นต้น	321	6.63
ประเภทผู้ป่วย		
ตรวจสุขภาพ	2,726	56.29
ผู้ป่วยทั่วไป ได้แก่ ผู้ป่วย IPD, ผู้ป่วย OPD, ผู้ป่วยนัดติดตามผล เป็นต้น	2,115	43.71

ผล

ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 4,841 ราย พบว่าเป็นเพศหญิงมากที่สุด (ร้อยละ 68.05) อายุเฉลี่ย 52.41 ± 13.54 ปี ดัชนีมวลกาย (BMI) 18.5-22.9 เชื้อชาติไทย (ร้อยละ 93.37) และเป็นการตรวจสุขภาพ (ร้อยละ 56.29) ดังแสดงในตารางที่ 1

การวิเคราะห์สาเหตุของการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำทั้ง 174 ครั้ง พบว่าสาเหตุหลักที่สุด คือ การหายใจเข้าไม่เต็มที่ (poor inspiration) 101 ครั้ง (ร้อยละ 58.05) รองลงมา คือ ภาพเอกซเรย์ที่มีสิ่งแปลกปลอม (image artifact) 45 ครั้ง (ร้อยละ 25.86) การจัดทำทางในการเอกซเรย์ไม่ถูกต้องหรือไม่สมบูรณ์ (positioning error) 18 ครั้ง (ร้อยละ 10.34)

ระบบเอกซเรย์มีความผิดปกติ (machine error) 5 ครั้ง (ร้อยละ 2.87) ผู้ป่วยขยับขณะถ่ายภาพหรือภาพรังสีที่มีการไหวเบลของภาพ (patient movement) 4 ครั้ง (ร้อยละ 2.30) และการตั้งค่าปริมาณรังสีที่ไม่เหมาะสม (exposure error) 1 ครั้ง (ร้อยละ 0.57) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สาเหตุของการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ (n = 174)

สาเหตุของการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ (Reject Reason)	จำนวน (ครั้ง)	ร้อยละ
หายใจเข้าไม่เต็มที่ (poor inspiration)	101	58.05
สิ่งแปลกปลอมในภาพ (image artifact)	45	25.86
การจัดท่าไม่ถูกต้อง (positioning error)	18	10.34
ระบบเอกซเรย์มีความผิดปกติ (machine error)	5	2.87
ผู้ป่วยขยับ (patient movement)	4	2.30
ค่าปริมาณรังสีที่ไม่เหมาะสม (exposure error)	1	0.57
รวม	174	100

อัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ พบว่ามีการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ 174 ครั้ง จากทั้งหมด 4,841 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.59 โดยส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง 119 ครั้ง (ร้อยละ 68.39) กลุ่มอายุ 45-64 ปี 92 ครั้ง (ร้อยละ 52.87) ดัชนีมวลกาย (BMI) ≥ 25.0 89 ครั้ง (ร้อยละ 51.15) ในผู้ป่วยชาวไทย 154 ครั้ง (ร้อยละ 88.51) และเป็นผู้ป่วยทั่วไป 93 ครั้ง (ร้อยละ 53.45) เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์

ระหว่างอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำกับปัจจัยประชากร (เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย เชื้อชาติ ประเภทผู้ป่วย) โดยใช้สถิติวิเคราะห์ไคสแควร์ (Chi-square) พบว่าดัชนีมวลกาย (BMI) เชื้อชาติ และประเภทผู้ป่วย มีความสัมพันธ์กับการเกิดการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่เพศและอายุ ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำกับปัจจัยประชากร (เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย (BMI) เชื้อชาติ ประเภทผู้ป่วย)

ปัจจัยประชากร	เกิดการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ (n = 174)		ไม่เกิดการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ (n = 4,667)		p-value
	จำนวน (คน)	ร้อยละ	จำนวน (คน)	ร้อยละ	
เพศ					0.920
เพศชาย	55	31.61	1,492	31.97	
เพศหญิง	119	68.39	3,175	68.03	
กลุ่มอายุ					0.053
< 15 ปี	0	-	0	-	
15-44 ปี	40	22.99	1,222	26.19	
45-64 ปี	92	52.97	1,992	42.68	
≥ 65 ปี	42	24.14	1,453	31.13	
ดัชนีมวลกาย (BMI)					< 0.001*
< 18.5	15	8.62	520	11.15	
18.5-22.9	49	28.16	2,103	45.06	
23.0-24.9	21	12.07	796	17.06	
≥ 25.0	89	51.15	1,248	26.73	

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำกับปัจจัยประชากร (เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย (BMI) เชื้อชาติ ประเภทผู้ป่วย) (ต่อ)

ปัจจัยประชากร	เกิดการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ (n = 174)		ไม่เกิดการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำ (n = 4,667)		p-value
	จำนวน (คน)	ร้อยละ	จำนวน (คน)	ร้อยละ	
เชื้อชาติ					0.009*
ไทย	154	88.51	4,366	93.55	
อื่นๆ ได้แก่ กัมพูชา ลาว ยุโรป เป็นต้น	20	11.49	301	6.45	
ประเภทผู้ป่วย					0.008*
ตรวจสุขภาพ	81	46.55	2,645	56.67	
ผู้ป่วยทั่วไป ได้แก่ ผู้ป่วย IPD, ผู้ป่วย OPD, ผู้ป่วยนัดติดตามผล เป็นต้น	93	53.45	2,022	43.33	

หมายเหตุ : p-value < 0.05

วิจารณ์

ผลการศึกษาพบว่าอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำเท่ากับร้อยละ 3.59 ซึ่งอยู่ในระดับต่ำกว่ามาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565⁽³⁾ ที่กำหนดให้มีอัตราการถ่ายภาพรังสีซ้ำไม่เกินร้อยละ 8 และต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่มีรายงานวิจัยที่ผ่านมา^(1,4) แสดงให้เห็นว่ากลุ่มงานรังสีวินิจฉัยและเวชศาสตร์นิวเคลียร์สามารถควบคุมคุณภาพภาพทางรังสีได้ในระดับที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำยังคงเป็นประเด็นที่สำคัญในงานคุณภาพบริการ เนื่องจากส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นโดยไม่จำเป็น เพิ่มภาระงานให้กับบุคลากรทางการแพทย์ ตลอดจนทำให้เกิดความล่าช้าในการวินิจฉัย ซึ่งไม่สอดคล้องกับหลักการ As Low As Reasonably Achievable (ALARA) และแนวทางป้องกันอันตรายจากรังสี (radiation protection)⁽²⁾

สาเหตุหลักของการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำในงานวิจัยนี้ คือ การหายใจเข้าไม่เต็มที่ (poor inspiration) คิดเป็นร้อยละ 58.05% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สมหมาย กันทะเมืองลี⁽⁵⁾ และทบวงการพลังงานปรมาณูระหว่างประเทศ (International Atomic Energy Agency: IAEA)⁽²⁾ ที่ระบุว่าการหายใจไม่เต็มที่

เป็นปัญหาพบบ่อยในถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอก เนื่องจากผู้ป่วยอาจหายใจไม่ทันจังหวะการถ่ายภาพ รองลงมาคือ สิ่งแปลกปลอมในภาพ (image artifacts) ร้อยละ 25.86% สอดคล้องกับงานวิจัยของ วัชรกร ปานเนียม และคณะ⁽⁶⁾ พบว่าสิ่งแปลกปลอม เช่น เสื้อผ้าโลหะ เครื่องประดับ หรือสายอุปกรณ์ทางการแพทย์ มักเป็นสาเหตุของภาพซ้ำและสามารถป้องกันได้โดยการตรวจสอบก่อนถ่ายภาพ อย่างไรก็ตามการจัดท่าไม่ถูกต้อง (positioning error) คิดเป็นร้อยละ 10.34% ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Fooks DH และคณะ⁽¹⁾ ที่พบถึงร้อยละ 20 ซึ่งอาจเกิดจากความชำนาญของนักรังสีการแพทย์ ขณะที่ระบบเอกซเรย์มีความผิดปกติ (machine error) ร้อยละ 2.87 และการตั้งค่าปริมาณรังสีที่ไม่เหมาะสม (exposure error) มีเพียงร้อยละ 0.57 แสดงให้เห็นว่าปัญหาหลักของการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำของกลุ่มงานฯ ไม่ได้อยู่ที่เครื่องมือหรือการตั้งค่า แต่เป็นที่ปัจจัยด้านกระบวนการทำงาน (workflow factors) ที่เกิดจากการสื่อสารกับผู้ป่วย การเตรียมตัวผู้ป่วย และทักษะของนักรังสีการแพทย์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ทางสถิติ ผลการศึกษาพบว่าดัชนีมวลกาย (BMI) เชื้อชาติ และประเภทผู้ป่วย มีความสัมพันธ์กับการเกิดการถ่ายภาพ

