วารสาร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 62 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2563 Vol. 62 No. 2 April - June 2020

ISSN 0125-684X
E-ISSN 2697-4525

วารสาร กรมวิทย พ 62 (2) เม.ย. - มิ.ย. 2563 Bull Dept Med Sci 62 (2) April - June 2020

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ที่ปรึกษาด้านบริหาร
นพ.โอภาส การย์กวินพงศ์ | นพ.พิเชฐ บัญญัติ
นพ.สมฤกษ์ จึงสมาน | นพ.สมชาย แสงกิจพร

ที่ปรึกษาด้านวิชาการ
ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ | พญ.มยุรา กุสุมภ์
นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท | ภญ.ดร.จงดี ว่องพินัยรัตน์
นางสาวสุมล ปวิตรานนท์ | นางปนัดดา ซิลวา
นางปราณี ชวลิตธำรง | นางธีรนารถ จิวะไพศาลพงศ์

บรรณาธิการ
ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ

รองบรรณาธิการ
ดร.เดือนถนอม พรหมขัติแก้ว | นางกนกพร อธิสุข
นายสุธน วงษ์ชีรี | นางวิชชุดา จริยะพันธุ์
ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน | นางสาวมาลินี จิตตกานต์พิชย์

คณะบรรณาธิการ

ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ.พญ.พรรณี ปิติสุทธิธรรม	มหาวิทยาลัยมหิดล
ดร.นพ.ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ	สำนักงานปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
รศ.ดร.พญ.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.สุชาดา ไชยสวัสดิ์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ดร.ดนัย ทิวาเวช	มหาวิทยาลัยนเรศวร
ภญ.สุวรรณา จารุนุช	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ดร.สลักจิต ชุติพงษ์วิเวท	สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ดร.สุณี ศิริวิชยกุล	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภญ.ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ดร.ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ภญ.ดร.ไตรพร วัฒนนาถ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ฝ่ายจัดการ

นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
นางสาวประสาน จุลวงษ์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กำหนดออก ราย 3 เดือน

อัตราสมาชิก ในประเทศปีละ 200.- บาท
ต่างประเทศปีละ 50.00 เหรียญสหรัฐอเมริกา

สำนักงานวารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000
โทร. 0-2951-0000 โทรสาร 0-2951-1297

พิมพ์ที่ บริษัท ธนอรุณการพิมพ์ จำกัด
457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200
โทร. 0-2282-6033-4

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 62 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2563 Vol. 62 No. 2 April - june 2020

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

พิษกึ่งเรื้อรังของน้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทย *(Crocodylus siamensis)* ในหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley 50

ภัสสราภรณ์ ศรีมังกรแก้ว อมร ประดับทอง จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ สุดาวรรณ เชยชมศรี และวิน เชยชมศรี

การประเมินผลเปปไทด์สังเคราะห์ต้านจุลินทรีย์ต่อ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* 59

นวลฉวี เวชประสิทธิ์ จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย นฤมล เผ่านักรบ และสิทธิรักษ์ รอยตระกูล

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

การทวนสอบวิธีตรวจปริมาณแอนติเจนของ Diphtheria ในวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ 76

สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์ และอุบลวรรณ ชัยอารยะเลิศ

การสำรวจสิ่งแปลกปลอมในพริกแห้ง 86

ขันทอง เพ็ชรนอก ก่อเกียรติ ศาสตรินทร์

บทความทั่วไป

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลสำหรับสอบเทียบเครื่องวัดแอลกอฮอล์จากลมหายใจ 96

จิรพรรณ บุญสูง และธรรมรัตน์ บุญสูง

การประเมินการใช้งานตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้งสำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี 106

บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ สุภาพร สุภารักษ์ สุทธิวัฒน์ ลำใย อัมรา โยวัง และวรางคณา อ่อนทรวง

ความชุกของแอนติบอดีที่พบไม่บ่อยในหญิงคลอดบุตรของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ 114

เปรมจิต ทั่งตระกูล ดารินต์ณัฏ บัวทอง ทนงศักดิ์ ยีละ และธีรกมล เพ็งสกุล

บทความพิเศษ

เทโลเมียร์/เทโลเมอเรส เพื่อสุขภาพ 123

ตรีทิพย์ รัตนวรชัย

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 62 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2563 Vol. 62 No. 2 April - june 2020

CONTENTS

Page

Original Articles

Sub-chronic Oral Toxicity of *Crocodylus siamensis* Bile in Sprague Dawley Rats 50

Passaraporn Srimangkornkaew Amon Praduptong Jindawan Siruntawineti Sudawan Chaeychomsri and Win Chaeychomsri

Evaluation of Synthetic Antimicrobial Peptides against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* 59

Nuanchawee Wetprasit Janthima Jaresitthikunchai Narumon Phaonakrop and Sittiruk Roytrakul

Laboratory Findings

Method Verification for Determination of Diphtheria antigen in Diphtheria vaccine 76

Sakalin Trisiriwanich and Ubonwan Chaiarayalert

A Survey of Filth in Dried Chilies 86

Kuntong Pednog and Kokeiat Sartiorin

General Articles

Preparation of Ethyl Alcohol Standard Solution for Breath Analyzer Calibration 96

Jirapun Bunsoong and Thamarat Bunsoong

An Evaluation for Use of Dried Tube Specimens as Internal Quality Control Samples for HIV Diagnosis 106

Busarawan Sriwanthana Supaporn Suparak Suttiwat Lumyai Amara Yowong and Warangkana Oncoung

Prevalence of Unexpected Maternal Antibodies at Delivery in Songklanagarind Hospital 114

*Premchit Thangtrakul Darinnat Buathong Tanongsak Yeela, and Theerakamol Pengsakul**

Special Article

Telomere/Telomerase for Health 123

Treetip Ratanavalachai

บรรณาธิการแถลง

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอเรียนว่าตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2563 ผู้นิพนธ์ส่งบทความทั้งในรูปแบบภาษาไทยและภาษาอังกฤษ เพื่อตีพิมพ์ในวารสารได้ทางระบบออนไลน์ Thai Journals online (ThaiJo 2) ที่ http://tci-thijo.org/index.php/jmt-amtt/authorDashboard/submission/151765 โดยสามารถติดต่อเพื่อสอบถามข้อมูลได้ทาง e-mail bull.dmsc@gmail.com

บทความที่เผยแพร่ในวารสารสามารถสืบค้นผ่านทาง http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/net/dlib/weblib.php และ http://tci-thijo.org

บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ

บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Sub-chronic Oral Toxicity of *Crocodylus siamensis* Bile in Sprague Dawley Rats

Passaraporn Srimangkornkaew[1,5] Amon Praduptong[1,4] Jindawan Siruntawineti[2] Sudawan Chaeychomsri[3] and Win Chaeychomsri[2]

[1]*Interdisciplinary Graduate Program in Bioscience, Faculty of Sciences, Kasetsart University, Bangkok 10900*

[2]*Department of Zoology, Faculty of Sciences, Kasetsart University, Bangkok 10900*

[3]*Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kasetsart University, Kamphaen Saen Campus, Nakhon Pathom 73140*

[4]*Thailand Center of Excellence for Life Sciences (Public Organization), Bangkok 10400*

[5]*National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170*

Abstract Siamese crocodile *(Crocodylus siamensis)* bile has been widely used for traditional medicine in many countries including Thailand. However, safety evaluation has been limited. This study aimed to determine sub-chronic toxicity of dried *C. siamensis* bile in male and female Sprague Dawley rats at doses of 2.5, 25 and 250 mg/kg body weight for 90 days. The results revealed no clinical signs of toxicity at all doses. Body weights, feed and water intake, and relative organ's weights of all groups treated showed no significant difference from control groups. No significant changes on hematological parameters were observed at any concentrations. In comparison with the control groups, significant increase in levels of ALT, AST and ALP at doses of 25 and 250 mg/kg body weight was demonstrated, however, all values were not significantly different after 14 days of recovery. Cholesterol levels in both males and females were significantly lower than the controls. No treatment-related changes were macroscopically and microscopically found. Our study could suggest that oral administration of dried *C. siamensis* bile as high as 250 mg/kg body weight for 90 days showed no systematic toxicity in male and female Sprague Dawley rats.

Keywords: crocodile bile, sub-chronic oral toxicity, *Crocodylus siamensis*

Corresponding e mail: passaraporn.sri@mahidol.edu

Received: 8 November 2019 *Revised: 28 November 2019* *Accepted: 2 December 2019*

Inroduction

Crocodylus siamensis (siamese crocodile) bile is consisted of cholestanol, coprocholic acid, coprocheno- deoxycholic acid and other derivatives including 3-oxo-7α, 12α-dihydroxy-5β-cholestanoic acid, 3α, 7α, 12α-trihydroxy-5β cholestanoic acid, 7-oxo-3α, 12α-dihydroxy-5β-cholestanoic acid, 3-oxo-7α, 12α-dihydroxy-5α-cholestanoic acid, chenodeoxy-cholic acid, 5α-cholestan-3α, 7α, 12α, 26-tertrol, 5β-cholestan-3α, 7α, 12α, 25-tertrol, ursodeoxycholic acid and 5α-cholic acid.[1] Many cultures have used crocodile bile as treatment for sepsis, hemorrhage, trauma and lung diseases[2] in their indigenous traditional medicine. Less scientific studies have, however, been investigated for its toxic effects.

The acute oral toxicity test revealed that siamese crocodile bile classified in GHS (*Globally Harmonized System* of Classification and Labelling of Chemicals) category 4 (300 mg/kg < LD50 < 2,000 mg/kg)[3,4] Further toxicity study on a long-term use is essential. Therefore, this study was to investigate sub-chronic oral toxicity of dried *C. siamensis* bile.

Materials and Methods

Preparation of dried *Crocodylus siamensis* bile:

Bile of *C. siamensis* was obtained from gallbladders of 100 siamese crocodiles at Ayutthaya crocodile farm, Tha Rua district, Phra Nakhon Si Ayutthaya, Thailand. Dried bile was processed according to the patented production of Thai patent application No. 0901001231, Kasetsart University. In brief, the bile was collected after removal of fat tissues and further freeze-dried using a freeze dryer (Lyomaster, USA) for 36 hours. The freeze-dried bile was powdered by graining and stored in a sterilized and dry jar. The bile powder was kept at 4°C until further use[5,6].

Preparation of Animals:

Fifty male and fifty female Sprague Dawley rats with body weights of 200±20 grams were obtained from National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakorn Pathom, Thailand. The animals were housed in stainless steel cages with standard diet (Perfect Companion Group Co., Ltd., Thailand) and hyperchlorinated water (5-7 ppm). The standard environmental conditions were temperature at 22±3°C, 30-70% relative humidity and 12 hours dark-light cycle. The study was approved by National Laboratory Animal Center Animal Care and Use Committee (NLAC-ACUC), Mahidol University; Thailand. (IACUC Approval No. RA2013-02, 2013 October 28).

Sub-chronic Toxicity Test

The sub-chronic toxicity was conducted using OECD 408 with modification[7]. The rats were randomized and divided into 5 groups, consisting of 10 female and 10 male for each group.

According to our acute oral toxicity study, the doses of dried bile used in this study were 2.5, 25 and 250 milligrams/kilograms body weight (mg/kg BW). The 5 groups were as followed; group 1: vehicle control (distilled water), group 2: low dose (2.5 mg/kg body weight), group 3: medium dose (25 mg/kg body weight), group 4: high dose (250 mg/kg body weight) and group 5: satellite group (250 mg/kg body weight).

The dried bile was dissolved in distilled water and orally given to each group of rats daily for 90 days while the control group received distilled water. All groups were daily observed for any signs of toxicity, mortality and changes in the body weights. Food and water consumption were recorded weekly. After 90 days, group 5 was continuously observed for a total of 14 days without administration of the dried bile.

For hematology and clinical biochemistry analysis, all animals were kept fasted for 15-18 hours prior to blood sample collection. The animals were euthanized on the last day of each experimental group using CO_2 inhalation. Blood samples were collected via cardiac puncture. Hematology and clinical biochemistry analysis were performed using automation analyzer (CELL-DYN 3700, Abbott Laboratory, USA and Cobas c111 automate blood analyzer, Roche, Switzerland).

The positions, shapes, sizes and colours of internal organs were observed for gross lesions. Liver, kidneys, lung, adrenals, testes (male), epididymides (male), uterus (female), ovaries (female), heart, spleen, brain and thymus were trimmed and weighed to determine relative organ's weights. Histopathological examinations were performed on liver, kidneys, lung, heart and spleen[8].

Statistical analysis:

Quantitative results were expressed as mean ± standard deviation. Data was statistically analyzed by Kolmogorov-Smirnov[a] and Levene's test for normality and homogeneity of variances. Statistical significance between the control group and each treatment group was determined by ANOVA and Mann Whitney U test using SPSS® Statistic software version 18.0.0. P values ≤ 0.05 were considered significant.

Results

The 90-day study of orally given dried *C. siamensis* bile at all doses did not reveal any changes related to mortality and clinical signs of toxicity (data not shown). The body weights and relative organ weights (g/100g BW) of both sexes of each experimental group were not significantly different from the control groups, as shown in Tables 1 and 2.

Hematological parameters of male and female rats of all tested groups were not significantly changed as compared with the controls (Tables 3 and 4). For blood chemistry analysis, significant elevation of alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) levels were found in male and female rats orally gavage with

the dried bile at the doses of 250 mg/kg BW. The AST level was also significantly higher in both sexes of rats given 25 mg/kg BW of the dried bile than the controls. Cholesterol level of male group receiving the dried bile at concentration of 250 mg/kg BW was significantly lower than the control group, while significant reduction of cholesterol was shown in female groups orally administration with 25, 250 mg/kg BW of dried bile and the satellite group (Tables 5 and 6). In addition, all groups did not show significant histopathological changes (data not shown).

Table 1 Body Weights of rats receiving dried *C.siamensis* bile for 90 days

Sex	Dose of *C.siamensis* Bile (mg/kg BW/day)	Body Weight (g)*					
		Day 0	Day 7	Day 14	Day 28	Day 60	Day 90
Male	Control	217.90±10.55	267.70±11.82	316±16.30	385.70±19.08	459.40±29.21	516.70±35.14
	2.5	213.20±7.42	261.10±8.31	310.80±9.45	376.20±11.58	453.30±12.91	510.50±16.23
	25	215.60±8.29	268.30±13.58	317.00±14.41	382.30±16.61	455.20±20.99	507.60±20.24
	250	221.10±8.69	262.50±14.28	305.40±34.60	370.20±37.61	447.00±21.04	492.56±24.53
	250 (Satellite)	220.40±8.11	265.40±10.77	319.00±10.59	379.50±11.71	448.60±19.49	503.80±24.86
Female	Control	190.80±6.63	206.20±7.79	221.30±9.49	243.20±10.75	272.30±12.47	284.50±11.52
	2.5	188.10±6.24	205.40±6.77	224.00±6.91	246.60±7.60	272.20±14.37	284.50±19.11
	25	194.50±5.04	210.00±7.13	229.60±6.92	253.00±8.01	277.11±11.98	295.33±15.86
	250	190.60±5.87	203.20±6.03	223.30±10.57	243.00±12.94	269.40±15.46	283.20±13.62
	250 (Satellite)	191.80±10.76	203.60±11.94	223.00±12.63	240.30±15.64	261.20±15.49	273.20±17.29

*mean ± standard deviation

Table 2 Relative organ's weights of rats receiving dried *C.siamensis* bile for 90 days

Sex	Dose of *C.siamensis* Bile (mg/kg BW/day)	Relative Organ's Weight per 100 g Body Weight (g)*					
		Liver	Kidney Lt.	Kidney Rt.	Heart	Lung	Spleen
Male	Control	2.82±0.21	0.34±0.02	0.34±0.02	0.32±0.02	0.32±0.03	0.19±0.01
	2.5	2.80±0.18	0.32±0.01	0.33±0.02	0.30±0.02	0.31±0.02	0.18±0.01
	25	2.84±0.20	0.33±0.03	0.34±0.02	0.32±0.03	0.31±0.02	0.18±0.01
	250	2.83±0.07	0.34±0.02	0.34±0.02	0.31±0.02	0.31±0.02	0.19±0.01
	250 (Satellite)	2.82±0.17	0.35±0.03	0.35±0.01	0.32±0.02	0.33±0.02	0.19±0.02
Female	Control	2.38±0.10	0.32±0.02	0.32±0.02	0.35±0.02	0.47±0.04	0.23±0.01
	2.5	2.32±0.15	0.31±0..03	0.31±0.02	0.35±0.02	0.45±0.06	0.23±0.03
	25	2.38±0.16	0.31±0.01	0.32±0.02	0.35±0.01	0.45±0.05	0.22±0.01
	250	2.35±0.16	0.32±0.01	0.33±0.01	0.35±0.01	0.46±0.04	0.25±0.02
	250 (Satellite)	2.32±0.14	0.33±0.02	0.33±0.02	0.35±0.02	0.46±0.06	0.25±0.02

*mean ± standard deviation

Table 3 Effect of dried *C. siamensis* bile on hematological values of male rats

Parameters	Dose of *C. siamensis* Bile (mg/kg BW/day)*				
	Control	2.5	25	250	250 (Satellite)
RBC (10^6/µl)	8.80±0.26	8.81±0.41	9.01±0.26	8.97±0.27	8.78±0.36
Hemoglobin (g/dl)	14.90±0.37	15.00±0.59	15.20±0.44	15.1±0.56	14.6±0.49
Hematocrit (%)	49.30±1.25	49.30±1.77	50.00±1.42	50.50±1.85	48.00±1.36
MCV (fl)	56.00±0.72	56.10±1.08	55.80±0.72	55.80±0.72	55.10±1.28
MCH (pg)	16.90±0.30	17.00±0.28	16.90±0.32	16.80±0.31	16.80±0.34
MCHC (g/dl)	30.20±0.24	30.40±0.27	30.50±0.26	30.40±0.27	30.30±0.46
PLT (10^3/µl)	853.00±50.86	885.00±50.75	919.00±56.43	916.00±88.65	912.00±26.33
WBC (10^6/µl)	7.50±0.94	7.51±1.69	8.29±1.49	8.00±0.86	8.02±1.02

*mean ± standard deviation

Table 4 Effect of dried *C. siamensis* bile on hematological values of female rats

Parameters	Dose of *C. siamensis* Bile (mg/kg BW/day)*				
	Control	2.5	25	250	250 (Satellite)
RBC (10^6/µl)	8.36±0.47	8.49±0.36	8.22±0.21	8.45±0.32	8.56±0.33
Hemoglobin (g/dl)	14.90±0.62	15.00±0.68	14.60±0.34	15.00±0.52	14.80±0.23
Hematocrit (%)	49.20±1.74	49.50±2.01	48.20±1.16	49.20±1.56	49.20±0.88
MCV (fl)	58.90±1.60	58.30±0.74	58.60±0.43	58.30±0.81	58.50±1.23
MCH (pg)	17.80±0.35	17.70±0.38	17.80±0.16	17.80±0.24	17.50±0.50
MCHC (g/dl)	30.30±0.35	30.30±0.44	30.40±0.11	30.40±0.23	30.30±0.36
PLT (10^3/µl)	839.00±43.15	835.00±91.00	843.00±67.06	852.00±35.19	849.00±85.66
WBC (10^6/µl)	6.39±0.90	6.45±0.30	6.48±1.97	6.48±0.82	6.47±0.52

*mean ± standard deviation

Table 5 Effect of dried *C. siamensis* bile on biochemical values of male rats

Parameters	Dose of *C. siamensis* Bile (mg/kg BW/day)*				
	Control	2.5	25	250	250 (Satellite)
Total protein (g/dl)	8.20±0.63	8.20±1.13	8.30±0.84	8.40±0.24	8.00±0.34
Cholesterol (mg/dl)	131.00±8.26	126.00±8.65	124.00±6.62	121.00±8.51**	118.00±8.93
Triglyceride (mg/dl)	86.00±6.55	86.00±4.76	83.00±5.93	80.00±7.46	85.00±5.44
ALT (U/l)	45.00±6.73	46.00±6.46	53.00±8.69	60.00±6.83**	44.00±3.09
AST (U/l)	72.00±3.59	73.00±4.16	87.00±7.01**	91.00±3.81**	69.00±6.64
ALP (U/l)	69.00±7.48	68.00±7.86	73.00±6.97	88.00±5.55**	67.00±3.28
Total bilirubin (mg/dl)	0.09±0.01	0.10±0.02	0.10±0.02	0.10±0.01	0.09±0.02
Albumin (g/dl)	5.40±0.39	5.40±0.54	5.40±0.37	5.40±0.34	5.30±0.16
Globulin (g/dl)	2.80±0.26	2.80±0.64	2.90±0.49	2.90±0.12	2.90±0.28
Creatinine (mg/dl)	0.30±0.05	0.30±0.04	0.30±0.05	0.30±0.05	0.30±0.03
BUN (mg/dl)	20.60±2.42	20.60±2.08	20.70±1.12	20.60±0.34	20.60±1.25
Uric acid (mg/dl)	2.80±0.30	2.70±0.22	2.40±0.73	2.60±0.60	2.60±0.43
Glucose (mg/dl)	203.00±20.74	195.00±38.11	190.00±48.77	185.00±25.37	188.00±39.03

*mean ± standard deviation

**$p \leq 0.05$

Table 6 Effect of dried *C. siamensis* bile on biochemical values of male rats

Parameters	Dose of *C. siamensis* Bile (mg/kg BW/day)*				
	Control	2.5	25	250	250 (Satellite)
Total protein (g/dl)	8.60±1.14	8.50±0.34	8.50±0.97	8.60±0.97	8.40±0.32
Cholesterol (mg/dl)	151.00±8.27	143.00±8.05	137.00±6.47**	124.00±7.04**	130.00±9.29**
Triglyceride (mg/dl)	62.00±4.57	62.00±2.23	60.00±3.54	59.00±2.13	63.00±7.25
ALT (U/l)	54.00±6.90	54.00±5.66	61.00±3.44	70.00±5.19*	52.00±3.05
AST (U/l)	108.00±4.17	108.00±4.37	114.00±7.30**	116.00±3.16**	102.00±3.11
ALP (U/l)	54.00±7.69	54.00±3.83	63.00±9.03	65.00±6.02**	59.00±4.62
Total bilirubin (mg/dl)	0.13±0.02	0.12±0.02	0.14±0.04	0.14±0.02	0.13±0.02
Albumin (g/dl)	6.00±0.65	5.90±0.35	6.00±0.49	6.00±0.27	5.80±0.18
Globulin (g/dl)	2.60±0.58	2.60±0.53	2.50±0.47	2.60±0.29	2.50±0.30
Creatinine (mg/dl)	0.40±0.07	0.40±0.08	0.40±0.07	0.40±0.08	0.40±0.05
BUN (mg/dl)	22.90±2.69	22.80±1.66	22.80±0.98	22.80±1.57	22.80±0.47
Uric acid (mg/dl)	2.80±0.66	2.80±0.55	2.70±0.25	2.80±0.45	2.70±0.54
Glucose (mg/dl)	176.00±34.37	144.00±23.66	138.00±21.70	138.00±8.60	139.00±19.65

*mean ± standard deviation
**$p \leq 0.05$

Discussion

The present study was performed to assess the sub-chronic toxicity of dried *C. siamensis* bile in male and female Sprague Dawley rats. There were no significant difference in body weight, feed and drinking water consumptions between the control and treatment groups. The toxic outcomes on vital body organs of all doses given, which were liver, kidney, heart, lung and spleen, were not observed either macroscopic or microscopic examinations as compared with the control group. In addition, no significant variations were found in relative organ weights It could suggest that dried *C. siamensis* bile at concentrations used in this study did not have any effects on the growth of rats.

There were no changes to RBC, Hemoglobin, Hematocrit, MCV, MCH, MCHC, Platelet and WBC of all groups of animals tested. This study, therefore demonstrated that dried *C. siamensis* bile is not toxic to blood parameters.

Biochemistry results showed significant elevation in ALT and ALP levels at the dose of 250 mg/kg BW and AST levels at doses of 25 mg/kg BW and 250 mg/kg BW, however, those levels in the satellite groups were not significantly different from the controls. Moreover, histological findings did not demonstrate any damage in liver in all groups. Therefore, in this study, it could suggest that dried *C. siamensis* bile orally administration at the dose as high as 250 mg/kg BW for 90 days did not have permanent effects to the liver. Significant reduction of cholesterol levels in both male and female rats was observed. It might possibly be due to an effect on elimination of cholesterol, one of the bile functions[9].

Conclusion

Oral administration of dried *C.siamensis* bile for 90 days at the doses of 2.5, 25 and 250 mg/kg body weight revealed no toxicities in male and female rats. Thus, no observed adverse effect level (NOAEL) of Siamese crocodile bile for Sprague Dawley rats could be equal to 250 mg/kg body weight per day.

Acknowledgements

This study was supported from National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand. The author would like to acknowledge Interdisciplinary Graduate Program in Bioscience, Faculty of Science and The Graduate School, Kasetsart University for all facility support during the course of this research.

References

1. China Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People′s Republic of China. Beijing, China: Chemical Industry Press; 1997.

2. Picheinsutthorn C, Jeerawong V. Animal medicinal materials. In: Hand out of Thai medicinal pharmacy Vol. III. Bangkok: Amarin Press; 2003. p. 150-167.
3. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guidelines for the testing of chemicals No. 420: acute oral toxicity – fixed dose procedure [online]. 2001; [cited 2020 Apr 26]; [14 screens]. Available from: URL: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl420.pdf.
4. Srimangkornkaew P, Praduptong A, Siruntawineti J, Chaeychomsri S, Chaeychomsri W. Acute oral toxicity of Crocodylus siamensis bile in sprague dawley rats. Bull Dept Med Sci 2020; 62(1): 16-25.
5. Chaeychomsri W, Siruntawineti J, Osotsila I. Process suitable for the preservation of crocodile gall bladder for adding value to product. In: Proceeding of the 35th congress on science and technology of Thailand; 2009 Oct 15–17; Chonburi, Thailand. Bangkok, Thailand: The Science Society of Thailand Under the Patronage of His Majesty the King; 2009. p. 569-576.
6. Chaeychomsri W, Siruntawineti J. Process for preparation of crocodile blood powder and its product, Thai Petty Patent No. 5074. Bangkok, Thailand: Kasetsart University; 2006.
7. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guidelines for the testing of chemicals test No. 408: repeated dose 90-days oral toxicity study in rodents [online]. 2018; [cited 2019 Oct 20]; [16 screens]. Available from: URL: https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070707-en.pdf?expires=1589271810&id=id&accname=guest&checksum=8BF6058D341C0664D65F9A5B948F0A99.
8. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 8th ed. London, England: Elsevier; 2018.
9. Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. Arch Intern Med 1999; 159(22): 2647-58.

พิษกึ่งเรื้อรังของน้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทย *(Crocodylus siamensis)* ในหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley

ภัสสราภรณ์ ศรีมังกรแก้ว[1,5] อมร ประดับทอง[1,4] จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ[2] สุดาวรรณ เชยชมศรี[3] และ วิน เชยชมศรี[2]

[1]หลักสูตรสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร 10900

[2]ภาควิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร 10900

[3]ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วิทยาเขตกำแพงแสน, จังหวัดนครปฐม 73140

[4]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิทยาศาสตร์ (องค์การมหาชน), กรุงเทพมหานคร 10400

[5]ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล, จังหวัดนครปฐม 73170

บทคัดย่อ น้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทยถูกใช้เป็นส่วนผสมในยาแผนโบราณมาเป็นเวลานาน แต่การศึกษาความปลอดภัยค่อนข้างจำกัด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของน้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทยในหนูแรท สายพันธุ์ Sprague Dawley โดยทำการป้อนสารที่ความเข้มข้น 2.5, 25 และ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ทุกวันต่อเนื่องกันเป็นเวลา 90 วัน ผลการทดสอบพบว่าน้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทย ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว การบริโภคอาหารและน้ำดื่ม รวมถึงน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะสำคัญ ค่าโลหิตวิทยาไม่มีความแตกต่างที่สัมพันธ์กับขนาดสารทดสอบทุกความเข้มข้น จากการทดสอบค่าเคมีคลินิกในเลือดพบว่าค่า ALT AST และ ALP ของหนูแรทที่ป้อนน้ำดีจระเข้ที่ความเข้มข้น 25 และ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญภายหลังหยุดให้น้ำดีจระเข้เป็นเวลา 14 วัน ขณะที่ค่า cholesterol ลดลง ส่วนการตรวจสอบทางพยาธิวิทยาไม่พบความเปลี่ยนแปลงในหนูทั้ง 2 เพศ ผลการศึกษาแสดงว่าน้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทยที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวเมื่อป้อนให้หนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley นั้นมีความปลอดภัย

คำสำคัญ: น้ำดีจระเข้, การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง, *Crocodylus siamensis*

ว กรมวิทย พ 2563; 62 (2) : 59 – 75

การประเมินผลเปปไทด์สังเคราะห์ต้านจุลินทรีย์ต่อ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

นวลฉวี เวชประสิทธิ์[1] จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย[2] นฤมล เผ่านักรบ[2] และสิทธิรักษ์ รอยตระกูล[2]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง หัวหมาก บางกะปิ กรุงเทพฯ 10240

[2]กลุ่มวิจัยส่วนผสมฟังก์ชั่นและนวัตกรรมอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ คลองหลวง ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ การศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกเปปไทด์จากฐานข้อมูลเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์จำนวน 9 เส้น ที่มีขนาด 6–25 กรดอะมิโน มีประจุสุทธิเป็นบวก และ 40–83% hydrophobicity นำเปปไทด์ทั้งหมดไปสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20635, MRSA DMST 20637 และ MRSA DMST 20654 พบว่าเปปไทด์ KLKLLLLLKLK สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมด จากนั้นทำการดัดแปลงเปปไทด์เส้นนี้ ทำให้ได้เปปไทด์จำนวน 12 เส้น ที่มีค่าของ %hydrophobicity และประจุสุทธิแตกต่างจากเดิม ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของเปปไทด์สังเคราะห์ 12 เส้น พบว่าเปปไทด์ KLKLKLKLKLK, LLLLLLKLK และ LLLLLLK มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635 และ MRSA DMST 20654 ได้สูงสุด โดยมีค่า IC_{50} 27.5–62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) พบว่าทุกสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* มี Peptide barcode แตกต่างกัน จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลินต่างกันมีผลต่อ Peptide barcode ต่างกัน และการตอบสนองต่อเปปไทด์สังเคราะห์ก็แตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของเปปไทด์ทั้ง 3 เส้น ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA ควรจะนำไปศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรค

คำสำคัญ : *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน, Peptide barcode, เปปไทด์สังเคราะห์

Corresponding author E-mail: nuanwee@yahoo.com

Received: 20 November 2019 *Revised: 13 April 2020* *Accepted: 13 May 2020*

บทนำ

เปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial peptides หรือ AMPs) เป็นสารที่สร้างขึ้นจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และมีบทบาทในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ AMPs มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ มัยโคแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา รวมทั้งเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ[1] ตัวอย่างเช่น เปปไทด์ hepcidin ที่สามารถต้านเชื้อ *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* และ *Aspergillus niger*[2] เปปไทด์ cathelicidin (LL-37) ต้านเชื้อก่อโรคผิวหนัง[3] และเชื้อก่อโรคในท่อกระเพาะปัสสาวะ[4] เป็นต้น ดังนั้น AMPs จึงมีบทบาทเป็นเหมือนยาปฏิชีวนะภายใน (endogenous antibiotics) ที่สร้างขึ้นมาเป็นระบบภูมิคุ้มกัน มีหน้าที่ซ่อมแซมบาดแผล และเป็น mediator ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ กระตุ้นให้เซลล์กำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยหลั่งสารน้ำออกมา เช่น ไซโตไคน์ (cytokine) จากแมคโครฟาจ (macrophage) และนิวโตรฟิล (neutrophil)[5] โดยทั่วไป AMPs ประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโน 12-50 ตัว ซึ่งมักมีกรดอะมิโนประจุบวกชนิดอาร์จินีน (arginine) ไลซีน (lysine) หรือฮีสติดีน (histidine) และกลุ่มของไฮโดรโฟบิค (hydrophobic) ซึ่งมีสัดส่วนมากกว่า 50% ในโมเลกุล[6] จากความแตกต่างทางลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิและประจุสุทธิ ทำให้มีการแบ่ง AMPs ออกเป็นหลายกลุ่ม[7, 8]

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้ในโรงพยาบาล มีคุณสมบัติดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด[9] สามารถแพร่กระจายได้ง่าย การระบาดของเชื้อกลุ่ม MRSA จะพบในผู้ป่วยที่รักษาตัวในโรงพยาบาล โดยเฉพาะผู้สูงอายุ หรือผู้ป่วยหนัก หรือได้รับแผลจากการผ่าตัด และมักพบในพื้นที่ชุมชนแออัด การติดเชื้อ MRSA นอกโรงพยาบาลจะเป็นการติดเชื้อที่ผิวหนังและอาจมีอาการรุนแรงได้ จากปัญหาเชื้อ MRSA ดื้อยาปฏิชีวนะนี้ ทำให้มีการพัฒนายาใหม่ ๆ ที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น แต่ยากลุ่มนี้มีจำนวนน้อยและก่อให้เกิดปัญหาดื้อยาอย่างรวดเร็ว กลไกการดื้อยาของเชื้อเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบที่บริเวณผนังเซลล์ เช่น กรดทีโคอิค (teichoic acids)[10] ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide)[11] หรือฟอสโฟโคลีน (phosphocholine)[12] เป็นต้น ในปัจจุบันมีการตรวจหาความแตกต่างทางด้านจีโนไทป์ (genotype) ของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย และสายพันธุ์ดื้อยาของแบคทีเรียในจีนัสและสปีชีส์เดียวกัน โดยการวิเคราะห์หาลายพิมพ์เปปไทด์ (peptide mass fingerprint) หรือ Peptide barcode ด้วยเครื่อง matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์การแยกชนิด (typing) ของแบคทีเรียได้จำเพาะและดีกว่าการแยกฟีโนไทป์ (phenotype) ด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test)[13, 14] จากการศึกษาวิจัยพบว่าแบคทีเรียที่มีการดื้อยาแตกต่างกัน จะมีลายพิมพ์เปปไทด์แตกต่างกัน[14] ทำให้การตอบสนองต่อยาก็แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ จากปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียทำให้มีการศึกษาและพัฒนา AMPs แทนยาปฏิชีวนะ เพื่อใช้เป็นยาชนิดใหม่สำหรับรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยา AMPs มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะทั่วไปและเชื้อไม่ดื้อยาง่าย สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ทำงานไปพร้อมกับการทำงานของ AMPs ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น AMPs จึงเป็นอีกทางเลือกที่จะนำไปพัฒนาเป็นยากลุ่มใหม่ที่จะใช้แทนหรือควบคู่ (combination therapy) กับยาอื่น ซึ่งมีรายงานการใช้เปปไทด์ LL-13 และ LL-17 (อนุพันธุ์ของเปปไทด์ cathelicidin) ร่วมกับการใช้ยาแวนโคมัยซิน (vancomycin) ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่สร้าง biofilm และดื้อยาแวนโคมัยซิน[15] นอกจากนี้ยังพบว่ามี AMPs บางชนิดมีผลทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์เยื่อหุ้มต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต[16] จึงเป็นปัญหาในการนำไปพัฒนาหรือประยุกต์ใช้ทางคลินิก ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยดัดแปลงโครงสร้างเปปไทด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเปปไทด์ ซึ่งจะต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเปปไทด์ เช่น สมบัติการเป็น amphipathicity (เป็นได้ทั้งไฮโดรฟิลิคและไฮโดรโฟบิค) สมบัติความเป็นประจุบวก (เป็นไฮโดรฟิลิค) สมบัติความเป็นไฮโดรโฟบิค ลำดับกรดอะมิโน (ควรเป็นกรดอะมิโน hydrophobic residue มากกว่า 50%) สมบัติการเกิดโครงสร้างเกลียว α-helix (helicity) สมบัติ self-association

