ศรีนครินทร์เวชสาร
Srinagarind Medical Journal

ISSN 2821 9724 (ONLINE)

ปีที่ 38 (ภาคผนวก) กันยายน 2566
Volume 38 (Supplement) September 2023

วารสารของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
A Publisher of the Faculty of Medicine, Khon Kaen University Khon Kaen, Thailand

SMJ ศรีนครินทร์เวชสาร
Srinagarind Medical Journal
www.smj.ejnal.com

Advisory Board

รศ.นพ.อภิชาติ จิระวุฒิพงศ์	Assoc. Prof. Apichat Jiravuttipong	คณบดีคณะแพทยศาสตร์
รศ.กมลวรรณ เจนวิถีสุข	Assoc. Prof. Kamonwan Janwitheesuk	รองคณบดีฝ่ายวิชาการ
รศ.วิมลรัตน์ ศรีราช	Assoc. Prof. Wimonrat Sriraj	รองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์

Editor-in-Chief

ศ.สุวรรณา อรุณพงค์ไพศาล	Prof. Suwanna	มหาวิทยาลัยขอนแก่น

English Editor

ศ.พจน์ ศรีบุญลือ	Prof. Pote Sriboonlue	มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Editorial Board

รศ.วรรณคล เชื้อมงคล	Assoc. Prof. Wannakon Chuemongkon	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ผศ.นิรันดร์ อินทรัตน์	Assist. Prof. Nirun Intarat	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ผศ.อะไรวรรณ ชัยชนะวิโรจน์	Assist. Prof. Uraiwan Chaichanawirote	มหาวิทยาลัยนเรศวร

Journal managers

นางสมปอง จันทะคราม	Mrs. Sompong Chantakram	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
น.ส.กรรณิการ์ ขันธวุฒิ	Miss. Kannika Khuntavuj	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
นางเสาวนีย์ ล้อมจันทร์	Mrs. Saowanee Lomjan	มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ศรีนครินทร์เวชสารเป็นวารสารของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ส่งเสริมและเผยแพร่ผลงานการค้นคว้าและวิจัยทางการแพทย์ (Medical research and public health research)
2. เผยแพร่ความก้าวหน้าด้านวิชาการทางการแพทย์ (Medicine) สุขอนามัย (General Health) วิทยาศาสตร์ชีวภาพการแพทย์ (Biomedical science) และสาธารณสุข (Public health)
3. ส่งเสริมการศึกษาต่อเนื่องหลังปริญญา (Continuous Medical Education)
4. เพื่อแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์ในเวชปฏิบัติ (Sharing experience in general medical practice)
5. เผยแพร่และประชาสัมพันธ์ชื่อเสียงของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้เป็นรู้จักกว้างขวางยิ่งขึ้น

ตีพิมพ์บทความ 6 ประเภทคือ

1. นวัตกรรมทางการแพทย์ (medical innovation) เป็นรายงานผลงานสิ่งประดิษฐ์คิดค้นใหม่หรือดัดแปลงแนวความคิด หรือวิธีการผ่าตัดใหม่ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางการแพทย์ได้
2. นิพนธ์ต้นฉบับ (original article) เป็นรายงานผลการค้นคว้าวิจัยของผู้เขียน
3. รายงานผู้ป่วย (case report) เป็นรายงานผลการศึกษาจากผู้ป่วย มีบทสรุปเสนอข้อคิดเห็นเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้
4. บทฟื้นฟูวิชาการ (review article) เป็นบทความที่เขียนจากการรวบรวมความรู้เรื่องใดเรื่องหนึ่งจากวารสารต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศ และมีบทสรุปวิจารณ์ (มีทั้งแบบฉบับ ปกติ และฉบับ special issue) บรรณาธิการอาจขอให้ออกข้อสอบ CME เรื่องละ 5 ข้อ ด้วย
5. บทสัมมนา-ประชุมวิชาการ (conference-symposium) เป็นบทความที่รวบรวมจากผลการประชุมวิชาการ การสัมมนาพยาธิ-คลินิก ที่น่าสนใจ (ฉบับ special issue)
6. จดหมายถึงบรรณาธิการ (letter to the editor) ได้แก่จดหมายที่เขียนวิจารณ์เกี่ยวข้องกับบทความที่ได้ลงตีพิมพ์แล้ว หรือแสดงผลงานทางวิชาการที่ต้องการเผยแพร่อย่างย่อๆ