เอกซเรย์ทรวงอกซ้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีดัชนีมวลกาย (BMI) ≥ 25.0 มีอัตราการเกิดการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำมากที่สุด อาจเกิดจากข้อจำกัดทางสรีระและการควบคุมการหายใจ นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยต่างชาติมีอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำสูงกว่าผู้ป่วยไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ จินตนา รัตนพรชัยวัตร⁽⁷⁾ ที่ระบุว่าความแตกต่างด้านภาษาและวัฒนธรรมอาจส่งผลต่อความเข้าใจคำสั่งจากเจ้าหน้าที่และผู้ป่วยทั่วไปมีอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำสูงกว่ากลุ่มตรวจสุขภาพซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ วัชรกร ปานเนียม และคณะ⁽⁶⁾ ที่อธิบายว่าผู้ป่วยทั่วไปมักมีข้อจำกัดทางร่างกายหรือมีอาการเจ็บป่วยที่ทำให้การควบคุมการหายใจและการจัดทำท่าทำได้ยาก การศึกษานี้พบว่าเพศและอายุไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาพบว่าอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับปัจจัยด้านกระบวนการทำงาน (workflow factors) มากกว่าปัจจัยด้านเทคนิค (technical factors) ดังนั้นแนวทางในการลดอัตราการถ่ายภาพซ้ำควรพัฒนาการสื่อสารกับผู้ป่วย การเตรียมผู้ป่วย การตรวจสอบก่อนการถ่ายภาพ และการพัฒนาทักษะของนักรังสีการแพทย์ รวมทั้งการติดตามผลการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสอดคล้องกับแนวทางของ IAEA⁽²⁾, มาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565⁽³⁾, American College of Radiology (ACR)⁽⁸⁾ และสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติของประเทศไทย⁽⁹⁾

การวางแผนลดอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำควรอาศัยข้อมูลเชิงพรรณนา ได้แก่ ความถี่ ร้อยละ และสาเหตุที่พบบ่อยเป็นหลัก ขณะที่ค่า p -value มีบทบาทในการสนับสนุนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ทางสถิติ และช่วยระบุปัจจัยที่ควรได้รับการเฝ้าระวังหรือปรับปรุงเพิ่มเติม ข้อจำกัดของการศึกษานี้ คือ เป็นการวิจัยย้อนหลังเชิงพรรณนา จึงมีโอกาสคลาดเคลื่อนจากความถูกต้องของข้อมูลที่บันทึก และยังไม่ได้รวมปัจจัยด้านเทคนิคอื่นๆ เช่น ค่าความต่างศักย์ของหลอดเอกซเรย์ (kilovolt peak: kVp) ค่ากระแสไฟฟ้าคูณเวลา

(milliampere-seconds: mAs) ระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดรังสีกับตัวรับภาพ (Source-to-Image Distance: SID) ค่าดัชนีชี้วัดปริมาณรังสี (Exposure Index: EI) หรือ ค่าเบี่ยงเบนปริมาณรังสี (Deviation Index: DI) เป็นต้น ซึ่งอาจมีผลต่อการเกิดภาพซ้ำ ดังนั้นการศึกษากครั้งต่อไปควรเพิ่มตัวแปรดังกล่าวและออกแบบการวิจัยเชิงกึ่งทดลอง เพื่อประเมินผลของมาตรการลดอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำอย่างเป็นระบบ^(1,6)

สรุป

การศึกษานี้พบว่าอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำเท่ากับร้อยละ 3.59 สาเหตุหลัก คือ การหายใจเข้าไม่เต็มที่ (poor inspiration) รองลงมา คือ สิ่งแปลกปลอมในภาพ (image artifacts) และการจัดทำไม่ถูกต้อง (positioning error) ตามลำดับ การวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าดัชนีมวลกาย เชื้อชาติ และประเภทผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่เพศและอายุพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซ้ำอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าอัตราการถ่ายภาพซ้ำที่พบจะอยู่ในระดับต่ำกว่ามาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565⁽³⁾ แต่สามารถพัฒนาเพิ่มเติมได้ โดยเฉพาะในด้านกระบวนการทำงาน ดังนั้นควรให้ความสำคัญกับการพัฒนาด้านกระบวนการทำงาน ได้แก่ การสื่อสารกับผู้ป่วยที่ชัดเจน การเตรียมผู้ป่วย การตรวจสอบก่อนถ่ายภาพ การตรวจสอบสิ่งแปลกปลอม และการพัฒนาทักษะของนักรังสีการแพทย์ รวมถึงการพัฒนากระบวนการทำงาน การควบคุมคุณภาพของภาพ และการติดตามการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำ นำมาวิเคราะห์อย่างต่อเนื่องจะช่วยลดการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำ ลดการได้รับรังสีที่ไม่จำเป็น เพิ่มคุณภาพของภาพเอกซเรย์ และยกระดับมาตรฐานงานรังสีวินิจฉัย⁽¹⁰⁾

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ในการวิจัยครั้งนี้ มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ ChatGPT (OpenAI, USA) ในการสืบค้นและแปลวรรณกรรมภาษาต่างประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณกันตนันท์ สมใจ และ คุณฐานิตา ปริณพาล ที่ให้คำปรึกษาข้อแนะนำในการปรับปรุง ให้งานวิจัยครั้งนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ รังสีแพทย์ นักรังสีการแพทย์ และบุคลากรในกลุ่มงานรังสีวินิจฉัย และเวชศาสตร์นิวเคลียร์ โรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บข้อมูล และขอขอบคุณ คณะผู้บริหารโรงพยาบาลมะเร็งอุบลราชธานี ที่สนับสนุนการศึกษาเป็นผลให้งานครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Foos DH, Sehnert WJ, Reiner B, Siegel EL, Segal A, Waldman DL. Digital radiography reject analysis: data collection methodology, results, and recommendations from an in-depth investigation at two hospitals. *J Digit Imaging* 2009; 22(1): 89-98.
2. International Atomic Energy Agency. Good practices in radiography. [online]. [cited 2025 Sep 10]. Available from: URL: <https://www.iaea.org/resources/rpop/health-professionals/radiology/radiography/good-practices>.
3. สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ: ปิยอนด์พับลิชชิง; 2565.
4. นฤมาน ภักธชยากุล. การศึกษาภาพดิจิทัลทางรังสีที่คัดออกในระบบเอกซเรย์ดิจิทัลแบบ DR โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี. *ว วิชาการแพทย์เขต* 11 2563; 34(4): 138-48.
5. สมหมาย กันทะเมืองลี. การวิเคราะห์ภาพดิจิทัลทางรังสีที่ไม่สามารถนำไปวินิจฉัยโรคได้ (Reject image) โรงพยาบาลนครปฐม. *ว สุขภาพภาคประชาชน* 2560; 2(4): 28-35.
6. วัชรกร ปานเนียม, พงศ์พล ลิ้มปรีวีเชียร, นที อินา, จงวัฒน์ ชีวกุล, เสรี ศักดิ์จิรพาพงษ์. การศึกษาปัจจัยและแนวทางลดอัตราการถ่ายภาพเอกซเรย์ซ้ำในระบบเอกซเรย์ดิจิทัลของการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกและเข้าทำยีนด้านข้าง ณ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์. *ว รังสีเทคนิค* 2562; 44(1): 45-52.
7. จินตนา รัตนพรชัยวัตร. แนวทางการลดการถ่ายภาพรังสีบริเวณทรวงอกซ้ำในโรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชสระแก้ว. *สระแก้ว: สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสระแก้ว*; 2567.
8. Norweck JT, Seibert JA, Andriole KP, Clunie DA, Curran BH, Flynn MJ, et al. ACR-AAPM-SIIM technical standard for electronic practice of medical imaging. *J Digit Imaging* [serial online]. 2013; [cited 2025 Sep 10]; 26(1): [15 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3553359>.
9. พระราชบัญญัติพลังงานนิวเคลียร์เพื่อสันติ พ.ศ. 2559. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนที่ 67 ก (วันที่ 5 สิงหาคม 2559).
10. Jones AK, Heintz P, Geiser W, Goldman L, Jerjian K, Martin M, et al. Ongoing quality control in digital radiography: report of AAPM Imaging Physics Committee Task Group 151. *Med Phys*. [serial online]. 2015; [cited 2025 Oct 7]; 42(11): [13 screens]. Available from: URL: <https://aapm.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1118/1.4932623>.

A Study of Repeat Digital Chest X-ray Radiography at Ubon Ratchathani Cancer Hospital

Nattaya Laosiri

Diagnostic Radiology, Ubonratchathani Cancer Hospital, Ubonratchathani 34000, Thailand

ABSTRACT Chest X-ray is one of the most commonly performed diagnostic imaging procedures. However, repeat X-rays remain a problem affecting service quality, increasing unnecessary radiation exposure for patients. The purpose of this study was to determine the repeat rate of chest X-ray, identify associated factors, and provide baseline data for developing strategies to reduce repeat examinations in digital radiography systems. This study included 4,841 patients who underwent chest X-ray at Ubon Ratchathani Cancer Hospital between October 1, 2024 and December 31, 2024. Data were collected from the Picture Archiving and Communication System (PACS), the Hospital Information System (HIS), and general digital radiography systems (1,000 mA). The results showed that 174 repeat examinations were performed, representing a repeat rate of 3.59%. The most common cause was poor inspiration (101 cases, 58.05%), followed by image artifacts (45 cases, 25.86%) and positioning error (18 cases, 10.34%). Statistical analysis demonstrated that body mass index (BMI), nationality, and patient type were significantly associated with repeat chest X-ray examinations, whereas gender and age were not associated with repeat chest X-ray examinations. In conclusion, repeat chest X-rays were primarily associated with workflow factors, including patient communication, patient preparation, pre-examination checking, and radiological technologist skills. These factors are modifiable. Improving these workflow processes and continuously monitoring repeat X-ray may reduce repeat examinations, decrease unnecessary radiation exposure, improve image quality and enhance the quality of radiographic services.