(การม้วนพับโปรตีน) โครงสร้างแบบสายตรง (linear) เป็นวง (cyclic) เป็นต้น[16, 17, 18, 19, 20] การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเปปไทด์ เช่น เป็นวงและเชื่อมต่อกับโมเลกุลไขมันทำให้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย MRSA ได้ดีขึ้น[21, 22] การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ออกแบบสายเปปไทด์สายสั้น ๆ และดัดแปลงโครงสร้างเพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน เพื่อจะนำไปศึกษากลไกการออกฤทธิ์และพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistances) แทนการใช้ยาปฏิชีวนะที่มีใช้ในปัจจุบัน

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคน *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 (ไม่ดื้อยาเมทิซิลลินและเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน; American Type Culture Collection) MRSA DMST 20635, MRSA DMST 20637 และ MRSA DMST 20654 จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และศูนย์รวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMST Culture Collection) กระทรวงสาธารณสุข

เปปไทด์สังเคราะห์และยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย

เปปไทด์สังเคราะห์ที่ใช้ในการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย มีจำนวนทั้งหมด 21 เส้น โดย MRSA1-MRSA9 เป็นเปปไทด์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูลเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ ส่วน MRSA10-MRSA21 เป็นเปปไทด์ที่ออกแบบและดัดแปลงจากเปปไทด์ MRSA1 สังเคราะห์โดยบริษัท China Peptide Co., Ltd., China, ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ เพนิซิลลิน (penicillin) และออกซาซิลลิน (oxacillin) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA, แวนโคมัยซิน ของบริษัท Merck, Germany

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635, MRSA DMST 20637 และ MRSA DMST 20654 ที่เก็บในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Tryptic Soy agar (Difco, Laboratories Inc., USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวจากอาหารแข็ง มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Tryptic Soy broth (Difco, Laboratories Inc., USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อมาเจือจางปรับความขุ่นด้วย 0.85% NaCl ให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 โดยใช้เครื่องวัดความขุ่น (suspension turbidity detector; Biosan Ltd., Latvia)

การออกแบบและสังเคราะห์เปปไทด์สายสั้น ๆ

ทำการคัดเลือกสายเปปไทด์ที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีจากฐานข้อมูล Antimicrobial Peptide Database (http://aps.unmc.edu/AP/main.php) ได้แก่ เปปไทด์ MRSA1-MRSA9 หลังจากนั้นทำการปรับเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ โดยออกแบบให้มีสมบัติการเป็น amphipathicity สมบัติความเป็นประจุบวก สมบัติความเป็นไฮโดรโฟบิค และสมบัติการเกิดโครงสร้างเกลียว α-helix หลากหลาย (http://aps.unmc.edu/AP/main.php และ https://pepcalc.com) ได้เป็นเปปไทด์ MRSA10-MRSA21 (ตารางที่ 1) นำเปปไทด์ทั้งหมดไปสังเคราะห์

ตารางที่ 1 ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์สังเคราะห์

ชื่อเปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโนบนสายเปปไทด์
MRSA1	KLKLLLLLKLK
MRSA2	CGGGGGAGLPSSLLLLLEKSSKVKF
MRSA3	FFGSVLKLIPKIL
MRSA4	FFSLLPSLIGGLVSAIK
MRSA5	KIAKVALKAL
MRSA6	GFWGKLWEGVKSAI
MRSA7	NMLPKLLHA
MRSA8	LMLLRF
MRSA9	NLLLMLSSK
MRSA10	KLKLLLLLLKLK
MRSA11	KLKLLLLLLLKLK
MRSA12	KLKLLLLLLLLKLK
MRSA13	KLLLLLLLLLK
MRSA14	KLKLLKLLKLK
MRSA15	KLKLLLKLKLK
MRSA16	KLKLKLKLKLK
MRSA17	LKLLLLLLKL
MRSA18	KLLLLLLK
MRSA19	LLLLLLKLK
MRSA20	LLLLLLKL
MRSA21	LLLLLLK

G = Glycine, A = Alanine, P = Proline, V = Valine, L = Leucine, I = Isoleucine, M = Methionine, S = Serine, T = Threonine, C = Cysteine, N = Asparagine, Q = Glutamine, D = Aspartate, K = Lysine, E = Glutamate, H = Histidine, R = Arginine, F = Phenylalanine, Y = Tyrosine, W = Tryptophan

การตรวจหา Peptide barcode ของเชื้อ *S. aureus* ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

นำเซลล์แบคทีเรียจากอาหารแข็งมาผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเอทานอลปริมาตร 900 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นเพื่อให้เซลล์ตกตะกอน นำตะกอนเซลล์ผสมกับสารละลาย MALDI matrix (10 มิลลิกรัม ของ sinapinic acid ใน 1 มิลลิลิตร ของ 50% acetonitrile ที่ประกอบด้วย 2.5% trifluoroacetic acid) นำสารละลายสกัดปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบน MALDI target (MTP384 ground steel, Bruker Daltonik, GmbH) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง[14] นำมาวิเคราะห์ด้วย Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonik, GmbH) ใช้ linear positive mode กับ mass range ที่ 2000-20000 Dalton แต่ละตัวอย่างทำการเก็บข้อมูลจากการยิงด้วยเลเซอร์ 500 shots ที่ 50 Hz โดยแต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ 24 ซ้ำ (n=24) หลังจากเก็บข้อมูลลายพิมพ์เปปไทด์ ซึ่งจะเป็น Peptide barcode ของแต่ละตัวอย่าง นำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลายพิมพ์เปปไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีใน MALDI Biotyper 2.0 software package ข้อมูลลายพิมพ์เปปไทด์ที่ตรงกันกับฐาน

ข้อมูลจะคำนวณออกมาเป็นคะแนน (score) และวิเคราะห์ Principal Component Analysis (PCA) ของลายพิมพ์เปปไทด์ ด้วย MALDI Biotype 2.0 software package โดยใช้ลายพิมพ์เปปไทด์ ของ *Escherichia coli* DH5α เป็น positive control และสารละลาย MALDI matrix เป็น blank

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Broth Microdilution

การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน โดยหาค่า half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) ด้วยวิธี microdilution ใน 96-well microtiter plate ที่ดัดแปลงวิธีการเล็กน้อย[23] นำเปปไทด์สังเคราะห์มาเตรียมเป็น stock solution ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเจือจางเปปไทด์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Tryptic Soy broth นำเชื้อแบคทีเรีย (ความขุ่น 10^5 CFU/ml) ใส่ลงใน 96-well microtiter plate ปริมาตร 80 ไมโครลิตร หลังจากนั้นดูดสารละลายเปปไทด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่เจือจางแล้วใส่ลงใน 96-well microtiter plate ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเปปไทด์ คือ 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยทำ 3 ซ้ำ (triplicate) จากนั้นนำ microtiter plate เข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวัดความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง microtiter plate reader (RT-2100C, Rayto) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ไม่มีเปปไทด์เป็นตัวควบคุม (negative control) และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสง หรือ optical density (OD) ของการทดสอบเปปไทด์ทั้งหมด คำนวณหาค่า %Growth inhibition ตามสูตรข้างล่าง และคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (minimum concentration หรือ lowest concentration) ของเปปไทด์ที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ 50% เมื่อเทียบกับ control ซึ่งจะเป็นค่า IC_{50}

$$\%\text{Growth inhibition} = 1 - [(OD_{\text{peptide treated}} - OD_{\text{blank}})/(OD_{\text{control}} - OD_{\text{blank}})] \times 100$$

ในการทดสอบนี้ใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารควบคุมในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยนำยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน ออกซาซิลลิน และแวนโคมัยซิน เตรียมเป็น stock solution ที่ความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางยาปฏิชีวนะด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อตามวิธีการข้างต้น ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะ คือ 1000, 800, 600, 400, 200, 150, 100, 50, 25, 10, 5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} ของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

ผล

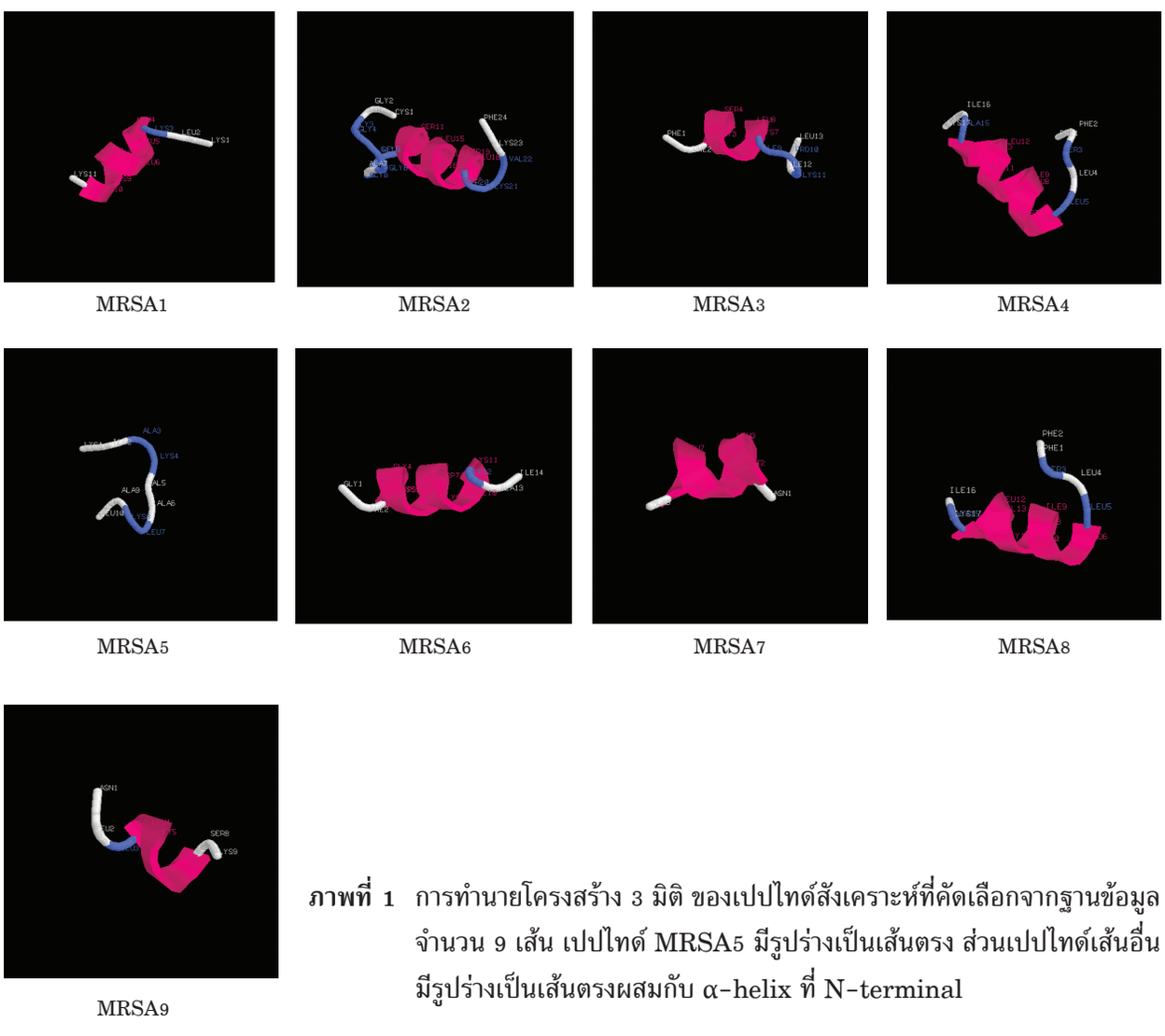
การออกแบบและสังเคราะห์เปปไทด์สายสั้น ๆ

ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ได้จากฐานข้อมูลของ Antimicrobial Peptide Database (http://aps.unmc.edu/AP/main.php) เปปไทด์ที่ออกแบบทั้งหมดนำมาคำนวณหาค่าคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physico-chemical) เช่น น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ค่า pI เป็นต้น ด้วยโปรแกรม (http://aps.unmc.edu/AP/main.php และ https://pepcalc.com) จำนวน 9 เส้น ได้แก่ เปปไทด์ MRSA1-MRSA9 แสดงในตารางที่ 2 เปปไทด์ทั้งหมดมีความยาวตั้งแต่ 6-25 กรดอะมิโน และมีความเป็น hydrophobicity ตั้งแต่ 40-83% และมีประจุสุทธิ (net charge) ตั้งแต่ +1 ถึง +4 ทำนายโครงสร้าง 3 มิติ (3-D structure) ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD 2.0 (http://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD) จากโครงสร้าง 3 มิติ พบว่าเปปไทด์บางเส้นมีรูปร่างเป็นเส้นตรง บางเส้นเปปไทด์มีรูปร่างเป็นเส้นตรงผสมกับ α-helix ที่ N-terminal และไม่พบเส้นเปปไทด์ที่มีรูปร่าง β-pleated sheet (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 2 ลำดับกรดอะมิโนและสมบัติทางเคมีกายภาพของเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล

Peptides	Sequences	No. amino acids	MW	pI	Total net charge	% HB	Protein-binding potential (kcal/mol)
MRSA1	KLKLLLLLKLK	11	1322.82	11.15	+4	63	-1.11
MRSA2	CGGGGGAGLPSSLLLLLEKSSKVKF	25	2418.90	10.09	+2	40	-0.32
MRSA3	FFGSVLKLIPKIL	13	1474.87	10.69	+3	61	-1.61
MRSA4	FFSLLPSLIGGLVSAIK	17	1762.14	9.88	+2	58	-1.61
MRSA5	KIAKVALKAL	10	1054.37	10.98	+4	70	-0.75
MRSA6	GFWGKLWEGVKSAI	14	1577.82	9.93	+2	50	-0.34
MRSA7	NMLPKLLHA	9	1036.31	9.70	+1	55	-0.23
MRSA8	LMLLRF	6	792.06	10.84	+1	83	-0.86
MRSA9	NLLLMLSSK	9	1018.28	9.70	+1	55	-0.33

G = Glycine, A = Alanine, P = Proline, V = Valine, L = Leucine, I = Isoleucine, M = Methionine, S = Serine, T = Threonine, C = Cysteine, N = Asparagine, Q = Glutamine, D = Aspartate, K = Lysine, E = Glutamate, H = Histidine, R = Arginine, F = Phenylalanine, Y = Tyrosine, W = Tryptophan



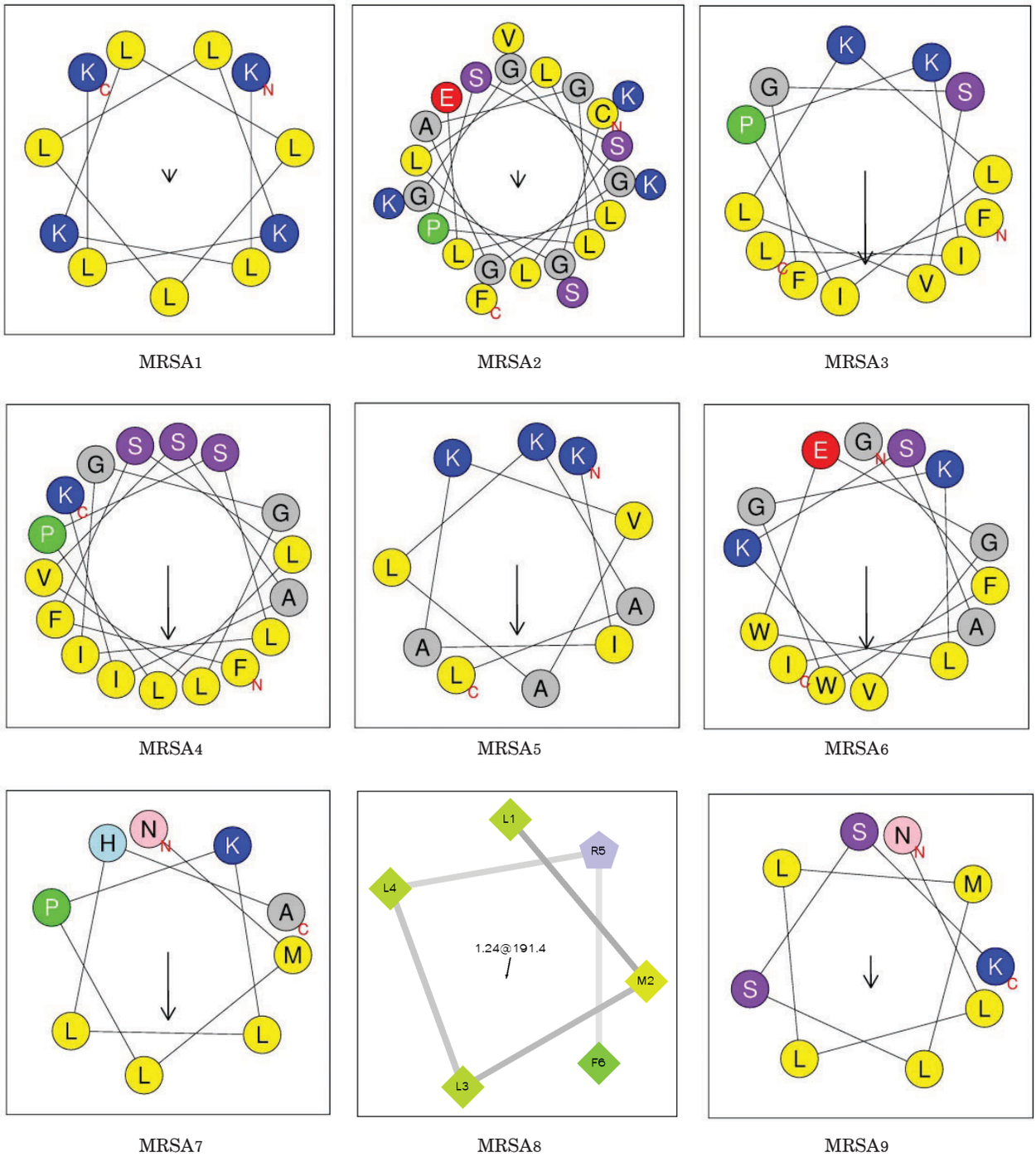
MRSA1 MRSA2 MRSA3 MRSA4

MRSA5 MRSA6 MRSA7 MRSA8

MRSA9

ภาพที่ 1 การทำนายโครงสร้าง 3 มิติ ของเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล จำนวน 9 เส้น เปปไทด์ MRSA5 มีรูปร่างเป็นเส้นตรง ส่วนเปปไทด์เส้นอื่นมีรูปร่างเป็นเส้นตรงผสมกับ α-helix ที่ N-terminal

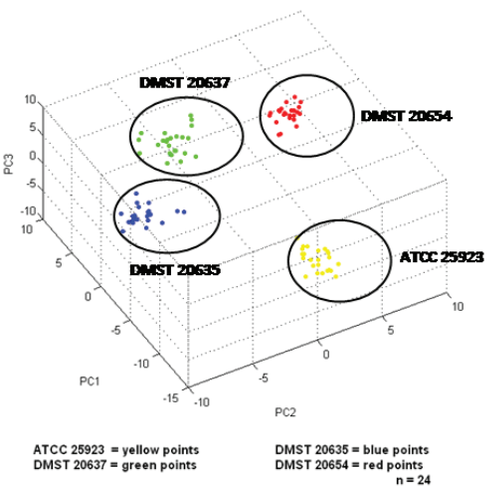
เมื่อวิเคราะห์รูปร่างของเปปไทด์ทั้ง 9 เส้น แบบ helical wheel ด้วยโปรแกรม heliquest (http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/) พบว่ามีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 2 เปปไทด์ MRSA1 มีลักษณะของโครงสร้างที่เป็นไฮโดรโฟบิค และไม่มีขั้ว (non-polar) เป็นครึ่งหนึ่งสมดุล เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์เส้นอื่น ๆ



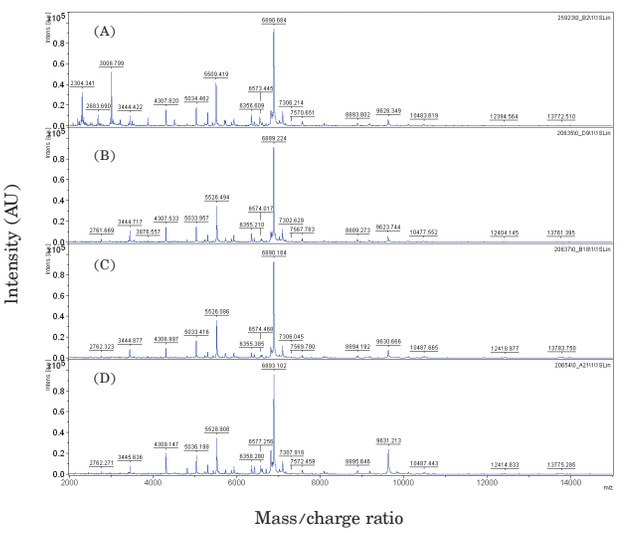
ภาพที่ 2 ลักษณะ helical wheel ของเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล จำนวน 9 เส้น เปปไทด์ MRSA1 มีลักษณะของโครงสร้างที่เป็นไฮโดรโฟบิค และไม่มีขั้ว เป็นครึ่งหนึ่งสมดุล เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์เส้นอื่น ๆ

การตรวจหา Peptide barcode ของเชื้อ *S. aureus* ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการตรวจหา Peptide barcode โดยใช้ MALDI-TOF MS มาตรวจวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเปปไทด์ในตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย ผลวิเคราะห์ที่ได้จะเป็นลายพิมพ์เปปไทด์ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของแต่ละชนิด และแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ลายพิมพ์เปปไทด์ที่ได้จะเป็นการตรวจพิสูจน์ยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียและความแตกต่างทางจีโนไทป์ของสายพันธุ์แบคทีเรียในจีนัสและสปีชีส์เดียวกัน จากการนำเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน จำนวน 4 สายพันธุ์ มาทำการสกัดเปปไทด์แล้ววิเคราะห์ลายพิมพ์เปปไทด์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS แล้วเปรียบเทียบลายพิมพ์เปปไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลลายพิมพ์เปปไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดใน MALDI Biotyper 2.0 software package พบว่า *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลินทั้ง 4 สายพันธุ์ มีค่า score มากกว่า 2.3 ตรงกับ *S. aureus* ในฐานข้อมูล แต่ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีลายพิมพ์เปปไทด์ หรือ Peptide barcode แตกต่างกัน ซึ่งสามารถเห็นได้จากผลภาพ PCA และ MALDI-TOF MS Spectrum (ภาพที่ 3 และ 4) แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* ที่นำมาใช้ทดสอบมีสายพันธุ์แตกต่างกันทั้ง 4 สายพันธุ์



ภาพที่ 3 3D PCA Scatter plot ของ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635, MRSA DMST 20637 และ MRSA DMST 20654 โดยใช้โปรแกรม ClinPro Tools 2.2 software (Bruker Daltonik, GmbH, Bremen, Germany)



ภาพที่ 4 ลายพิมพ์เปปไทด์ของ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ (A) *S. aureus* ATCC 25923, (B) MRSA DMST 20635, (C) MRSA DMST 20637 และ (D) MRSA DMST 20654 ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Broth Microdilution

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลินกับเปปไทด์สังเคราะห์

นำเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูลเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ จำนวน 9 เส้น มาทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ใน 96-well microtiter plate และทำการวัดการเจริญเติบโตที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเปปไทด์ MRSA1 (KLKLLLLLKLK) ซึ่งมี จำนวน 11 กรดอะมิโน ค่าประจุสุทธิเท่ากับ +4 และ %hydrophobicity เท่ากับ 63% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (%Growth inhibition) ได้ดีที่สุด โดยยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 มากกว่า 50% ยับยั้ง *S. aureus* (MRSA) DMST 20635 และ DMST 20637 มากกว่า 30% และยับยั้ง *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 มากกว่า 14% ที่ความเข้มข้นของเปปไทด์ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเปปไทด์เส้นอื่นๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้น้อย โดยมีค่า %Growth inhibition ที่เวลา 16 ชั่วโมง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลินกับเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูลจำนวน 9 เส้น โดยใช้เปปไทด์ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 16 ชั่วโมง

Peptides	%Growth Inhibition			
	S. aureus **ATCC 25923**	**MRSA DMST 20635**	**MRSA DMST 20637**	**MRSA DMST 20654**
MRSA1	52.39	35.95	32.78	14.21
MRSA2	12.77	29.09	23.54	1.62
MRSA3	9.5	33.57	25.04	0
MRSA4	13.24	31.54	26.03	0
MRSA5	11.2	34.91	23.04	0.61
MRSA6	17.07	39.05	32.40	0
MRSA7	15.30	35.59	24.41	0
MRSA8	14.23	34.67	23.16	11.77
MRSA9	5.47	39.05	26.03	7.61

จากการทดสอบเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน ออกซาซิลลิน และแวนโคมัยซิน ที่ใช้เป็นสารควบคุมในการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการทดลองเช่นเดียวกับเปปไทด์สังเคราะห์ พบว่ายาทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ โดยยาแวนโคมัยซินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} 3.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเพิ่มจำนวน (exponential phase) ของเชื้อ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะที่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน โดยวิธี Broth Microdilution ที่เวลา 4 ชั่วโมง

S. aureus	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	เพนิซิลลิน	**ออกซาซิลลิน**	**แวนโคมัยซิน**
ATCC 25923	0.68	270	3.9
MRSA DMST 20635	500	>1000	3.9
MRSA DMST 20637	500	750	3.9
MRSA DMST 20654	500	>1000	3.9

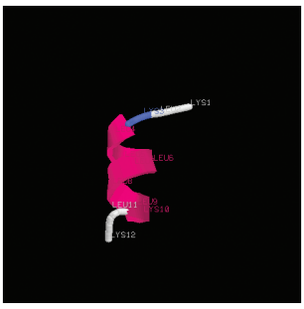
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลินกับเปปไทด์สังเคราะห์ดัดแปลง

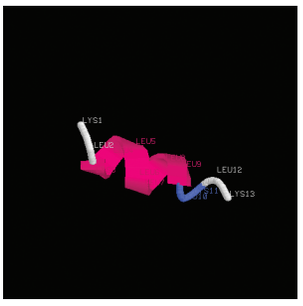
จากผลการทดสอบเปปไทด์คัดเลือกจากฐานข้อมูลจำนวน 9 เส้น (MRSA1-MRSA9) พบว่าเปปไทด์ MRSA1 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้ดีที่สุด จึงทำการดัดแปลงเปปไทด์เส้นนี้ให้มีรูปร่าง ประจุสุทธิ และ hydrophobicity เปลี่ยนไป คุณสมบัติต่าง ๆ ของเปปไทด์ดัดแปลงจำนวน 12 เส้น (MRSA10-MRSA21) แสดงในตารางที่ 5 ความยาวของเปปไทด์มีขนาดตั้งแต่ 7-14 กรดอะมิโน มีความเป็น hydrophobicity ตั้งแต่ 45-87% และมีประจุสุทธิตั้งแต่ +1 ถึง +6 จากการทำนายโครงสร้าง 3 มิติ ของเปปไทด์ พบว่า MRSA13, 20 และ 21 มีรูปร่างเป็นเส้นตรง ส่วนเส้นอื่นมีรูปร่างเป็นเส้นตรงผสมกับ α-helix ที่ N-terminal และไม่พบเส้นเปปไทด์ที่มีรูปร่าง β-pleated sheet (ภาพที่ 5) และการทำนายโครงสร้างในการเกาะจับของเปปไทด์กับเมมเบรน (membrane) โดยใช้โปรแกรม PPM 2.0 (https://opm.phar.umich.edu/ppm_server) พบว่าเปปไทด์ MRSA13, MRSA18, MRSA19, MRSA20 และ MRSA21 ไม่สามารถจับกับเมมเบรนได้ แต่เปปไทด์ MRSA1, MRSA10, MRSA11, MRSA12, MRSA14, MRSA15, MRSA16 และ MRSA17 ที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงและมี α-helix ตรงปลาย N-terminal สามารถจับกับเมมเบรนได้ (ภาพที่ 6)

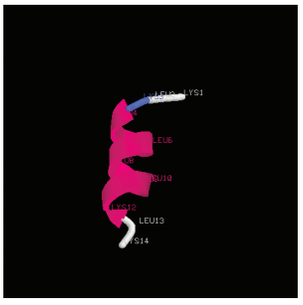
หลังจากนำเปปไทด์สังเคราะห์ที่ดัดแปลงโครงสร้าง จำนวน 12 เส้น มาทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ใน 96-well microtiter plate และทำการวัดการเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ พบว่าเปปไทด์ MRSA16 (KLKLKLKLKLK) ประกอบด้วย 11 กรดอะมิโน ประจุสุทธิ +6 และ 45% hydrophobicity เปปไทด์ MRSA19 (LLLLLLKLK) มี 9 กรดอะมิโน ประจุสุทธิ +2 และ 77% hydrophobicity และเปปไทด์ MRSA21 (LLLLLLK) มี 7 กรดอะมิโน ประจุสุทธิ +1 และ 85% hydrophobicity มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635 และ MRSA DMST 20654 ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ MRSA1 โดยมีค่า IC_{50} 27.5-62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6-8 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเพิ่มจำนวนของเชื้อ (ตารางที่ 6)

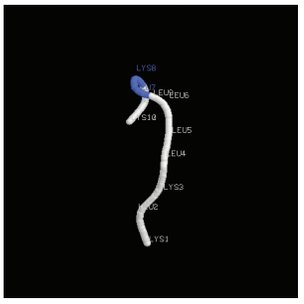
ตารางที่ 5 ลำดับกรดอะมิโนและสมบัติทางเคมีกายภาพของเปปไทด์สังเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก MRSA1

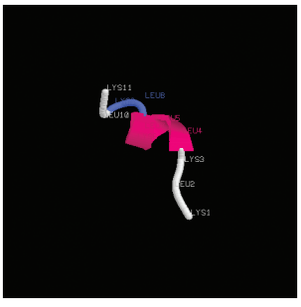
Peptides	Sequences	No. amino acids	MW	pI	Total net charge	%HB	Protein-binding potential (kcal/mol)
MRSA10	KLKLLLLLLKLK	12	1435.98	11.15	+4	66	-1.43
MRSA11	KLKLLLLLLLKLK	13	1549.14	11.15	+4	69	-1.69
MRSA12	KLKLLLLLLLLKLK	14	1662.30	11.15	+4	71	-1.92
MRSA13	KLLLLLLLLLK	11	1292.80	10.69	+2	81	-3.01
MRSA14	KLKLLKLLKLK	11	1337.83	11.28	+5	54	-0.16
MRSA15	KLKLLLKLKLK	11	1337.83	11.28	+5	54	-0.16
MRSA16	KLKLKLKLKLK	11	1352.84	11.37	+6	45	0.79
MRSA17	LKLLLLLLKL	10	1179.64	10.73	+2	80	-2.82
MRSA18	KLLLLLLK	8	953.32	10.69	+2	75	-2.3
MRSA19	LLLLLLKLK	9	1066.48	10.73	+2	77	-2.59
MRSA20	LLLLLLKL	8	938.31	10.12	+1	87	-3.61
MRSA21	LLLLLLK	7	825.15	10.12	+1	85	-3.42

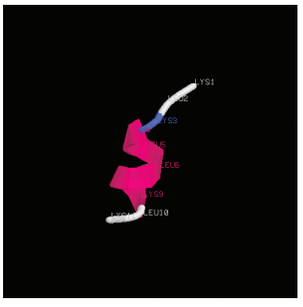

MRSA10


MRSA11

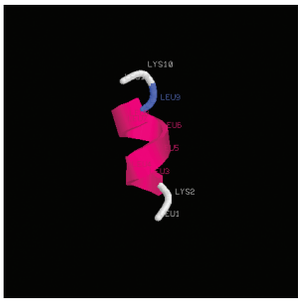

MRSA12

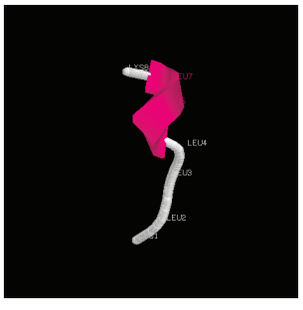

MRSA13

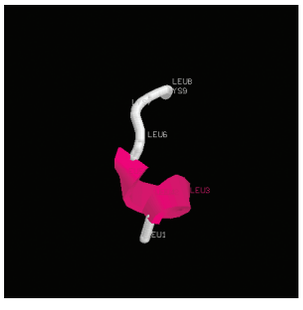

MRSA14

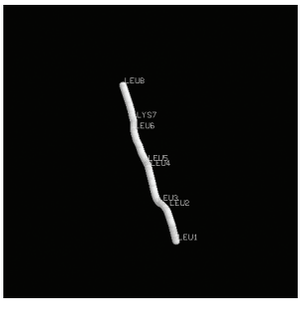

MRSA15

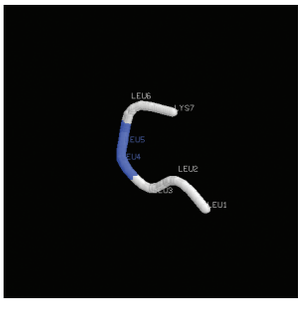
MRSA16


MRSA17

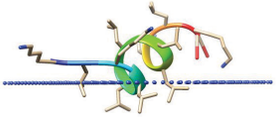

MRSA18

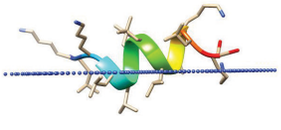

MRSA19

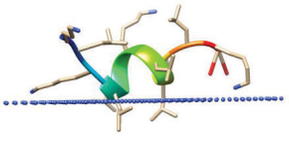

MRSA20

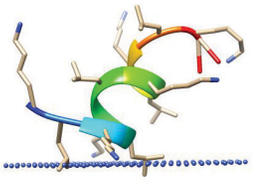

MRSA21

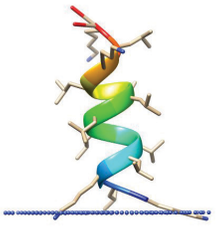
ภาพที่ 5 แสดงการทำนายโครงสร้าง 3 มิติ ของเปปไทด์สังเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก MRSA1 จำนวน 12 เส้น เปปไทด์ MRSA13, 20 และ 21 มีรูปร่างเป็นเส้นตรง ส่วนเปปไทด์เส้นอื่นมีรูปร่างเป็นเส้นตรงผสมกับ α-helix ที่ N-terminal

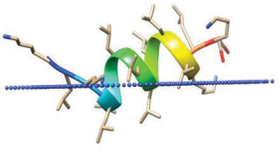

MRSA1

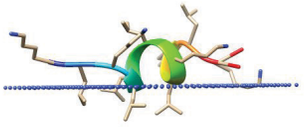

MRSA10

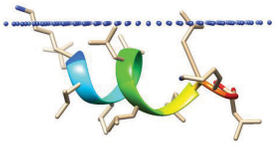

MRSA14


MRSA16


MRSA11


MRSA12


MRSA15


MRSA17

ภาพที่ 6 ไดอะแกรมโครงสร้าง 3 มิติ ของเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล (MRSA1) และเปปไทด์สังเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก MRSA1 (MRSA10, 11, 12, 14, 15, 16 และ 17) สามารถเกาะกับเมมเบรนได้

ตารางที่ 6 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลินกับเปปไทด์ MRSA1 และเปปไทด์สังเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก MRSA1 ที่เวลา 6-8 ชั่วโมง

Peptides	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	S. aureus ATCC 25923	MRSA DMST 20635	MRSA DMST 20637	MRSA DMST 20654
MRSA1	29.5	75	>100	>100
MRSA10	27.3	>100	>100	>100
MRSA11	27.3	>100	>100	75.5
MRSA12	>100	>100	>100	>100
MRSA13	>100	>100	>100	64.5
MRSA14	>100	>100	>100	>100
MRSA15	68.2	30.0	>100	>100
MRSA16	34.5	27.5	>100	>100
MRSA17	>100	>100	70.0	69.5
MRSA18	>100	>100	>100	>100
MRSA19	37.5	37.0	>100	49.5
MRSA20	27.0	39.5	>100	>100
MRSA21	30.0	62.5	>100	36.5