โดยมีกำหนดเผยแพร่ ปีละ 6 ฉบับ (กุมภาพันธ์, เมษายน, มิถุนายน, สิงหาคม, ตุลาคม และธันวาคม)

รายละเอียดเกี่ยวกับการเตรียมบทความ และการส่งบทความดูได้จากคำแนะนำสำหรับผู้เขียนบทความซึ่ง อยู่ด้านท้ายของศรีนครินทร์เวชสาร ทางกองบรรณาธิการจะไม่พิจารณาตีพิมพ์บทความหากไม่ได้เขียนในรูปแบบ ตามคำแนะนำ

การพิจารณาบทความ

บทความทุกบทความจะได้รับการประเมินบทความจากผู้ทรงคุณวุฒิ (Peer Review) ในสาขาที่เกี่ยวข้อง จากผู้ทรงคุณวุฒิที่ไม่มีส่วนได้ส่วนเสียกับผู้นิพนธ์ และต่างหน่วยงาน/ต่างสถาบันอย่างน้อยจำนวน 3 ท่านโดยผู้ประเมินจะ ไม่ทราบชื่อผู้นิพนธ์บทความ

รูปภาพ ตาราง หรือข้อความที่ผู้นิพนธ์ได้คัดมาจากที่อื่น เป็นความรับผิดชอบที่ผู้นิพนธ์จะต้องขออนุญาตในการนำมา ตีพิมพ์ซ้ำ

บทความที่ได้รับการตีพิมพ์ในศรีนครินทร์เวชสาร เป็นความรับผิดชอบของผู้นิพนธ์

กองบรรณาธิการ ไม่สงวนสิทธิ์ในการคัดลอกเพื่อการพัฒนาด้านวิชาการแต่ต้องได้รับการอ้างอิงอย่างถูกต้อง ตามหลักวิชาการ

สำนักงานธุรการ

สมปอง จันทะคราม
สำนักงานศรีนครินทร์เวชสาร
ฝ่ายวิชาการ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
โทร 043-363385
E-mail: csompo@kku.ac.th

Office Address

Sompong Chantakram
Srinagarind Medical Journal
Academic Affairs, Faculty of Medicine
Khon Kaen University
Khon Kaen, Thailand. 40002
Tel 043-363385
E-mail: csompo@kku.ac.th

สารบัญ

ปีที่ 38 (ภาคผนวก) กันยายน 2566

บรรณาธิการแถลง

นิพนธ์ต้นฉบับ /Original Article

1. **Peptide Derived from Progranulin of the Carcinogenic Liver Fluke, *Opisthorchis viverrini* Stimulates Cell Hyperproliferation and Proinflammatory Cytokine Production**
Thanapat Hembasat, Sujittra Chaiyadet, Wannaporn Ittiprasert, Michael J Smout, Neil D Young, Alex Loukas, Paul J Brindley, Thewarach Laha..... **1**

2. **Suppression of O-GlcNAc Transferase Enhances Drug Sensitivity of Melanoma**
Nopkamol Kanchanangkul, Panupong Mahalapbutr, Sukanya Luang, Wunchana Seubwai, Worasak Keawkong, Sopit Wongkham, Atit Silsirivanit..... **16**

3. **Genotypic Identification of Clinical Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates by Whole Genome Sequencing (WGS)**
Voleak Vorn, Lumyai Wonglakorn, Yothin Hinwan, Sakawrat Kunthawong, Umaporn Yordpratum..... **23**

4. **Biofilm Formation of *Burkholderia pseudomallei* H777 Strain in Roswell Park Memorial Institute (RPMI), Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), and Luria-Bertani (LB)**
Wongsakon Sainglers, Muthita Khamwong, Sorujsiri Chareonsudjai..... **29**

5. **Reduction of Turnaround Time for Serum Protein Electrophoresis and Serum Immunofixation Test in Multiple Myeloma Diagnosis**
Thipaporn Jaroonsirimaneekul, Prinya. Prasongdee, Chanpen Sriphan, Kutcharin Phunikhom, Papawadee Hongart..... **37**

6. **Development of Business Intelligence (BI) for Clinical Chemistry and Immunology Laboratory at Srinagarind Hospital by Web Application**
Prinya Prasongdee, Papawadee Hongart ,Thipaporn Jaroonsirimaneekul, Napitta Buasri..... **45**