Keywords: Chest X-ray, Digital radiography, Repeat X-ray, Repeat rate

การประเมินประสิทธิผลระบบบริหารคุณภาพ ISO/IEC 17025:2017 ห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา

ปาณิสรา เชาวนะกิจ ปาริฉัตร ลักขณา มงคล พัทธโน และ ศิริวรรณ สำอางค์
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สงขลา 90000

บทคัดย่อ ห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา ได้นำมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 มาใช้ในการบริหารคุณภาพและปรับสู่ ISO/IEC 17025:2017 ซึ่งเพิ่มข้อกำหนดด้านการบริหารความเสี่ยงและความเป็นกลางของการดำเนินงาน ส่งผลให้การบริหารจัดการมุ่งสู่การประเมินประสิทธิผลของระบบบริหารคุณภาพในเชิงกลยุทธ์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิผลระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา ภายใต้มาตรฐาน ISO/IEC 17025 โดยประยุกต์ใช้กรอบแนวคิด Balanced Scorecard การวิจัยเป็นการวิจัยเชิงพรรณนาแบบกรณีศึกษา วิเคราะห์ข้อมูลทุติยภูมิระหว่างปี พ.ศ. 2562-2567 ครอบคลุม 4 มุมมอง ได้แก่ ด้านการเงิน ด้านลูกค้า ด้านกระบวนการภายใน และด้านการเรียนรู้และพัฒนา ผลการศึกษาพบว่าระบบบริหารมีประสิทธิผลในระดับสูง โดยความถูกต้องและความทันเวลาของรายงานผลการทดสอบมีค่าเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 99 ระดับความพึงพอใจของผู้รับบริการเฉลี่ยร้อยละ 90.27 บุคลากรได้รับการพัฒนาตามแผนครบถ้วน ร้อยละ 100 มีการพัฒนาขีดความสามารถในการทดสอบใหม่รวม 15 รายการ และรายได้จากงานบริการมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามพบความเสี่ยงด้านความพึงพอใจของบุคลากรและผู้รับบริการในบางช่วงเวลา ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้ Balanced Scorecard สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการประเมินประสิทธิผลของระบบบริหารคุณภาพ ISO/IEC 17025:2017 ในมิติที่กว้างกว่าการประเมินความสอดคล้องตามข้อกำหนดและช่วยสนับสนุนการบริหารจัดการเชิงกลยุทธ์และการปรับปรุงระบบอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: ระบบบริหารคุณภาพ, Balanced Scorecard, ISO/IEC 17025

Corresponding author E-mail: yodnam.r@gmail.com

Received: 24 January 2026

Revised: 7 April 2026

Accepted: 10 April 2026

บทนำ

มาตรฐาน ISO/IEC 17025 เป็นมาตรฐานสากลที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้รับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ⁽¹⁾ โดยครอบคลุมทั้งด้านการบริหารจัดการและด้านวิชาการ เพื่อสร้างความมั่นใจว่าผลการทดสอบมีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และสามารถนำไปใช้ประกอบการตัดสินใจทางวิชาการและเชิงกฎหมายได้อย่างเหมาะสม ห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา มีบทบาทสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ สมุนไพร และการชันสูตรโรค เพื่อสนับสนุนภารกิจด้านการคุ้มครองผู้บริโภค การเฝ้าระวังทางสาธารณสุข และการวินิจฉัยทางการแพทย์⁽²⁾ โดยห้องปฏิบัติการได้ประยุกต์ใช้ข้อกำหนดมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 และได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2562 ด้านยาและเครื่องสำอาง อาหาร รังสีและเครื่องมือแพทย์ และด้านนิติวิทยาศาสตร์ (พิษวิทยา) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่รวมงานชันสูตรโรค เนื่องจากไม่อยู่ในขอบข่ายการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 การดำเนินงานในระบบบริหารคุณภาพที่ผ่านมา มุ่งเน้นการตรวจสอบความสอดคล้องตามข้อกำหนดของมาตรฐานเป็นหลัก เช่น การตรวจติดตามคุณภาพภายใน การตรวจประเมินจากหน่วยรับรอง การทบทวนการบริหาร ซึ่งสะท้อนผลลัพธ์เชิงกิจกรรมหรือผลผลิต (output) เฉพาะด้าน ยังไม่สามารถสะท้อนให้เห็นถึง “ประสิทธิผลเชิงกลยุทธ์” ของระบบบริหารคุณภาพว่ามีส่วนสนับสนุนต่อการพัฒนาศักยภาพบุคลากรการปรับปรุงกระบวนการทำงาน ความพึงพอใจของผู้รับบริการ และความคุ้มค่าในการใช้ทรัพยากรขององค์กร ในระยะยาวเพียงใด

แนวคิด Balanced Scorecard (BSC)⁽³⁻⁵⁾ เป็นเครื่องมือการบริหารเชิงกลยุทธ์ที่สามารถเชื่อมโยงเป้าหมาย วิสัยทัศน์ และพันธกิจขององค์กรเข้ากับตัวชี้วัดผลการดำเนินงานอย่างเป็นระบบผ่าน 4 มุมมอง ได้แก่ ด้านการเงิน ด้านลูกค้า (ผู้รับบริการ) กระบวนการภายใน และการเรียนรู้และการพัฒนา ซึ่งสอดคล้องกับ

หลักการสำคัญของ ISO/IEC 17025:2017 ที่ให้ความสำคัญกับสมรรถนะบุคลากร ความถูกต้องของกระบวนการ ความเชื่อมั่นในผลการทดสอบ และการบริหารทรัพยากรอย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นการประเมินประสิทธิผลระบบบริหารคุณภาพ ISO/IEC 17025:2017 โดยประยุกต์ใช้ Balanced Scorecard ร่วมกับแนวคิด risk-based thinking จึงเป็นแนวทางที่เหมาะสมในการขยายมุมมองจากการประเมินเชิงข้อกำหนดไปสู่การประเมินเชิงยุทธศาสตร์ ทั้งนี้แนวคิด risk-based thinking ช่วยระบุและจัดการความเสี่ยงและโอกาส ทำให้ตัวชี้วัดสอดคล้องกับบริบทขององค์กร และสามารถมองเห็นความสัมพันธ์เชิงเหตุ-ผลของการพัฒนาบุคลากร กระบวนการทำงาน คุณภาพการให้บริการ และความยั่งยืนขององค์กรได้อย่างเป็นรูปธรรม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแนวทางการประเมิน วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเหตุ-ผลของตัวชี้วัดในแต่ละมิติ และเสนอรูปแบบสำหรับการประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการ ผลการประเมินที่ได้จะเป็นข้อมูลเชิงประจักษ์สำหรับผู้บริหารในการตัดสินใจ วางแผนปรับปรุงระบบบริหารคุณภาพอย่างต่อเนื่อง ตลอดจนใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาการประเมินประสิทธิผลของห้องปฏิบัติการภาครัฐในบริบทเดียวกันต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงประเมิน (evaluation research) โดยประยุกต์ใช้แนวคิด Balanced Scorecard เป็นกรอบการประเมินประสิทธิผลของระบบบริหารคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ของห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา รูปแบบการวิจัยเป็นการวิจัยแบบผสมผสาน (mixed methods research) ใช้ข้อมูลเชิงปริมาณจากตัวชี้วัดผลการดำเนินงานที่เชื่อมโยงข้อกำหนด ISO/IEC 17025:2017 กับมุมมอง Balanced Scorecard ทั้ง 4 มุมมอง ได้แก่ ด้านการเงิน ด้านลูกค้า กระบวนการภายใน และการเรียนรู้และการพัฒนา ร่วมกับข้อมูลเชิงคุณภาพจากการวิเคราะห์เอกสาร รายละเอียดดังนี้

ISO/IEC 17025:2017

ISO/IEC 17025:2017 เป็นมาตรฐานสากลที่จัดทำร่วมกันระหว่าง ISO (The International Organization for Standardization) และ IEC (The International Electrotechnical Commission) เป็นข้อกำหนดทั่วไปที่วัดด้วยความสามารถห้องปฏิบัติการในการดำเนินการทดสอบและสอบเทียบ ใช้รับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ข้อกำหนดของมาตรฐานนี้ครอบคลุมทั้งด้านการบริหารจัดการและด้านวิชาการ โดยเน้นความสำคัญในทุกขั้นตอนการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการเพื่อให้ผลการทดสอบและการสอบเทียบมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ ซึ่งจะช่วยสร้างความมั่นใจให้กับผู้ใช้บริการในคุณภาพของผลการทดสอบและสอบเทียบ มาตรฐานนี้มีข้อกำหนดหลัก ๆ ที่สำคัญดังนี้⁽¹⁾

หมวดที่ 4 ข้อกำหนดทั่วไป (general requirements) ครอบคลุมความเป็นกลาง (impartiality) และการรักษาความลับ (confidentiality) เพื่อสร้างความเชื่อถือและความไว้วางใจจากผู้ใช้บริการและหน่วยงานกำกับว่าผลการทดสอบ/สอบเทียบปราศจากอคติ