วิจารณ์

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ โดยเฉพาะ *S. aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน เป็นสาเหตุของการเกิดโรครุนแรงและเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุข ดังนั้นเปปไทด์ต้านเชื้อจุลินทรีย์หรือ AMPs จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่มีการดื้อยา ในปัจจุบันได้มีการดัดแปลง เปลี่ยนโครงสร้าง และรูปร่างโมเลกุลของ AMPs เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ให้มากขึ้น เช่น การเพิ่มประจุบวกด้วยกรดอะมิโนไลซีน[24, 25] การเปลี่ยนเป็นไฮโดรโฟบิคด้วยกรดอะมิโนลิวซีน[26] การเปลี่ยนเป็นไฮโดรโฟบิคและไฮโดรฟิลิคในโมเลกุลเดียวกัน[27] การเปลี่ยนรูปร่างเป็น α-helix และมีประจุบวกที่ปลายซี (C-terminal domain)[28] การเปลี่ยนรูปร่างเป็น α-helix และมีกรดอะมิโนไลซีนและลิวซีนที่ปลายเอ็น (N-terminal domain)[21] และการมีกรดอะมิโนจำพวกอาร์จินีน (arginine)[29] และโพรลีน (proline)[30] เป็นองค์ประกอบหลัก เป็นต้น จากรายงานการวิจัยพบว่าเปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็น α-helix และมีประจุสุทธิเป็นบวกสามารถที่จะจับกับเมมเบรนที่ยื่นออกมาของแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ[31, 32] ในการวิจัยครั้งนี้ได้ดัดแปลงเปปไทด์ให้มีขนาด ประจุสุทธิ ความเป็นไฮโดรโฟบิค รูปร่าง และลำดับของกรดอะมิโนไลซีนและลิวซีน ที่มีความแตกต่างกัน พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA แต่ละสายพันธุ์เปลี่ยนแปลงไปซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาไว้แล้ว[21] จากการทำนายโครงสร้าง 3 มิติของเปปไทด์ MRSA1, MRSA16 และ MRSA19 พบว่ามีโครงสร้างเป็น α-helix และ MRSA21 มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง เปปไทด์ทั้งหมดนี้มีขนาดเล็ก ความเป็นไฮโดรโฟบิคสูง และประจุสุทธิเป็นบวก ดังนั้นการต้านเชื้อของเปปไทด์อาจเกิดจากโครงสร้าง α-helix เข้าจับกับเมมเบรนซึ่งมีประจุสุทธิเป็นลบ จากนั้นส่วนที่ไม่ชอบน้ำของเปปไทด์จะเคลื่อนตัวเข้าไปในชั้นฟอสโฟลิปิดของเมมเบรน และรบกวนการจัดเรียงตัวของกรดไข

มันที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน ทำให้เซลล์แตกสารสามารถผ่านเข้าออกเมมเบรนได้[7, 33] หรืออาจเกิดจากเปปไทด์ที่เป็นประจุบวกจับกับเมมเบรนที่เป็นประจุลบของไลโปโพลีแซคคาไรด์ โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำของเปปไทด์แทรกตัวเข้าไปในชั้นฟอสโฟลิปิดของเมมเบรน ทำให้เกิดรูบนเมมเบรนแล้วทำให้เซลล์แตก[7, 34] มีรายงานการวิจัยพบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ WR12 (ประกอบด้วย 12 กรดอะมิโน ที่มีกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) และอาร์จินีนเป็นองค์ประกอบ) และ D-IK8 (ประกอบด้วย 8 กรดอะมิโน โครงสร้าง β-pleated sheet) มีขนาดเล็กสามารถแทรกตัวเข้าไปในเมมเบรนได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ และสามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีกว่าเปปไทด์ cathelicidin ที่ประกอบด้วย 37 กรดอะมิโน[35] นอกจากนี้ยังมีการวิจัยพบว่าการสังเคราะห์เปปไทด์ดัดแปลงที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีนเพื่อให้โครงสร้างเป็นประจุบวกของเปปไทด์ AamAP1-Lysine มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ถึง 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ AamAP1 จากพิษแมงป่อง[24] การเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนลิวซีนในเปปไทด์ melittin ให้เป็น melittin diastereomer ที่มี D-amino acid ใน leucine zipper sequence ยังให้ผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบได้มากขึ้น[36] การยับยั้งการเจริญของเชื้อนั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ การออกฤทธิ์ได้เร็วและมีประสิทธิภาพจะเป็นช่วงระยะเพิ่มจำนวนของเชื้อที่เวลา 4-6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาการออกฤทธิ์ของยาตามหลักทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetic) และเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamic) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ของเปปไทด์ MRSA1, MRSA16, MRSA19, MRSA21 และยาปฏิชีวนะ ได้ค่าการยับยั้งเชื้อแตกต่างกัน ในช่วงระยะเวลาการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่เวลา 4-8 ชั่วโมง

จากผลการตรวจหา Peptide barcode ด้วย MALDI-TOF MS ของเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลินทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่ามีลายพิมพ์เปปไทด์ที่แตกต่างกันซึ่งเกิดจากจีโนไทป์ของแบคทีเรียที่มีการแสดงออกหรือไม่แสดงออกของยีนในจีนัสและสปีชีส์เดียวกัน ทำให้สายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ใช้ทดสอบมีชนิดและปริมาณของเปปไทด์แตกต่างกัน ซึ่งลายพิมพ์เปปไทด์ หรือ Peptide barcode ที่แตกต่างกันของเชื้อจะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เปปไทด์ MRSA1, MRSA16, MRSA19 และ MRSA21 มีผลการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ แตกต่างกัน แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโน ประจุความเป็นไฮโดรโฟบิค และความยาวของเส้นเปปไทด์ มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้น *S. aureus* ที่มีการดื้อยาเมทิซิลลินแตกต่างกันก็จะมีผลทำให้ Peptide barcode ของเชื้อแบคทีเรียเกิดความแตกต่างกัน และการตอบสนองต่อเปปไทด์ก็จะต่างกันด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาเปปไทด์สังเคราะห์ BAMP-28 ที่สามารถยับยั้งกลุ่มเชื้อ Enterobacteriaceae ที่ดื้อยา carbapenam ได้ดีที่สุด และมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์สังเคราะห์เส้นอื่นที่มีขนาด ลำดับกรดอะมิโน ประจุสุทธิ และความเป็นไฮโดรโฟบิคแตกต่างกัน โดยเชื้อดื้อยาที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 72 สายพันธุ์ มีลายพิมพ์เปปไทด์แตกต่างกัน[14]

MRSA เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนและมีการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่ามีการดื้อต่อเปปไทด์ cathelicidin[37] การใช้ AMPs มาแทนยาปฏิชีวนะนั้นต้องมีการศึกษาวิจัยหา AMPs ตัวใหม่ ๆ หรือสังเคราะห์ดัดแปลงโครงสร้างของเปปไปด์ เช่น การสังเคราะห์เปปไทด์สายสั้น ๆ ให้มีความเป็นไฮโดรโฟบิคและมีประจุสุทธิเป็นบวก[21] เปลี่ยนโครงสร้างเป็น amphiphatic helix และ β-pleated sheet[35] ดัดแปลงโครงสร้างแบบวงโดยเชื่อมต่อกับไขมัน[20] เป็นต้น การดัดแปลงโครงสร้างของเปปไทด์ทั้งหลายนี้ เพื่อให้ AMPs มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ MRSA ให้มีประสิทธิภาพได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัย AMPs ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA จะเป็นประโยชน์ต่อการนำ AMPs มาใช้ในการรักษาโรค ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากโดยเฉพาะทางการแพทย์ ดังนั้นการดัดแปลงโครงสร้างของเปปไทด์จึงมีความสำคัญที่ทำให้เปปไทด์มีการออกฤทธิ์ได้ดีมากขึ้น และมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียดื้อยา จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จะเป็นแนวทางในการนำไปสู่การพัฒนาประยุกต์ใช้เปปไทด์เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ในการรักษาผู้ป่วยในโรคติดเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยา

สรุป

เปปไทด์สังเคราะห์ KLKLLLLLKLK สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635, MRSA DMST 20637 และ MRSA DMST 20654 เมื่อดัดแปลงเปปไทด์เส้นนี้ให้มีขนาดประจุสุทธิ ความเป็นไฮโดรโฟบิค และรูปร่าง แตกต่างจากเดิม พบว่าเปปไทด์ KLKLKLKLKLK, LLLLLLKLK และ LLLLLLK มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635 และ MRSA DMST 20654 ได้ดีที่สุด จากการวิเคราะห์ Peptide barcode ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS พบว่าลายพิมพ์เปปไทด์ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ แตกต่างกัน จึงตอบสนองต่อเปปไทด์สังเคราะห์ต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยรามคำแหงและสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณแผ่นดินในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณนายวิรัตน์ แดงลาด ที่อำนวยความสะดวกเครื่องมือและอุปกรณ์ตลอดระยะเวลาการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. Am J Transl Res 2019; 11(7): 3919-31.
2. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem 2001; 276(11): 7806-10.
3. Ballardini N, Johansson C, Lilji G, Lindh M. Linde Y, Scheynius A, et al. Enhanced expression of the antimicrobial peptide LL-37 in lesional skin of adults with atopic eczema. Br J Dermatol 2009; 161(1): 40-7.
4. Chromek M, Slamova Z, Bergman P, Kovacs L, Podracka L, Ehren I, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. Nat Med 2006; 12(6): 636-41.
5. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science 1996; 272(5258): 50-4.
6. Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. Biotechnol Adv 2003; 21(6): 465-99.
7. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat Rev Microbiol 2005; 3(3): 238-50.
8. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. Cent Eur J Biol 2007; 2(1): 1-33.
9. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associates with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1984; 158(2): 513-6.
10. Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Götz F. Inactivation of the dlt operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. J Biol Chem 1999; 274(13): 8405-10.

11. Ernst RK, Yi EC, Guo L, Lim KB, Burns JL, Hackett M, et al. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. Science 1999; 286(5444): 1561-5.
12. Lysenko ES, Gould J, Bals R, Wilson JM, Weiser JN. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. Infect Immun 2000; 68(3): 1664-71.
13. Stephan R, Cernela N, Ziegler D, Pfluger V, Tonolla M, Ravasi D, et al. Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica by* MALDI-TOF mass spectrometry. J Microbiol Methods 2011; 87(2): 150-3.
14. Arpornsuwan T, Paveenkittiporn W, Jaresitthikunchai J, Roytrakul S. BAMP-28 antimicrobial peptide against different MALDI biotype of Carbapenam resistant Enterobacteriaceae. Int J Pept Res Ther 2018; 25(3): 951-60.
15. Shurko JF, Galega RS, Li C, Lee GC. Evaluation of LL-37 antimicrobial peptide derivatives alone and in combination with vancomycin against *S. aureus.* J Antibiot 2018; 71(11): 971-4.
16. Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. Protein Cell 2010; 1(2): 143-52.
17. Jiang Z, Vasil AI, Hale JD, Handcock REW, Vasil ML, Hodges RS. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α-helical cationic antimicrobial peptides. Biopolymers 2008; 90(3): 369-83.
18. Gregory SM, Cavenaugh A, Journigan V, Pokorny A, Almeida PFF. A quatitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial peptide cecropin A. Biophys J 2008; 94(5): 1667-80.
19. Mika JT, Moiset G, Cirac AD, Feliu L, Bardaji E, Planas M, et al. Structural basis for the enhanced activity of cyclic antimicrobial peptides: the case of BPC194. Biochim Biophys Acta 2011; 1808(9): 2197-205.
20. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. Bioperlymers 2000; 55(1): 4-30.
21. Alvarez-Bravo J, Kurata S, Natori S. Novel synthetic antimicrobial peptides effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biochem J 1994; 302(Pt 2): 535-8.
22. Silverman JA, Perlmutter NG, Shapiro HM. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(8): 2538-44.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard, CLSI document M7-A7. 7th ed. Wayne, Pennsylvania; CLSI; 2006.
24. Almaaytah A, Tarazi S, Abu-Alhaijaa A, Altall Y, Alshar'i N, Bodoor K, et al. Enhanced antimicrobial activity of AamAP1-Lysine, a novel synthetic peptide analog derived from the scorpion venom peptide AamAP1. Pharmaceuticals 2014; 7(5): 502-16.
25. Sato H, Feix JB. Lysine-enriched cecropin-mellitin antimicrobial peptides with enhanced selectivity. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(12): 4463-5.

26. Unubol N, Cinaroglu SS, Elmas MA, Akcelik S, Ildeniz ATO, Arbak S, et al. Peptide antibiotics developed by mimicking natural antimicrobial peptides. Clin Microbiol 2017; 6(4): 1-6.
27. Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. J Am Acad Dermatol 2005; 52(3): 381-90.
28. Gutsmann T, Hagge SO, Larrick JW, Seydel U, Wiese A. Interaction of CAP18-derived peptides with membranes made from endotoxins or phospholipids. Biophys J 2001; 80(6): 2935-45.
29. Skerlavaj B, Romeo D, Gennaro R. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram-negative bacteria by bactenecins. Infect Immun 1990; 58(11): 3724-30.
30. Boman HG, Agerberth B, Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. Infect Immun 1993; 61(7): 2978-84.
31. Epand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. Biochim Biophys Acta 1999; 1462(1-2): 11-28.
32. Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, et al. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. Eur J Biochem 2002; 269(19): 4799-810.
33. Gazit E, Boman A, Boman HG, Shai Y. Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipids vesicles. Biochemistry 1995; 34(36): 11479-88.
34. Christensen B, Fink J, Merrifield RB, Mauzerall D. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85(14): 5072-6.
35. Mohamed MF, Abdelkhalek A, Seleem MN. Evalution of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. Sci Rep 2016; 6: 29707. (14 pages).
36. Zhu WL, Nan YH, Hahm KS, Shin SY. Cell selectivity of an antimicrobial peptide melittin diastereomer with D-amino acid in the leucine zipper sequence. J Biochem Mol Biol 2007; 40(6): 1090-4.
37. Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, Nishi H, Fujiwara T, Fujiue Y, et al. Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2008; 61(6): 1266-9.

Evaluation of Synthetic Antimicrobial Peptides against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Nuanchawee Wetprasit[1] Janthima Jaresitthikunchai[2] Narumon Phaonakrop[2] and Sittiruk Roytrakul[2]

[1]*Department of Biotechnology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Huamark, Bangkapi, Bangkok 10240*

[2]*Functional Ingredients and Food Innovation Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Khlong Luang, Pathumthani 12120 Thailand.*

Abstract In this study, nine peptides containing 6-25 amino acids residues with positive charge and 40-83% hydrophobicity were selected from an antimicrobial peptide database. All of them were chemically synthesized and evaluated for their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20635, MRSA DMST 20637 and MRSA DMST 20654. It was found that KLKLLLLLKLK had effective antibacterial activity against all *S. aureus.* This peptide was then modified and yielded twelve peptides with different hydrophobicity and charges. In the antibacterial assay with these twelve synthetic peptides, KLKLKLKLKLK, LLLLLLKLK and LLLLLLK were found to have potent antibacterial activity against *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635 and MRSA DMST 20654 with IC_{50} values of 27.5-62.5 μg/ml. Furthermore, matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis results showed that peptide barcodes of all *S. aureus* strains were significant different. The results from this study indicated that the different degree of methicillin-resistant *S. aureus* has an effect on difference in peptide barcode and difference in response to synthetic peptides. However, the antibiotic mechanism of these three modified peptides against MRSA should be further studied for development as therapeutic agents.

Keywords: Methicillin-resistant *Stahylococcus aureus* (MRSA), Peptide barcode, Synthetic peptides

Corresponding author E-mail: nuanwee@yahoo.com

Received: 20 November 2019 *Revised: 13 April 2020* *Accepted: 13 May 2020*

การทวนสอบวิธีตรวจปริมาณแอนติเจนของ Diphtheria ในวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ

สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์ และอุบลวรรณ ชัยอารยะเลิศ
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ได้ทำการทวนสอบความใช้ได้ของเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อตรวจหาปริมาณแอนติเจน (adsorbed antigen) และการดูดซับแอนติเจน (degree of adsorption) ของสารเสริมฤทธิ์ในวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ พบว่าการทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ในวันเดียวกันมีค่าเบี่ยงเบน (SD) และเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของการทดสอบปริมาณ adsorbed antigen และ degree of adsorption เท่ากับ 1.01, 1.44 และ 1.00, 0.29 ตามลำดับ สำหรับการทดสอบต่างวันมีค่า SD และ %CV ของการทดสอบปริมาณ adsorbed antigen และ degree of adsorption เท่ากับ 1.01, 1.38 และ 1.01, 0.59 ตามลำดับ การทดสอบความทนของวิธีโดยเปรียบเทียบผลจากผู้ทำการทดสอบ 2 ราย มีค่า SD และ %CV ของการทดสอบปริมาณ adsorbed antigen และ degree of adsorption เท่ากับ 1.01, 1.19 และ 1.01, 0.83 ตามลำดับ สำหรับการทดสอบความจำเพาะพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยักมาตรฐาน การทดสอบนี้แสดงว่าวิธี ELISA มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์เพื่อเฝ้าระวังคุณภาพการผลิตวัคซีนป้องกันโรคคอตีบในแต่ละรุ่นการผลิตได้

คำสำคัญ: แอนติเจนเชื้อคอตีบ, ปริมาณแอนติเจน, การทวนสอบวิธี

Corresponding e mail: sakalin.t@dmsc.mail.go.th

Received: 18 May 2018 *Revised: 3 April 2019* *Accepted: 14 May 2020*

บทนำ

โรคคอตีบ (Diphtheria) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium diphtheriae* เป็นโรคติดเชื้อทางเดินหายใจเฉียบพลัน ติดต่อทางการไอและจาม เชื้อจะอยู่ในโพรงจมูก ในลำคอของผู้ป่วย อาการป่วย คือ มีไข้ พิษของเชื้อจะทำลายกล้ามเนื้อหัวใจและเส้นประสาทส่วนปลาย ทำให้ลำคออักเสบและมีแผ่นเยื่อในลำคอ ในรายที่รุนแรงจะทำให้ทางเดินหายใจตีบตัน และอาจเสียชีวิตได้[1, 2] ประเทศไทยมีการใช้วัคซีนป้องกันโรคคอตีบในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศเป็นเวลานานกว่า 20 ปีแล้ว เพื่อลดอัตราการเกิดโรคคอตีบในเด็ก ปัจจุบันได้มีการรณรงค์ให้มีการฉีดวัคซีนในผู้ใหญ่เนื่องจากพบว่าระดับภูมิคุ้มกันของผู้ใหญ่ในกลุ่มอายุ 20–50 ปี ไม่เพียงพอ เสี่ยงต่อการเป็นโรคคอตีบได้สูง นอกจากนี้มีรายงานการระบาดของโรคคอตีบในประเทศเพื่อนบ้านอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งการเป็นสมาชิกของประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน ทำให้มีประชากรจากประเทศเพื่อนบ้านเดินทางเข้าออกประเทศไทยมากขึ้น จึงมีความเสี่ยงที่เชื้อก่อโรคคอตีบอาจแพร่กระจายและระบาดได้[2]

วัคซีนป้องกันโรคคอตีบอยู่ในรูปของวัคซีนผสมของคอตีบ และบาดทะยัก หรือวัคซีนผสมของคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน โดยวัคซีนป้องกันโรคคอตีบประกอบด้วย diphtheria toxoid ที่ถูกดูดซับ (adsorbed) ด้วยสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสถาบันชีววัตถุ ได้มีการประเมินคุณภาพวัคซีนทั้งประกอบการขึ้นทะเบียน และรับรองรุ่นการผลิตก่อนการจำหน่ายในท้องตลาด (Lot release) ประกอบด้วยการทดสอบค่าความแรง ความปลอดภัย และการทดสอบทางเคมี เพื่อให้มั่นใจว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพดีตามมาตรฐานสากล ขณะที่การรับรองรุ่นการผลิตเป็นการเฝ้าระวังความสม่ำเสมอของการผลิตจากการประเมินความสอดคล้องของผลการวิเคราะห์เทียบกับรุ่นการผลิตที่ได้ทดสอบเพื่อขึ้นทะเบียนไว้ และเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการควบคุมคุณภาพวัคซีน[3] ปัจจุบันการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบใช้วิธี neutralization test (US Potency method)[4] ในหนูตะเภา ซึ่งเป็นการทดสอบที่บอกเพียงความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันว่ามากกว่าหรือน้อยกว่าเมื่อเทียบกับวัคซีนมาตรฐาน แต่ระบุเป็น International Unit (IU) ที่ใช้เปรียบเทียบระหว่างวัคซีนแต่ละรุ่นไม่ได้ นอกจากนี้กระบวนการตรวจวิเคราะห์ในสัตว์ทดลองใช้เวลาอย่างน้อย 45 วัน และเมื่อรวมกับขั้นตอนดำเนินการอื่น ๆ แล้วจะมีผลให้กระบวนการประเมินคุณภาพใช้เวลาไม่น้อยกว่า 60 วัน ส่งผลให้กระบวนการรับรองรุ่นการผลิตวัคซีนป้องกันโรคคอตีบที่ผลิตในประเทศใช้ระยะเวลานาน

วิธีการหาค่าแอนติเจนในวัคซีนโดยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีหนึ่งที่องค์การอนามัยโลกได้แนะนำไว้[5] แม้ว่าวิธีการนี้ไม่สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการสร้างภูมิคุ้มกันได้เช่นเดียวกับวิธีการตรวจสอบความแรงในสัตว์ทดลอง แต่ผลการทดสอบที่ได้สามารถนำมาวิเคราะห์แนวโน้ม และเฝ้าระวังคุณภาพการผลิตได้ ปัจจุบันได้มีการใช้การตรวจหาปริมาณแอนติเจนในวัคซีนสำหรับการเฝ้าระวังความสม่ำเสมอในการผลิตแทนการตรวจสอบค่าความแรงในสัตว์ทดลองเพื่อให้สอดคล้องกับหลักจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง 3Rs คือ การหลีกเลี่ยงการใช้สัตว์โดยใช้วิธีอื่นทดแทน (replacement) ลดการใช้สัตว์ทดลองให้น้อยที่สุด โดยยังให้ความแม่นยำ (reduction) ให้สัตว์ทรมานน้อยที่สุด (refinement) เช่น การหาปริมาณไกลโคโปรตีนในวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า โดยเทคนิค ELISA หรือ SRD[6] เป็นต้น

การศึกษานี้เพื่อหาวิธีทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบในกระบวนการรับรองรุ่นการผลิตของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ หรือนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างวัคซีน วัคซีนมาตรฐาน และสารมาตรฐาน

ตัวอย่างสำหรับการทดสอบ: วัคซีนรวมป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก ไอกรน (DTP vaccine) รุ่นการผลิต 0005812 บริษัท Bio Farma ประเทศอินโดนีเซีย

วัคซีนมาตรฐาน: Diphtheria toxoid (NIBSC code 02/176) ความเข้มข้นปริมาณแอนติเจน 1100 Limes flocculation (Lf) units ผลิตจาก National Institute for Biological Standards and Control, ประเทศสหราชอาณาจักร

สารมาตรฐาน: Tetanus Toxoid (NIBSC code 04/150) และ Diphtheria Polyclonal Antibody (NIBSC code 10/128) ทั้งหมดผลิตจาก National Institute for Biological Standards and Control, ประเทศสหราชอาณาจักร

การเตรียมตัวอย่างวัคซีน และวัคซีนมาตรฐาน

ตัวอย่างวัคซีน

ทำการเตรียมตัวอย่างวัคซีนโดยแบ่งเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่หนึ่ง ปั่นเก็บส่วนใส แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้เจือจาง ด้วย carbonate coating buffer (3.7 กรัม $NaHCO_3$, 0.64 กรัม Na_2CO_3 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) pH 9.6 ในอัตราส่วน 1:10 เพื่อทำการทดสอบหาปริมาณแอนติเจนอิสระที่ไม่ถูกดูดซับโดยสารเสริมฤทธิ์ (non-adsorbed antigen) และชุดที่สอง ทำการผสมตัวอย่างวัคซีนกับ 20% w/v tri-sodium citrate ในน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:2 เพื่อ desorption จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเจือจาง ด้วย carbonate coating buffer ในอัตราส่วน 1:100 ก่อนนำมาใช้ทดสอบหาปริมาณ Adsorbed antigen

วัคซีนมาตรฐาน (NIBSC 02/176) เตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 Lf/ml โดยเจือจางด้วย carbonate coating buffer

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างวัคซีน และวัคซีนมาตรฐานที่เตรียม ปริมาตร 100 µl มาหยดลงใน ELISA plates (96- well; Nunc MaxiSorp™ round-bottom 449824, Thermo Fisher Scientific, USA) แล้วเจือจาง (2-fold dilution) ด้วย carbonate coating buffer pH 9.6 เป็นจำนวน 8 dilutions จากแถว A ถึง H โดยตัวควบคุมวิธีวิเคราะห์ (blank) คือ carbonate coating buffer จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างด้วย Phosphate buffer saline-Tween [PBS-T: PBS + 0.05% (V/V) Tween 20] 3 ครั้ง เติม blocking solution [PBS-T + 2.5% (V/V) Bovine serum albumin (BSA)] ปริมาตร 150 µl/well นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วเติม Guinea pig anti diphtheria IgG (NIBSC10/128) ที่ขนาดเจือจาง 1:200 ปริมาตร 100 µl/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง จากนั้นเติม anti GP peroxides conjugate IgG (Chemicon® AP193P, Sigma-Aldrich, USA) ที่ขนาดเจือจาง 1:10000 ปริมาตร 100 µl/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง แล้วเติม Tetramethilbenzidine (TMB Life technologies®00-2019, Thermo Fisher Scientific,USA) ปริมาตร100 µl/well บ่มที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้โดนแสงเป็นเวลา 15-20 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.5M H_2SO_4 ปริมาตร 50 µl/well แล้วอ่านค่าดูดกลืนแสง (Optical Density: OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Infinite® 200 PRO, TECAN, Switzerland)

คำนวณผลโดยใช้โปรแกรม parallel line (Bioassay assist; National Institute of Infectious Disease, Japan) ระหว่างความเข้มข้น และการดูดกลืนแสง

การทดสอบความเที่ยง (precision)

1. การทดสอบซ้ำในวันเดียว Intra-assay หรือ repeatability

ทำการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และร้อยละการดูดซับแอนติเจนของสารเสริมฤทธิ์ (degree of adsorption) ของวัคซีนตัวอย่างในวันและเวลาเดียวกันอย่างน้อย 3 การทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนซึ่งจะต้องมีค่า < 10%

2. การทดสอบซ้ำต่างวัน Inter-assay หรือ reproducibility

ทำการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และร้อยละ degree of adsorption ของวัคซีนตัวอย่าง ต่างวันและเวลากัน (separate experiment) อย่างน้อย 3 การทดสอบ นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนซึ่งจะต้องมีค่า < 10%

การทดสอบความทนของวิธี (Ruggedness/Robustness)

ทำการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และร้อยละ degree of adsorption ของวัคซีนตัวอย่าง จากผู้วิเคราะห์ 2 คน ๆ ละ 3 การทดสอบ นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนซึ่งจะต้องมีค่า < 10%

การทดสอบความเหมาะสมของระบบ และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (System suitability and linearity)

ตรวจสอบผลการทดสอบค่าความสัมพันธ์ของการเตรียมวัคซีนมาตรฐานและวัคซีนตัวอย่าง ต้องเป็นไปในลักษณะ dose response (regression) ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเส้นตรง (linearity) คู่ขนาน (parallelism) ($r2 > 98\%$) ซึ่งหากไม่เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดโปรแกรม parallel line จะไม่สามารถคำนวณผลได้

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ทำการทดสอบด้วยวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยักมาตรฐานเทียบกับวัคซีนรวมป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน ในสภาวะการทดสอบที่เหมือนกัน ค่า OD ของผลการทดสอบแอนติบอดีต่อวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยักมาตรฐานต้องไม่แตกต่างจาก blank

การคำนวณ

คำนวณหาปริมาณแอนติเจนด้วยโปรแกรม parallel line assay โดยค่าความสัมพันธ์ระหว่างวัคซีนมาตรฐานและวัคซีนตัวอย่างเป็นลักษณะ dose response (regression) ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Confidence Interval) เป็นเส้นตรง (linearity) และคู่ขนาน (parallelism) ผลที่ได้นำมาหาค่าเฉลี่ยแบบถ่วงน้ำหนัก (weighted geometric mean: WGO-Mean) ค่าช่วงการยอมรับบนและล่าง (upper-lower limit) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (weighted geometric standard deviation : WGO-SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (percent geometric coefficient of variation: %GCV) สำหรับค่าร้อยละการดูดซับแอนติเจน (Degree of adsorption) คำนวณโดยค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean : GO-Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิต (geometric standard deviation: GSD) และวิเคราะห์ผลความจำเพาะของวิธีการทดสอบโดยเปรียบเทียบค่า OD และผลการทดสอบแอนติบอดีต่อวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยักมาตรฐาน ด้วยสถิติ Paired t-test[7]

ผล

การทดสอบความเที่ยง (precision)

การทดสอบซ้ำในวันเดียว Intra-assay หรือ repeatability: ผลการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และ degree of adsorption ของวัคซีนตัวอย่างในวันและเวลาเดียวกัน อย่างน้อย 3 การทดสอบ ที่เป็นอิสระต่อกัน ผลวิเคราะห์ปริมาณ adsorbed antigen ทั้ง 3 ซ้ำ มีค่า WGO-SD เท่ากับ 1.01 และ %GCV เท่ากับ 1.44 สำหรับ degree of adsorption มีค่า GSD เท่ากับ 1.00 และ %GCV เท่ากับ 0.29 (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน

ครั้งที่	Adsorbed antigen (Lf/ml)	Lower limit	Upper limit	Non-adsorbed antigen (Lf/ml)	Degree of adsorption (%)
1	29.60	28.12	31.26	2.38	91.95
2	30.17	28.75	31.67	2.27	92.48
3	29.62	28.29	31.01	2.31	92.20
WGO-Mean	29.80	28.97	30.65	GO-Mean	92.21
WGSD	1.01			GSD	1.00
%GCV	1.44			%GCV	0.29

WGO-Mean: weighted geometric mean
WGO-SD: weighted geometric standard deviation
%GCV: percent geometric coefficient of variation
GO-Mean: geometric mean
GSD: geometric standard deviation

การทดสอบซ้ำต่างวัน Inter-assay หรือ reproducibility

ผลการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และ degree of adsorption ของวัคซีนตัวอย่างต่างวันและเวลากัน (separate experiment) อย่างน้อย 3 การทดสอบ ผลวิเคราะห์ปริมาณ adsorbed antigen ทั้ง 3 วัน มีค่า WGO-SD เท่ากับ 1.01 และ %GCV เท่ากับ 1.38 สำหรับ degree of adsorption มีค่า GSD เท่ากับ 1.01 และ %GCV เท่ากับ 0.59 (ตารางที่ 2)

การทดสอบความทนของวิธี

ผลการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และ degree of adsorption ของวัคซีนตัวอย่าง จากผู้วิเคราะห์ 2 คน คนละ 3 การทดสอบ ผลวิเคราะห์ปริมาณ adsorbed antigen มีค่า WGO-SD เท่ากับ 1.01 และ %GCV เท่ากับ 1.19 สำหรับ degree of adsorption มีค่า GSD เท่ากับ 1.01 และ %GCV เท่ากับ 0.83 ซึ่งผลการทดสอบมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่า 10 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน

วันที่	ครั้งที่	Adsorbed antigen (Lf/ml)	Lower limit	Upper limit	Non-adsorbed antigen (Lf/ml)	Degree of adsorption (%)
1	1	29.60	28.12	31.26	2.38	91.95
	2	30.17	28.75	31.67	2.27	92.48
	3	29.62	28.29	31.01	2.31	92.20
2	1	28.01	25.07	31.27	1.87	93.32
3	1	27.36	22.93	32.6	1.94	92.91
WGO-Mean		29.63	28.84	30.44	GO-Mean	92.58
WGSD		1.014			GSD	1.01
%GCV		1.38			%GCV	0.59

WGO-Mean: weighted geometric mean
WGO-SD: weighted geometric standard deviation
%GCV: percent geometric coefficient of variation
GO-Mean: geometric mean
GSD: geometric standard deviation

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงทนของวิธี

ผู้ทดสอบ	ครั้งที่	Adsorbed antigen (Lf/ml)	Lower limit	Upper limit	Non-adsorbed antigen (Lf/ml)	Degree of adsorption (%)
รายที่ 1	1	27.36	22.93	32.6	1.94	92.91
	1	29.60	28.12	31.26	2.38	91.95
	2	30.17	28.75	31.67	2.27	92.48
	3	29.62	28.29	31.01	2.31	92.20
	4	28.01	25.07	31.27	1.93	93.32
	5	27.36	22.93	32.6	2.02	92.91
รายที่ 2	1	27.23	25.38	29.23	2.56	91.06
	2	30.5	28.57	32.55	1.94	92.91
	3	28.64	22.96	35.33	1.87	93.32
WGO-Mean		29.45	28.77	30.15	GO-Mean	92.53
WGSD		1.01			GSD	1.01
%GCV		1.19			%GCV	0.83

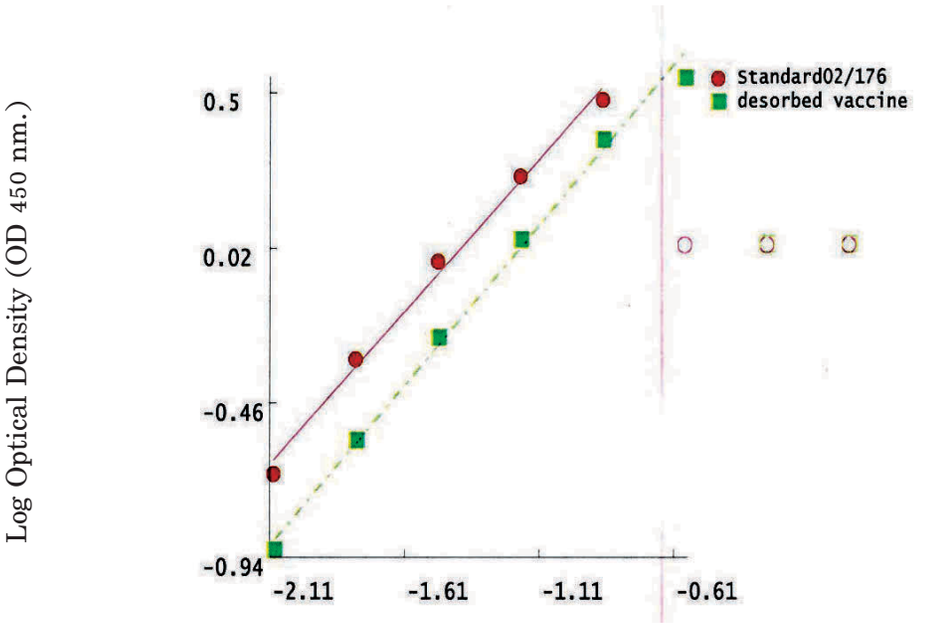
WGO-Mean: weighted geometric mean
WGO-SD: weighted geometric standard deviation
%GCV: percent geometric coefficient of variation
GO-Mean: geometric mean
GSD: geometric standard deviation