หมวดที่ 5 ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง (structural requirements) ครอบคลุมการกำหนดบทบาท อำนาจหน้าที่ และความรับผิดชอบขององค์กร เพื่อให้โครงสร้างองค์กรเอื้อต่อการควบคุมคุณภาพ และความเป็นอิสระทางวิชาการ

หมวดที่ 6 ข้อกำหนดด้านทรัพยากร (resource requirements) ครอบคลุมบุคลากร เครื่องมือ สภาพแวดล้อม สอบกลับได้ (traceability) และการใช้ผลิตภัณฑ์และบริการจากภายนอก เป็นหัวใจของ “ความสามารถทางเทคนิค” เพื่อประกันว่าผลการทดสอบมีความถูกต้อง แม่นยำ และสอบกลับได้ตามระบบสากล

หมวดที่ 7 ข้อกำหนดด้านกระบวนการ (process requirements) ครอบคลุมการทบทวนคำขอวิธีทดสอบ/สอบเทียบ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี การสุ่มตัวอย่าง การจัดการตัวอย่าง บันทึกวิชาการ การควบคุมคุณภาพผล การรายงานผล และการจัดการงานไม่เป็นไปตามข้อกำหนด เป็นการควบคุม “ตั้งแต่ต้นน้ำถึง

ปลายน้ำ” ของกระบวนการห้องปฏิบัติการ เพื่อลดความผิดพลาด เพิ่มความน่าเชื่อถือของผลและรองรับการตัดสินใจเชิงวิชาการ

หมวดที่ 8 ข้อกำหนดด้านระบบการบริหาร (management system requirements) ครอบคลุมระบบเอกสารและบันทึก เชื่อมโยงระบบคุณภาพกับการปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง (PDCA) เน้น risk-based thinking การตรวจติดตามภายใน การทบทวนฝ่ายบริหาร และการจัดการโอกาส/ความเสี่ยง

Balanced Scorecard

Balanced Scorecard (BSC) คือ เครื่องมือในการบริหารจัดการที่ใช้ในการประเมินและติดตามผลการดำเนินงานขององค์กร โดยไม่มุ่งเน้นเพียงแค่ผลทางการเงินเท่านั้น แต่ยังครอบคลุมถึงมุมมองที่สำคัญอื่นๆ ที่ส่งผลต่อความสำเร็จขององค์กรในระยะยาว โดยมี 4 มุมมองหลัก⁽³⁾ ได้แก่

1) มุมมองด้านการเงิน (financial perspective) มุ่งเน้นการประเมินผลจากมุมมองทางการเงิน เช่น การเติบโตของรายได้ กำไร หรือการลดต้นทุน ซึ่งช่วยให้องค์กรสามารถตรวจสอบผลลัพธ์ทางการเงินและประเมินประสิทธิภาพในด้านการใช้ทรัพยากรทางการเงินได้

2) มุมมองด้านลูกค้า (customer perspective) มุ่งเน้นการวัดความพึงพอใจของลูกค้า เช่น คุณภาพการให้บริการ ความเร็วในการจัดส่ง หรือการตอบสนองต่อความต้องการของลูกค้า ซึ่งทำให้สามารถประเมินและปรับปรุงการให้บริการที่ตอบสนองความต้องการของลูกค้าได้

3) มุมมองด้านกระบวนการภายใน (internal process perspective) มุ่งเน้นการประเมินประสิทธิภาพและประสิทธิผลของกระบวนการภายในองค์กร เช่น การปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงาน การลดข้อผิดพลาด หรือการพัฒนาความสามารถในการจัดการกระบวนการทดสอบ/ผลิตภัณฑ์ ซึ่งช่วยให้องค์กรสามารถปรับปรุงกระบวนการภายในได้อย่างต่อเนื่อง

4) มุมมองด้านการเรียนรู้และการพัฒนา (learning and growth perspective) มุ่งเน้นการประเมินการพัฒนาทักษะและความรู้ของบุคลากร

รวมถึงการพัฒนาทรัพยากรทางเทคโนโลยีและนวัตกรรม การฝึกอบรม การเรียนรู้ และการใช้เทคโนโลยีใหม่ๆ เพื่อเพิ่มขีดความสามารถขององค์กรในอนาคต

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ได้แก่ การกำหนดกรอบการประเมิน การออกแบบตัวชี้วัด และเกณฑ์การประเมิน การเก็บรวบรวมข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล และการสรุปผลและตีความเชิงกลยุทธ์ รายละเอียดดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การกำหนดกรอบการประเมิน เป็นการกำหนดกรอบการประเมินโดยนำกรอบแนวคิด Balanced Scorecard มาใช้เป็นโครงสร้างหลักในการประเมิน ซึ่งครอบคลุม 4 มุมมอง ได้แก่ ด้านการเงิน ด้านลูกค้า ด้านกระบวนการภายใน และด้านการเรียนรู้และการพัฒนา ควบคู่กับการวิเคราะห์และเชื่อมโยงข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 กับเป้าหมายเชิงกลยุทธ์ ตัวชี้วัดผลการดำเนินงาน (Key Performance Indicators: KPIs) และความเสี่ยง เพื่อให้กรอบการประเมินสะท้อนทั้งการปฏิบัติตามมาตรฐานและประสิทธิผลเชิงกลยุทธ์ขององค์กร

ขั้นตอนที่ 2 การออกแบบตัวชี้วัดและเกณฑ์ประเมิน โดยพัฒนาตัวชี้วัดจากวัตถุประสงค์คุณภาพ และข้อกำหนดที่เกี่ยวข้องในมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 โดยบูรณาการตัวชี้วัดผลลัพธ์ (lagging indicators) ซึ่งสะท้อนผลการดำเนินงานที่ผ่านมา และตัวชี้วัดนำ (leading indicators) ซึ่งสะท้อนศักยภาพและแนวโน้มผลการดำเนินงานในอนาคต เพื่อให้การประเมินมีความสมดุล

ขั้นตอนที่ 3 การเก็บรวบรวมข้อมูล โดยใช้ข้อมูลทุติยภูมิจากการดำเนินงานในระบบบริหารคุณภาพของห้องปฏิบัติการ ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2567 ได้แก่ รายงานการทบทวนการบริหาร รายงานความถูกต้องและความทันเวลาของรายงานผล รายงานความพึงพอใจของผู้รับบริการและบุคลากร รายงานการพัฒนาศักยภาพบุคลากร รายงานการประชุมทบทวนการบริหาร รายงานการวิจัย/พัฒนางาน และรายงานด้านการเงิน ทั้งนี้ มีการตรวจสอบความถูกต้องและความครบถ้วนของข้อมูล

เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือและสามารถนำไปใช้ในการประเมินประสิทธิผลได้

ขั้นตอนที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูล ดำเนินการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนา ได้แก่ การคำนวณร้อยละ ค่าเฉลี่ย การวิเคราะห์แนวโน้มตามช่วงเวลา และวิเคราะห์ความเชื่อมโยงเชิงเหตุ-ผลของผลการดำเนินงานตามกรอบ Balanced Scorecard ร่วมกับแนวคิดการบริหารความเสี่ยง (risk-based thinking) เพื่อสะท้อนความสัมพันธ์ระหว่างกลยุทธ์ กระบวนการ และผลลัพธ์ขององค์กร

ขั้นตอนที่ 5 การสรุปผลและตีความเชิงกลยุทธ์ โดยสังเคราะห์ผลการประเมินเพื่อระบุจุดแข็ง จุดเสี่ยง และโอกาสในการพัฒนาระบบบริหารคุณภาพของห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งเชื่อมโยงผลการประเมินกับการตัดสินใจเชิงนโยบายและการปรับปรุงระบบอย่างต่อเนื่อง

ตัวชี้วัดการวิจัย

กำหนดตัวชี้วัดตามมุมมอง Balanced Scorecard พัฒนาจากวัตถุประสงค์คุณภาพและข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025:2017 ร่วมกับเป้าหมายเชิงกลยุทธ์ขององค์กร โดยจัดกลุ่มตัวชี้วัดตามมุมมอง Balanced Scorecard และบูรณาการแนวคิด risk-based thinking เพื่อสะท้อนความเสี่ยงที่อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิผลของระบบบริหารคุณภาพในระดับองค์กร ดังแสดงในตารางที่ 1

ผล

ผลการประเมินประสิทธิผลของระบบบริหารคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 โดยประยุกต์ใช้กรอบแนวคิด Balanced Scorecard แสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา มีผลการดำเนินงานอยู่ในระดับสูงในทุกมุมมอง โดยมุมมองกระบวนการภายในมีเสถียรภาพมากที่สุด อย่างไรก็ตามพบความแตกต่างของเสถียรภาพและระดับความเสี่ยงเชิงระบบในแต่ละมุมมอง โดยเฉพาะในมุมมองการเรียนรู้และพัฒนา และมุมมองด้านลูกค้า (ผู้รับบริการ) ในบางช่วงเวลา ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ความเชื่อมโยงระหว่างข้อกำหนด ISO/IEC 17025:2017 กับ Balanced Scorecard เป้าหมายเชิงกลยุทธ์ ตัวชี้วัด และความเสี่ยง