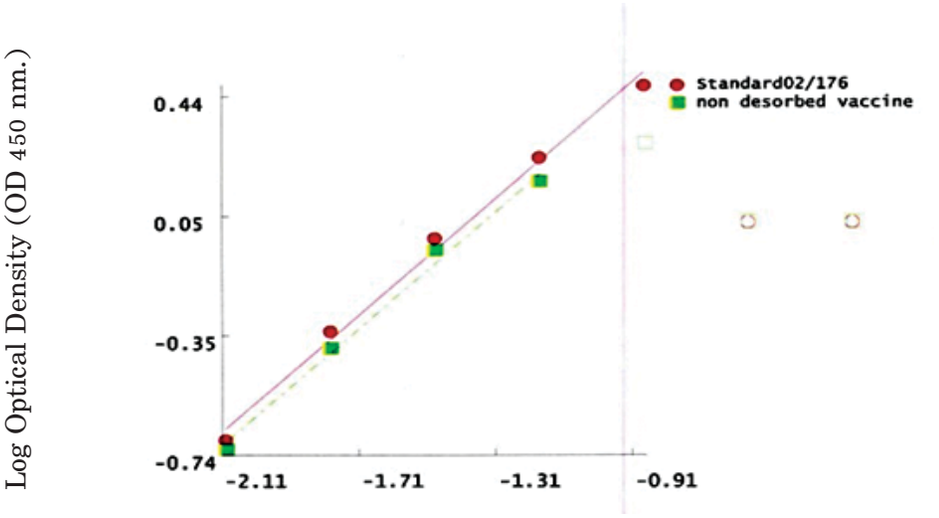
การทดสอบความเหมาะสมของระบบ และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

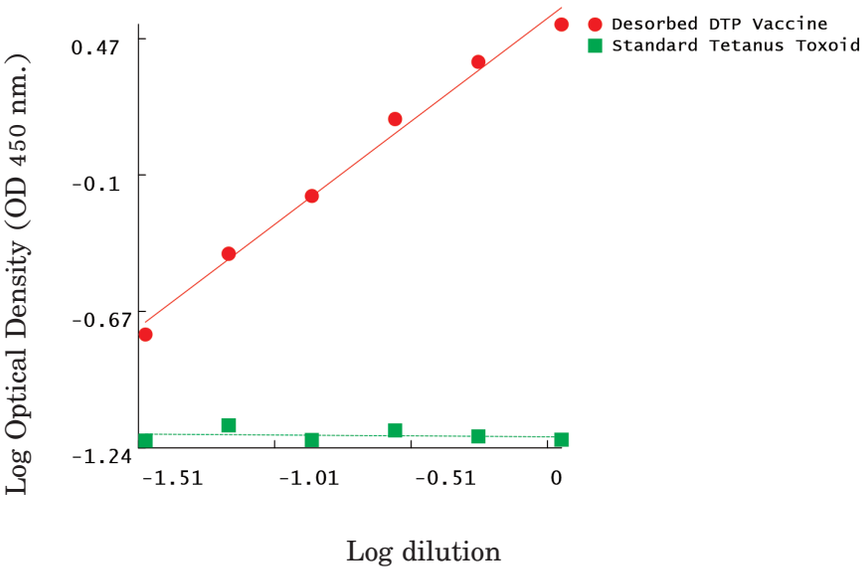
เมื่อพิจารณาค่า OD ของตัวอย่างวัคซีนและวัคซีนมาตรฐาน พบว่าแปรผันตามระดับการเจือจาง และเป็นคู่ขนานกับผลการทดสอบวัคซีนมาตรฐาน ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด ดังแสดงในภาพที่ 1

การทดสอบความจำเพาะของวิธี

การทดสอบด้วยวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยักมาตรฐานเทียบกับวัคซีนรวมป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน ไม่พบว่าเทคนิค ELISA นี้ตรวจจับแอนติเจนวัคซีนป้องกันบาดทะยักที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของวัคซีนรวมได้ ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยค่า OD ที่อ่านได้ไม่แตกต่างจาก blank ($p = 0.082$)







ภาพที่ 2 การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

วิจารณ์

ผลจากการทดสอบความเที่ยงของการทดสอบพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการทดสอบทั้งหมด ไม่ว่าจะเป็นการทดสอบในวันเดียวกัน ต่างวัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียว หรือ 2 คน ให้ค่าต่ำกว่าร้อยละ 2 จากการทดสอบความจำเพาะของวิธีไม่พบการตรวจจับแอนติเจนวัคซีนป้องกันบาดทะยัก และค่า OD ของผลการทดสอบไม่มีความแตกต่างจากตัวควบคุม (blank) แสดงให้เห็นว่าการทดสอบนี้มีความจำเพาะ แม้ว่า antibody ที่ใช้จะเป็น polyclonal antibody เท่านั้น สำหรับความเป็นเส้นตรง หรือ linearity เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของการวิเคราะห์ด้วยสมการเส้นตรง หรือ parallel line[3] ดังนั้นทุกผลการทดสอบที่สามารถคำนวณค่าได้จึงต้องผ่านคุณสมบัตินี้ ซึ่งผลการทดสอบทุกครั้งและทุกค่าแสดงถึงความเป็นเส้นตรง ค่าดูดกลืนแสงลดลงตามระดับการเจือจางของตัวอย่าง และผลการทดสอบเป็นไปในลักษณะคู่ขนานกับวัคซีนมาตรฐาน ผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับข้อกำหนดสากลที่ระบุให้วัคซีนรวมมีปริมาณ Diphtheria antigen 6.7–25 Lf/ dose (0.5 ml)[8] จากการศึกษาวิธีการหาปริมาณ Diphtheria antigen ในวัคซีนรวมป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน โดยเทคนิค ELISA สามารถชี้ให้เห็นว่าวิธีนี้มีความเที่ยง ความคงทน ความจำเพาะ และความเป็นเส้นตรงของวิธี สอดคล้องกับที่ระบุในแนวทางขององค์การอนามัยโลก[5, 8, 9] เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการเพื่อการเฝ้าระวังคุณภาพการผลิตของวัคซีนในแต่ละรุ่นได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Laura C. และคณะ[10] วิธีนี้สามารถลดระยะเวลาการวิเคราะห์ ลดความถี่ในการตรวจสอบความแรงในสัตว์ทดลองสอดคล้องตามหลักจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง นอกจากนี้จะสามารถลดค่าใช้จ่ายได้

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน diphtheria โดยเทคนิค ELISA เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง มีความเที่ยง แม่นยำ มีความคงทน เชื่อถือได้ ให้ผลรวดเร็ว เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นงานประจำเพื่อการเฝ้าระวังการผลิตของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบในแต่ละรุ่นการผลิต และเพื่อลดความถี่การตรวจสอบความแรง เป็นการลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลอง และสามารถใช้ควบคุมคุณภาพวัคซีนให้มีมาตรฐานตามที่ได้ขึ้นทะเบียนไว้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ และ นางวิชชุดา จริยะพันธุ์ ผู้ทรงคุณวุฒิด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ชีววิทยา) ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำและสนับสนุน จนทำให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Diphtheria. In: Centers for Disease Control and Prevention Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. 13th ed. [online]. 2015; [cited 2015 Sep 15]; [12 screens]. Available from: URL: http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/dip.pdf.
2. สำนักงานสารนิเทศและประชาสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข. สธ. ชี้ผู้ใหญ่วัย 20-50 ปี เสี่ยงป่วย “โรคคอตีบ” รณรงค์ฉีดวัคซีนป้องกันฟรี เฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพฯ. ข่าวเพื่อสื่อมวลชน. [ออนไลน์]. 15 ม.ค. 2558; [สืบค้น 3 พ.ค. 2561]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: http://dcd.ddc.moph.go.th/uploads/pdf/ข่าวสารนิเทศ%20dT%2015-01-58.pdf.
3. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การควบคุมกำกับคุณภาพวัคซีนโดยการรับรองรุ่นการผลิต (lot release) ของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: บริษัท Full Forse จำกัด; 2557.
4. Gupta RK, Siber GR. Use of in vitro Vero cell assay and ELISA in the United States potency test of vaccines containing adsorbed diphtheria and tetanus toxoids. Dev Biol Stand 1996; 86: 207-15.
5. Chapter II: testing for diphtheria vaccines. In: World Health Organization. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines, WHO/IVB/11.11. Geneva, Switzerland: Department of Immunization, Vaccines and Biologicals; 2013. p. 30-51.
6. World Health Organization. International collaborative study to assess the suitability of the candidate 7th WHO International Standard for rabies vaccine, WHO/BS/2018.2335. [online]. 2018; [cited 20 Jun 19]; [40 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/biologicals/BS.2018.2335_7th_IS_Rabies_Vaccine.pdf.
7. Niroumand H, Zain MFM, Jamil MA. Statistical methods for comparison of data sets of construction methods and building evaluation. Procedia Soc Behav Sci 2013; 89: 218-21.
8. World Health Organization. Observed rate of vaccine reactions diphtheria, pertussis, tetanus vaccines. [online] 2014; [cited 4 Sep 15]; [10 screens]. Available from: URL: http://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tools/DTP_vaccine_rates_information_sheet.pdf.
9. World Health Organization. Immunological basis for immunization/Module 2: diphtheria, WHO/EPI/GEN/93.12. Geneva, Switzerland: Department of Vaccines and Biologicals; 2001.
10. Coombes L, Stickings P, Tierney R, Rigsby P, Sesardic D. Development and use of a novel in vitro assay for testing of diphtheria toxoid in combination vaccine. J Immunol Methods 2009; 350(1-2): 142-9.

Method Verification for Determination of Diphtheria antigen in Diphtheria vaccine

Sakalin Trisiriwanich and Ubonwan Chaiarayalert

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

ABSTRACT This study was aimed to verify an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) used to determine an amount of diphtheria antigen (adsorbed antigen) and degree of adsorption in diphtheria vaccine. The results revealed that standard deviations (SD) and percentages of coefficient of variation (% CV) for adsorbed antigen and degree of adsorption in intra-assay precision were 1.01, 1.44 and 1.00, 0.29, respectively, while those of inter-assay precision were 1.01, 1.38 and 1.01, 0.59, respectively. For robustness analysis, values of SD and %CV for adsorbed antigen and degree of adsorption were 1.01, 1.19 and 1.01, 0.83, respectively, as determined by each analyst. In addition, no cross reaction to standard tetanus vaccine was shown, indicating that the method is specific to combined DTP vaccine. Our study could suggest that ELISA is appropriate to use as an alternative method to monitor consistency of diphtheria vaccine production.

Keywords: Diphtheria antigen, Antigen content, Method verification

การสำรวจสิ่งแปลกปลอมในพริกแห้ง

ขันทอง เพ็ชรนอก ก่อเกียรติ ศาสตรินทร์
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ พริกเป็นเครื่องเทศที่ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารและยา และทำเป็นพริกป่นเพื่อเพิ่มรสชาติอาหาร ซึ่งอาจพบสิ่งแปลกปลอมปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ได้ เพื่อเป็นการวิเคราะห์คุณภาพพริกแห้งที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานครและปริมณฑลทั้งที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ จึงได้ตรวจหาสิ่งแปลกปลอมในตัวอย่างพริกแห้งจำนวน 81 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างพริกป่นตักแบ่ง พริกป่นซอง และพริกเม็ดจำนวน 31, 30 และ 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ จากการตรวจด้วยตาเปล่าพบมอดแป้ง (*Tribolium* spp.) มีชีวิตในพริกป่นตักแบ่ง จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.24) และเมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์ Defect Action Levels ของ US FDA คือ พบชิ้นส่วนแมลงมากกว่า 50 ชิ้นในพริกป่นตักแบ่ง พริกป่นซอง และพริกเม็ดจำนวน 12, 13 และ 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 38.71, 43.33 และ 50.00) ตามลำดับ และขนหนูมากกว่า 6 เส้น ในพริกป่นตักแบ่งและพริกป่นซองจำนวน 5 และ 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.13 และ 13.33) ตามลำดับ ข้อมูลจากการสำรวจบ่งชี้ว่าผู้ผลิตควรปรับปรุงกระบวนการผลิต ควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ การรักษาความสะอาดบริเวณผลิต และระบบป้องกันแมลงและสัตว์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี

คำสำคัญ: สิ่งแปลกปลอม, สิ่งแปลกปลอมน้ำหนักเบา, พริกแห้ง

Corresponding e mail: kunthong.p @dmsc.mail.go.th
Received: 19 March 2019 *Revised: 9 August 2019* *Accepted: 12 June 2020*

บทนำ

พริกเป็นพืชล้มลุก อยู่ในวงศ์ Solanaceae สกุล Capsicum แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ *Capsicum furtescens* L. เป็นพริกที่มีความเผ็ดมาก ได้แก่ พริกขี้หนูสวน พริกขี้หนูไทย พริกเหลือง และ *Capsicum annuum* L. เป็นพริกที่มีความเผ็ดน้อย ได้แก่ พริกหยวก พริกชี้ฟ้า และพริกหวาน[1] คนไทยบริโภคสดหรือนำมาตากแห้งทำพริกป่นหรือเครื่องเทศสำหรับปรุงแต่งรสชาติ กลิ่น และสี ใส่ในอาหารเพื่อเพิ่มรสชาติ ปัจจุบันมีการสกัดสารเผ็ดที่เรียกว่าแคปไซซิน (capsaicin) ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เพื่อกระตุ้นการทำงานของกระเพาะอาหาร กระตุ้นการไหลเวียนของโลหิต บำรุงหัวใจ บรรเทาอาการปวดเมื่อย ฉีดพ่นรักษาอาการโรคไซนัส รวมทั้งใช้เพื่อควบคุมน้ำหนัก นอกจากนี้ยังนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ เช่น ใช้แทนแก๊สน้ำตาเพื่อปราบจลาจล ใช้เคลือบสายไฟและสายไฟเบอร์ออปติกส์ต่าง ๆ เพื่อป้องกันการกัดแทะของสัตว์ ผลิตภัณฑ์จากพริกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้แก่ พริกแห้ง พริกป่น ซอสพริก พริกดอง น้ำจิ้มไก่ น้ำพริกแกง ปาปริกา และโอลีโอเรซิน (oleoresin) ซึ่งพริกแห้ง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากผลของพืชสกุลพริก (*Capsicum* sp.) เช่น พริกขี้หนูสวน (*Capsicum minimum* Roxb.) พริกขี้หนู (*Capsicum frutescens* Linn.) และพริกอ่อนหรือพริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* Linn.) ที่สุกหรือแก่จัด นำมาทำให้แห้ง อาจมีก้านผลติดอยู่หรือไม่ก็ได้[2] ส่วนพริกป่น หมายถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำผลพริกที่สุกหรือแก่จัดอาจมีก้านผลติดอยู่ นำไปผึ่งแดดหรืออบให้แห้ง อาจนำไปคั่วแล้วนำไปบด[3] หรือเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากผลของพริกที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Capsicum frutescens* L. และ *Capsicum annuum* L. ที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งก่อนนำไปบด[1]

ขั้นตอนการนำพริกสดผลิตเป็นพริกแห้งและพริกป่น อาจพบสิ่งแปลกปลอม (Filth) ที่มีอยู่ในพริกแห้ง ซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับหรือเป็นสิ่งน่ารังเกียจที่มาจากสัตว์ เช่น สัตว์กลุ่มที่ใช้ฟันแทะ (rodents) แมว สุนัข แมลง นก หรือมาจากกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ และอาจพบสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็ก น้ำหนักเบาหรือน้ำหนักน้อย (Light Filth) ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ได้แก่ แมลง ชิ้นส่วนแมลง ขนคน ขนหนู ขนแมว/สุนัข และขนนก ซึ่งเกณฑ์การตัดสินคุณภาพด้านสิ่งแปลกปลอมในพริกแห้งที่มองเห็นด้วยตาเปล่า[1] สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กำหนดเกณฑ์มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 3004 – 2560 เรื่องพริกป่นหัวข้อ 3.2.3(3) แมลงและชิ้นส่วนแมลง ขนสัตว์ และสิ่งปฏิกูล ไม่พบเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า และเกณฑ์คุณภาพด้านสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็ก น้ำหนักเบา (Light Filth) ของคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (US FDA) ซึ่งเป็นหน่วยงานภายใต้ Department of Health and Human Services ระบุข้อกำหนด Defect Action Levels (DAL)[4] คุณภาพของพริกป่น (Ground Capsicum) ต้องพบชิ้นส่วนแมลง (insect fragments) ไม่เกิน 50 ชิ้น หรือ ขนหนู (rodent hairs) ไม่เกิน 6 เส้น ในตัวอย่างพริกแห้ง 25 กรัม

ประเทศไทยผลิตพริกแห้งเพื่อบริโภคภายในประเทศและส่งออก ในบางฤดูพริกในประเทศไม่เพียงพอหรือมีราคาสูง เนื่องจากต้นทุนการผลิตสูงปริมาณผลผลิตต่ำจึงนำเข้าจากต่างประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2557 – 2559 มีข้อมูลการส่งออกและนำเข้าพริกป่น คือ ส่งออกพริกป่นปริมาณ 3,150 ตัน (130.07 ล้านบาท) 3,057 ตัน (149.62 ล้านบาท) และ 4,107 ตัน (142.01 ล้านบาท) นำเข้าพริกป่นปริมาณ 4,769 ตัน (241.94 ล้านบาท) 2,752 ตัน (235.40 ล้านบาท) และ 4,983 ตัน (489.77 ล้านบาท) ส่วนพริกแห้งมีการส่งออกปริมาณ 8,078 ตัน (261.73 ล้านบาท) 9,547 ตัน (285.19 ล้านบาท) และ 3,812 ตัน (270.93 ล้านบาท) นำเข้าพริกแห้งปริมาณ 64,175 ตัน (1,476.80 ล้านบาท) 71,427 ตัน (2,140.00 ล้านบาท) และ 63,518 ตัน (4,412.86 ล้านบาท) (ข้อมูล ปี 2559 เดือนมกราคม ถึง เดือนพฤศจิกายน 2559)[5]

ปัญหาสำคัญของการผลิตพริก คือ ราคาและมาตรฐานของสินค้า เนื่องจากราคาพริกสดมีความแปรปรวนสูง จากผลกระทบการเปิดเขตการค้าเสรี (FTA) ที่มีการนำเข้าพริกจากต่างประเทศ ทำให้ผู้บริโภคได้ซื้อสินค้าราคาถูก แต่คุณภาพหรือมาตรฐานส่วนใหญ่ไม่มีการตรวจสอบยืนยัน การกำหนดมาตรฐานพริกแห้งเพื่อเป็นการสนับสนุนให้เกษตรกรผลิตพริกแห้งคุณภาพดีและมีมาตรฐานที่ชัดเจน โดยเฉพาะสิ่งแปลกปลอมในพริกแห้งจะเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้รับอาหารที่ถูกสุขลักษณะและเป็นการเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันกับตลาดต่างประเทศให้มากขึ้น[6]

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้ทำการสำรวจคุณภาพด้านสิ่งแปลกปลอมในพริกแห้ง เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับเผยแพร่แก่ผู้ผลิต ผู้ส่งออกและผู้นำเข้าพริกแห้ง และเพื่อรวบรวมเป็นข้อมูลนำไปประกอบการพิจารณาเพื่อจัดทำเกณฑ์มาตรฐานตัดสินคุณภาพของพริกแห้งในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างศึกษา

ตัวอย่างพริกป่นตักแบ่ง พริกป่นซอง พริกเม็ด จากตลาดและซุปเปอร์มาเก็ตในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ได้แก่ ตลาดเทเวศร์ ตลาดราษฎร์บูรณะ ตลาดบางกะปิ ตลาดยิ่งเจริญ ตลาดบางบัวทอง ตลาดท่าน้ำนนท์ ตลาดไท ซุปเปอร์มาร์เก็ต ได้แก่ เดอะมอลล์ บางกะปิ เซ็นทรัล ลาดพร้าว บิ๊กซี ติวานนท์ เดอะมอลล์ งามวงศ์วาน และตัวอย่างนำเข้าจากต่างประเทศที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ส่งตรวจ รวมทั้งหมดจำนวน 81 ตัวอย่าง แบ่งเป็นพริกป่นตักแบ่ง พริกป่นซอง (บรรจุซองปิดสนิท) และพริกเม็ดจำนวน 31, 30 และ 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยตัวอย่างพริกป่นตักแบ่งจำนวน 31 ตัวอย่าง เก็บจากตลาดภายในประเทศ 22 ตัวอย่าง และนำเข้าจากต่างประเทศ 9 ตัวอย่าง พริกเม็ดจำนวน 20 ตัวอย่าง เก็บจากตลาดภายในประเทศและนำเข้าแหล่งละ 10 ตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์ในช่วงเดือนตุลาคม 2558 ถึง เดือนสิงหาคม 2559

การตรวจสิ่งแปลกปลอมที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

ตรวจความผิดปกติต่าง ๆ ที่อาจมองเห็นด้วยตาเปล่า (macroscopic หรือ visual examination) ของบรรจุภัณฑ์ หากมีรูฉีกขาดหรือรอยกัดแทะจะไม่ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างนั้น จากนั้นเปิดถุงเทตัวอย่างลงในจานสีขาว ใช้ช้อนเขี่ยกระจายตัวอย่างเพื่อหาสิ่งแปลกปลอม[7] รวบรวมสิ่งแปลกปลอมที่ตรวจพบไว้ใน petri dish ทำการตรวจจำแนกชนิดและจำนวน โดยเปรียบเทียบกับลักษณะอ้างอิงจากสมุดภาพ[8]

การตรวจสิ่งแปลกปลอมประเภทที่ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (light filth)

ตรวจตามวิธี AOAC 978.22 ข้อ 16. 14.10 Light Filth in Capsicums (Ground)[9] โดยพับกระดาษกรองเป็นรูปถ้วย วางลงใน beaker 1,000 มิลลิลิตร ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ลงในถ้วยกระดาษ เติม isopropanol 400 มิลลิลิตร นำไปต้มบน hot plate ให้เดือดเบา ๆ นาน 10 นาที นำถ้วยกระดาษไปดูดของเหลวออกช้า ๆ ถ่ายตัวอย่างลงในตะแกรง เบอร์ 230 ใช้น้ำอุ่นฉีดล้างจนน้ำใส แล้วถ่ายลงใน trap flask 2,000 มิลลิลิตร โดยใช้ช้อนเขี่ยผ่านกรวยแก้ว ล้างตะแกรงด้วย 60% alcohol และปรับปริมาตรให้ได้ 600 มิลลิลิตร นำไปต้มบน hot plate ให้เดือดเบา ๆ นาน 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็น (cooling bath) ให้อุณหภูมิลดลงน้อยกว่า 25 องศาเซลเซียส นำออกจากอ่างน้ำเย็น เติม flotation liquid (paraffin oil 85 มิลลิลิตร ผสมกับ heptane 15 มิลลิลิตร) 40 มิลลิลิตร และเติม 60% alcohol ให้ได้ 800 มิลลิลิตร กวนส่วนผสมด้วย magnetic stirrer 5 นาที เติมส่วนผสม Tween 80 plus

60% alcohol และ Na4EDTA – alcohol solution (1+1) 100 มิลลิลิตร จากนั้นกวนส่วนผสมด้วยแท่งกวน 1 นาที และตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ค่อยๆ เติม 60% alcohol ผ่านแท่งกวนจนเกือบเต็มคอ flask จากนั้นหมุนแท่งกวนเพื่อให้สิ่งแปลกปลอมที่ติดค้างอยู่ใต้แผ่นยางหลุดออก ค่อยๆ เติม 60% alcohol ผ่านแท่งกวน เพื่อให้ชั้นน้ำมันสูงกว่าแผ่นยาง 1 เซนติเมตร ใช้ forceps ยึดแท่งกวนที่จุดกึ่งกลางของ trap flask ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นค่อยๆ หมุนแท่งกวนและกวนชั้นน้ำมันให้แตกตัว ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เทของเหลวที่อยู่เหนือแผ่นยางลงใน beaker ล้างคอ flask ด้วย 60% alcohol นำของเหลวใน beaker ไปกรอง เติม flotation liquid 30 มิลลิลิตร กวนของเหลวด้วยแท่งกวน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นค่อยๆ หมุนแท่งกวนและปรับระดับชั้นน้ำมัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เทของเหลวเหนือแผ่นยางลงใน beaker ล้างคอ flask ให้สะอาดด้วย 95% alcohol หรือ isopropanol จนสามารถถ่ายสิ่งแปลกปลอมที่ติดค้างบริเวณคอ flask ลงใน beaker ให้หมด นำของเหลวใน beaker ไปกรองบนกระดาษกรองด้วยชุดเครื่องกรอง แล้วนำกระดาษกรองไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า เพื่อตรวจจำแนกชนิดและนับจำนวนสิ่งแปลกปลอมประเภทแมลง ชิ้นส่วนแมลง ขนหนู ขนแมว/สุนัข ขนคน และขนนก โดยเปรียบเทียบกับลักษณะอ้างอิงจากสมุดภาพ[8]

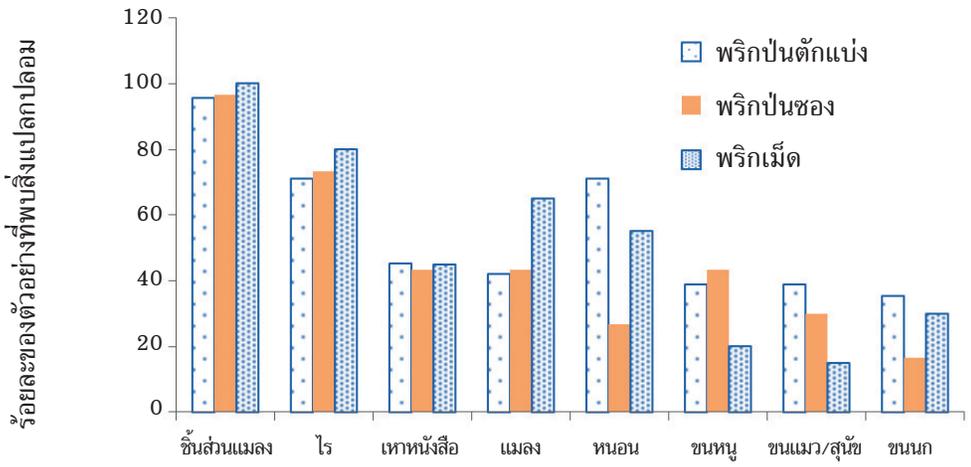
ผล

สิ่งแปลกปลอมที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

ผลการตรวจพริกแห้งจำนวน 81 ตัวอย่าง ได้แก่ พริกป่นตักแบ่ง พริกป่นซอง และพริกเม็ดจำนวน 31, 30 และ 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบมอดแป้ง (*Tribolium* spp.) มีชีวิตจำนวน 30 ตัว ในตัวอย่างพริกป่นตักแบ่งในประเทศ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.24 ซึ่งไม่เป็นไปตามมาตรฐาน มกษ. 3004 – 2560[1] ขณะที่ตรวจไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่มองได้ด้วยตาเปล่าในทุกตัวอย่างของพริกป่นซอง และพริกเม็ด

สิ่งแปลกปลอมประเภทที่ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (light filth)

ผลการตรวจสิ่งแปลกปลอมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า พบสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ได้แก่ ชิ้นส่วนแมลง ไร เหาหนังสือ แมลง ขนคน ขนหนู ขนแมว/สุนัข และขนนก ในพริกป่นตักแบ่งจำนวน 29, 22, 14, 13, 22, 12, 12 และ 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 93.55, 70.97, 45.16, 41.94, 70.97, 38.71, 38.71



ภาพที่ 1 ชนิดสิ่งแปลกปลอม ประเภท light filth ในพริกแห้ง 3 ประเภท

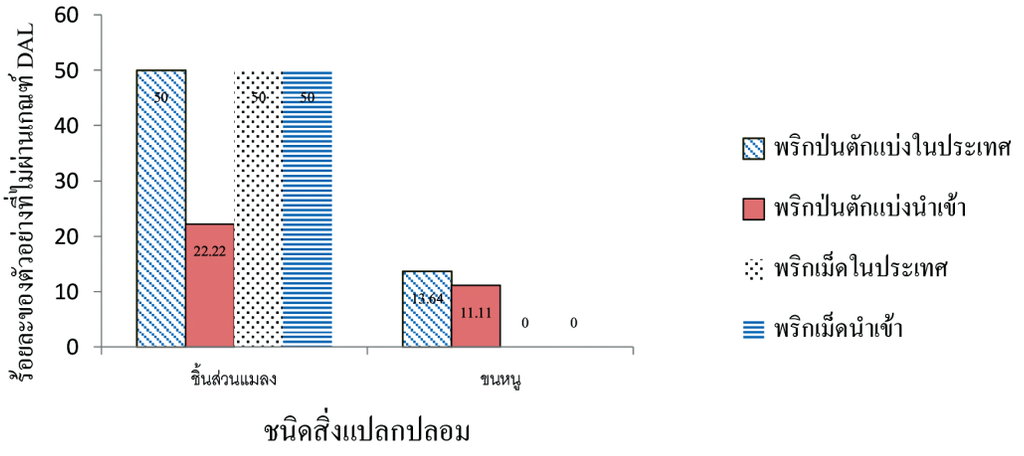
และ 35.48 ตามลำดับ ในพริกป่นซองจำนวน 29, 22, 13, 13, 8, 13, 9 และ 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 96.67, 73.33, 43.33, 43.33, 26.67, 43.33, 30.00 และ 16.67 ตามลำดับ และในพริกเม็ดจำนวน 20, 16, 9, 13, 11, 4, 3 และ 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100.00, 80.00, 45.00, 65.00, 55.00, 20.00, 15.00 และ 30.00 ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

เมื่อจำแนกชิ้นส่วนแมลงออกเป็นกลุ่มตามจำนวนที่ตรวจพบ คือ 1 – 50, 51 – 100 และมากกว่า 101 ชิ้น พบชิ้นส่วนแมลงมากกว่า 50 ชิ้น จำนวน 12, 13 และ 10 ตัวอย่าง ในพริกป่นตักแบ่ง พริกป่นซอง และพริกเม็ด ตามลำดับ แบ่งเป็น 51 – 100 ชิ้น จำนวน 7, 9, 6 ตัวอย่าง และมากกว่า 101 ชิ้น จำนวน 5, 4, และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่พบชิ้นส่วนแมลงมากกว่า 50 ชิ้นจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนด Defect Action Levels (DAL)[4] ขณะที่พบขนหนูมากกว่า 6 เส้น ซึ่งไม่เป็นไปตาม DAL[4] ในพริกป่นตักแบ่งจำนวน 5 ตัวอย่าง และพริกป่นซองจำนวน 4 ตัวอย่าง นอกจากนี้ตรวจพบไร 1 – 30 ตัว, 31 – 60 ตัว และพบมากกว่า 61 ตัว ในพริกป่นตักแบ่ง พริกป่นซอง และพริกเม็ดจำนวน 14, 10 และ 7 ตัวอย่าง จำนวน 2, 3 และ 4 ตัวอย่าง และจำนวน 6, 9 และ 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนชิ้นส่วนแมลง ขนหนู และไร ที่ตรวจพบในตัวอย่างพริกแห้ง 3 ประเภท

สิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา (Light Filth)	พริกป่นตักแบ่ง (ตัวอย่าง)	พริกป่นซอง (ตัวอย่าง)	พริกเม็ด (ตัวอย่าง)
ชิ้นส่วนแมลง (ชิ้น)			
1 – 50	17	16	10
51 – 100	7	9	6
มากกว่า 101	5	4	4
ขนหนู (เส้น)			
1 – 2	6	7	4
3 – 4	1	2	0
มากกว่า 6	5	4	0
ไร (ตัว)			
1 – 30	14	10	7
31 – 60	2	3	4
มากกว่า 61	6	9	5

เมื่อเปรียบเทียบพริกป่นตักแบ่งจากตลาดในประเทศกับนำเข้าจากต่างประเทศ พบพริกในประเทศ 22 ตัวอย่าง ไม่ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนด DAL 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 63.64 และพริกนำเข้า 9 ตัวอย่าง ไม่ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนด DAL 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.33 โดยพบชิ้นส่วนแมลงในพริกในประเทศ 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.00 และในพริกนำเข้า 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 22.22 พบขนหนูในพริกในประเทศ 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.64 และในพริกนำเข้า 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.11 ส่วนพริกเม็ดในประเทศและพริกนำเข้าพบเฉพาะชิ้นส่วนแมลงและไม่ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนด DAL จำนวนแหล่งละ 5 ตัวอย่าง เท่ากัน คิดเป็นร้อยละ 50.00 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบจำนวนพริกป่นตักแบ่งและพริกเม็ดในประเทศและนำเข้าที่ไม่ผ่านเกณฑ์ DAL

ผลการเปรียบเทียบการพบชิ้นส่วนของแมลง และขนหนูของพริกป่นตักแบ่งในประเทศและนำเข้า โดยคำนวณค่าไคสแควร์ (χ^2 – test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05[10] พบว่าตัวอย่างพริกป่นตักแบ่งที่ผลิตในประเทศและตัวอย่างนำเข้าตรวจพบชิ้นส่วนแมลงและขนหนูไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความแตกต่างของพริกป่นตักแบ่งตักแบ่งในประเทศและนำเข้า

สิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา (Light Filth)	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)		χ^2 – test
	พบ	ไม่พบ	
ชิ้นส่วนแมลง (> 50 ชิ้น)[4]			
พริกป่นตักแบ่งในประเทศ	11 (50.00)	11 (50.00)	2.60
พริกป่นตักแบ่งนำเข้า	1 (11.11)	8 (88.89)	
รวม	12 (38.71)		19 (61.29)
ขนหนู (> 6 เส้น)[4]			
พริกป่นตักแบ่งในประเทศ	4 (18.18)	18 (81.82)	0.00
พริกป่นตักแบ่งนำเข้า	1 (11.11)	8 (88.89)	
รวม	5 (16.13)		26 (83.87)

ค่าไคสแควร์ χ^2 จากตารางที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า 3.84

วิจารณ์

ผลการตรวจวิเคราะห์พริกแห้งด้วยตาเปล่าจำนวน 81 ตัวอย่าง ไม่พบสิ่งแปลกปลอมทุกชนิดในพริกป่นซองและพริกเม็ด แต่พบมอดแป้ง (*Tribolium* spp.) มีชีวิตจำนวน 30 ตัว ในพริกป่นตักแบ่งจำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.24 ของตัวอย่างทั้งหมด ทำให้ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ. 3004 – 2560)[1] อาจเกิดจากการเก็บรักษาไม่ถูกวิธี เช่น ภาชนะบรรจุไม่มีฝาปิดหรือไม่สามารถป้องกันการกัดแทะของแมลง รวมทั้งสภาพแวดล้อม

ในการเก็บรักษาระหว่างรอบริโภค บรรจุ จัดจำหน่าย มีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ ถ้าพบมอดแป้งในผลิตภัณฑ์จะทำให้อาหารที่มันอาศัยอยู่นั้นเปลี่ยนสีและมีกลิ่นเหม็น จากการปล่อยฮอร์โมน benzoquinones ซึ่งผลิตจากต่อมที่อยู่ส่วนท้องของมอดแป้ง กลิ่นนี้จะติดทนนานในอาหารแม้จะนำไปทำอาหารแล้วก็ยังมีกลิ่นติดอยู่ [11] เพื่อป้องกันการปนปลอมของแมลง ผู้ผลิตต้องนำระบบควบคุมและป้องกันแมลง ด้วยวิธีทำความสะอาดโรงเก็บ การควบคุมความชื้น การควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ความเย็นจัด และการเก็บรักษาในสภาพสุญญากาศ หรือภาชนะที่ปิดสนิทมาใช้ป้องกันหรือกำจัดแมลง[12]