มุมมอง Balanced Scorecard	ข้อกำหนด ISO/IEC 17025:2017	เป้าหมาย เชิงกลยุทธ์	ตัวชี้วัด (KPI)	ค่าเป้าหมาย	ความเสี่ยงที่สะท้อน
1. ด้านการเงิน	4.1 5 6.4, 6.6 8.9	ใช้ทรัพยากรคุ้มค่า และยั่งยืน	แนวโน้มรายได้จากบริการ	เพิ่มขึ้นต่อเนื่อง	ความเสี่ยง ด้านความยั่งยืน
2. ด้านลูกค้า	4.1–4.2 7.1 7.8–7.9	สร้างความเชื่อมั่น และความพึงพอใจ ของผู้รับบริการ	ร้อยละความพึงพอใจของ ผู้รับบริการ จำนวนข้อร้องเรียน ด้านความเป็นกลาง/ ผลประโยชน์ทับซ้อน	≥ 90% 0 เรื่อง	ความเสี่ยง ด้านภาพลักษณ์ ความเสี่ยง ด้านจริยธรรม
3. ด้านการเรียนรู้ ภายใน	4.1–4.2 6.3–6.5 7.1–7.11 8.7–8.9	กระบวนการทดสอบ ถูกต้อง เชื่อถือได้ และทันเวลา	ร้อยละความถูกต้องของ รายงานผล ร้อยละความทันเวลา รายงานผล (TAT)	100% 100%	ความเสี่ยง ด้านความถูกต้อง ความเสี่ยง ด้านระยะเวลา
4. ด้านการเรียนรู้ และพัฒนา	6.2–6.3 8.2 8.5–8.7	บุคลากรมีสมรรถนะ และความเป็นกลาง	ร้อยละบุคลากรที่ผ่าน การพัฒนาตามแผน จำนวนรายการทดสอบ/ งานที่ปรับปรุงหรือ พัฒนาใหม่ ความพึงพอใจของ บุคลากร ร้อยละการรับรู้การสื่อสาร ระบบเอกสาร จำนวนรายการปรับปรุง งานโดยใช้เทคโนโลยี	100% ≥ 2 รายการ/ปี ≥ 80% ≥ 90% ≥ 2 รายการ/ปี	ความเสี่ยงด้านสมรรถนะ ความเสี่ยงด้าน ความเป็นกลาง ความเสี่ยง ด้านขีดความสามารถ ความเสี่ยง ด้านแรงจูงใจ ความเสี่ยง ด้านการสื่อสารและ การนำระบบไปใช้ ความเสี่ยงด้าน ขีดความสามารถ ในการพัฒนานวัตกรรม

จากผลการดำเนินงานของตัวชี้วัดในช่วงปี พ.ศ. 2562–2567 ดังแสดงในตารางที่ 2 สามารถนำมาวิเคราะห์ และแสดงผลลัพธ์ได้อย่างเป็นระบบ โดยแสดงในรูปแบบ กราฟแยกตาม 4 มุมมองของ Balanced Scorecard ได้แก่ มุมมองด้านการเงิน มุมมองด้านลูกค้า มุมมอง ด้านกระบวนการภายใน และมุมมองด้านการเรียนรู้และการพัฒนา ดังนี้

มุมมองด้านการเงิน

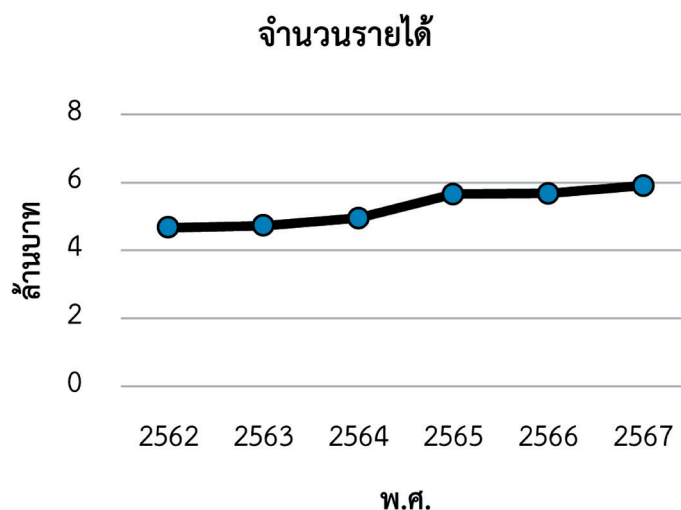
ผลการดำเนินงานด้านการเงินในช่วงปี พ.ศ. 2562–2567 สามารถสะท้อนให้เห็นถึงประสิทธิภาพ ในการบริหารจัดการทรัพยากรและความคุ้มค่าในการ ดำเนินงานขององค์กร ผลการวิจัยพบว่ารายได้จากการ ให้บริการมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะจาก งานรังสีและเครื่องมือแพทย์เป็นผลจากการปรับอัตราค่า

บริการและปริมาณงานที่เพิ่มขึ้น จากตัวอย่างเครื่องเป่า แอลกอฮอล์จากลมหายใจเป็นผลสืบเนื่องจากนโยบายรัฐบาลในการเฝ้าระวังอุบัติเหตุช่วงเทศกาล อย่างไรก็ตาม ข้อมูลด้านการเงินยังไม่สามารถวิเคราะห์เชิงประสิทธิภาพ และความคุ้มค่าเชิงลึกได้ทั้งหมด เนื่องจากข้อจำกัด

ด้านโครงสร้างข้อมูล ผลการดำเนินงานตามตัวชี้วัดด้านการเงินถูกนำเสนอในรูปแบบกราฟ เพื่อแสดงแนวโน้มและระดับความสำเร็จในการบรรลุเป้าหมายเชิงกลยุทธ์ด้านการเงิน ดังแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 2 สรุปผลการดำเนินงานของแต่ละตัวชี้วัดในช่วงปี พ.ศ. 2562-2567

ตัวชี้วัด	เกณฑ์	ผลการดำเนินงาน ปีงบประมาณ พ.ศ.						
		2562	2563	2564	2565	2566	2567	เฉลี่ย
1. ด้านการเงิน								
รายได้ (ล้านบาท)	เพิ่มขึ้น	4.677	4.733	4.949	5.658	5.680	5.910	5.27
2. ด้านลูกค้า								
ร้อยละความพึงพอใจของลูกค้า	90	89.22	90.35	92	93.34	87.48	89.23	90.27
การพบข้อร้องเรียน การรับสินบน/ผลประโยชน์ทับซ้อน	0	0	0	0	0	0	0	0
3. ด้านกระบวนการภายใน								
รายงานผลถูกต้อง	100	100	99.85	100	99.94	99.97	99.9	99.94
รายงานผลทันเวลา	100	100	99.59	100	100	99.35	99.76	99.78
4. ด้านการเรียนรู้และพัฒนา								
บุคลากรได้รับการพัฒนา (ตามแผน)	100	100	100	100	100	100	100	100
พัฒนาศักยภาพงาน/การทดสอบ (เรื่อง)	2	2	2	3	3	3	2	2.5
ความพึงพอใจของบุคลากร	80	-	-	78	-	-	-	-
การรับรู้การสื่อสารระบบเอกสาร	90	-	-	-	100	-	-	-
ปรับปรุงงานโดยใช้เทคโนโลยี (ระบบแจ้งเตือน/ฐานข้อมูล)	2	1	2	3	4	2	2	2.3

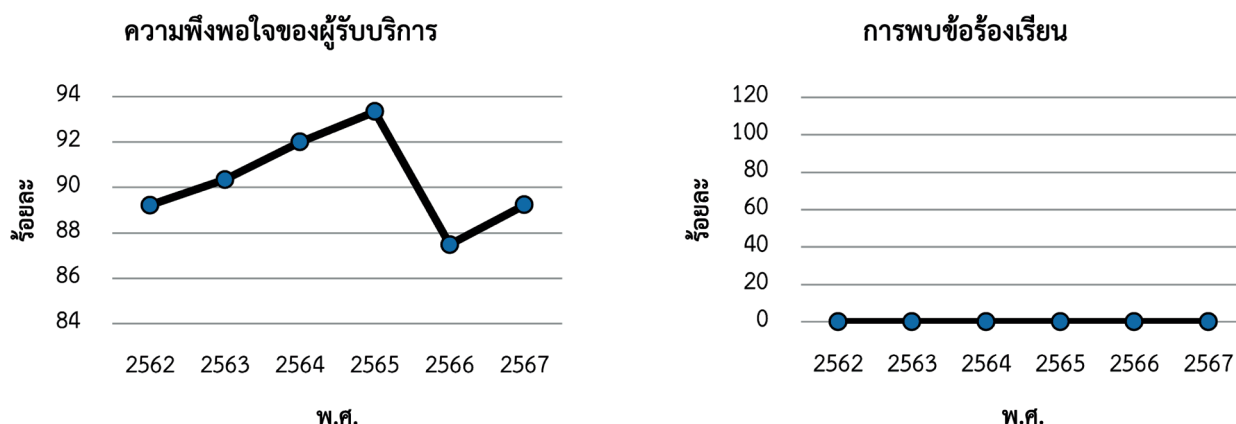


ภาพที่ 1 ผลการดำเนินงานตามมุมมองด้านการเงิน ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2567