ผลการตรวจสิ่งแปลกปลอมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า ในพริกแห้ง จำนวน 81 ตัวอย่าง สิ่งแปลกปลอมที่พบมากที่สุด คือ ชิ้นส่วนแมลงพบจำนวน 78 ตัวอย่าง และพบไม่ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนด Defect Action Levels (DAL)[4] เนื่องจากตรวจพบชิ้นส่วนแมลงเกิน 50 ชิ้น อาจมาจากวัตถุดิบหรือการควบคุมกระบวนการผลิตไม่ดี ทำให้ตัวแมลงหรือชิ้นส่วนแมลงแปลกปลอมลงในพริกในขั้นตอนการเก็บเกี่ยว การตากเพื่อลดความชื้น และการเก็บรักษาในโรงเก็บเพื่อรอการแปรรูปหรือจำหน่าย เมื่อนำพริกแห้งมาป่นหรือบด ตัวแมลงหรือชิ้นส่วนแมลงจะแตกเป็นชิ้นกระจายอยู่ในผลิตภัณฑ์ ทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ยอมรับหรือน่ารังเกียจ สำหรับผู้บริโภคหากส่งออกอาจถูกกักกัน ผู้ผลิตควรควบคุมและจัดระบบป้องกันแมลงในทุกขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอย่างเข้มงวด เช่น ติดมุ้งลวด หรือกับดักแมลงตามช่องทางต่าง ๆ ของโรงผลิตพริกแห้ง หรือเก็บพริกในภาชนะปิดสนิทที่สามารถป้องกันการกัดแทะของแมลง เพื่อลดปัญหาการตรวจพบชิ้นส่วนแมลงในผลิตภัณฑ์

ตรวจพบไรจำนวนมากกว่า 61 ตัว ในตัวอย่างพริกทั้ง 3 ประเภท อาจเกิดจากการเก็บรักษาในสภาพแวดล้อมที่เหมาะต่อการเจริญเติบโต เช่น ช่วงอุณหภูมิ ความชื้น และความยาวแสง ซึ่งไรมีการเจริญเติบโตที่ช่วงอุณหภูมิ 10 – 35 องศาเซลเซียส ความชื้น 85 – 95% และความยาวแสงสั้น ไรจะทำลายผลผลิตทางการเกษตรโดยตรงเป็นตัวแพร่กระจายของเชื้อราและแบคทีเรีย ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเสียคุณภาพและเน่าเสียได้อย่างรวดเร็ว[13] ส่วนเหาหนังสือและแมลงตรวจพบจำนวน 1 – 2 ตัว ในบางตัวอย่างเท่านั้น โดยเหาหนังสือจะเจริญเติบโตในที่มีความชื้นสูง อาจทำให้พบการเจริญของเชื้อราเนื่องจากเหาหนังสือกินเชื้อราเป็นอาหาร หากพบเชื้อราอาจก่อให้เกิดอาการแพ้หรือเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ส่วนแมลงเกิดจากการเก็บรักษาพริกแห้งไม่ถูกวิธี เช่น ไม่ได้บรรจุในภาชนะปิดสนิทและภาชนะไม่สามารถป้องกันการกัดแทะ ทำให้แมลงเจาะและไชเข้าไปกินสารอาหารในพริกแห้งแล้วเจริญเติบโต ออกไข่ เป็นตัวหนอน ตัวอ่อน ตัวเต็มวัย และขยายพันธุ์ในขั้นต่อไป การตรวจพบแมลงในพริกแห้งอาจทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทางเกษตร นอกจากนี้การพบแมลงหรือชิ้นส่วนของแมลงปนปลอมไปกับผลิตผลเกษตรที่ส่งไปขายยังต่างประเทศ ทำให้มีผลต่อการส่งออกเป็นอย่างมากโดยเฉพาะการกำหนดราคาผลิตผลเกษตร ผู้ผลิตควรเก็บรักษาพริกแห้งในภาชนะปิดสนิท ทนต่อการกัดแทะของแมลงเพื่อป้องกัน ไร เหาหนังสือและแมลง ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์[11]

ตรวจพบขนคนในตัวอย่างพริกทุกประเภท อาจเนื่องจากการปฏิบัติตนไม่ถูกสุขลักษณะการผลิตส่วนบุคคล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการป่นหรือบดและการบรรจุพริกป่นลงในภาชนะบรรจุชนิดต่าง ๆ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนผู้ผลิตจะต้องปรับปรุงและควบคุมกระบวนการผลิตให้ถูกสุขลักษณะ โดยให้ผู้ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสวมถุงมือและตาข่ายคลุมผมให้มิดชิดในขณะทำการผลิตหรือการบรรจุ ส่วน ขนแมว/สุนัข และขนนก ตรวจพบจำนวน 1 – 2 เส้น และพบในบางตัวอย่างเท่านั้น อาจปนเปื้อนจากขั้นตอนการตากแห้งในในสถานที่เปิด โดยอาศัยความร้อนจากดวงอาทิตย์จึงทำให้สัตว์ผ่านได้ในบริเวณดังกล่าว ทำให้ขนสัตว์ร่วงหล่นลงในผลิตภัณฑ์ ควรป้องกันโดยทำตาข่ายปิดรอบบริเวณที่ผลิตเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของขนสัตว์

ส่วนการตรวจพบขนหนูในตัวอย่างพริกแห้งทุกประเภทโดยเฉพาะการพบขนหนูมากกว่า 6 เส้น ซึ่งไม่ผ่านตามเกณฑ์ข้อกำหนด DAL ในพริกป่นตักแบ่ง และพริกป่นซอง อาจเกิดจากการปนเปื้อนตั้งแต่ขั้นตอนเก็บวัตถุดิบ การตากแห้งที่หนูกัดกินหรือเหยียบทำให้ขนร่วง หรือระหว่างเก็บรักษารอการแปรรูปจากแหล่งผลิตไม่มีการป้องกันหนูจากท่อหรือแหล่งผลิต เมื่อนำมาป่นหรือบดทำให้หักเป็นเส้นขนาดเล็กจำนวนมากซึ่งหนูเป็นพาหะนำโรคมาสู่คน ผู้ผลิตควรหมั่นทำความสะอาดบริเวณผลิตเพื่อไม่ให้มีเศษอาหารให้หนูกินและปิดช่องทางที่หนูเข้า – ออก หรือท่อระบายน้ำเพื่อป้องกันไม่ให้หนูเข้าในแหล่งผลิต

ตัวอย่างพริกป่นตักแบ่งในประเทศไม่ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนด DAL มากกว่าพริกนำเข้าอาจเกิดจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นเหมาะต่อการเจริญของแมลง ทำให้แมลงเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้มากรวมทั้งพริกเป็นอาหารของหนูที่ในแหล่งวัตถุดิบและในโรงเก็บ ซึ่งสิ่งแปลกปลอมที่เป็นชิ้นส่วนแมลงและขนหนูเป็นสิ่งที่ไม่ยอมรับหรือถือเป็นสิ่งที่น่ารังเกียจสำหรับผู้บริโภค ดังนั้นผู้ผลิตควรปรับปรุงกระบวนการผลิตและหาวิธีป้องกันแมลงและขนหนูในทุกขั้นตอนการผลิต เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์พริกแห้งที่มีคุณภาพเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

สรุป

ชิ้นส่วนแมลงและขนหนูเป็นปัญหาสำคัญของคุณภาพพริกแห้งที่ผู้ผลิต ผู้ส่งออก และนำเข้าพริกแห้ง จะต้องเข้มงวดในเรื่องสุขลักษณะและวิธีปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (Good Manufacturing Practice, GMP) การควบคุมและป้องกันแมลงและหนูเป็นสิ่งต้องเข้มงวดมากยิ่งขึ้น ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปเป็นแนวทางประเมินคุณภาพพริกแห้งและรวบรวมเป็นข้อมูลเบื้องต้น สำหรับเผยแพร่ให้แก่ผู้ผลิต ผู้ส่งออกพริกแห้ง และผลิตภัณฑ์ให้นำไปแก้ไขปรับปรุงสุขลักษณะการผลิตเพื่อยกระดับคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพดีสม่ำเสมอให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำไปเป็นแนวทางในการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อรวบรวมเป็นข้อมูลในการจัดทำเกณฑ์มาตรฐานตัดสินคุณภาพของพริกแห้งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. มกษ. 3004 – 2560. มาตรฐานสินค้าเกษตรพริกป่น. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2560
2. มอก. 456 – 2526. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมพริกแห้ง. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม; 2526.
3. มผช. 492/2547. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนพริกป่น. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม; 2547.
4. Food defect action levels: levels of natural or unavoidable defects in foods that present no health hazards for humans. Washington, DC: Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition; 1995.
5. รุ่งนภา โบวิเชียร. พื้นที่เก็บเกี่ยวพริกของประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2560; [สืบค้น 21 พ.ย. 2560]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://www.agriman.doae.go.th/home/news/year%202017/022_chilli.pdf.

6. กมล เลิศรัตน์. การผลิต การปลูก การแปรรูป และการตลาดของพริกและผลิตภัณฑ์พริกในประเทศไทย. ประชาคมวิจัย. [ออนไลน์]. 2550; [สืบค้น 6 มิ.ย. 2563]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://rescom.trf.or.th/display/keydefault.aspx?id_colum=1936.
7. Chapter V – 8: spices, condiments, flavors, and crude drugs. In: FDA technical bulletin number 5. Macroanalytical procedures manual. Washington, DC: U.S. Food and Drug Administration; 1994. p. 32.
8. Gentry JW, Harris KL. Microanalytical entomology for food sanitation control. Florida: Litho Graphics Altamonte Springs; 1991.
9. Whitlock LL, Chapter editior. Chapter 16, Extraneous materials: isolation. In: Latimer GW, editor. Official method of analysis of AOAC International. 20 th ed. Maryland: AOAC International; 2016. p. 1 – 5, 48.
10. ทัสสนี นุชประยูร, เติมศรี ชำนิจารกิจ, บรรณาธิการ. สถิติในวิจัยทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: โอ เอส พริ้นติ้ง เฮาส์; 2537. หน้า 85 – 86, 265.
11. พรทิพย์ วิสารทานนท์, อัจฉรา เพชรโชติ. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการควบคุมศัตรูผลิตผลเกษตร เรื่อง แมลงศัตรูผลิตผลเกษตรและแมลงศัตรูธรรมชาติ. วันที่ 9 – 11 กรกฎาคม 2551. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2551.
12. ใจทิพย์ อุไรชื่น. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการควบคุมศัตรูผลิตผลเกษตร เรื่อง การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูผลิตผลเกษตรโดยไม่ใช้สารฆ่าแมลง. วันที่ 9 – 11 กรกฎาคม 2551. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2551.
13. พลอยชมพู กรวิภาสเรือง. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการควบคุมศัตรูผลิตผลเกษตร เรื่อง ไรศัตรูผลิตผลเกษตร. วันที่ 9 – 11 กรกฎาคม 2551. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2551.

A Survey of Filth in Dried Chilies

Kuntong Pednog, Kokeiat Sarttarin
Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 1100 Thailand.

ABSTRACT Chili, one of the spices, is used as a raw material in food and drug processing industries. In addition, dried chili is for flavors of food. Contamination with filth or light filth in products of dried chilies is possible. We, therefore, performed a survey to determine quality of various local and imported products of dried chilies marketed in Bangkok and Metropolitan Area. A total of 81 products, consisting of 31, 30 and 20 ground and divided for sale products, ground and sealed bags and whole dried chilies products, respectively, were included in our survey. Living insects of *Tribolium* spp., as determined by visual examination, were found in 1 (1.24%) ground and divided for sale product. Using microscopic examination, in accordance with Defect Action Levels of US FDA, insect fragments of greater than 50 pieces were found in 12 (38.71%) ground and divided for sale products, 13 (43.33%) ground and sealed bags and 10 (50.00%) whole dried chilies products. Additionally, rat hairs of greater than 6 pieces were examined in 5 (16.13%) ground and divided for sale products and 4 (13.33%) ground and sealed bags. Our study indicated that manufacturers should improve their production process. Quality control of raw materials, cleanliness of production areas and insects and animals control systems should be highly effective for manufacturing dried chilies with good quality.

Key words: Filth, Light Filth, Dried chilies

ว กรมวิทย พ 2563; 62 (2) : 96 – 105

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล สำหรับสอบเทียบเครื่องวัดแอลกอฮอล์จากลมหายใจ

จิรพรรณ บุญสูง และธรรมรัตน์ บุญสูง

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอแม่ริม เชียงใหม่ 50180

บทคัดย่อ ได้ทำการศึกษาเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลสำหรับใช้สอบเทียบเครื่องวัดปริมาณเอทานอลจากลมหายใจ โดยมีปริมาณไอเอทานอลเท่ากับ 0.045, 0.050 และ 0.055 กรัมเปอร์เซ็นต์ แบ่งบรรจุ 500 มิลลิลิตร ในขวดพลาสติกปิดด้วยฝาอลูมิเนียมและปิดทับด้วยฝาเกลียวพลาสติกอีกชั้นหนึ่ง ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเสถียร และปริมาณเอทานอลโดยเทคนิค Static Headspace Gas Chromatography-FID พบว่าสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่เตรียมขึ้นมานั้นเป็นเนื้อเดียวกัน ($p > 0.05$) เสถียรที่อุณหภูมิห้องนาน 24 เดือน ($p = 0.59$) มีปริมาณไอเอทานอลที่ 3 ระดับความเข้มข้น และความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์เท่ากับ 0.0466 ± 0.0022, 0.0508 ± 0.0024 และ 0.0562 ± 0.0024 กรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สามารถสอบกลับไปยังวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน NIST SRM® 1828b Ethanol-water solutions ชี้ให้เห็นว่าสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่เตรียมได้นี้เป็นประโยชน์กับงานประจำของห้องปฏิบัติการสอบเทียบเครื่องวัดแอลกอฮอล์จากลมหายใจ และใช้ทดแทนวัสดุอ้างอิงมาตรฐานจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง

คำสำคัญ : สารละลายมาตรฐานเอทานอล, เครื่องวัดแอลกอฮอล์จากลมหายใจ, ห้องปฏิบัติการสอบเทียบ

Corresponding e mail: Jirapun.b@dmsc.mail.go.th

Received: 3 October 2018 *Revised: 8 May 2019* *Accepted: 15 May 2020*

บทนำ

สารละลายมาตรฐานเอทานอลที่ใช้ในการสอบเทียบเครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์จากลมหายใจชนิดตรวจยืนยันผล (Evidential Breath Alcohol Analyzer : EBA) โดยวิธีจำลองไอสารละลาย (wet bath simulator) มีผลิตจำหน่ายในต่างประเทศ เช่น Guth Certified Premixed Alcohol Reference Solution[1] และ Alcohol Reference Solution (ARS) ยี่ห้อ ALCOLOCK[2] ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของประเทศอเมริกา ในรูปแบบขวดบรรจุ 500 มิลลิลิตร เปิดใช้ทันที มีปริมาณเอทานอลในช่วง 0.02 – 0.4 กรัมเปอร์เซ็นต์ (g%) และแบบหลอด (ampoule) ซึ่งต้องเจือจางให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตรก่อนใช้ มีปริมาณเอทานอลในช่วง 0.05–0.15 g% ในประเทศไทยยังไม่มีผู้ผลิตสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่ใช้ในการสอบเทียบเครื่องวัดแอลกอฮอล์จากลมหายใจ

เครื่องวัดแอลกอฮอล์แบบตรวจยืนยันผล (Evidential Breath Alcohol Analyzer : EBA) ใช้สำหรับตรวจจับผู้ขับขี่ยานพาหนะที่เมาสุราในประเทศไทยเป็นชนิดที่มีตัวตรวจจับแบบเซลล์ไฟฟ้าเคมี ต้องสอบเทียบเครื่องทุก 6 เดือน เพื่อความถูกต้องในการวัดปริมาณแอลกอฮอล์[3, 4] การสอบเทียบเครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ฯ โดยวิธีจำลองไอสารละลายตามข้อกำหนดของ OIML R 126:2012[5] นั้น จะวัดปริมาณไอแอลกอฮอล์เทียบเป็นปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือดโดยใช้ค่า Blood Breath Ratio เท่ากับ 2000:1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลสำหรับให้เครื่องวัดแอลกอฮอล์ฯ อ่านค่าเป็นปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือดสามารถคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์ในสารละลายได้โดยใช้สมการ Dubowski's formula[5] ดังนี้

$C_{air} = 0.04145 \times 10^{-3} \times C_{H_2O} \times \exp(0.06583t)$

C_{H_2O} = ปริมาณเอทานอลในสารละลาย (g%)

C_{air} = ปริมาณไอเอทานอล (g%)

t = อุณหภูมิ (34 องศาเซลเซียส)

$C_{air} = 0.38866 \times 10^{-3} \times C_{H_2O}$

ขั้นตอนการสอบเทียบเครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ฯ โดยวิธีจำลองไอสารละลาย[5, 6] ทำได้โดยใช้สารละลายมาตรฐานเอทานอลปริมาณ 0.05 g% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใส่ใน Breath Alcohol Simulator ปิดฝาให้สนิท เปิดเครื่องนาน 60 นาที รอให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 34 ± 0.5 องศาเซลเซียส ตั้งค่าอัตราการไหลของ Gas Flow Meter ตามที่กำหนดในคู่มือของเครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ฯ แล้ววัดปริมาณไอเอทานอลที่ความเข้มข้นสารละลายต่างกัน 3 ระดับคือ 0.045, 0.050, 0.055 g% ทำซ้ำ 3 – 5 ครั้ง รายงานผลสอบเทียบโดยใช้เกณฑ์ในการประเมินผลการสอบเทียบตาม OIML R 126:2012 ซึ่งกำหนดค่าความคลาดเคลื่อนสูงสุดไม่เกิน 7.5% ของค่ากำหนด

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่เปิดบริการสอบเทียบเครื่องวัดแอลกอฮอล์จากลมหายใจโดยวิธีจำลองไอสารละลายที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ตามข้อกำหนดของ OIML R 126:2012 ห้องปฏิบัติการของศูนย์ฯ ขอการรับรองห้องปฏิบัติการสอบเทียบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017[7] จากสำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ในขอบข่ายที่ระดับปริมาณเอทานอล 0.05 g% เพื่อให้สอดคล้องกับกฎกระทรวง ฉบับที่ 16 พ.ศ. 2537 ตามความในพระราชบัญญัติจราจรทางบก พ.ศ. 2522 กระทรวงมหาดไทย ที่กำหนดไว้ว่าระดับเอทานอลในเลือดที่เกิน 50 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ (mg%) ถือเป็นผู้ขับขี่ยานพาหนะที่เมาสุรา[8] ในการรับรองห้องปฏิบัติการครั้งนี้ หน่วยรับรองได้กำหนดให้วัดปริมาณเอทานอลครอบคลุมปริมาณ 0.05 g% ด้วย ดังนั้น จึงทำการศึกษาเพื่อเตรียมสารละลายเอทานอลชนิดพร้อมใช้งานปริมาตร 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.045, 0.050, 0.055 g% เพื่อใช้ภายในห้องปฏิบัติการ และทดแทนการนำเข้าวัสดุอ้างอิงมาตรฐานจากต่างประเทศที่มีราคาแพง

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือ

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ผลิตภัณฑ์ของ Varian สหรัฐอเมริกา รุ่น star 3400 CX ประกอบด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector คอลัมน์ RTX® Volatile 30 m × 0.53 mm, 2 μm film thickness ของบริษัท Restek ตั้งอุณหภูมิ ของ column, injector และ detector ที่อุณหภูมิ 65, 210 และ 220 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อัตราการไหลของไนโตรเจน 10 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ split ratio 20:1

เครื่อง Headspace Auto sampler ผลิตภัณฑ์ของ Varian สหรัฐอเมริกา รุ่น Genesis ตั้งสภาวะทำงานดังนี้ sample loop 500 μl, plate temperature 50 องศาเซลเซียส, sample equilibration time 4 นาที, sample mix time 7 นาที, loop temperature 150 องศาเซลเซียส และ transfer line temperature 200 องศาเซลเซียส

สารเคมีและสารมาตรฐาน

วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (Standard Reference Material, SRM) NIST SRM® 1828b Ethanol-water solutions ผลิตภัณฑ์ของ National Institute Standard and Technology (NIST) สหรัฐอเมริกา ที่ความเข้มข้น 0.01951 ± 0.00018, 0.03900 ± 0.00046, 0.08023 ± 0.00074 และ 0.10084 ± 0.00083 g%, Ethyl alcohol 99.99% (HPLC grade) และ Isopropanol 99.99% (HPLC grade) ผลิตภัณฑ์ของ Merck เยอรมนี

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล

เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล 3 ระดับความเข้มข้น (0.045, 0.050 และ 0.055 g%) จาก Dubowski's Equation โดยชั่ง Ethyl alcohol (99.99%) ปริมาณ 29.01, 32.23 และ 35.45 กรัม ตามลำดับ ปรับปริมาตรเป็น 50 ลิตร ด้วยน้ำกรอง 18.2 เมกกาโอห์ม ผสมในถังพลาสติกที่มีฝาปิดโดยใช้เครื่องกวนนานอย่างน้อย 8 ชั่วโมง แบ่งบรรจุใส่ขวดพลาสติกปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใช้ dispenser จำนวน 80 ขวด ปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียมตามด้วยฝาเกลียวพลาสติกและแผ่นพลาสติกอีกชั้นหนึ่ง เรียงลำดับตามการบรรจุ ติดฉลากระบุชื่อ ความเข้มข้น วันที่เตรียม และวันหมดอายุ

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในสารละลายมาตรฐาน และค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์ (u_{char})

สุ่มตัวอย่างโดยวิธีสุ่มแบบชั้นภูมิ (stratified random sampling) คือแบ่งตัวอย่างสารละลายมาตรฐานเอทานอลแต่ละระดับความเข้มข้นออกเป็น 10 กลุ่มๆ ละ 8 ขวด จากนั้นสุ่มมากลุ่มละ 1 ขวด รวมได้ตัวอย่างระดับความเข้มข้นละ 10 ขวด หาปริมาณเอทานอลโดยใช้ Static Headspace Gas Chromatography-FID[9] เทียบกับกราฟมาตรฐาน วิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยและค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์

การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve): ปิเปตสารละลายไอโซโปรปานอลความเข้มข้น 0.25% และ NIST SRM® 1828b Ethanol-water solutions อย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในขวดขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมที่มี septa อยู่ด้านใน วิเคราะห์ด้วย Static Headspace Gas Chromatography-FID[9] สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลกับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคระหว่างเอทานอลและไอโซโปรปานอล โดยเตรียมอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น

การเตรียมตัวอย่าง: ปิเปตสารละลายไอโซโปรปานอลความเข้มข้น 0.25% และตัวอย่างสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่เตรียมไว้ อย่างละ 100 ไมโครลิตรใส่ในขวดขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมที่มี septa อยู่ด้านในวิเคราะห์ด้วย Static Headspace Gas Chromatography-FID[9] เทียบกับกราฟมาตรฐาน

คำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (u_{char}) ตามแนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนในการวัดทางเคมี[10] โดยใช้สมการดังนี้

$$U_{char} = 2*C\sqrt{RSU^2_{std} + RSU^2_{pipett} + RSU^2_{pre} + RSU^2_{cal}}$$

เมื่อ U_{char} = standard uncertainty due to characterization

RSU_{std} = Relative standard uncertainty due to NIST SRM® 1828b Ethanol-water solutions จากใบรับรองค่าวัสดุอ้างอิงมาตรฐานของ National Institute Standard and Technology (NIST)

RSU_{pipett} = Relative standard uncertainty due to micropipette จากใบรับรองการสอบเทียบไมโครปิเปต

$RSU_{precision}$ = Relative standard uncertainty due to precision จากการหาค่า precision ของการทำ 10 ซ้ำ

RSU_{cal} = Relative standard uncertainty due to calibration จากการสร้างกราฟมาตรฐาน

C = ปริมาณไอเอทานอล (g%)

การคำนวณปริมาณเอทานอล 0.05 g/100 g เป็นปริมาณเอทานอล 0.05 g/100 ml

ปริมาณเอทานอล 0.05 g/100 g มีปริมาณน้ำเท่ากับ 99.95 g คำนวณเป็นปริมาตรน้ำ 99.95 ml (ค่าความหนาแน่นของน้ำเท่ากับ 1 g/ml)

ปริมาณเอทานอล 0.05 g/100 g มีปริมาณเอทานอล เท่ากับ 0.05 g คำนวณเป็นปริมาตรเอทานอล 0.063 ml (ค่าความหนาแน่นของเอทานอลเท่ากับ 0.79 g/ml)

ดังนั้นปริมาณเอทานอล 0.05 g/100g มีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.05 g × 100/(100.013) = 0.05 g/100 ml

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของสารละลายมาตรฐานเอทานอล และความไม่แน่นอนจากทดสอบ (u_{bb})

ทดสอบความแตกต่างของปริมาณเอทานอลแต่ละระดับความเข้มข้น ๆละ 10 ขวด โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) คำนวณความไม่แน่นอนจากการทดสอบตาม ISO Guide 35:2006[11] ดังนี้

$u_{bb} = \sqrt{MS_{within}/n} \quad \sqrt[4]{2/\nu_{MS_{within}}}$

u_{bb} = standard uncertainty due to between bottle (in) homogeneity

MS_{within} = Mean square within group

n = 2 (duplicate)

$\nu_{MS_{within}}$ = degrees of freedom ของ Mean square within group

การทดสอบความเสถียรของสารละลายมาตรฐานเอทานอล และความไม่แน่นอนจากการทดสอบ (u_{lts})

เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 0.055 g% จำนวน 80 ขวด เก็บที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) นาน 12 และ 24 เดือน ใช้วิธีสุ่มแบบชั้นภูมิโดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 5 กลุ่ม

กลุ่มละ 16 ขวด จากนั้นสุ่มมากลุ่มละ 1 ขวด รวมได้ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละช่วงเวลามากลุ่มละ 5 ขวด หาปริมาณเอทานอลโดย Static Headspace Gas Chromatography-FID เทียบกับกราฟมาตรฐาน วิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาสร้างสมการถดถอย (regression) ระหว่างระยะเวลา (x_i) กับความเข้มข้นของเอทานอล (y) ดังสมการ $y = b_0 + b_1 x$ โดย x_i มีค่าเท่ากับ 0 (วันที่เตรียมเสร็จ), 12 และ 24 เดือน หาค่าเฉลี่ยและความไม่แน่นอนจากการทดสอบตาม ISO Guide 35:2006 ดังนี้

$u_{lts} = s(b_1)^* t$

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_1^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

u_{lts} = standard uncertainty due to long-term (in) stability

b_1 = slope

b_0 = intercept

s = standard deviation of the point among the line

$s(b_1)$ = standard uncertainty with the slope

t = shelf life = 24 เดือน

การประมาณความไม่แน่นอนรวม (Expanded Measurement Uncertainty) ของสารละลายมาตรฐานเอทานอล

ความไม่แน่นอนรวมตามมาตรฐาน ISO Guide 35:2006 คำนวณได้โดยใช้สมการ

$$U_{std} = k \sqrt{u^2_{char} + u^2_{bb} + u^2_{lts} + u^2_{sts}}$$

เมื่อ U_{std} = expanded uncertainty of a property value

u_{char} = standard uncertainty due to characterization

u_{bb} = standard uncertainty due to between bottle (in) homogeneity

u_{lts} = standard uncertainty due to long-term (in) stability

u_{sts} = standard uncertainty due to transport

k = coverage factor = 2 และสารละลายมาตรฐานเอทานอลเก็บไว้ใช้ในห้องปฏิบัติการของศูนย์ฯ ทำให้ค่าความไม่แน่นอนในการขนส่งไม่เพิ่มขึ้น ดังนั้น $u_{sts} = 0$

ผล

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในสารละลายมาตรฐาน และความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์ (U_{char})

ผลวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้น 3 ระดับความเข้มข้น ระดับละ 10 ซ้ำ มีค่าเท่ากับ 0.0466, 0.0508 และ 0.0562 g% และความไม่แน่นอน (U_{char}) เท่ากับ 0.0010570, 0.0011028 และ 0.0010984 g% ตามลำดับ คิดเป็นความไม่แน่นอนสัมพัทธ์เท่ากับ 2.27, 2.17 และ 1.95 % ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณไอเอทานอลในสารละลายมาตรฐานเอทานอล 3 ระดับความเข้มข้น และค่าความไม่แน่นอนสัมพัทธ์จากการวิเคราะห์

ขวดที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (g%)					
	0.045		0.050		0.055	
1	0.0475	0.0468	0.0506	0.0506	0.0560	0.0564
2	0.0473	0.0466	0.0507	0.0509	0.0557	0.0564
3	0.0466	0.0461	0.0529	0.0517	0.0553	0.0560
4	0.0461	0.0462	0.0498	0.0523	0.0559	0.0554
5	0.0462	0.0469	0.0504	0.0511	0.0561	0.0565
6	0.0462	0.0462	0.0501	0.0503	0.0560	0.0563
7	0.0462	0.0463	0.0504	0.0508	0.0567	0.0575
8	0.0466	0.0467	0.0505	0.0508	0.0553	0.0570
9	0.0468	0.0467	0.0507	0.0502	0.0565	0.0565
10	0.0466	0.0466	0.0504	0.0507	0.0567	0.0558
เฉลี่ย	0.0466		0.0508		0.0562	
RSU_{std}	0.0050336		0.0050336		0.0050336	
RSU_{pipett}	0.0050336		0.0015880		0.0015880	
$RSU_{precision}$	0.0015880		0.0032490		0.0022507	
RSU_{cal}	0.0018594		0.0089123		0.0079104	
U_{char}	0.0010570		0.0011028		0.0010984	
U_{char} สัมพัทธ์	2.27%		2.17%		1.95%	

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของสารละลายมาตรฐานเอทานอล และความไม่แน่นอนจากทดสอบ (u_{bb})

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้น 3 ระดับความเข้มข้นเป็นเนื้อเดียวกัน ($p > 0.05$) มีค่า p-value เท่ากับ 0.09, 0.27 และ 0.41 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ส่วนความไม่แน่นอนจากการทดสอบ (u_{bb}) มีค่าเท่ากับ 0.0001403, 0.0003146 และ 0.0002586 g% ตามลำดับ คิดเป็นความไม่แน่นอนสัมพัทธ์เท่ากับ 0.30, 0.62 และ 0.46% ตามลำดับ

ตารางที่ 2 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของสารละลายมาตรฐานเอทานอล 3 ระดับความเข้มข้น และค่าความไม่แน่นอนสัมพัทธ์ของการทดสอบ

ความเข้มข้นของเอทานอล (g%)	แหล่งความแปรปรวน	SS	df	MS	F	p-value	u_{bb} (g%)	u_{bb} สัมพัทธ์ (%)
0.045	ระหว่างกลุ่ม	1.97×10^{-6}	9	2.19×10^{-7}	2.48	0.09	0.0001403	0.30
	ภายในกลุ่ม	8.8×10^{-7}	10	8.8×10^{-8}				
	รวม	2.85×10^{-6}	19					
0.050	ระหว่างกลุ่ม	5.92×10^{-6}	9	6.58×10^{-7}	1.49	0.27	0.0003146	0.62
	ภายในกลุ่ม	4.43×10^{-6}	10	4.43×10^{-7}				
	รวม	1.03×10^{-5}	19					
0.055	ระหว่างกลุ่ม	3.09×10^{-6}	9	3.43×10^{-7}	1.15	0.41	0.0002586	0.46
	ภายในกลุ่ม	2.99×10^{-6}	10	2.99×10^{-7}				
	รวม	6.08×10^{-6}	19					

การทดสอบความเสถียรของสารละลายมาตรฐานเอทานอล และความไม่แน่นอนจากการทดสอบ (u_{lts})

เมื่อทดสอบด้วยสถิติวิเคราะห์ความถดถอย (regression) พบว่าสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.055 g% มีความเสถียร ($p > 0.05$) มีค่า p-value เท่ากับ 0.59 แสดงว่าสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 24 เดือน และมีความไม่แน่นอนจากการทดสอบเท่ากับ 0.00039 g% คิดเป็นความไม่แน่นอนสัมพัทธ์เท่ากับ 0.66% ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเสถียรของสารละลายมาตรฐานเอทานอล

เวลา (เดือน)	ปริมาณไอเอทานอล (g%)
0	0.0587
12	0.0582
24	0.0584
$s(b_1)$	0.00002
u_{lts}	0.00039
u_{lts} สัมพัทธ์	0.66%

การประมาณความไม่แน่นอนรวม (Expanded Measurement Uncertainty) ของสารละลายมาตรฐานเอทานอล

สารละลายมาตรฐานจำนวน 3 ระดับความเข้มข้น มีปริมาณเอทานอล ± ความไม่แน่นอนรวมเท่ากับ 0.0466 ± 0.0022, 0.0508 ± 0.0024 และ 0.0562 ± 0.0024 g% ตามลำดับ คิดเป็นความไม่แน่นอนสัมพัทธ์ เท่ากับ 4.77, 4.70 และ 4.23% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณไอเอทานอลในสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น และค่าความไม่แน่นอนรวม

Ethanol concentration (g%)	Certified Concentration (g%)	U_{std} (g%)	U_{std} สัมพัทธ์ (%)
0.045	0.0466	0.0022	4.77
0.050	0.0508	0.0024	4.70
0.055	0.0562	0.0024	4.23

วิจารณ์

สารละลายมาตรฐานเอทานอลที่เตรียมขึ้นมาแบบเปิดใช้งานทันที บรรจุในขวดพลาสติก ขนาด 500 มิลลิลิตร มีความสะดวกในการใช้สอบเทียบเครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ฯ ผลวิเคราะห์โดยเทคนิค Static Headspace Gas Chromatography-FID พบว่าสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น มีปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วง 0.0466 – 0.0562 g% ห้องปฏิบัติการสามารถนำสารละลายดังกล่าวไปใช้ในการสอบเทียบเครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ฯ ที่ระดับ 0.05 g% ได้ ซึ่งเป็นปริมาณเอทานอลในเลือดตามที่กฎหมายกำหนด[8] และสามารถเตรียมสารละลายที่มีปริมาณเอทานอลได้สูงถึง 0.3 g% เทียบจาก NIST SRM® 1828b Ethanol-water solutions ค่าความไม่แน่นอนสัมพัทธ์มีค่าอยู่ในช่วง 1.95-2.27% ซึ่งสามารถลดค่าความไม่แน่นอนได้ด้วยการใช้วิธีมาตรฐานการวัดปฐมภูมิ (Primary Measurement Standard) เช่น gravimetric หรือ titrimetric ในการหาปริมาณเอทานอล อย่างไรก็ตามสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่เตรียมขึ้น สามารถนำมาใช้ในการสอบเทียบเครื่องวัดแอลกอฮอล์จากลมหายใจตามเกณฑ์ของ OIML R 126:2012 มีความเป็นเนื้อเดียวกัน เนื่องจากเตรียมด้วยน้ำกรองและบรรจุในระบบปิดสนิทป้องกันการระเหย อีกทั้งยังเสถียรเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องนานถึง 24 เดือน เทียบกับผลการศึกษาในปี พ.ศ. 2551[12] ที่สามารถเก็บที่สภาวะเดียวกันนานเพียง 12 เดือนเท่านั้น

สรุป

สารละลายมาตรฐานเอทานอลชนิดพร้อมใช้งานขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตรที่เตรียมขึ้น มีความสะดวกในการใช้ และเก็บได้นาน เหมาะกับงานประจำของห้องปฏิบัติการสอบเทียบเครื่องวัดแอลกอฮอล์จากลมหายใจ และใช้ทดแทนการนำเข้าวัสดุอ้างอิงมาตรฐานจากต่างประเทศได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสังคม วิทยนันทน์ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ที่ให้คำปรึกษาและให้คำแนะนำในการดำเนินงาน

เอกสารอ้างอิง

1. Guth certified premixed alcohol reference solution. [online]. 2018; [cited 2019 Sep 12]; [1 screen]. Available from: URL: https://www.guthlabs.com/product/premix-alcohol-reference-solution.
2. Alcohol reference solution. [online]. 2018; [cited 2019 Sep 12]; [2 screens]. Available from: URL: https://alcolock.ca/alcohol-reference-solution.

3. สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์. คู่มือสำหรับประชาชน: การสอบเทียบเครื่องวัดแอลกอฮอล์ในเลือดโดยวิธีเป่าลมหายใจ. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 23 พ.ย. 2561]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://info.go.th/Intro?returnUrl=%2FGuide%2FGenerateCitizenGuideFront%2F782437.
4. ชัยยศ อินทร์ติยะ, สาธิตา ปานขวัญ, ธัญจิรา เพ็ญสิริกุล. คุณภาพเครื่องวัดแอลกอฮอล์ในเลือดโดยวิธีเป่าลมหายใจ. [ออนไลน์]. 2558; [สืบค้น 15 ก.พ. 2561]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ URL: http://e-library.dmsc.moph.go.th/view.asp?id=224.
5. OIML R 126:2012. Evidential breath analyzers. France: International Organization of Legal Metrology; 2012.
6. Anghel MA. Quality assurance in breath-alcohol analysis. UPB Sci Bull, Series A 2006; 68(2): 61-70.
7. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
8. กฎกระทรวง ฉบับที่ 16 (พ.ศ. 2537) ออกตามความในพระราชบัญญัติจราจรทางบก พ.ศ. 2522. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 111 ตอนที่ 54 ก (วันที่ 8 ธันวาคม 2537).
9. จิรพรรณ บุญสูง. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเลือดโดยวิธี Static headspace GC. ว กรมวิทย พ 2543; 42(2): 133-9.
10. สุวรรณา จารุนุช และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
11. ISO Guide 35:2006. Reference material-general and statistical principle for certification. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2006.
12. ธรรมรัตน์ บุญสูง, จิรพรรณ บุญสูง. การผลิตวัสดุอ้างอิงรับรองสำหรับสอบเทียบเครื่องวัดแอลกอฮอล์จากลมหายใจ. ว เทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2551; 41(1): 32-8.

Preparation of Ethyl Alcohol Standard Solution for Breath Analyzer Calibration

Jirapun Bunsoong and Thamarat Bunsoong

Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai, Department of Medical Sciences, Amphoe Mae Rim, Chiang Mai 50180, Thailand

Abstract This study was to prepare ethanol standard solution for breath analyzer calibration at the concentrations of 0.045, 0.050 and 0.055 g%. A 500 ml aliquot was filled in plastic bottle with aluminium and plastic screw cap. The prepared solutions were tested for homogeneity, stability and alcohol content using Static Headspace Gas Chromatography-FID. The results showed that 3 different concentration levels of solution are homogeneous ($p > 0.05$) and stable at room temperature for 24 months ($p = 0.59$). The alcohol contents in each concentration level were 0.0466 ± 0.0022, 0.0508 ± 0.0024 and 0.0562 ± 0.0024 g%, respectively, and was traceable to NIST SRM® 1828b Ethanol-water solutions. Our study indicated that the prepared solution helped support the routine work of breath analyzer calibration laboratory and can be used as a substitute for imported certified reference material.

Keywords: ethanol standard solution, breath alcohol analyzer, calibration laboratories

ว กรมวิทย พ 2563; 62 (2) : 106 – 113

การประเมินการใช้งานตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้งสำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี

บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ[1] สุภาพร สุภารักษ์[2] สุทธิวัฒน์ ลำใย[2] อัมรา โยวัง[3] และวรางคณา อ่อนทรวง[4]

[1]สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

[2]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

[3]ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย อำเภอเมือง เชียงราย 571000

[4]กองแผนงานและวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ประจำวันมีความสำคัญต่อการรายงานผลการทดสอบการตรวจการติดเชื้อเอชไอวีทางซีโรโลยี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดสอบด้วยชุดตรวจแบบรวดเร็ว (rapid test) จึงได้พัฒนาตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้งที่สะดวกต่อการขนส่งและเก็บรักษาขึ้น และศึกษาการใช้งานตัวอย่างชนิดแห้งเพื่อควบคุมคุณภาพการตรวจในห้องปฏิบัติการเครือข่าย โดยส่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกไปยังห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลชุมชน จำนวน 48 แห่ง เพื่อทำการทดสอบสัปดาห์ละ 1 การทดสอบ เป็นระยะเวลา 4 เดือน จากผลการทดสอบทั้งหมด 1,350 การทดสอบ พบรายงานเป็นบวกและลบ 1,302 (96.44%) และ 48 (3.55%) การทดสอบตามลำดับ แสดงว่าตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้งสามารถนำมาใช้เพื่อช่วยควบคุมคุณภาพการตรวจการติดเชื้อเอชไอวีได้ดี ขณะที่ผลการทดสอบที่ผิดพลาดอาจเกิดจาก วิธีการทดสอบและการอ่านผลการทดสอบ วิธีการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพก่อนใช้งาน รวมทั้งทักษะของผู้ทดสอบ ตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้งจึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งของห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลชุมชนที่สามารถจัดเตรียมใช้งานได้เอง สำหรับการตรวจวิเคราะห์ประจำวันสอดคล้องกับข้อกำหนดมาตรฐานคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

คำสำคัญ: ตัวอย่างชนิดแห้ง, ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ, คุณภาพการตรวจเอชไอวี

Corresponding e mail: busarawan.s@dmsc.mail.go.th

Received: 30 December 2019 *Revised: 5 May 2020* *Accepted: 10 June 2020*

บทนำ

วิสัยทัศน์ “มุ่งสู่เป้าหมายที่เป็นศูนย์” (Getting to Zero) ของยุทธศาสตร์ป้องกันและแก้ไขปัญหาเอดส์แห่งชาติ[1] ที่มีเป้าหมายหลักคือ 1. ไม่มีผู้ติดเชื้อรายใหม่ 2. ไม่มีการตายเนื่องจากเอดส์ และ 3. ไม่มีการตีตราและเลือกปฏิบัติ การตรวจวินิจฉัยที่เกี่ยวข้องมีส่วนสำคัญในการดำเนินการให้บรรลุเป้าประสงค์ วิธีการหนึ่งที่สนับสนุนยุทธศาสตร์ดังกล่าว คือ การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อที่ให้ผลถูกต้องเชื่อถือได้ของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุขทุกระดับของประเทศ

การตรวจการติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ ในโรงพยาบาลชุมชนต่าง ๆ มักนิยมใช้ชุดทดสอบแบบรวดเร็ว (rapid test)[2] เพื่อให้สามารถออกผลได้ภายในวันเดียว ลดระยะเวลาการรอคอย ลดค่าใช้จ่ายเพื่อการกลับมาฟังผลการตรวจ ส่งผลให้ผู้ติดเชื้อสามารถเข้าสู่กระบวนการการให้คำปรึกษา (counseling) เพื่อป้องกัน ควบคุม และเข้าสู่การรักษาได้รวดเร็ว การควบคุมคุณภาพการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ จึงมีความสำคัญต่อความถูกต้องเชื่อถือได้ของผลการตรวจวิเคราะห์ประจำวันของห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบแบบรวดเร็ว (Rapid testing) ซึ่งใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน และดำเนินการทดสอบโดยบุคลากรทางการแพทย์ที่มีประสบการณ์และความเชี่ยวชาญในการอ่านผลน้อย

ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (Internal Quality Control Sample) เป็นเครื่องมือสำคัญที่ห้องปฏิบัติการทดสอบการติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ จำเป็นต้องมีไว้สำหรับการควบคุมคุณภาพของการทดสอบเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด[3] ตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดเหลวซีรั่มหรือพลาสม่า (Liquid specimen) ที่มีจำหน่ายไม่สะดวกในการขนส่งไปยังโรงพยาบาลชุมชนต่าง ๆ เนื่องจากตัวอย่างของเหลวต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นจึงจะสามารถรักษาความคงตัวได้ ทำให้เพิ่มค่าใช้จ่ายในการขนส่ง นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดของโครงสร้างและสิ่งอำนวยความสะดวกของห้องปฏิบัติการเพื่อการจัดเก็บรักษาตัวอย่างควบคุมคุณภาพของโรงพยาบาลชุมชน หรือหน่วยบริการเคลื่อนที่

จากรายงานการศึกษาการใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้ง (Dried tube specimen, DTS) เพื่อการควบคุมคุณภาพการทดสอบการตรวจการติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ และการตรวจหาปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดสำหรับห้องปฏิบัติการของประเทศที่มีทรัพยากรจำกัดนั้น[4,5] แสดงว่าตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้งสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเสริมสร้างศักยภาพและมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ของโรงพยาบาลชุมชน หรือหน่วยบริการเคลื่อนที่ได้ จึงได้ดำเนินการเตรียมตัวอย่างคุณภาพชนิดแห้ง และประเมินผลการใช้งานตัวอย่างควบคุมคุณภาพแบบแห้ง (DTS) สำหรับการทดสอบการติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ โดยชุดทดสอบแบบเร็ว (HIV rapid testing) สำหรับโรงพยาบาลชุมชนหรือเทียบเท่า ของเครือข่ายห้องปฏิบัติการชันสูตรของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย และ เครือข่ายห้องปฏิบัติการชันสูตรของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์

วัสดุและวิธีการ

การรวบรวมข้อมูลชุดตรวจของห้องปฏิบัติการ

จัดทำแบบสอบถาม เพื่อรวบรวมข้อมูลชุดตรวจการติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ ของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั้งภาครัฐและเอกชน ภายใต้เครือข่ายของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ เพื่อเตรียมความพร้อมการเข้าร่วมโครงการนำร่องการใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้ง (DTS)

สำหรับเป็นตัวอย่างควบคุมคุณภาพ

การเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้ง (DTS)

นำตัวอย่างทดสอบความชำนาญของแผนทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการการตรวจเอชไอวีซีโรโลยีแห่งชาติที่ได้จากฝ่ายปฏิบัติการด้านเชื้อถ่ายทอดทางการให้เลือด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประกอบด้วยตัวอย่าง anti-HIV positive และ anti-HIV negative มาเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้ง เพื่อการตรวจที่มีผลเป็นบวก และลบ ตามลำดับ

สำหรับตัวอย่าง anti-HIV Positive นำมาเตรียมเป็น Stock positive sample โดยเจือจางด้วยตัวอย่าง anti-HIV negative แบบ serial two-fold dilution จำนวน 15 dilution จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางทั้งหมดมาทดสอบด้วยชุดตรวจที่ต้องการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพ ทำการอ่านผล แล้วเลือก dilution ที่ความเข้มข้นของปฏิกิริยาเมื่ออ่านด้วยตาเปล่าไม่เกินระดับ 2+ เป็นจุดความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเตรียม Stock positive sample จากนั้นนำ Stock positive sample มาเจือจางด้วยตัวอย่าง anti-HIV negative ให้มีความเข้มข้น 10 เท่าของความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละชุดตรวจเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมคุณภาพบวก แล้วทำการแบ่งตัวอย่างลงในหลอดก้นแหลมขนาด 1.5 ml หลอดละ 20 µl เปิดฝาหลอดทิ้งไว้ในตู้ชีวนิรภัยอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จนตัวอย่างแห้ง ส่วนตัวอย่างควบคุมคุณภาพลบ คือ ตัวอย่าง anti-HIV negative

การศึกษาความคงสภาพ (stability) ของตัวอย่าง DTS

ตัวอย่าง DTS ที่จัดส่งไปยังห้องปฏิบัติการเครือข่าย ได้ถูกนำมาทดสอบที่ฝ่ายปฏิบัติการด้านเชื้อถ่ายทอดทางการให้เลือด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ควบคู่ไปตลอดระยะเวลาศึกษา เพื่อเฝ้าติดตามความคงสภาพของตัวอย่างเมื่อจัดเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ด้วยชุดตรวจที่ห้องปฏิบัติการเครือข่ายใช้ตรวจวินิจฉัย

การประเมินตัวอย่างควบคุมคุณภาพ

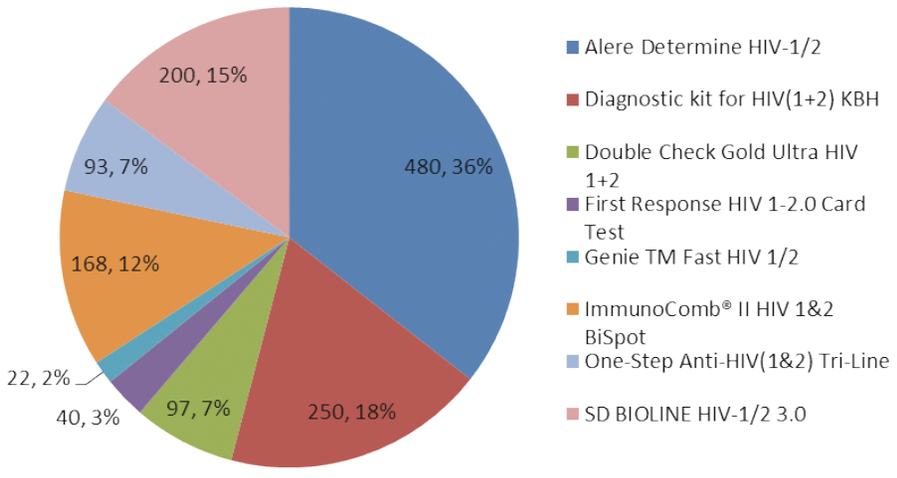
ละลายตัวอย่าง DTS ด้วยสารละลาย PBS Buffer pH 7.2 ปริมาตร 200 µl เขย่าให้ตัวอย่างที่ติดก้นหลอดละลายจนหมด โดยทำการเตรียมใหม่ก่อนใช้งานทุกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 - 30˚C) นานอย่างน้อย 30 นาที แล้วนำไปทำการทดสอบด้วยชุดทดสอบแบบรวดเร็วที่ห้องปฏิบัติการใช้ในงานประจำ โดยทดสอบจำนวน 4 ครั้ง/เดือน เป็นเวลา 4 เดือน โดยแต่ละห้องปฏิบัติการทำการทดสอบอย่างน้อยอาทิตย์ละ 1 ครั้ง แล้วประเมินผลการใช้งานตัวอย่าง DTS โดยผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการต่าง ๆ เปรียบเทียบกับผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการอ้างอิงการตรวจเอชไอวีซีโรโลยีของประเทศ คือ ห้องปฏิบัติการของฝ่ายปฏิบัติการด้านเชื้อถ่ายทอดทางการให้เลือด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ทดสอบด้วยชุดตรวจผลิตภัณฑ์เดียวกัน

ผล

ชุดตรวจวินิจฉัยเอชไอวีแบบรวดเร็วในพื้นที่ทำการศึกษารวม 79 แห่ง จากห้องปฏิบัติการเครือข่ายของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 (เชียงราย) 27 แห่ง และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 (นครสวรรค์) 52 แห่ง ทั้งหมด 8 ชุดตรวจ ซึ่งนำไปใช้เป็นข้อมูลเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้ง (DTS)

จากการดำเนินการส่งตัวอย่าง DTS ที่เป็นตัวอย่างบวกและมีความเข้มข้นจำเพาะในแต่ละชุดตรวจ

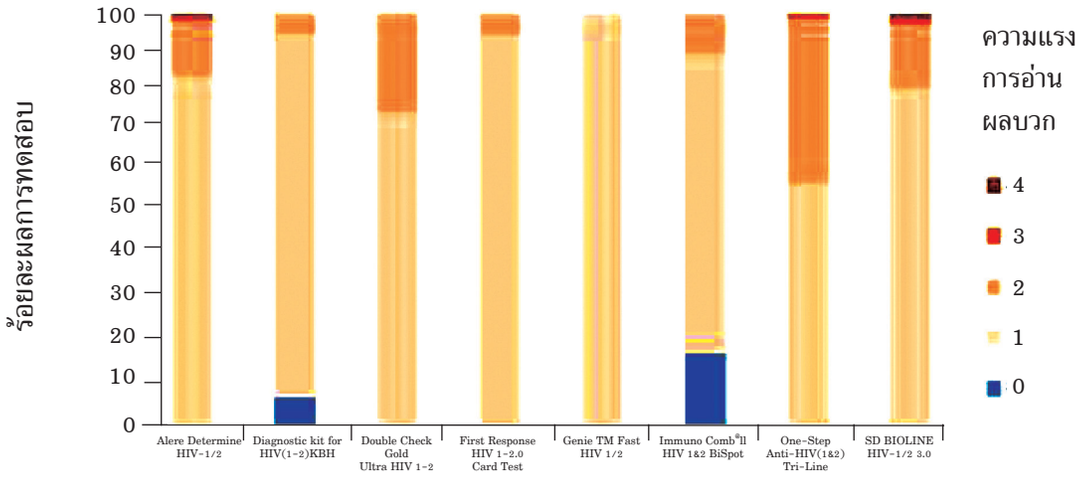
ให้ห้องปฏิบัติการเครือข่ายทำการทดสอบด้วยชุดตรวจประเภทรวดเร็วที่ใช้ตามงานประจำวัน ระหว่างห้องปฏิบัติการรายงานผลประจำเดือนกลับมา จำนวน 48 แห่ง จากการทดสอบด้วยชุดตรวจ 8 ผลิตภัณฑ์ รวมทั้งสิ้น 1,350 ผลการ



ภาพที่ 1 สัดส่วนของจำนวนผลการทดสอบแยกตามชุดตรวจ

ทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 1

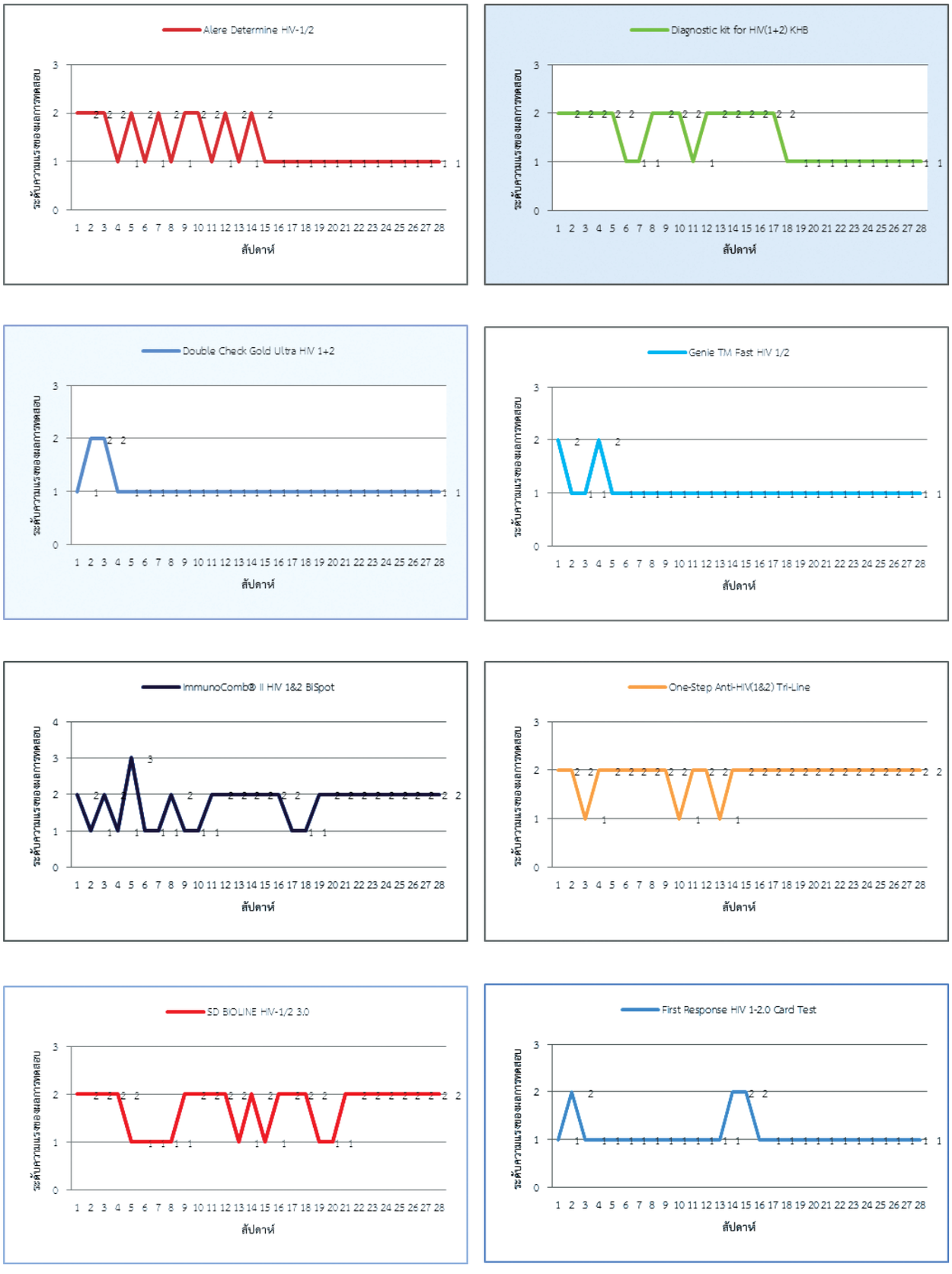
จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบตัวอย่างควบคุมคุณภาพบวก พบผลการทดสอบเป็นบวกด้วยชุดตรวจที่จำเพาะต่อตัวอย่าง จำนวน 96.44% และผลลบ 3.55% โดยพบผลลบของการทดสอบดังกล่าวในชุดตรวจเพียง



ภาพที่ 2 อัตราส่วนของผลการทดสอบในแต่ชุดตรวจที่ทำการศึกษา

2 ผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 2) ทั้งนี้ ผลลบดังกล่าวถูกรายงานมาจากห้องปฏิบัติจำนวน 6 แห่ง

จากการศึกษาความคงสภาพ (Stability) ของตัวอย่าง DTS ที่จัดส่งไปยังห้องปฏิบัติการเครือข่าย ได้ถูกนำมาทดสอบที่ฝ่ายปฏิบัติการด้านเชื้อถ่ายทอดทางการให้เลือด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ควบคู่ไปตลอดระยะเวลาศึกษา เพื่อเฝ้าติดตามความคงสภาพของตัวอย่างเมื่อจัดเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส พบว่าตัวอย่าง



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบความคงตัวของตัวอย่าง DTS ที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

DTS สามารถคงสภาพได้ตลอดระยะเวลา 7 เดือน (28 สัปดาห์) ที่ทำการศึกษาในทุกชุดตรวจ ดังแสดงในภาพที่ 3

วิจารณ์

การประกันคุณภาพการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการนั้น แบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ คือ ระยะก่อนการทดสอบ (pre-anayltical phase) ระยะทดสอบ (analytical phase) และระยะหลังการทดสอบ (post-analytical phase) ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (Quality Control Sample) เป็นสิ่งสำคัญในขั้นตอนการทดสอบ เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นต่อผลการทดสอบในแต่ละวัน หรือแต่ละรอบที่ดำเนินการทดสอบนั้น ๆ

ตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดแห้ง (Dried Tube Specimen: DTS) จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นด้วยเป้าหมายหลักเพื่อใช้ในประเทศที่มีข้อจำกัดทางทรัพยากรเป็นสำคัญ รวมถึงการบริหารจัดการตัวอย่างที่ค่อนข้างลำบากเนื่องจากโครงสร้างพื้นฐานไม่อำนวย[4,5] เป็นที่ทราบกันว่าระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุขของไทย มีความเข้มแข็งและก้าวไกลกว่าหลาย ๆ ประเทศอาเซียน แต่ยังมีข้อจำกัดในการจัดหาตัวอย่างควบคุมคุณภาพทั้งที่เป็นประเภท QC sample และ EQA sample ภายในประเทศ ที่ครอบคลุมการทดสอบที่ให้บริการของห้องปฏิบัติการต่าง ๆ โดยเฉพาะโรงพยาบาลชุมชนที่ปริมาณการทดสอบบางชนิดมีจำนวนตัวอย่างน้อย ไม่คุ้มทุนในการจัดซื้อตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดเหลวที่มีราคาค่อนข้างสูง และไม่สะดวกในการเก็บรักษา

การศึกษานี้ได้นำข้อมูลการเตรียมตัวอย่างชนิดแห้งที่มีการรายงานในต่างประเทศ[2] มาประยุกต์ใช้เพื่อประเมินประสิทธิภาพการใช้ตัวอย่าง DTS ในการตรวจการติดเชื้อเอชไอวีประจำวันของห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลชุมชน ซึ่งนอกจากช่วยให้ห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการทดสอบได้ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์แล้ว ยังมีส่วนช่วยให้เกิดความเชื่อมั่นของรายงานผลการตรวจการติดเชื้อเอชไอวี ส่งผลให้ผู้รับบริการได้รับการปฏิบัติการตามขั้นตอนอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

ผลการทดสอบตัวอย่าง DTS ที่ใช้ตามงานประจำของเครือข่ายห้องปฏิบัติการพบว่าผลการทดสอบมีความสอดคล้องกับค่าของตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่ได้เตรียมขึ้นประมาณร้อยละ 96 แต่ยังพบว่าประมาณร้อยละ 4 ให้ผลไม่สอดคล้องกัน ซึ่งอาจเกิดจากทักษะของผู้ปฏิบัติงานในการดำเนินการทดสอบ วิธีการละลายตัวอย่างก่อนใช้งาน การอ่านผลของผู้ปฏิบัติงานหรือการเก็บรักษาชุดตรวจ และจากการศึกษาความคงตัวของตัวอย่าง DTS ในการศึกษานี้พบว่ามีความสอดคล้องกับที่มีการรายงานไว้[2] แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง DTS เตรียมได้ง่าย ปลอดภัยและสะดวกในการจัดเก็บ จึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลชุมชนนำไปประยุกต์ใช้เพื่อจัดเตรียมตัวอย่างคุณภาพสำหรับการทดสอบอื่น ๆ โดยเฉพาะการตรวจหาแอนติบอดีเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้ออื่น ๆ

สรุป

ตัวอย่าง DTS สามารถนำมาใช้เป็นตัวอย่างเพื่อควบคุมและประกันคุณภาพการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ได้ อย่างไรก็ตามในการใช้งานต้องคำนึงถึงความเข้มข้นของตัวอย่างในระดับที่เหมาะสมกับชุดตรวจ นอกจากนี้ผลการทดสอบที่พบในห้องปฏิบัติการบางแห่งที่เข้าร่วมโครงการ แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนในกระบวนการทดสอบการติดเชื้อเอชไอวีด้วยชุดตรวจประเภทรวดเร็ว ดังนั้นการควบคุมคุณภาพการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีด้วยตัวอย่างควบคุมคุณภาพ เป็นสิ่งสำคัญที่ควรตระหนักเพื่อลดความเสี่ยงในการรายงานผลผิดพลาดอันอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาวะของผู้รับบริการและการถูกตีตราได้ จากความสำคัญในการควบคุมคุณภาพของการรายงานผลตรวจ ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการจึงขอรับการถ่ายทอดการเตรียมตัวอย่าง DTS เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเครือข่ายของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย และห้องปฏิบัติการเครือข่ายของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ที่เข้าร่วมโครงการนี้ และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนการดำเนินการโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย และผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยมุ่งเป้าด้านสุขภาพ และชีวเวชศาสตร์ ประจำปี 2556 จากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส)

เอกสารอ้างอิง

1. คณะกรรมการแห่งชาติว่าด้วยการป้องกันและแก้ไขปัญหาเอดส์. ยุทธศาสตร์แห่งชาติว่าด้วยการยุติปัญหาเอดส์ พ.ศ. 2560 – 2573. กรุงเทพฯ: บริษัท เอ็นซี คอนเซปต์ จำกัด; 2560.
2. Parekh BS, Kalou MB, Alemnji G, Ou CY, Gershy-Damet GM, Nkengasong JN. Scaling up HIV rapid testing in developing countries: comprehensive approach for implementing quality assurance. Am J Clin Pathol 2010; 134(4): 573-84.
3. Constantine NT, Callahan JD, Watts DM. HIV testing & quality control: a guide for laboratory personnel. North Carolina: Family Health International; 1991.
4. Parekh BS, Anyanwu J, Patel H, Downer M, Kalou M, Gichimu C, et al. Dried tube specimens: a simple and cost-effective method for preparation of HIV proficiency testing panels and quality control materials for use in resource-limited settings. J Virol Methods 2010; 163(2): 295-300.
5. Ramos A, Nguyen S, Garcia A, Subbarao S, Nkengasong JN, Ellenberger D. Generation of dried tube specimen for HIV-1 viral load proficiency test panels: a cost-effective alternative for external quality assessment programs. J Virol Methods 2013; 188(1-2): 1-5.

An Evaluation for Use of Dried Tube Specimens as Internal Quality Control Samples for HIV Diagnosis

Busarawan Sriwanthana[1], Supaporn Suparak[2], Suttiwat Lumyai[2], Amara Yowang[3] and Warangkana Oncoung[4]

[1]Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000.

[2]National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000.

[3]Regional Medical Sciences Center 1/1 Chiang Rai, Department of Medical Sciences, Amphoe Muang, Chiang Rai 57100

[4]Division of Planning and Technical Coordination, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000. Thailand

Abstract It has been well-recognized that quality control (QC) samples are essential for routine testing results, particularly HIV serology testing conducted by a rapid test. This study was to evaluate Dried Tube Specimens (DTS) for implementing as QC samples at laboratory networks of RMSC 1/1 Chaing Rai and RMSC 3 Nakhonsawan. DTS were delivered to 48 community hospital laboratories and were tested 1 time a week for 4 months. It was found that 1302 of 1,350 (96.44%) tests and 48 of 1,350 (3.55%) tests were reported positive and negative, respectively. Our study suggested that it is possible to use DTS as QC samples for HIV rapid testing. HIV misclassification might possibly be due to testing procedure, reading test results or competency of technicians. Owing to its ease of preparation and storage, DTS are alternative tools for community hospital laboratories to use as quality control materials as a requirement for routine testing in compliance with medical laboratory standards.

Keywords: Dried tube specimen, Quality control sample, HIV quality control

ว กรมวิทย พ 2563; 62 (2) : 114 - 122

ความชุกของแอนติบอดีที่พบไม่บ่อยในหญิงคลอดบุตรของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

เปรมจิต ทั่งตระกูล[1] ดารินต์ณัฏ บัวทอง[2] ทนงศักดิ์ ยีละ[1] และธีรกมล เพ็งสกุล[2]

[1]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ สงขลา 90110

[2]คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ สงขลา 90110

บทคัดย่อ การจัดหาเลือดที่ปลอดภัย ต้องจัดหาเลือดที่ไม่มีแอนติเจนต่อแอนติบอดีที่มีในผู้ป่วย การตรวจหมู่เลือดระบบ ABO, Rh D, การตรวจกรองแอนติบอดีและการแยกชนิดแอนติบอดีในผู้ป่วยมีความสำคัญในการเตรียมเลือด จึงได้ทำการศึกษาเพื่อตรวจหาความชุกของแอนติบอดีที่พบไม่บ่อยนอกเหนือจากหมู่เลือดระบบ ABO ในหญิงคลอดบุตรที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ระหว่างเดือนมกราคม 2556 ถึง ตุลาคม 2561 จำนวน 19,450 ราย พบผลการตรวจกรองแอนติบอดีที่พบไม่บ่อยจำนวน 244 ราย (ร้อยละ 1.3) โดยช่วงอายุที่พบมากสุดอยู่ระหว่าง 26-30 ปี ในกลุ่มนี้หมู่เลือดในระบบ ABO ที่พบมาก คือ หมู่เลือด O (ร้อยละ 34.0) และร้อยละ 9.4 เป็น Rh D ลบ สำหรับแอนติบอดีที่พบไม่บ่อยที่พบมากสุด ชนิด IgM คือ anti-Lewis (anti-Le^a, anti-Le^b และ anti-Le^{a+b}) ร้อยละ 32.4, และ ชนิด IgG คือ anti-E ร้อยละ 15.2 ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการตรวจกรองแอนติบอดีเป็นบวก ซึ่งมีทั้งแอนติบอดีชนิด IgG และ IgM ทำให้แพทย์สามารถเฝ้าระวังภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในทารกแรกเกิด ซึ่งจะทำให้มีการวางแผนการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

คำสำคัญ การตรวจกรองแอนติบอดี, เอบีโอ, อาร์เอช ดี, แอนติบอดีที่พบไม่บ่อย

Corresponding E-mail: theerakamol.p @psu.ac.th

Received: 19 March 2019 *Revised: 9 August 2019* *Accepted: 11 June 2020*

บทนำ

แอนติบอดีต่อหมู่เลือดบนเม็ดเลือดแดงประกอบด้วย expected antibody ได้แก่ anti-A, anti-B และ anti- A,B ส่วน unexpected antibody ได้แก่ แอนติบอดีของหมู่เลือดชนิดอื่นๆ ที่นอกจากระบบ ABO ซึ่งมีทั้งชนิด IgG และ IgM ความสำคัญทางคลินิกของแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง ขึ้นกับการทำให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลายมากหรือน้อยเพียงใด หรือทำให้เกิดปฏิกิริยาเม็ดเลือดแดงแตกในทารก ที่มีหมู่เลือดระหว่างแม่กับลูกเข้ากันไม่ได้ (hemolytic disease of the fetus and newborn, HDFN) รวมทั้งทำให้ผู้ที่รับเลือดเกิดปฏิกิริยาจากการรับเลือด (hemolytic transfusion reaction, HTR)[1]

หมู่เลือดระบบ Rh D จะแตกต่างจากระบบ ABO คือ คนที่มี Rh D ลบ จะไม่เกิดแอนติบอดีขึ้นเอง แต่จะเกิดจากการกระตุ้นโดยเม็ดเลือดแดงของคนอื่น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชนิด IgG ในคนที่เป็น Rh D ลบ จะไม่มีทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี D แต่เมื่อได้รับเลือด Rh D บวก หรือในกรณีตั้งครรภ์ที่มีลูก Rh D บวก บุคคลนั้นจะได้รับการกระตุ้นแล้วสร้างแอนติบอดีขึ้น ซึ่งแอนติบอดีนี้สามารถตรึง Complement ได้ แต่ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ Complement เนื่องจากแอนติเจนอยู่ห่างกันจึงไม่มีการแตกทำลายเม็ดเลือดแดงภายในเส้นเลือด แต่จะเกิด extra vascular hemolysis ได้ใน 80% ของคนที่ Rh D ลบ จะสร้าง anti-D เมื่อได้รับเลือด Rh D บวก เพียง 10 มิลลิลิตร[1,2,3] ดังนั้น ในการให้เลือดนอกจากพิจารณาหมู่เลือด ABO แล้ว ยังต้องคำนึงถึงระบบ Rh ด้วย ถ้าลูกคนแรกเป็น Rh D บวก จะกระตุ้นแม่ที่ Rh D ลบ ให้สร้างแอนติบอดี ซึ่งทำให้ลูกคนที่ 2 จะเกิด HDFN จากแอนติบอดีชนิด IgG ที่ผ่านรกมา นอกจากนี้แอนติบอดีชนิดอื่นๆ ในระบบ Rh ได้แก่ Anti-c, anti-C, anti-e, anti-E เป็นสาเหตุการเกิดทั้ง HTR และ HDFN ได้ สามารถป้องกันการเกิด HDFN โดยการฉีด Rh immune globulin ให้แม่หลังคลอดภายใน 72 ชั่วโมง ซึ่งจะป้องกันได้เฉพาะ anti-D เท่านั้น[4]