มุมมองด้านลูกค้า

ผลการดำเนินงานด้านลูกค้า (ผู้รับบริการ) ในช่วงปี พ.ศ. 2562–2567 สามารถสะท้อนให้เห็นถึงระดับความสามารถขององค์กรในการตอบสนองความต้องการและความคาดหวังของผู้รับบริการ คุณภาพและความต่อเนื่องของการให้บริการ ตลอดจนระดับความพึงพอใจและความเชื่อมั่นต่อการดำเนินงานขององค์กร ผลการวิจัยพบว่าระดับความพึงพอใจของผู้รับบริการมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 90.27 แม้ว่าจะมีความผันผวนในช่วงเวลา โดยปัจจัยที่ผู้รับบริการให้ความสำคัญ ได้แก่ ราคา ความรวดเร็ว ความสะดวกในการติดต่อสื่อสาร การเข้าถึงข้อมูลผลการทดสอบ และความยืดหยุ่นของรูปแบบการให้บริการ ผู้รับบริการส่วนใหญ่มีความ

พึงพอใจต่อการรายงานผลในรูปแบบอิเล็กทรอนิกส์ซึ่งช่วยลดระยะเวลาในการรับรายงานและลดค่าใช้จ่าย อย่างไรก็ตามความต้องการบริการใหม่และความคาดหวังที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะจากภาคเอกชน สะท้อนว่าคุณภาพทางวิชาการเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอในการรักษาความพึงพอใจในระยะยาว ทั้งนี้ไม่พบข้อร้องเรียนด้านความเป็นกลางหรือผลประโยชน์ทับซ้อนตลอดช่วงเวลาการศึกษา แสดงถึงความเข้มแข็งของระบบบริหารความเป็นกลางตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025:2017 ผลการดำเนินงานตามตัวชี้วัดด้านลูกค้าถูกนำเสนอในรูปแบบกราฟ เพื่อแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงและระดับความสำเร็จของการดำเนินงานในแต่ละปี ดังแสดงในภาพที่ 2

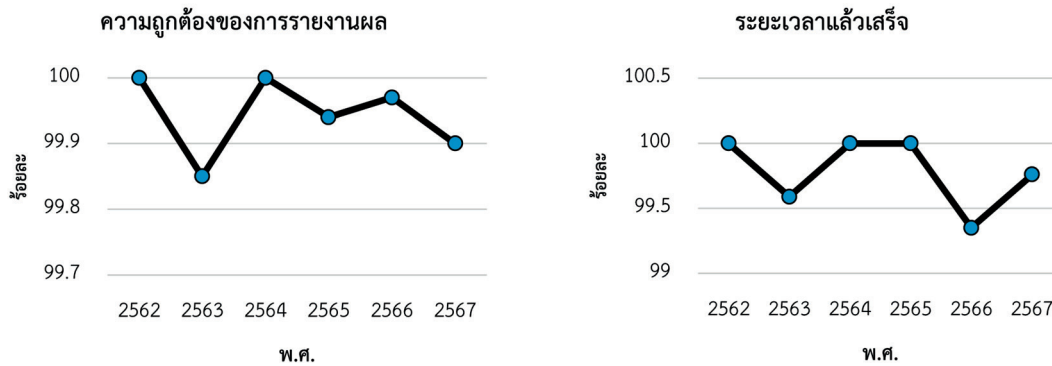


ภาพที่ 2 ผลการดำเนินงานตามมุมมองด้านลูกค้า ระหว่างปี พ.ศ. 2562–2567

มุมมองด้านกระบวนการภายใน

ผลการดำเนินงานด้านกระบวนการภายในในช่วงปี พ.ศ. 2562–2567 สามารถสะท้อนให้เห็นถึงประสิทธิภาพและประสิทธิผลของกระบวนการทำงานภายในองค์กร ผลการวิจัยพบว่าผลการดำเนินงานด้านกระบวนการภายในมีเสถียรภาพสูงตลอดช่วงเวลาศึกษา โดยความถูกต้องของรายงานผลการทดสอบมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 99.94 และความทันเวลาของรายงานผล (turnaround time) มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 99.78 อัตราความผิดพลาดของรายงานผลต่ำกว่าร้อยละ 0.1 อย่างต่อเนื่อง ข้อผิดพลาดที่พบส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสนับสนุน เช่น การจัดการข้อมูลและการรายงานผลมากกว่าขั้นตอน

การทดสอบโดยตรง ปัจจัยที่ส่งผลต่อความล่าช้าในการรายงานผล ได้แก่ ภาระงานที่เพิ่มขึ้น จำนวนตัวอย่างที่มากในช่วงเวลาจำกัด การขัดข้องของเครื่องมือ และการเปลี่ยนแปลงบุคลากร การนำมาตรการควบคุม เช่น การใช้ checklist การพัฒนาทักษะให้บุคลากรสามารถปฏิบัติงานทดแทนกันได้ และระบบแจ้งเตือนระยะเวลาแล้วเสร็จของงาน ช่วยลดความเสี่ยงเชิงปฏิบัติการและเสริมสร้างความเชื่อถือได้ของกระบวนการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ ผลการดำเนินงานตามตัวชี้วัดด้านกระบวนการภายในถูกนำเสนอในรูปแบบกราฟ เพื่อแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงและระดับความสำเร็จของการดำเนินงานในแต่ละปี ดังแสดงในภาพที่ 3

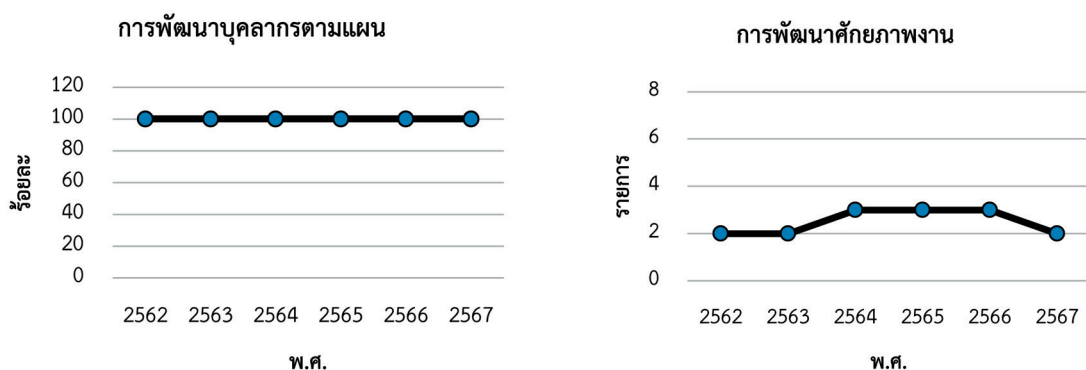


ภาพที่ 3 ผลการดำเนินงานตามมุมมองด้านกระบวนการภายใน ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2567

มุมมองด้านการเรียนรู้และพัฒนา

ผลการดำเนินงานด้านการเรียนรู้และการพัฒนา ในช่วงปี พ.ศ. 2562-2567 สามารถสะท้อนให้เห็นถึง ศักยภาพของบุคลากร ความพร้อมด้านความรู้ ทักษะ และสมรรถนะ ผลการวิจัยพบว่าบุคลากรได้รับการ พัฒนาตามแผนอย่างครบถ้วน ร้อยละ 100 ครอบคลุม การพัฒนาด้านวิชาการ ด้านการบริหารจัดการ ทักษะ ดิจิทัล และคุณธรรมจริยธรรม ส่งผลให้ห้องปฏิบัติการ สามารถพัฒนาขีดความสามารถด้านการทดสอบใหม่ รวมทั้งสิ้น 15 รายการ ตลอดช่วงเวลาการศึกษา เพื่อ ตอบสนองนโยบายภาครัฐ ปัญหาเชิงพื้นที่ และ ความต้องการของผู้รับบริการ นอกจากนี้การนำเทคโนโลยี สารสนเทศมาประยุกต์ใช้ เช่น ระบบแจ้งเตือนผ่าน

LINE Notify การจัดการข้อมูลด้วย Google Sheets และ Google Drive รวมถึงระบบเอกสารคุณภาพ (DocSYS) ช่วยสนับสนุนการจัดการเอกสารและกระบวนการทำงาน ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามระดับความ พึงพอใจของบุคลากรมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 78 ซึ่งต่ำกว่า เกณฑ์ที่กำหนด สะท้อนถึงความเสี่ยงด้านแรงจูงใจ ความผูกพันต่อองค์กร และการรักษาบุคลากร ใน ระยะยาวแม้ว่าการพัฒนาศักยภาพเชิงปริมาณจะอยู่ใน ระดับสูงก็ตาม ผลการดำเนินงานตามตัวชี้วัดด้าน การเรียนรู้และการพัฒนาถูกนำเสนอในรูปแบบกราฟ เพื่อแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงและระดับความสำเร็จ ของการดำเนินงานในแต่ละปี ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ผลการดำเนินงานตามมุมมองด้านการเรียนรู้และพัฒนา ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2567

วิจารณ์

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการ ประเมินระบบบริหารคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 โดยประยุกต์ใช้กรอบแนวคิด Balanced