แอนติบอดีของหมู่เลือด นอกจากจะเกิดขึ้นจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนแปลกปลอมที่ได้รับ ได้แก่ การรับเลือด การตั้งครรภ์ หรือการได้รับสารที่มีโครงสร้างคล้ายแอนติเจนหมู่เลือดแล้ว ยังกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีชนิดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (natural occurring antibody) ซึ่งได้แก่แอนติบอดีหมู่เลือดระบบ Lewis (anti-Le^a, anti-Le^b) ภาวะการตั้งครรภ์สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของหมู่เลือดอื่นๆ ที่มีความสำคัญทางคลินิกที่ไม่ใช่หมู่เลือดระบบ ABO โดยได้มีการศึกษาพบว่า เม็ดเลือดแดงของทารกจำนวนเล็กน้อยมีโอกาสที่จะหลุดลอดเข้าสู่กระแสเลือดของแม่ได้ในระหว่างการตั้งครรภ์หรือทันทีภายหลังการคลอดได้ถึงร้อยละ 75[5] โดยเม็ดเลือดแดงของทารกในครรภ์ที่ไหลเข้าสู่กระแสเลือดของมารดาจะมีแอนติเจนของระบบหมู่เลือดแปลกปลอม ที่ได้รับการถ่ายทอดพันธุกรรมจากพ่อและกระตุ้นให้ร่างกายแม่สร้างแอนติบอดีได้[1] และหากแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นนั้นเป็นชนิด IgG ได้แก่ แอนติบอดีของระบบ Rh, Kidd และ Duffy จะสามารถผ่านรกและก่อให้เกิดภาวะ HDN สามารถทำให้เกิดการเสียชีวิตของทารกได้ การตรวจหมู่เลือด ABO, Rh D และการตรวจกรองแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญในการเตรียมเลือดให้แก่ผู้ป่วย กรณีที่มีการตรวจพบแอนติบอดีของหมู่เลือดที่มีความสำคัญทางคลินิก ต้องเลือกเลือดของผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจนชนิดนั้นมาเตรียมให้กับผู้ป่วย ความสำคัญทางคลินิกของแอนติบอดีขึ้นกับความสามารถในการทำให้เกิด HTR หรือ HDFN ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้มักทำปฏิกิริยาที่ 37°C และสามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี indirect antiglobulin test (IAT)[6,7,8] หน่วยคลังเลือดและเวชศาสตร์บริการโลหิต โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ได้ทำการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO, Rh D

การตรวจกรองแอนติบอดีและตรวจแยกชนิดของแอนติบอดี โดยใช้เทคนิค saline ร่วมกับเทคนิคเอนไซม์ และใช้เทคนิค column agglutination ด้วย Low ionic strength solution (LISS/gel test) ในหญิงคลอดบุตร การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกในการตรวจพบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก เพื่อเป็นการป้องกันและติดตามความเสี่ยงของภาวะ HDFN ที่อาจเกิดขึ้น

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างทดสอบ เก็บตัวอย่างเลือดชนิด EDTA blood ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร จากหญิงคลอดบุตรที่มีการขอใช้เลือดที่หน่วยคลังเลือดและเวชศาสตร์บริการโลหิต โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ระหว่างเดือน มกราคม 2556 ถึง ตุลาคม 2561 จำนวน 19,450 ราย แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 3400 rpm นาน 5 นาที แล้วแยกพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดแดง

การศึกษานี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ สำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมของ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตามหมายเลขสำคัญโครงการ REC 59-005-19-2

การตรวจหมู่เลือดระบบ ABO และ Rh D

ABO cell grouping ใช้เซลล์ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1% ใน Gel LISS solution จำนวน 50 ไมโครลิตร ตรวจวิเคราะห์และแปลผลการทดสอบ ด้วย ID-Card ชนิด DG Gel Specific Card ที่มี anti-A, anti-B (Ortho-Clinical Diagnostic, Inc., Johnson & Johnson company, USA)

Rh D typing ใช้เซลล์ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1% ใน Gel LISS solution จำนวน 50 ไมโครลิตร ตรวจวิเคราะห์และแปลผลการทดสอบ ด้วย ID-Card ชนิด DG Gel Specific Card ที่มี anti-D (Ortho-Clinical Diagnostic, Inc., Johnson & Johnson company, USA) หากให้ผลลบทำการตรวจยืนยันด้วยวิธีหลอดทดลอง โดยใช้เซลล์ตัวอย่าง ทำปฏิกิริยากับ anti-D ที่อุณหภูมิห้อง (25˚C), 37˚C และ antiglobulin phase[6]

ABO serum grouping ใช้เซลล์มาตรฐาน A cell และ B cell ที่ความเข้มข้น 1% ใน Gel LISS solution จำนวน 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับพลาสมาของตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร ตรวจวิเคราะห์และแปลผลการทดสอบ ด้วย ID-Card ชนิด DG Gel Neutral Card ใช้เซลล์สำเร็จรูป ประกอบด้วย A cell และ B cell (Ortho-Clinical Diagnostic, Inc., Johnson & Johnson company, USA)

การตรวจกรองแอนติบอดี

ใช้ LISS/gel test ทดสอบด้วยเครื่องอัตโนมัติใช้ Coombs gel card, screening cell O1, O2 (0.8% Gel LISS solution) (Ortho-Clinical Diagnostic, Inc., Johnson & Johnson company, USA) และ O3 มีแอนติเจน Mi^a และ Di^a (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) ทดสอบตามวิธีที่ระบุในเอกสารเครื่อง กล่าวคือใช้พลาสมาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ screening cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (˚C) นาน 15 นาที ปั่นอ่านผลดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

การตรวจหาชนิดแอนติบอดี (antibody identification)

ตรวจหาชนิดแอนติบอดีด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานเทคนิค multiple phase saline antiglobulin test ในตัวอย่างที่การตรวจกรองแอนติบอดีให้ผลบวก multiple phase saline antiglobulin test ประกอบด้วยขั้นตอนอุณหภูมิห้อง (25°C), 37°C และ antiglobulin phase ทดสอบโดยหยดซีรัมลงในหลอดทดลองขนาด 12 × 75 มิลลิเมตร จำนวน 11 หลอด ๆ ละ 2 หยด เติม 3% panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติจำนวน 1 หยด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นอ่านผล 15 วินาที ที่ความเร็วรอบ 3,400 rpm เพื่อดูการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีชนิด IgM นำไป อุ่นที่อุณหภูมิ 37°C 30 นาที ปั่นอ่านผล 15 วินาที ที่ความเร็วรอบ 3,400 rpm แล้วนำไปล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.85% normal saline ครั้งสุดท้ายซับให้แห้ง แล้วหยดน้ำยา antihuman globulin 2 หยด ปั่นอ่านผล 15 วินาที ที่ความเร็วรอบ 3,400 rpm ถ้าให้ผลลบนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อยืนยันอีกครั้ง ควบคุมคุณภาพการทดสอบด้วยการหยดน้ำยา Coombs control cell (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) ในหลอดทดลองที่ให้ผลลบ

การตรวจยืนยันความถูกต้องของชนิดแอนติบอดีที่พบไม่บ่อย

การตรวจยืนยันเพื่อการพิสูจน์ชนิดของแอนติบอดีหรือเพื่อพิจารณาดูความเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีชนิดใดบ้าง โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ดังนี้

1. Red cell typing โดยใช้น้ำยาแอนติบอดีที่ทราบชนิดมาทดสอบกับเซลล์ของผู้ป่วย เช่น ถ้าตรวจพบ anti-E จึงนำเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยมาตรวจหาแอนติเจน E โดยให้ทำปฏิกิริยากับน้ำยา anti-E ด้วยเทคนิค multiple phase saline antiglobulin test และควรได้ผลเป็นลบ เป็นต้น น้ำยาที่ใช้ได้แก่ anti-E, anti-c, anti-Mi^a, anti-M (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) และน้ำยา anti-e, anti-C, anti-Jk^a (Boiclone, Ortho-clinical diagnostic, USA)

2. หากตรวจพบแอนติบอดีมากกว่าหนึ่งชนิด ใช้เซลล์ที่ทราบแอนติเจนของหมู่เลือด (extra cell) มาทดสอบเพื่อแยกชนิดของแอนติบอดี เช่น ตรวจพบ anti-E ร่วมกับ anti-c ใช้ extra cell ที่แอนติเจน E บวก c ลบ และแอนติเจน E ลบ c บวก มาทดสอบกับผู้ป่วย ได้ผลบวก และทดสอบกับ extra cell ที่แอนติเจน E ลบ c ลบ ได้ผลลบ จึงยืนยันว่าผู้ป่วยมีแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด เป็นต้น

3. ใช้เทคนิคเอนไซม์ เพื่อช่วยแยกชนิดแอนติบอดี ในกลุ่มหมู่เลือดที่เอนไซม์สามารถเพิ่มในการทำปฏิกิริยา (enhance) และยับยั้งในการทำปฏิกิริยา (inhibit) เช่น สงสัยว่าผู้ป่วยมี anti-M ร่วมกับ anti-Le^a เมื่อแยกชนิดแอนติบอดีด้วยเทคนิคเอนไซม์ พบว่าหลอดทดสอบที่แสดงผลเป็น anti-M ให้ผลของปฏิกิริยาลดลงหรือเป็นลบ เนื่องจากเอนไซม์ยับยั้งปฏิกิริยาของ anti-M ในขณะที่หลอดทดสอบที่แสดงผลเป็น anti-Le^a ให้ผลของปฏิกิริยาแรงขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ส่งเสริมปฏิกิริยาของ anti- Le^a เป็นต้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

คำนวณความชุก (prevalence) ของหมู่เลือดระบบ ABO, Rh D, ผลการตรวจกรองแอนติบอดีเป็นบวกและชนิดของแอนติบอดีที่พบไม่บ่อยในหญิงคลอด เป็นร้อยละ

ผล

หญิงที่มาคลอดที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวน 19,450 ราย พบ unexpected antibody จำนวน 244 ราย (ร้อยละ 1.3) และช่วงอายุที่พบมากสุดอยู่ระหว่าง 26-30 ปี เมื่อวิเคราะห์หมู่เลือดในระบบ ABO ของกลุ่มที่ตรวจพบ unexpected antibody หมู่เลือดที่พบมากตามลำดับ คือ หมู่ O, B, A และ AB คิดเป็นร้อยละ 34.0, 29.9, 24.2 และ 11.9 ตามลำดับ ขณะที่ผลการตรวจวิเคราะห์หมู่เลือดระบบ Rh D พบว่าเป็น Rh D บวก 221 ราย (ร้อยละ 90.6) และ Rh D ลบ 23 ราย (ร้อยละ 9.4) ดังตารางที่ 1

สำหรับ unexpected antibody นั้น จากการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีพบว่าแอนติบอดีที่เป็น IgG ที่มีความสำคัญทางคลินิกที่พบมากสุด ได้แก่ anti-E 37 ราย (ร้อยละ 15.1) รองลงมา anti-c 10 ราย (ร้อยละ 4.1) และ anti-C 6 ราย (ร้อยละ 2.5) พบ anti-e, anti-Jk^a และ anti-Fy^b อย่างละ 2 ราย (ร้อยละ 0.8), ส่วน anti- Jk^b, anti-Fy^a, anti-Di^a และ anti-K พบอย่างละ 1 ราย (ร้อยละ 0.4) จากการศึกษานี้ยังพบแอนติบอดีชนิดอื่นๆ ที่เป็น IgM ได้แก่ anti-Lewis (anti-Le^a, anti-Le^b และ anti-Le^{a+b}) 79 ราย (ร้อยละ 32.5), anti-Mi^a 65 ราย (ร้อยละ 26.7), anti-P1 7 ราย (ร้อยละ 2.9), anti-M 4 ราย (ร้อยละ 1.6), anti-N 1 ราย (ร้อยละ 0.4), anti-HI 1 ราย (ร้อยละ 0.4) และที่ไม่สามารถระบุชนิดแอนติบอดีได้ (unidentified) 24 ราย (ร้อยละ 9.9) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 หมู่เลือดระบบ ABO และ Rh ในหญิงคลอดที่ตรวจพบ unexpected antibody

หมู่เลือด	จำนวน	ร้อยละ
ABO		
A	59	24.2
B	73	29.9
O	83	34.0
AB	29	11.9
Rh D		
Rh positive	221	90.6
Rh negative	23	9.4

ตารางที่ 2 ชนิดและความถี่ของ unexpected antibodies

Antibody	ABO Group				Total
	A	B	O	AB	ราย (%)
C	1	2	2	1	6 (2.5)
c	2	2	2	4	10 (4.1)
E	7	8	19	3	37 (15.1)
e	0	0	2	0	2 (0.8)
Mi^a	14	25	19	7	65 (26.7)
M	0	1	3	0	4 (1.6)
N	1	0	0	0	1 (0.4)
Jk^a	0	1	1	0	2 (0.8)
Jk^b	0	1	0	0	1 (0.4)
Fy^a	0	0	1	0	1 (0.4)
Fy^b	0	0	2	0	2 (0.8)
Di^a	0	1	0	0	1 (0.4)
P1	3	2	1	1	7 (2.9)
Lewis	21	23	25	10	79 (32.4)
HI	1	0	0	0	1 (0.4)
K	1	0	0	0	1 (0.4)
Unidentified	8	7	6	3	24 (9.9)
Total	59 (24.2%)	73 (29.9%)	83 (34.0%)	29 (11.9%)	244 (100.0)

วิจารณ์

การจัดหาเลือดที่ปลอดภัยให้กับผู้ป่วยหรือหญิงคลอดบุตร นอกจากความเข้ากันได้ของระบบ ABO แล้ว หากผู้ป่วยมีการตรวจพบแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงหมู่เลือดอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากระบบ ABO มีความจำเป็นที่จะต้องจัดหาเลือดที่ไม่มีแอนติเจนต่อแอนติบอดีชนิดนั้น ๆ ให้แก่ผู้ป่วย ดังนั้นการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO, Rh D, การตรวจกรองแอนติบอดี และการแยกชนิดแอนติบอดี ในผู้ป่วยจึงมีความสำคัญ ในการเตรียมเลือดที่ปลอดภัยให้แก่ผู้ป่วย[5]

การศึกษานี้ได้ตรวจหมู่เลือด ABO, Rh D, การตรวจกรองแอนติบอดี และการแยกชนิดแอนติบอดีของหญิงคลอดที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ระหว่าง เดือน มกราคม 2556 ถึง ตุลาคม 2561 จำนวนทั้งสิ้น 19,450 ราย ซึ่งพบ unexpected antibody จำนวน 244 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.2 เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาจากงานวิจัยในกลุ่มตัวอย่างหญิงตั้งครรภ์ในยุโรป พบ unexpected antibody ประมาณร้อยละ 8.2 ของหญิงตั้งครรภ์ทั้งหมด ซึ่งมากกว่าการศึกษาในครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากสถิติของโลหิตหมู่ Rh ลบของประชากรไทยน้อยกว่าประชากรในแถบประเทศยุโรปมาก จึงทำให้ร้อยละของการเกิดการกระตุ้นรวมในหมู่โลหิตระบบ Rh D น้อยกว่า[9] ในการศึกษานี้ช่วงอายุที่พบการตรวจกรองแอนติบอดีมากที่สุดอยู่ระหว่าง 26–30 ปี จำนวน 65 ราย (26.7%) อาจเนื่องจากอยู่ในช่วงที่เป็นวัยเจริญพันธุ์ หรือมีแนวโน้มว่าผู้หญิงจะแต่งงานและมีบุตรเมื่ออายุมากขึ้น และจากผลการตรวจวิเคราะห์หมู่เลือด

ระบบ Rh D พบว่าเป็น Rh D บวก 221 ราย (90.6%) และ Rh D ลบ 23 ราย (9.5%) ซึ่งหญิงฝากครรภ์ที่มีผล Rh D ลบ จะได้รับการฉีด Rhesus Immunoglobulin products (RhIG) หรือ Anti-D immunoglobulin เมื่ออายุครรภ์ที่ประมาณ 28 สัปดาห์ หรือจะฉีด RhIG ให้แม่หลังคลอดภายใน 72 ชั่วโมง ซึ่งจะป้องกันได้เฉพาะ anti-D เท่านั้น[10] ภาวะการเกิดการแตกทำลายเม็ดเลือดแดงของทารกในครรภ์อันเนื่องจากแอนติบอดีที่เป็น IgG ซึ่งมีความสำคัญทางคลินิก และจากการติดตามมี 1 ราย ที่แม่มีหมู่เลือด O Rh D บวก พบว่าแม่มีการสร้าง anti-E จากการสืบค้นประวัติ ไม่เคยตั้งครรภ์และไม่เคยรับเลือดมาก่อน ดังนั้นแอนติบอดีที่สร้างขึ้นน่าจะเกิดจากการกระตุ้นของการตั้งครรภ์ปัจจุบัน ซึ่งในรายนี้ไม่ได้มีการฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ลูกที่คลอดมีภาวะ HDFN และจากการทดสอบเลือดลูกพบว่าเป็น anti-E ซึ่งแพทย์ได้ทำการเปลี่ยนถ่ายเลือดให้กับทารกรายนี้เป็นที่ปลอดภัย

มีรายงานผู้ป่วยที่เกิดปัญหา acute hemolytic transfusion reaction จาก anti- Le^a ซึ่งทำปฏิกิริยาที่ 37˚C ดังนั้นการพบแอนติบอดี ระบบ Lewis ในหญิงตั้งครรภ์สามารถทำให้เด็กเกิดภาวะ HDFN ได้แต่พบได้น้อย[11] และรายงานการศึกษาในไต้หวันพบว่า anti-Mi^a เป็นแอนติบอดีที่เป็นสาเหตุของภาวะ Intravascular hemolytic transfusion reaction และ HDFN ที่พบบ่อยที่สุด แต่เป็นหมู่โลหิตที่พบน้อยมากในแถบยุโรป[12] ส่วนในคนไทย เนื่องจากแอนติเจนที่พบส่วนใหญ่เป็น Mi (a-) ดังนั้นโอกาสการสร้าง anti-Mi^a จึงมีโอกาสสูง ถึงแม้ว่าแอนติบอดีชนิด IgM จะมีความสำคัญทางคลินิกน้อยกว่า IgG แต่ถ้าเกิดปฏิกิริยาที่ 37˚C และ/หรือ indirect antiglobulin test (IAT) อาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนจากการรับโลหิตได้

สรุป

การศึกษานี้ทำให้ทราบถึงการกระจายตัวของการตรวจพบแอนติบอดีที่พบไม่บ่อยของหมู่เลือดระบบอื่น ๆ ที่ไม่ใช่หมู่เลือดระบบ ABO (unexpected antibody) ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ซึ่งการบ่งชี้แอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นระหว่างการตั้งครรภ์ชนิด IgG ก็จะมีประโยชน์ต่อแพทย์ในการวินิจฉัยและติดตามภาวะการเกิด HDFN ทำให้แพทย์สามารถวางแผนการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อความแข็งแรงและสมบูรณ์ทั้งของมารดาและทารกต่อไป นอกจากนี้ยังเก็บเป็นฐานข้อมูลของมารดาเพื่อเป็นการเฝ้าระวังในครั้งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภททุนพัฒนานักวิจัยประเภทที่ 1 ประจำปีงบประมาณ 2560 สัญญาเลขที่ MET 601273S-0 และขอขอบคุณบุคลากรของหน่วยคลังเลือดและเวชศาสตร์บริการโลหิต โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ที่มีส่วนร่วมในการเก็บข้อมูลอันเป็นประโยชน์ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Suresh B, Babu KVS, Arun R, Jothibai DS, Bharathi T. Prevalence “unexpected antibodies” in the antenatal women attending the Government Maternity Hospital, Tirupati. J Clin Sci Res 2015; 4(1): 22-30.
2. ปราณี พิสัยพงศ์, ลัดดา ฟองสถิตกุล, พันธนา ชัยนวล, นวลชื่น คำทอน. ชนิดและความถี่ของการตรวจพบแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงในประชากรภาคเหนือ. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2546; 13(3): 254.

3. ดารินต์ณัฏ บัวทอง, สรัญญา หัสรินทร์. การตรวจหาแอนติเจนหมู่โลหิตย่อยที่มีความสำคัญทางคลินิกของผู้บริจาคโลหิตในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์. สงขลานครินทร์เวชสาร 2559; 34(3): 109-118.
4. Bowman JM. Controversies in Rh prophylaxis. Who needs Rh immune globulin and when should it be given?. Am J Obstet Gynecol 1985; 151(3): 289-94.
5. Promwong C. Clinical and laboratory experience in Songklanagarind University Hospital. In: The national conference on transfusion medicine 2003. Bangkok: The Thai Red Cross Society; 2003.
6. ศจิกา ปลั่งกลาง, ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ. แอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิตซึ่งตรวจด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานและวิธีเจล: การศึกษาเพื่อความปลอดภัยของโลหิตบริจาค. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2557; 24(1): 17-23.
7. Shanwell A, Sallander S, Bremme K, Westgren M. Clinical evaluation of a solid-phase test for red cell antibody screening of pregnant women. Tranfusion 1999; 39(1): 26-31.
8. จริยา สายพิณ. เทคนิคการตรวจแอนติบอดีของหมู่โลหิต. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2546; 13(3): 225-31.
9. อรรถพงษ์ สินกิจจาทรัพย์, วิชา สุระกมลเลิศ, พิตตินันท์ จันตา. การศึกษาความชุกของการตรวจพบแอนติบอดีต่อหมู่เลือดระบบอื่น ๆ ที่ไม่ใช่หมู่เลือดในระบบเอบีโอ ในหญิงฝากครรภ์ของโรงพยาบาลตากสิน. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2554; 21(3): 153-8.
10. Lee CK, Ma ESK, Tang M, Lam CCK, Lin CK, Chan LC. Prevalence and specificity of clinically significant red cell alloantibodies in Chinese women during pregnancy-a review of case from 1997 to 2001. Transfus Med 2003; 13(4): 227-31.
11. Thaktal B, Jain A, Saluja K, Sharma RR, Singh TS, Marwaha N. Acute hemolytic transfusion reaction by Lea alloantibody. Am J Hematol 2006; 81(10): 807-8.
12. Wu KH, Chu SL, Chang JG, Shih MC, Peng CT. Haemolytic disease of the newborn due to maternal irregular antibodies in the Chinese population in Taiwan. Transfus Med 2003; 13(5): 311-4.

Prevalence of Unexpected Maternal Antibodies at Delivery in Songklanagarind Hospital

Premchit Thangtrakul[1] Darinnat Buathong[2] Tanongsak Yeela[1], and Theerakamol Pengsakul[2]

[1]*Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat yai, Songkhla, 90110,*

[2]*Faculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Hat yai, Songkhla, 90110, Thailand*

Abstract Provision of antigen and antibody compatible blood is important for blood transfusion leading to safety of a recipient. Blood group testing, antibody screening and antibody identification are essential to conduct for safety of blood supply. The aim of this study was to investigate prevalence of unexpected maternal antibodies at delivery in Songklanagarind Hospital. A total of 19,450 individuals at delivery were recruited between January 2013 to October 2018. We found unexpected antibodies from antibody screening test in 224 patients (1.3%) with the most common age was between 26-30 years. Of these 224 patients, a majority of ABO blood group found was group O at a percentage of 34 and about 9.5% was Rh D negative (Rh D-). Furthermore, the most common IgM and IgG unexpected antibodies were anti-Lewis IgM (anti-Le^a, anti-Le^b and anti-Le^a+b) and anti-E IgG at the percentages of 32.4 and 15.2, respectively. Our study indicated that positive antibody screening both IgG and IgM at delivery could help clinicians in monitoring hemolytic disease of the fetus and newborn, resulting in effectiveness of treatment planning.

Keywords: Antibody screening, ABO, Rh D, unexpected antibody

ว กรมวิทย พ 2563; 62 (2) : 123 - 132

เทโลเมียร์/เทโลเมอเรส เพื่อสุขภาพ

ตรีทิพย์ รัตนวรชัย

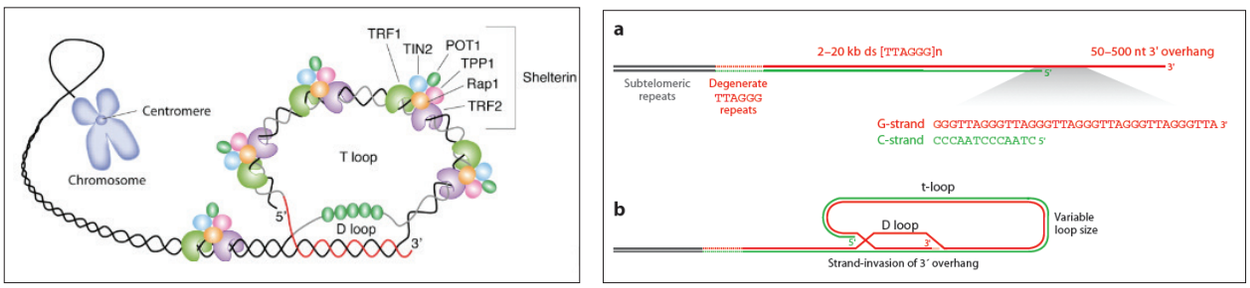
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

เทโลเมียร์

สัตว์ชั้นสูง (eukaryotic cells) มีดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่ประกอบด้วยโพลีนิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวมีลักษณะเป็นเส้นตรง (linear double-stranded DNA) มีส่วนปลายสองด้านที่เรียกว่าเทโลเมียร์ ส่วนสัตว์ชั้นต่ำ (prokaryotic cells) เช่น แบคทีเรีย ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวเชื่อมต่อกันเป็นวงกลม (circular double-stranded DNA) จึงไม่มีปลายเทโลเมียร์ ซึ่งปลายเทโลเมียร์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงนี้ มีลักษณะเฉพาะที่คล้ายกันไม่ว่าจะเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใด คือจะประกอบด้วยโพลีนิวคลีโอไทด์สองสาย สายหนึ่งจะมีลำดับเบสจากปลาย 5′ ไปยังปลาย 3′ อีกสายหนึ่งจะมีลำดับเบสอยู่ในทิศทางตรงข้าม (antiparallel) จากปลาย 3′ ไปยังปลาย 5′ สายที่ลำดับเบสเรียงจาก 5′ ไป 3′ นั้นจะมีชุดของลำดับเบสที่มีคู่เบส GT อยู่มาก มีความยาวประมาณ 6-8 คู่เบส อยู่เป็นชุด ๆ ต่อเนื่องกัน (tandem GT-rich repeats) ชุดลำดับเบสของโปรโตซัวเตตระไฮมีนา เทอร์โมไฟล์ *(Tetrahymena thermophile)* คือ 5′-TTGGGG-3′ ของยีสต์แซคคาโรไมเซทิส ซีรีวิสิเอ *(Saccharomyces cerevisiae)* คือ 5′-TGGG-3′ และของมนุษย์ คือ 5′-TTAGGG-3′ สำหรับเทโลเมียร์ของมนุษย์ มีชุดลำดับเบสนี้ยาวประมาณ 300-8,000 ชุด (2-20 กิโลเบส) มีปลาย 3′ ยื่นยาวออกมาประมาณ 50-500 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 1) บริเวณปลายเทโลเมียร์จะมีการม้วนเป็นวงเพื่อเก็บส่วนปลายไว้ภายในปลาย 3′ เก็บในรูป Displacement loop (D-loop) ซ้อนอยู่ในวงใหญ่ของปลาย 5′ ที่ม้วนเก็บในรูป Telomere-loop (T-loop) และมีกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่าเชลเทอริน (Shelterin) ที่มีองค์ประกอบย่อยเป็นโปรตีนหลายชนิดมารวมกันเข้ามาเกาะตลอดปลายสายดีเอ็นเอ ลักษณะที่มีโปรตีนหุ้มนี้ช่วยป้องกันอันตรายจากการย่อยสลายปลายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์เอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) ซึ่งจะเข้ามากำจัดปลายดีเอ็นเอสายคู่ที่มีการฉีกขาด (double-stranded DNA breaks)

Corresponding author E-mail: treetip2000@gmail.com

Received: 7 October 2019 *Revised: 4 February 2020* *Accepted: 1 June 2020*



ภาพที่ 1 ลักษณะของปลายเทโลเมียร์ที่มีการม้วนเก็บปลายในรูป D-loop และ T-loop
ที่มา (https://nhsjs.com/2016/role-of-telomeres-in-aging/ login 6/10/2562

ประวัติการศึกษาเทโลเมียร์/เทโลมอเรส

ในปี คศ 1926 Professor Dr. Hermann J. Muller นักพันธุศาสตร์ชาวอเมริกันของมหาวิทยาลัยโคลัมเบีย ได้ศึกษาและตั้งสมมุติฐานว่าส่วนปลายโครโมโซมมีความสำคัญในการปกป้องเซลล์ โดยศึกษาการกลายพันธุ์ของแมลงหวี่ *(Drosophila melanogaster)* พบว่าเมื่อให้แมลงหวี่รับรังสีเอกซ์ ซึ่งโดยทั่วไปจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของสายดีเอ็นเอด้วยการทำให้ดีเอ็นเอเกิดการแตกหักและมีการเชื่อมต่อที่ผิดพลาด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ นำไปสู่การเกิดกลายพันธุ์ แต่ผลงานวิจัยพบว่าบริเวณปลายของโครโมโซมนั้นจะไม่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น เป็นที่มาของการเรียกส่วนนี้ว่าปลายเทโลเมียร์และคาดว่าต้องเป็นส่วนปกป้องอันตรายให้กับสายดีเอ็นเอได้ (Professor Dr. Hermann J. Muller ได้รับรางวัลโนเบลด้านสรีรวิทยาหรือการแพทย์ ปี คศ 1946)[1]

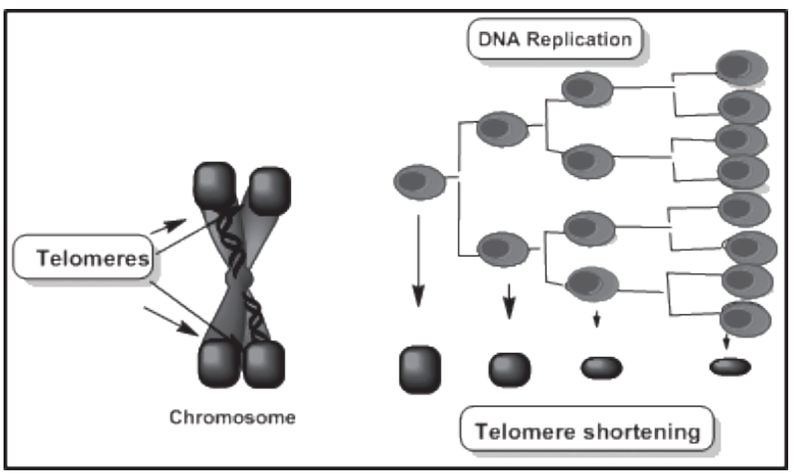
ในช่วงเวลาเดียวกัน Professor Dr. Barbara McClintock นักวิจัยพันธุศาสตร์ทำงานที่มหาวิทยาลัยมิสซูรี ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ศึกษาโครโมโซมของข้าวโพด (maize) ที่ได้รับรังสีเอกซ์พบว่าโครโมโซมเกิดการแตกหักและส่วนที่แตกหักกลับมาเชื่อมกันใหม่ได้ (breakage-fusion-bridge cycle)[2] แสดงว่าเกิดกระบวนการเชื่อมต่อที่เรียกว่ารีคอมบิเนชัน (recombination) และพบว่าบริเวณส่วนปลายเทโลเมียร์ไม่ได้เข้าร่วมเชื่อมหรือตัดต่อเมื่อมีการแตกหักนี้แต่อย่าง ซึ่งให้ผลทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Professor Dr. Hermann J. Muller ดังนั้นจึงเป็นข้อมูลสนับสนุนว่าปลายของโครโมโซมที่เรียกว่าเทโลเมียร์นี้มีความสำคัญเปรียบเหมือนปลอกหุ้มดีเอ็นเอภายในไม่ให้เกิดการแตกหักได้ นอกจากนี้ Professor Dr. Barbara McClintock ยังพบว่าเมื่อนำสายดีเอ็นเอที่ท่อนปลายขาดหายไป นำไปเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม สามารถต่อสายตัวเองได้แต่ยังไม่ทราบว่าเนื่องจากเหตุใด

ในปี คศ 1981 Professor Dr. Elizabeth H. Blackburn ได้ศึกษาส่วนปลายของโครโมโซมของโปรโตซัว *Tetrahymena thermophile* ซึ่งเป็นสัตว์เซลล์เดียวที่มีซีเลียรอบตัวและพบมากตามบึงน้ำต่าง ๆ มีโครโมโซมเป็นเส้นตรงเล็ก ๆ จำนวนมากกว่า 20,000 แท่ง ซึ่งเหมาะกับการศึกษาเทโลเมียร์ จากการศึกษาพบว่าเทโลเมียร์ของโปรโตซัวนี้มีชุดลำดับเบสเป็น 5′-TTGGGG-3′ ประมาณ 500 นิวคลีโอไทด์[3] ต่อมาได้ทำงานร่วมกับ Prof. Dr. Carol Greider และ Prof. Dr. Jack W. Szostak พบว่า เมื่อนำท่อนเทโลเมียร์ของ *Tetrahymena thermophile* ใส่ในพลาสมิดและนำพลาสมิดนั้นใส่ในยีสต์ *(Saccharomyces cerevisiae)* ยีสต์สามารถต่อสายยาวเทโลเมียร์ของ *Tetrahymena Thermophile* ได้ แต่สายยาวที่ต่อออกมาได้กลับเป็นรหัสเทโลเมียร์ของยีสต์เองคือ TTGGG ไม่ใช่ TTGGGG ของ *Tetrahymena*[4] ภายหลังสามารถสกัดแยกสารสกัดจำเพาะชนิดหนึ่ง จาก *Tetrahymena* เมื่อนำไปทดสอบกับยีสต์ที่มีท่อนเทโลเมียร์ของ *Tetrahymena* อยู่ภายใน พบว่าท่อนเทโลเมียร์สามารถต่อสายให้ยาวขึ้นโดยได้ท่อนปลายเป็นเทโลเมียร์ของ *Tetrahymena* ได้ ตั้งชื่อสารสกัดนั้นว่าเอนไซม์เทโลเมอเรส (telomerase)[5] เอนไซม์นี้เป็นไรโบไซม์ คือมีองค์ประกอบเป็นอาร์เอ็นเอรวมกับโปรตีน (ribonucleoprotein)

ปัจจุบันการศึกษาเรื่องของเทโลเมียร์และเทโลเมอเรสได้เพิ่มขึ้นมากมายและนำมาประยุกต์ใช้ให้ประโยชน์หลายด้าน นักวิทยาศาสตร์ทั้งสามท่านได้รับรางวัลโนเบลด้านสรีรวิทยาหรือการแพทย์ในปี 2009 ในการค้นพบการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสและการนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์

ความสำคัญและกลไกการทำงานของเทโลเมอเรส

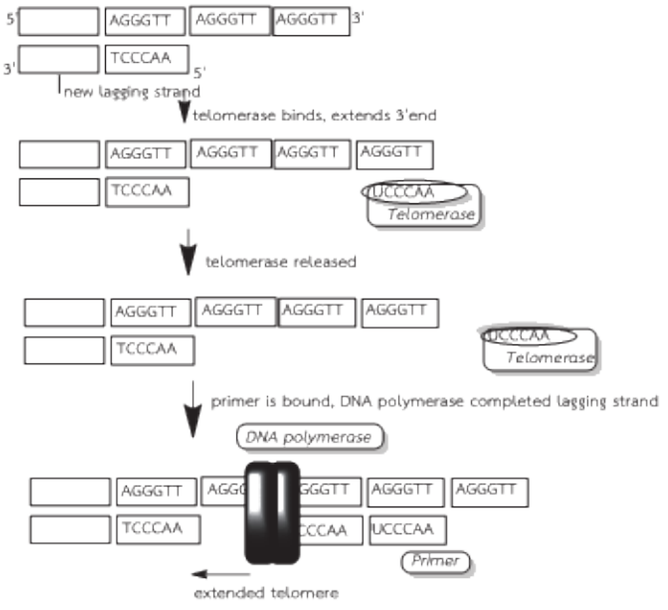
เอนไซม์เทโลเมอเรสมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต ทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถถ่ายทอดดีเอ็นเอไปยังรุ่นลูกหลานได้อย่างถูกต้องครบถ้วน หลักการสำคัญคือ เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่านั้น ดีเอ็นเอจะต้องสามารถจำลองตัวเองเพิ่มขึ้นสองเท่าได้เช่นกัน ประเด็นสำคัญ คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ทุกครั้งจะมีการสร้างสายเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอก่อนเสมอ ในที่สุดจะมีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จำเพาะในการตัดสายอาร์เอ็นเอที่ปนอยู่ออกไปและต่อสายดีเอ็นเอใหม่ขึ้นมาแทน แต่หากอาร์เอ็นเอที่ตัดออกไปเป็นส่วนที่อยู่ปลายสุดแล้ว จะไม่สามารถต่อสายดีเอ็นเอขึ้นมาแทนได้ ดังนั้นท่อนดีเอ็นเอนี้จะสั้นกว่าเดิม ในขณะที่ดีเอ็นเอสายแม่แบบจะยาวกว่าและเป็นสายเดี่ยวยื่นยาวออกมา (overhang) และเนื่องจากลักษณะที่อยู่เป็นสายเดี่ยวจึงไม่เสถียร ในที่สุดดีเอ็นเอจะสั้นลงทุกครั้งที่มีการจำลองตัวเอง นั่นคือมีปลายเทโลเมียร์สั้นลง (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การจำลองตัวเองของดีเอ็นเอทุกครั้งทำให้ปลายเทโลเมียร์สั้นลงทุกครั้ง ดัดแปลงจาก https://www.tasciences.com/what-is-a-telomere.html login 6/10/2562

การทำงานของเทโลเมอเรสเริ่มโดยใช้ส่วนของอาร์เอ็นเอบนเอนไซม์ที่มีเบสเข้าคู่กับเบสบนปลายเทโลเมียร์ได้พอดี เช่น ปลายเทโลเมียร์เป็น TTGGGA จะมีอาร์เอ็นเอเป็น AACCCU โดยอาร์เอ็นเอนี้จะใช้เป็นแม่แบบให้มีการต่อสายดีเอ็นเอจากปลาย 3′-OH ของสายดีเอ็นเอที่ค้างอยู่ (Primer) ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่ปลาย 3′ ยาวขึ้นอีก (ภาพที่ 3) หลังจากนั้นเข้าสู่กระบวนการจำลองตัวเองตามปกติได้สายดีเอ็นเอที่ยาวขึ้น เทโลเมอเรสจึงมีความสำคัญมากในการรักษาความยาวของดีเอ็นเอไม่ให้สั้นลง โดยเอนไซม์นี้จะมีและทำงานในเซลล์สืบพันธุ์ (gametes), เซลล์ต้นกำเนิด และเซลล์ร่างกายบางชนิด เช่น เซลล์รากผม เซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซท์ การมีเทโลเมอเรสในเซลล์สืบพันธุ์ทำให้ข้อมูลของดีเอ็นเอที่ใช้ในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นไปอย่างถูกต้อง หรือมีในเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซท์ทำให้มีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกายต่อเนื่อง แต่เทโลเมอเรสมีและทำงานน้อยมากในเซลล์ร่างกายทั่ว ๆ ไป เช่น เซลล์อีพิทีเลียล และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งทำให้ดีเอ็นเอสั้นลงและเข้าสู่กระบวนการชราภาพ ความยาวของเทโลเมียร์ในเซลล์สืบพันธุ์ของมนุษย์โดยประมาณ คือ 9-17 กิโลเบส เทโลเมียร์ของเซลล์ร่างกายยาวประมาณ 5-15 กิโลเบส ในขณะที่เซลล์ที่ชราภาพหยุดการแบ่งตัว (cell senescence) มีความยาวเทโลเมียร์ประมาณ 2 กิโลเบส

อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันพบว่าการคงไว้ของความยาวเทโลเมียร์ยังมีกระบวนการอื่นนอกจากเทโลเมอเรสมาเกี่ยวข้องเรียกกระบวนการนี้ว่า alternative lengthening of telomeres (ALT) กรณีที่ไม่มีเทโลเมอเรสสายดีเอ็นเอยังคงมีการต่อให้ยาวได้ด้วยการเกิดรีคอมบิเนชันกับสายดีเอ็นเอข้างเคียงที่มีอยู่ได้ (อาจเป็นของโครโมโซมแท่งอื่น) ทำให้มีเทโลเมียร์ยาวได้เช่นกัน ซึ่งยังต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อความชัดเจนต่อไป



ภาพที่ 3 การทำงานของเทโลเมอเรส ที่มี RNA ใช้เป็นสายแม่แบบ ช่วยสร้างสายดีเอ็นเอที่ปลาย 3′ให้ยาวขึ้นและทำให้สร้างสายคู่ของดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ในที่สุด[6]

เอนไซม์เทโลเมอเรสและการสั้นลงของโครโมโซม

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้นเทโลเมียร์จะสั้นลง เด็กแรกคลอดมีความยาวเทโลเมียร์ประมาณ 10.8 กิโลเบส ส่วนคนที่อายุประมาณ 95 ปี จะมีเทโลเมียร์ประมาณ 6-7 กิโลเบส การที่ปลายเทโลเมียร์สั้นลง หากสั้นจนถึงจุดวิกฤต (critical point) คือ ไม่มี T-loop จะเหมือนกับสายดีเอ็นเอมีการขาดของโพลีนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสาย ซึ่งหากเป็นเช่นนั้นก็จะมีการซ่อมแซมโดยเอาปลายที่ขาดมาต่อกันเอง (end to end fusion) ซึ่งทำให้โครโมโซมเกิดความไม่เสถียร ทำให้เซลล์เกิดการชราภาพและหยุดแบ่งตัว (cellular senescence)

โดยสรุปการที่ปลายเทโลเมียร์สั้นลงเกิดผลกระทบสำคัญหลายประการได้แก่

1. การขาดหายไปของข้อมูลส่วนปลายเทโลเมียร์ (telomere erosion) ทำให้ปลายของโครโมโซมไม่มีปลอกเทโลเมียร์หุ้ม ข้อมูลของสายดีเอ็นเออาจขาดหายหรือย้ายที่ ซึ่งย่อมมีผลต่อข้อมูลทางพันธุกรรมที่อาจเปลี่ยนไปได้

2. การขาดหายไปของเทโลเมียร์หรือเทโลเมียร์ที่สั้นลงมาก ๆ จะทำให้ส่วนปลายของโครโมโซมมีลักษณะคล้ายกับปลายของดีเอ็นเอที่ขาดออกแบบที่เรียกว่ามีการขาดทั้งสองสายของซิสเตอร์โครมาติดของโครโมโซม (double-stranded breaks) ลักษณะเช่นนี้จะทำให้เกิดความผิดพลาดหลายประการเช่น

2.1 การเกิดเป็นลักษณะที่คล้ายกับ double-stranded breaks อาจเป็นสื่อทำให้เซลล์เข้าใจผิดคิดว่าเกิดการบาดเจ็บจริงและจึงเกิดกระบวนการต่อเนื่องกระตุ้นเซลล์ตอบสนองต่อการบาดเจ็บ (DNA damage response) เช่น มีการหลั่งไซโตไคน์หลายชนิดตอบสนองให้เกิดกระบวนการอักเสบตามมา

2.2 กรณีที่เกิดลักษณะคล้ายกับ double-stranded break ทำให้เกิดลักษณะปลายเหนียวและเอาส่วนปลายเหนียวนี้มาต่อกันเอง (end to end fusion) ซึ่งลักษณะเช่นนี้เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัว จะทำให้เกิดการดึงแยกกัน

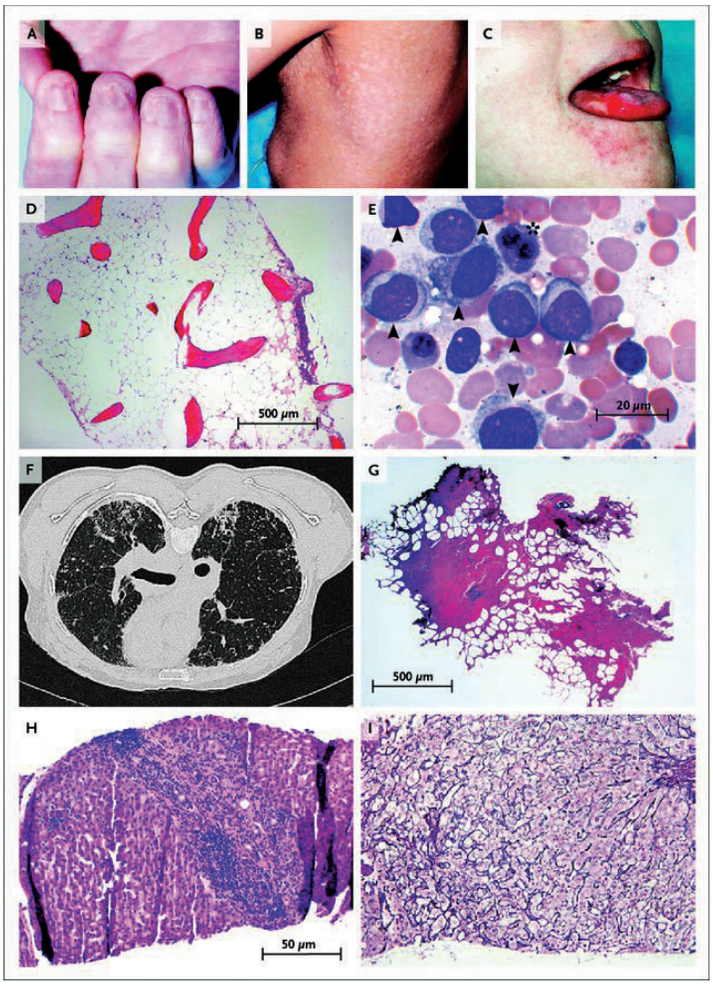
และขาดออกจากกันแบบไม่ถูกต้อง บางเซลล์ได้โครโมโซมมีส่วนเกินหรือบางเซลล์มีส่วนขาด ทำให้ดีเอ็นเอและโครโมโซมมีลักษณะที่ไม่เสถียรและเกิดความผิดปกติต่อไป

โรคและพยาธิสภาพที่เกี่ยวข้องกับการหดสั้นของเทโลเมียร์[7] (ภาพที่ 4) ได้แก่

1. โรคดิสเคอราโตซิสแต่กำเนิด (Dyskeratosis congenita) ประกอบด้วยลักษณะเล็บที่ไม่สมบูรณ์ (nail dystrophy) เกิดเม็ดสีเข้มขึ้นหรือจางลงที่ผิวหนัง (hyper or hypopigmentation) และเกิดฝ้าขาวในปากที่เรียกว่าลิวโคพลาเคีย (leukoplakia)

2. เม็ดโลหิตจางแบบอะพลาสติก (Aplastic anemia) เม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดผิดปกติ

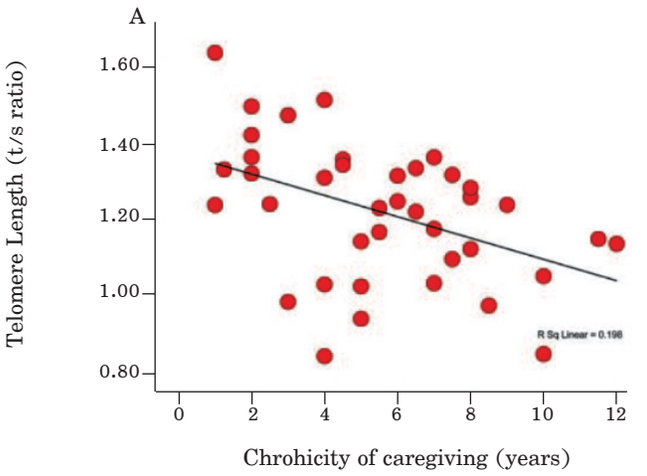
3. มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ชนิด Chronic lymphocytic leukemia: CLL และชนิด Acute myelocytic leukemia; AML



ภาพที่ 4 Dyskeratosis congenita (A: nail dystrophy, B: hyper/hypopigmentation, C: leukoplakia), D: Aplastic anemia, E: Acute myeloid leukemia[7]

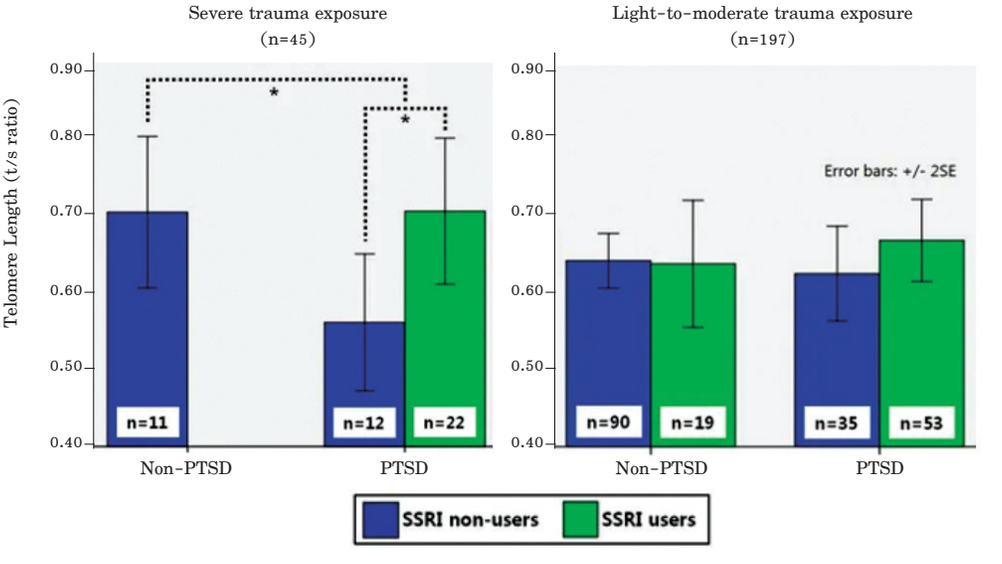
การศึกษาความสัมพันธ์ของการหดสั้นของเทโลเมียร์ต่อสุขภาพกายและใจ

ได้มีการศึกษากลุ่มผู้ที่ได้รับความเครียดเป็นประจำ[8] กล่าวคือ หญิงวัยก่อนหมดประจำเดือนที่เป็นมารดาผู้มีบุตรสุขภาพดีจำนวน 19 คน และมารดาผู้มีบุตรป่วยเรื้อรัง จำนวน 39 คน พบเทโลเมียร์ของมารดาที่ดูแลบุตรป่วยมีเทโลเมียร์สั้นลงแปรผันตามระยะเวลาที่ดูแล (ภาพที่ 5)



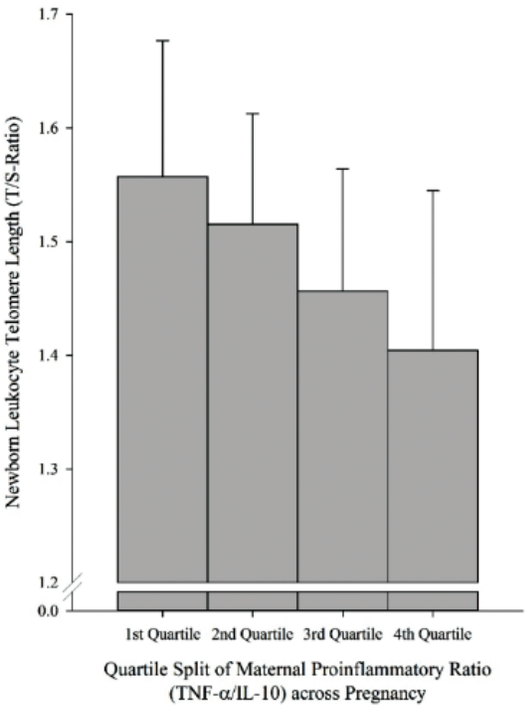
ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของเทโลเมียร์กับกลุ่มผู้ได้รับความเครียดจากการดูแลผู้ป่วย[8]

นอกจากนี้ผลการศึกษากลุ่มคนผู้ดูแลผู้ป่วยสมองเสื่อมซึ่งเป็นหญิงวัยหมดประจำเดือน 14 คน และกลุ่มควบคุม 15 คน พบว่าผู้ดูแลผู้ป่วยสมองเสื่อมมีระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลสูงเพิ่มขึ้น แสดงถึงมีความเครียดเพิ่มขึ้น และมีความยาวของเทโลเมียร์สั้นลงตามระยะเวลาที่ใช้ดูแลผู้ป่วย[9] และยังมีรายงานผลการศึกษาในเด็กที่ถูกล่วงละเมิดทางเพศหรือได้รับการทรมานทางใจในวัยเด็ก ส่งผลถึงความเครียดมีความสัมพันธ์กับการลดลงของความยาวเทโลเมียร์และแปรผันตรงกับระดับไซโตไคน์ที่บ่งชี้กระบวนการอักเสบ คือ ระดับ IL-6 และ TNF-α[10] โดยข้อมูลนี้ตรงกับการศึกษาในเด็กที่ได้รับเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ในอดีตส่งผลให้เทโลเมียร์สั้นลง[11] สอดคล้องกับผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความยาวของเทโลเมียร์ของทหารผ่านศึกของประเทศเกาหลีใต้ที่ได้พบเหตุการณ์ที่มีความรุนแรงอย่างมากในอดีตส่งผลให้ความยาวเทโลเมียร์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อกลุ่มนี้ได้รับยาลดการซึมเศร้า (selective serotonin reuptake inhibitor; SSRI) พบว่ามีความยาวของเทโลเมียร์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่กลุ่มที่ได้พบเหตุการณ์ที่มีความรุนแรงน้อยหรือปานกลาง ไม่ส่งผลเปลี่ยนแปลงความยาวของเทโลเมียร์อย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มนี้เมื่อได้รับยา SSRI มีแนวโน้มที่มีความยาวเทโลเมียร์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 6)[12]



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของเทโลเมียร์กับกลุ่มทหารผ่านศึกที่พบความเครียดที่รุนแรงมากและรุนแรงปานกลาง และผลจากการได้รับยาลดซึมเศร้า[12]

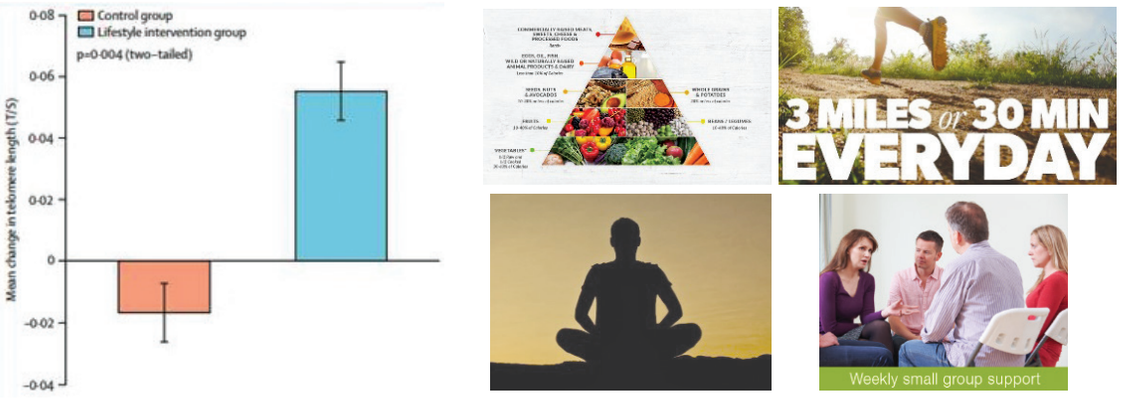
ในมารดาที่สูบบุหรี่หรือสิ่งเสพติดขณะตั้งครรภ์ที่ทำให้มีสัดส่วนของ TNFα (proinflammatory cytokine) /Interleukin-10 (anti-inflammatory cytokine) สูงนั้น ความยาวของเทโลเมียร์ของเด็กแรกเกิดที่วัดในรูปของ T/S ratio (ค่าเทโลเมียร์ที่คิดเทียบกับเทโลเมียร์ของกลุ่มประชาชนตัวอย่างที่มีอายุกลุ่มเดียวกับกลุ่มที่ทดสอบ เป็นการเทียบเพื่อให้ได้ค่าที่เป็นมาตรฐานมากขึ้น) ได้ค่า T/S ratio สั้นลง (ภาพที่ 7) เป็นสัดส่วนผกผันกับ TNFα/IL-10 ratio[13] นอกจากนี้ผู้ที่มีโรคหัวใจแบบ obstructive cardiomyopathy (HOCM) หรือแบบ non-obstructive cardiomyopathy (HNCM) ต่างก็มีความยาวของเทโลเมียร์สั้นลงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ[14]



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของเทโลเมียร์กับกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มารดาขณะตั้งครรภ์สูบบุหรี่หรือสิ่งเสพติด[13]

จากข้อมูลเหล่านี้ทำให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของเทโลเมียร์ที่สั้นและผลเสียต่อสุขภาพ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิธีการต่าง ๆ หลายรูปแบบที่จะทำให้ความยาวของเทโลเมียร์เพิ่มมากขึ้น โดยปรับให้ผู้ป่วยมีสุขภาพดีขึ้นและวัดจากความยาวของเทโลเมียร์

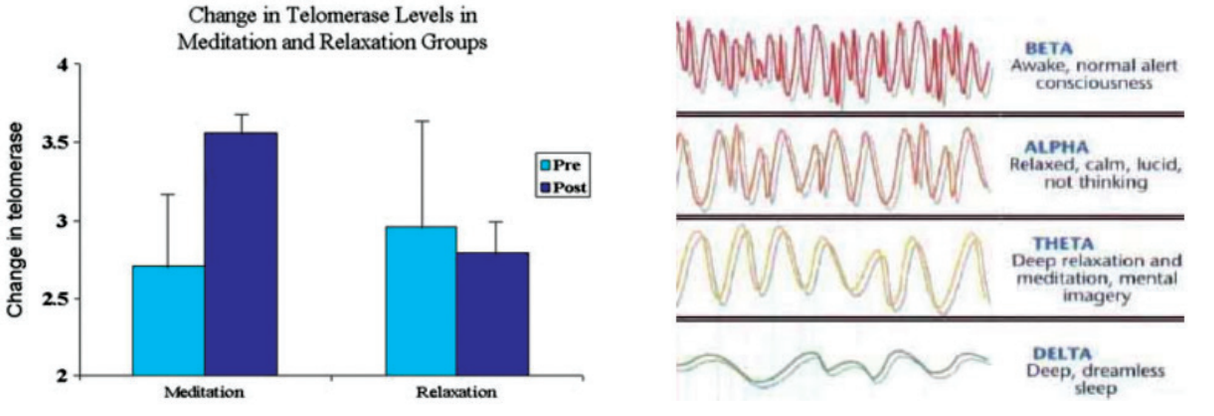
ผลการศึกษาในกลุ่มชายที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมากที่ยังไม่รุนแรงโดยเปลี่ยนแปลงวิถีการดำเนินชีวิต ใน 4 ด้าน คือ ด้านอาหาร การออกกำลังกาย การควบคุมความเครียด และการมีพลังสนับสนุนจากสังคม เน้นรับประทานอาหารโปรตีนที่มาจากผัก รับประทานผลไม้ ผัก ถั่วที่ยังไม่ได้เปลี่ยนแปลงสภาพ ธัญพืชทั้งหลาย รวมถึงจำกัดปริมาณไขมันให้มีแคลอรี่เพียง 10% ของแคลอรีทั้งหมด อาหารคาร์โบไฮเดรตชนิดเป็นเส้นใย มีการออกกำลังกายแบบแอโรบิคโดยเดิน 30 นาทีต่อวันเป็นเวลา 6 วันต่อสัปดาห์ ยืดตัวด้วยวิธีโยคะแบบเบา ๆ ฝึกลมหายใจ ฝึกสมาธิ ฝึกการผ่อนคลายโดยใช้จินตภาพ เป็นเวลา 60 นาทีต่อวัน และจัดกลุ่มพูดคุย สนับสนุน เป็นเวลา 60 นาทีต่อสัปดาห์ แบ่งเป็นกลุ่มควบคุม 25 คน และกลุ่มผู้ป่วย 10 คน ทำการศึกษาเป็นเวลา 5 ปีต่อเนื่องกัน (5-Year Life Style Intervention) ผลการศึกษา พบว่า กลุ่ม intervention มีระดับความยาวของเทโลเมียร์เพิ่มขึ้น ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีความยาวของเทโลเมียร์ลดลง (ภาพที่ 8)[15]



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของเทโลเมียร์กับการปรับเปลี่ยนวิถีดำรงชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งต่อมรูปหมากแบบไม่รุนแรง โดยใช้หลักสี่ประการคืออาหาร ออกกำลัง ทำสมาธิและการมีส่วนร่วมของสังคม[15]

นอกจากนี้ผลของการออกกำลังกายแบบทนทาน (endurance training) โดยการวิ่งหรือเดินที่ทำให้มีการเต้นของหัวใจ 60 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที พบว่าช่วยเพิ่มความยาวของเทโลเมียร์และการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสได้ แต่การออกกำลังแบบออกแรงต้านด้วยเครื่องมือต่าง ๆ ที่ห้องออกกำลังกาย เช่น การยกน้ำหนักด้วยแขนและขาที่ห้องออกกำลังกาย ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความยาวของเทโลเมียร์[16]

สำหรับการศึกษาในกลุ่มผู้ดูแลครอบครัวที่มีปัญหาสมองเสื่อม เมื่อใช้การดูแลโดยการทำสมาธิแบบโยคะที่เรียกว่า Yogic meditation (practicing Kirtan Kriya) เปรียบเทียบกับการฟังเพลงแบบผ่อนคลายเป็นเวลา 12 นาทีต่อวัน รวม 8 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มที่ทำสมาธิ มีความยาวของเทโลเมียร์เพิ่มขึ้น ในขณะที่กลุ่มฟังเพลงผ่อนคลายมีความยาวของเทโลเมียร์ลดลงเล็กน้อย (ภาพที่ 9) และพบว่าผู้ที่ทำสมาธิจะมีคลื่นสมองที่สงบอยู่ในระดับ theta wave (5–8 Hz) ในขณะที่คลื่นสมองของผู้ที่ผ่อนคลายจะอยู่ในระดับ alpha wave (9–14 Hz) และคลื่นสมองผู้ที่อยู่ในชีวิตปกติจะอยู่ในช่วง beta wave (12–25 Hz)[17] ซึ่ง พบว่าสุขภาพที่ดีขึ้นกับนโยบายการดูแลสุขภาพ (health care) 10% สิ่งแวดล้อม 5% สังคม 15%, พันธุกรรม 30% และพฤติกรรม 40%[18]



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของเทโลเมียร์กับการทำสมาธิหรือการพักผ่อนฟังเพลง[17,18]

นอกจากยังนี้พบว่าอาหารเสริมก็มีบทบาทสำคัญ เช่น มีการศึกษาเกี่ยวกับนมผึ้งซึ่งเป็นอาหารพิเศษที่ผึ้งงานจะช่วยกันผลิตและหลั่งออกมาจากต่อมน้ำลายได้นำมาใช้ประโยชน์ต่อสุขภาพมานานทั่วโลก ตั้งแต่กรีก อียิปต์ จีน อเมริกา แคนาดา ออสเตรเลียและไทย คุณประโยชน์ของนมผึ้งเมื่อใช้ในความเข้มข้นที่เหมาะสมจะสามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ ยืดอายุขัย และต้านอนุมูลอิสระ[17,19]

สรุป

ความสั้นยาวของเทโลเมียร์บ่งบอกอายุและพยาธิสภาพของโรคได้ เทโลเมียร์ที่สั้นลงจะบ่งบอกถึงความชรา เทโลเมียร์ที่สั้นเกินกว่าปกติ จะเสมือนหนึ่งทำให้โครโมโซมแท่งนั้น ๆ มีลักษณะคล้ายกับเกิดการฉีกขาด เป็นผลให้โครโมโซมและยีนขาดเสถียรภาพ เกิดพยาธิสภาพหลายอย่างได้ การปกป้องเทโลเมียร์ไม่ให้สั้นเกินไปจนเกิดพยาธิสภาพสามารถทำได้หลายวิถีทาง ทั้งทางพฤติกรรมในวิถีชีวิต ประจำวันและทางใจ โดยระมัดระวังเรื่องอาหารให้มีการออกกำลังกายแบบแอโรบิค มีการทำสมาธิให้จิตรู้สึกตัว และเสริมด้วยการได้พลังสนับสนุนจากกลุ่มบุคคลในสังคม สามารถเสริมให้เทโลเมียร์ยืดยาว ช่วยให้สุขภาพดีและอายุยืนยาว

เอกสารอ้างอิง

1. NobelPrize.org. Hermann J. Muller – nobel lecture. [online]. 1946; [cited 2019 Oct 6]; [16 screens]. Available from: URL: https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1946/muller/lecture.
2. McClintock B. The Stability of broken ends of chromosomes in Zea mays. Genetics 1941; 26(2): 234-82.
3. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. J Mol Biol 1978; 120(1): 33-53.
4. Szostak JW, Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. Cell 1982; 29(1): 245-55.
5. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell 1985; 43(2 Pt 1): 405-13.
6. Blackburn EH. The telomere and telomerase: nucleic acid-protein complexes acting in a telomere homeostasis system. A review. Biochemistry (Mosc) 1997; 62(11): 1196-201.
7. Gramatges MM, Bertuch AA. Short telomeres: from dyskeratosis congenita to sporadic aplastic anemia and malignancy. Transl Res 2013; 162(6): 353-63.
8. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(49): 17312-5.
9. Tomiyama AJ, O'Donovan A, Lin J, Puterman E, Lazaro A, Chan J, et al. Does cellular aging relate to patterns of allostasis? An examination of basal and stress reactive HPA axis activity and telomere length. Physiol Behav 2012; 106(1): 40-5.
10. Kiecolt-Glaser JK, Gouin JP, Weng NP, Malarkey WB, Beversdorf DQ, Glaser R. Childhood adversity heightens the impact of later-life caregiving stress on telomere length and inflammation. Psychosom Med 2011; 73(1): 16-22.
11. O'Donovan A, Epel E, Lin J, Wolkowitz O, Cohen B, Maguen S, et al. Childhood trauma associated with short leukocyte telomere length in posttraumatic stress disorder. Biol Psychiatry 2011; 70(5): 465-71.

12. Kim TY, Kim SJ, Choi JR, Lee ST, Kim J, Hwang IS, et al. The effect of trauma and PTSD on telomere length: An exploratory study in people exposed to combat trauma. Sci Rep 2017; 7: 4375. (7 pages).
13. Lazarides C, Epel ES, Lin J, Blackburn EH, Voelkle MC, Buss C, et al. Maternal pro-inflammatory state during pregnancy and newborn leukocyte telomere length: a prospective investigation. Brain Behav Immun 2019; 80: 419-26.
14. Chatterjee S, de Gonzalo-Calvo D, Derda AA, Schimmel K, Sonnenschein K, Bavendiek U, et al. Leukocyte telomere length correlates with hypertrophic cardiomyopathy severity. Sci Rep 2018; 8: 11227. (8 pages).
15. Ornish D, Lin J, Chan JM, Epel E, Kemp C, Weidner G, et al. Effect of comprehensive lifestyle changes on telomerase activity and telomere length in men with biopsy-proven low-risk prostate cancer: 5-year follow-up of a descriptive pilot study. Lancet Oncol 2013; 14(11): 1112-20.
16. Werner CM, Hecksteden A, Morsch A, Zundler J, Wegmann M, Kratzsch J, et al. Differential effects of endurance, interval, and resistance training on telomerase activity and telomere length in a randomized, controlled study. Eur Heart J 2019; 40(1): 34-46.
17. Tang YY, Tang R, Rothbart MK, Posner MI. Frontal theta activity and white matter plasticity following mindfulness meditation. Curr Opin Psychol 2019; 28: 294-7.
18. McGinnis JM, Williams-Russo P, Knickman JR. The case for more active policy attention to health promotion. Health Aff (Millwood). 2002; 21(2): 78-93.
19. Lavretsky H, Siddarth P, Nazarian N, Cyr NS, Khalsa DS, Lin J, et al. A pilot study of yogic meditation for family dementia caregivers with depressive symptoms: effects on mental health, cognition, and telomerase activity. Int J Geriatr Psychiatry 2013; 28(1): 57-65.
20. Jenkhetkan W, Thitiorul S, Jansom C, Ratanavalachai T. Molecular and cytogenetic effects of Thai royal jelly: modulation through c-MYC, h-TERT, NRF2, HO-1, BCL2, BAX and cyclins in human lymphocytes in vitro. Mutagenesis 2017; 32(5): 525-31.
21. Kunugi H, Mohammed Ali A. Royal jelly and its components promote healthy aging and longevity: from animal models to humans. Int J Mol Sci 2019; 20(19): 4662. (26 pages).

ใบสมัครเป็นสมาชิก
วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ชื่อ.....

ที่อยู่.....

อาชีพ.....

โทรศัพท์.....

ต้องการรับ วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เวลา 1 ปี (4 ฉบับ) เป็นเงิน 200.- บาท

ตั้งแต่ปี.....

พร้อมนี้ได้ส่ง ☐ ธนาณัติ ☐ ตั๋วแลกเงินไปรษณีย์

☐ เงินสด

สั่งจ่าย **นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ**

ห้องสมุดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ซอยโรงพยาบาลบำราศนราดูร ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

โทร. 0-2589-9850-8 ต่อ 99339

E-mail.....

สั่งจ่าย ปณฝ. กระทรวงสาธารณสุข รหัสไปรษณีย์ 11000

THE BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

The bulletin of the Department of Medical Sciences is an official publication of the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. It is devoted to the dissemination of knowledge concerning medical sciences and the facilitation of co-operation among scientists.

Owner	Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health	
Administrative Advisor	Opart Karnkawinpong	Phichet Banyati
	Somlerk Jeungsamarn	Somchai Sangkitporn
Technical Advisor	Amara Vongbuddhapitak	Mayura Kusum
	Pimjai Naigowit	Jongdee Wongpinairat
	Sumol Pavitranon	Panadda Silva
	Pranee ChavalitThumrong	Teeranart Jivapaisarnpong
Editor	Busarawan Sriwanthana	Department of Medical Sciences
Assistant Editor	Duanthanorm Promkhatkaew	Kanokporn Atisook
	Suthon Vongsheree	Wichuda Jariyapan
	Apiwat Tawatsin	Malinee Chittaganpitch
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana	Siriraj Hospital, Mahidol University
	Prasert Auewarakul	Siriraj Hospital, Mahidol University
	Punnee Pitisuttithum	Mahidol University
	Pathom Sawanpanyalert	Office of the Permanent Secretary, Ministry of Science and Technology
	Pintip Pongpech	Chulalongkorn University
	Suchada Chaisawadi	King Mongkut's Institute of Technology Thonburi
	Danai Tiwawech	Naresuan University
	Suwanna Charunut	Huachiew Chalermprakiet University
	Salakchit Chutipongvivate	The Association of Medical Technologists of Thailand
	Padet Siriyasatien	Chulalongkorn University
	Pornpimol Kongtip	Mahidol University
	Srisurang Tantimavanich	Mahidol University
	Nuanchawee Wetprasit	Ramkhamhaeng University
	Sunee Sirivichayakul	Chulalongkorn University
	Supanee Duangteraprecha	Department of Medical Sciences
	Piyada Wangroongsarb	Department of Medical Sciences
	Wantana Paveenkittiporn	Department of Medical Sciences
	Duangpen Pattamadilok	Department of Medical Sciences
	Triporn Wattananat	Department of Medical Sciences
Administration	Namfon Noiprasert	Department of Medical Sciences
	Prasan Julwong	Department of Medical Sciences

Subscription Rate The Bulletin of the Department of Medical Sciences is published quarterly. Annual subscription rate is ฿ 200.00 for domestic and US.$ 50.00 for all other countries.

Office Department of Medical Sciences
88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand.
Tel. 0-2951-0000 Fax: 0-2951-1297

Printed by Thanaaroonkarnpim co., Ltd.
457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200
Tel. 0-2282-6033-4

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

เปิดใจ ใฝ่รู้ คู่คุณธรรม นำหลักวิชาการ มาตรฐานสากล

www.dmsc.moph.go.th