Scorecard ร่วมกับแนวคิด risk-based thinking สามารถสะท้อนประสิทธิผลเชิงกลยุทธ์ของระบบบริหาร คุณภาพได้อย่างครอบคลุมและเป็นระบบมากกว่า การประเมินแบบมุ่งเน้นความสอดคล้องตามข้อกำหนด

(compliance-based assessment) เพียงอย่างเดียว ผลการประเมินในภาพรวมสะท้อนในมุมมองต่างๆ ดังนี้

มุมมองด้านการเงิน แม้องค์กรภาครัฐจะไม่ได้มุ่งเน้นการแสวงหากำไรเป็นหลัก แต่แนวโน้มรายได้จากการให้บริการที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องประกอบกับความถูกต้องและความทันเวลาของรายงานผลในระดับสูง แสดงถึงความเชื่อมั่นของผู้รับบริการและประสิทธิภาพของระบบควบคุมคุณภาพ

มุมมองด้านลูกค้า ความผันผวนของระดับความพึงพอใจของผู้รับบริการสะท้อนว่าคุณภาพทางเทคนิคเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอในการสร้างการรับรู้คุณภาพบริการในระยะยาว โดยปัจจัยด้านความเร็ว ช่องทางการสื่อสาร และรูปแบบบริการ มีบทบาทสำคัญมากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ โลมสโล วังจันตา และคณะ⁽⁶⁾ ที่เสนอการให้บริการรายงานผลในรูปแบบออนไลน์เพื่อเพิ่มความเร็วและงานวิจัยของ รัชนี อัสวรุณรัตน์ และคณะ⁽⁷⁾ ที่ชี้ว่าผู้รับบริการให้ความสำคัญกับความเอาใจใส่ความรับผิดชอบของเจ้าหน้าที่ และความเร็ว ในการให้บริการ ความผันผวนดังกล่าวสามารถตีความได้ว่าเป็นสัญญาณเตือนล่วงหน้าต่อความเชื่อมั่นในระยะยาว แม้จะไม่พบข้อร้องเรียนด้านความเป็นกลางหรือผลประโยชน์ทับซ้อนก็ตาม

มุมมองด้านกระบวนการภายใน ผลการศึกษา ยืนยันถึงความเข้มแข็งของระบบควบคุมคุณภาพที่ สอดคล้องกับข้อกำหนดหลักของ ISO/IEC 17025:2017 อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ภายใต้กรอบ risk-based thinking พบว่าความเสี่ยงสำคัญ ส่วนใหญ่อยู่ในกระบวนการสนับสนุนมากกว่า กระบวนการทดสอบโดยตรง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เสาวนีย์ อารมณสุข และคณะ⁽⁸⁾ ที่ชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการเสริมสร้างมาตรการควบคุมเชิงระบบ ใน supporting processes เพื่อป้องกันผลกระทบเชิงลูกโซ่ต่อผลลัพธ์ของการให้บริการ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ ปิยะดา คุณาวารักษ์⁽⁹⁾ ที่ระบุว่ากระบวนการดำเนินงานภายในที่มีประสิทธิภาพส่งผลเชิงบวกต่อผู้รับบริการ

มุมมองด้านการเรียนรู้และพัฒนา แม้ว่าบุคลากร ได้รับการพัฒนาตามแผนครบถ้วน ร้อยละ 100 อย่างต่อเนื่อง แต่ระดับความพึงพอใจของบุคลากร ที่ต่ำกว่าเกณฑ์สะท้อนให้เห็นช่องว่างระหว่างการลงทุนด้านการพัฒนาศักยภาพกับการนำสมรรถนะที่ได้รับไปใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ ปัจจัยด้านการสื่อสาร สภาพแวดล้อมการทำงาน ภาระงาน และความแตกต่างด้านช่วงอายุของบุคลากร ล้วนส่งผลต่อแรงจูงใจและความผูกพันต่อองค์กร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ญัฐวิวัฒน์ ภควันฉัตร และคณะ⁽¹⁰⁾ นิชาพร ฤทธิบุรณ์ และ สุธนา บุญเหลือ⁽¹¹⁾ สุรางค์ บุญยะพงศ์ไชย⁽¹²⁾ และ นลินี สุรดิษฐ์⁽¹³⁾ นอกจากนี้หากไม่จัดการความเสี่ยงด้านบุคลากรอย่างเป็นระบบอาจส่งผลกระทบต่อความยั่งยืนของระบบบริหารคุณภาพในระยะยาว สอดคล้องกับข้อค้นพบของ ญัฐชยา อุดมชัยรัตน์ และ นนทิพัทธ์ ประยูรหงส์⁽¹⁴⁾ ที่ชี้ให้เห็นว่าระบบการบริหารจัดการคนเก่งมีความสำคัญ

การนำกรอบ Balanced Scorecard ที่บูรณาการตัวชี้วัดด้านความเสี่ยงมาใช้ร่วมกับตัวชี้วัดผลลัพธ์และตัวชี้วัดนำช่วยสนับสนุนการตัดสินใจเชิงรุก การวางแผนปรับปรุงระบบอย่างต่อเนื่อง และการจัดสรรทรัพยากรอย่างมีประสิทธิภาพ แนวทางดังกล่าวช่วยยกระดับบทบาทของระบบบริหารคุณภาพจากเครื่องมือเพื่อการรับรองมาตรฐานไปสู่กลไกเชิงนโยบายที่สนับสนุนการบริหารจัดการเชิงยุทธศาสตร์ เสริมสร้างความโปร่งใสและความน่าเชื่อถือของห้องปฏิบัติการภาครัฐ สอดคล้องกับงานวิจัยของ พิศพงษ์ จันทรพุ่ม⁽¹⁵⁾ และแนวคิดของ ศิริณ วิชัยเรืองธรรม และคณะ⁽¹⁶⁾ ที่ชี้ว่าการประยุกต์ใช้ Balanced Scorecard เป็นการยกระดับจากการวัดผลเชิงปฏิบัติไปสู่การบริหารเชิงกลยุทธ์อย่างแท้จริง จากการประเมินเชิงประจักษ์ของห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา ในช่วงปี พ.ศ. 2562–2567 พบว่าระบบบริหารคุณภาพมีความเข้มแข็งด้านสมรรถนะทางเทคนิคและกระบวนการภายใน โดยความถูกต้องและความทันเวลาของรายงานผลการทดสอบอยู่ในระดับสูงอย่างต่อเนื่อง สะท้อนถึงประสิทธิภาพของระบบควบคุมคุณภาพตามมาตรฐานสากล ขณะเดียวกัน

การพัฒนาศักยภาพบุคลากรและการขยายขีดความสามารถด้านการทดสอบใหม่ ช่วยเพิ่มศักยภาพในการตอบสนองภารกิจเชิงนโยบายด้านการคุ้มครองผู้บริโภคและการเฝ้าระวังทางสาธารณสุข อย่างไรก็ตาม ผลการประเมินยังสะท้อนประเด็นเชิงนโยบายที่ควรได้รับการจัดการอย่างเป็นระบบ ได้แก่ ความพึงพอใจของบุคลากรที่ต่ำกว่าเกณฑ์และความผันผวนของความพึงพอใจผู้รับบริการในบางช่วงเวลา ซึ่งเป็นสัญญาณเตือนล่วงหน้าต่อความเสี่ยงด้านความต่อเนื่องและความยั่งยืนของระบบบริหารคุณภาพ หากไม่บูรณาการประเด็นดังกล่าวเข้ากับกระบวนการกำหนดนโยบายและการจัดสรรทรัพยากร อาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการรักษาคุณภาพบริการในระยะยาว

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้กรอบแนวคิด Balanced Scorecard ร่วมกับแนวคิด risk-based thinking เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการประเมินประสิทธิผลของระบบบริหารคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ในเชิงกลยุทธ์ โดยสามารถสะท้อนความเชื่อมโยงเชิงเหตุ-ผลของการดำเนินงานในหลายมิติได้อย่างชัดเจน และให้มุมมองที่ครอบคลุมมากกว่าการประเมินที่มุ่งเน้นเพียงความสอดคล้องตามข้อกำหนดของมาตรฐาน โดยผลการศึกษาดังกล่าวยังสามารถขยายผลเป็นต้นแบบสำหรับห้องปฏิบัติการอื่น ในการเสริมความเข้มแข็งของระบบบริหารคุณภาพและใช้เป็นกลไกหลักที่สำคัญในการประชุมทบทวนการบริหาร การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงกรณีของหน่วยงานเดียว งานวิจัยในอนาคตควรขยายขอบเขตการศึกษาไปยังห้องปฏิบัติการหลายแห่ง เพื่อยืนยันความสัมพันธ์เชิงเหตุ-ผลของมุมมอง Balanced Scorecard และผลลัพธ์ของระบบบริหารคุณภาพในบริบทที่หลากหลายยิ่งขึ้น

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ผู้เขียนได้ใช้เครื่องมือปัญญาประดิษฐ์ ChatGPT (OpenAI, USA) ในวัตถุประสงค์ต่อไปนี้ 1) ใช้เพื่อ

ปรับแก้ไวยากรณ์และความถูกต้องของภาษาอังกฤษในส่วนของ Abstract เพื่อให้สำนวนภาษาเป็นไปตามหลักวิชาการและมาตรฐานการเขียนบทความภาษาอังกฤษ 2) ใช้ในการสืบค้นวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในกระบวนการทบทวนเอกสาร อย่างไรก็ตาม การคัดเลือกแหล่งอ้างอิงและการสังเคราะห์องค์ความรู้ยังคงเป็นผลงานของผู้เขียนทั้งหมด และ 3) ใช้เพื่อช่วยในการปรับรูปแบบการอ้างอิงจากระบบ APA เป็นระบบ Vancouver โดยผู้เขียนได้ตรวจสอบความถูกต้องของรายการอ้างอิง ลำดับเลขอ้างอิง และรูปแบบการเขียนให้เป็นไปตามรูปแบบที่วารสารกำหนด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้บริหารและบุคลากร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา ที่ให้การสนับสนุนด้านข้อมูลทรัพยากรที่จำเป็น ตลอดจนความร่วมมือและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ซึ่งช่วยให้การศึกษานี้ดำเนินไปอย่างราบรื่นและสำเร็จตามเป้าหมาย

เอกสารอ้างอิง

1. กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุข กรมอนามัย. มาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ข้อกำหนดทั่วไปสำหรับความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 6 ม.ค. 2567]; [33 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://phld.anamai.moph.go.th/th/academic-documents/download?id=100515&mid=24437&mkey=document&lang=th&did=31050>.
2. กฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนที่ 98 ก (วันที่ 28 ธันวาคม 2552).
3. นกตล รมโพธิ์. การวัดผลองค์กรแบบสมดุล = Balanced Scorecard. กรุงเทพฯ: ศูนย์หนังสือมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2553.
4. Kaplan RS, Norton DP. The balanced scorecard: translating strategy into action. Boston, MA: Harvard Business School Press; 1996.
5. สมบูรณ์ สารพัด, ณีฐนิชา สุขฤทธิ, ณีฐนิยา แก่นทรัพย์เกริก, นวพร สุทธิประภา, นวอร ฉาโธสง,

- ปิยราช บางศิริ, และคณะ. หลักการและทฤษฎีการวัดผลการดำเนินงานขององค์กรโดยใช้ Balanced Scorecard และการนำไปประยุกต์ใช้. ว สยามวิชาการ 2562; 20(34): 35–48.
6. โลมไสล วงศ์จันทา, วสุ บำรุงชัยชนะ, กิตติชัย จันท, ปาริชาติ กัญญาบุญ, วิษญาดา วุฒิอดิเรก. การปรับปรุงคุณภาพการให้บริการทดสอบทางห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ด้วยระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์. ว กรมวิทย พ 2564; 63(1): 13–27.
 7. รัชนี อัสวรุ่งนรินทร์, รุจิกาญจน์ อัสวรุ่งนรินทร์, พรพรรณ โรจนแสง. การศึกษาความพึงพอใจของผู้รับและผู้ให้บริการห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา. ว การแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ 2557; 21(1): 63–70.
 8. เสาวนีย์ อารมณสุข, ธนวัฒน์ ศรีดาพันธ์, ลีพรพรรณ แสงอรุณ. การวิเคราะห์ข้อบกพร่องตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ของห้องปฏิบัติการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการให้การรับรองในปี พ.ศ. 2564 และ 2566. ว กรมวิทย พ 2568; 67(3): 518–29.
 9. ปิยะดา คุณาวารักษ์. การประเมินผลสัมฤทธิ์ของงานเฝ้าระวังป้องกันและควบคุมโรคตามแนวทางการประเมินแบบสมดุลย์ของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 ปี 2547. ว ควบคุมโรค 2551; 34(4): 397–409.
 10. ณัฐวิวัฒน์ ภควันฉัตร, กฤติยา อิศวเรศระกุล, วณิชญดา วาจิรัมย์. การพัฒนาทรัพยากรมนุษย์ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการปฏิบัติงานในองค์กรของพนักงานภาคเอกชน จังหวัดชลบุรี. ว วิจัยมหาวิทยาลัยเวสเทิร์นมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ 2565; 8(2): 29–38.
 11. นิชาพร ฤทธิบุรณ์, สุธนา บุญเหลือ. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความผูกพันองค์กรของบุคลากรภาครัฐในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย. ว มนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชพฤกษ์ 2562; 5(1): 151–66.
 12. สุรางค์ บุญยะพงศ์ไชย. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการปฏิบัติงานของบุคลากร. ว วิชาการสังคมมนุษย มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช 2565; 12(1): 64–90.
 13. นลินี สุรดิษฐ์กร. การบริหารทรัพยากรมนุษย์ที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการปฏิบัติงานของบุคลากรในธุรกิจห้องปฏิบัติการทดสอบ. ว รัชต์ภาคย์ 2565; 16(47): 486–500.
 14. ณัฐชา อุดมชัยรัตน์, นนทิพันธุ์ ประยูรหงษ์. แบบจำลองปัจจัยที่ส่งผลต่อการบริหารจัดการคนแก่กับความภักดีต่อองค์กร. ว มจร การพัฒนาสังคม 2567; 9(1): 27–42.
 15. พีรพงษ์ จันทร์พุ่ม. การประเมินผลการพัฒนาศูนย์ทันตกรรม โรงพยาบาลห้วยยอด โดยใช้การวัดผลองค์กรแบบสมดุล (Balanced Scorecard). ว ทันต สงขลานครินทร์ 2560; 5(1): 28–43.
 16. ศิริณ วิชัยเรืองธรรม, กิตติกร วิชัยเรืองธรรม, พิศมัย จารุจิตติพันธ์. การประยุกต์ใช้กรอบแนวคิดเกี่ยวกับการวัดผลดุลยภาพในการบริหารจัดการองค์กรสุขภาพ. ว สังคมศาสตร์เพื่อการพัฒนาท้องถิ่น มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม 2568; 9(4): 843–54.

Evaluation of the Effectiveness of the ISO/IEC 17025:2017 Quality Management System at the Laboratory of Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla

Parnisa Chaowanakit, Parichat Lakkhana, Mongkol Phatthano, and Siriwan Sam-ang
Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla, Department of Medical Sciences, Songkhla 90000, Thailand

ABSTRACT The laboratory of Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla implemented ISO/IEC 17025:2005 for quality management and later transitioned to ISO/IEC 17025:2017, which introduced additional requirements on risk management and impartiality. As a result, the management approach has shifted toward evaluating the strategic effectiveness of the quality management system. This study aimed to evaluate the effectiveness of the laboratory quality management system at Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla under ISO/IEC 17025 by applying the Balanced Scorecard (BSC) framework. A descriptive case study design was employed, analyzing secondary data collected between 2019 and 2024 across four perspectives: financial, customer, internal process, and learning and growth. The results indicate that the quality management system demonstrates a high level of effectiveness. The accuracy and timeliness of test reports exceeded 99 percent on average, while the mean customer satisfaction level was 90.27 percent. Personnel development was fully achieved in accordance with the established plans (100 percent), and laboratory capability was expanded through the development of 15 new testing scopes. In addition, revenue generated from laboratory services showed a continuous upward trend. Nevertheless, certain periods revealed risks related to staff satisfaction and customer satisfaction. Overall, the findings suggest that the Balanced Scorecard is an effective tool for evaluating the performance of an ISO/IEC 17025:2017 quality management system beyond traditional compliance-based assessment. Its application supports strategic management, risk-based thinking, and the sustainable improvement of laboratory quality management systems.

Keywords: Quality management system, Balanced Scorecard, ISO/IEC 17025

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 Sarawut Boonsuk Watcharapong Kumla
Phichet Banyati Suradet Chawadet

Technical Advisor Panadda Silva Yaowapa Pongsuwanna
Pranee Chavalittumrong Duanthanorm Promkhatkaew
Busarawan Sriwanthana Hansa Chaivanit
Salakchit Chutipongvivate

Executive Editor Supaporn Phumiamorn

Editor Patamaporn Pruksakorn

Assistant Editor Siripakorn Sangkitporn Panadda Dhepakson
Siriphan Saeng-Aroon Siriwan Chaisomboonpan
Decha Pangjai Supaporn Suparak

Editorial Board Pilaipan Puthavathana Mahidol University
Prasert Auewarakul Mahidol University
Danai Tiwawech Naresuan University
Pornpimol Kongtip Mahidol University
Srisurang Tantimavanich Mahidol University
Chanitra Thuwajit Mahidol University
Pintip Pongpech Independent Scholar
Suwanna Charunut Independent Scholar
Usavadee Thavara Independent Scholar
Wichuda Chittangkura Independent Scholar
Supanee Duangteraprecha Independent Scholar
Wantana Paveenkittiporn Independent Scholar
Uruyakorn Chansang Independent Scholar
Apiwat Tawatsin Independent Scholar
Prapai Wongsinkongman Independent Scholar
Nuanjun Wichukchinda Independent Scholar

Administration Numfon Noiprasert Department of Medical Sciences
Pawinee Sukcharoen Department of Medical Sciences
Apisara Khomduean Department of Medical Sciences
Chamaiporn Chumjurn Department of Medical Sciences
Aphimon Jiraphongsathorn Department of Medical Sciences
Navy Srivarom Department of Medical Sciences

Office Bureau of Expert Advisory Panels, Department of Medical Sciences, Department of Medical Sciences
88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand.
Tel. 0-2951-0000 ext. 99662, 98205, 98206 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>