7. **Stability of Serum Glucose, Total Bilirubin and Direct Bilirubin in Total Lab Automation with Refrigerated Sample Store**
Papawadee Hongart, Prinya Prasongdee , Thipaporn Jaroonsirimaneekul and Napitta Buasri..... **55**

8. **An Evaluation of Pooled Leukocyte Depleted Platelet Concentrates and Pooled Leukocyte Poor Platelet Concentrates in Platelet Additive Solution with Emphasis on Anti-A and Anti-B Titer Levels in Group O Blood**
Chetniphat Mattra, Ronnarit Boonyarat, JongkolAkahat, Pattarapon Tiensri, Wiyada Panjaruk, Kriangsak Jenwitheesuk..... **61**

9. **Comparison of Platelet Count between ABO-compatible and ABO-incompatible Platelet Transfusions in Blood Transfusion Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University**
Chamaiporn Singha, Thanet Thanukarn, Teerapat Pongtapthai, Suthatai Chaliawwai, Chalawan Butryojantho, Ronnarit Boonyarat, Kritsada Singha, Kriangsak Jenwitheesuk..... **67**

10. **Preparation of Leukocyte-depleted Red Cell (LDPRC) by the BioR Flex Filter**
Jongkol Akahat, Chetniphat Mattra, Wiyada Panjaruk, Kriangsak Jenwitheesuk..... **74**

สารบัญ

Volume 38 (Supplement) September 2023

บทคัดย่อ / Abstract

11. **Association of Potential Pharmacokinetic Drug Interaction of Non-vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants (NOACs) in Atrial Fibrillation Patients and Risk of Major Bleeding**
Pansu Chumworathayi, Chaiyasith Wongvipaporn, Tapakorn Ainganu, Warinthorn Tooltham, Weeraya Sonakoo, Verawan Uchaipichat..... **78**

12. **Performance Assessment of Radiation Dose in Liver Cancer Patients Undergoing Transarterial Chemoembolization (TACE) in Comparison with International Diagnostic Reference Levels**
Sirinart Pariyashartgesorn, Utit Chaleeon, Sichon Khuanrubsuan, Soponwit Sriboonlert, Anucha Ahooja, Vivian Klungbounkrong, Jitraporn Wongwiwatchai, Siritorn Buranurak, Varaporn Pong-inwong..... **80**

13. **Rate of Blood Deposit Using at Operating Rooms in Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University**
Putthida Tanthanapornkul, Chalawan Butryojantho, Nilnet Chantha, Chamaiporn Singha1, Ratchataporn Pimpoomee, Teerapat Pongtapthai, Suttahathai Chaewwai, Chananyu Patcharasawatkul, Kriangsak Jenwitheesuk..... **81**

14. **Effects of Using Sterile 0.9% Normal Saline Solution Gargling to Reduce Sore Throat in Patients with Upper Respiratory Tract Infections**
Wilawan Aunruean..... **82**

15. **Suppression of Acetyl-CoA Carboxylase 1 Inhibits CCA Migration via AMPK-NF-B-Snail Pathway**
Saowaluk Saisomboon, Ryusho Kariya, Piyanard Boonnate, Kanlayanee Sawanyawisuth, Ubon Cha'on, Vor Luvira, Yaovalux Chamgramol, Chawalit Pairojkul, Wunchana Seubwai, Atit Silsirivanit, Sopit Wongkham, Seiji Okada, Sarawut Jitrapakdee, Kulthida Vaeteewoottacharn..... **83**

16. **Correlation between CYP3A5and CYP2D6 Polymorphisms and Quetiapine Plasma Level in Thai Psychiatric Patients**
Sootthikarn Mungkhunthod, Apichaya Paungperch, Pongsatorn Paholpak, Panita Limpawattana, Manchumad Manjavong, Nontaya Nakam, Chonlaphat Sukasem, Wichittra Tassaneeyakul, Suda Vannaprasaht..... **84**

17. **Clinical Courses Comparison between Limited Cutaneous Systemic Sclerosis and Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis with Positive for Anti-Topoisomerase I Antibody: A Cohort Study**
Chana Chaovanitkul, Tippawan Onchan, Patnarin Pongkulkiat, Ajanee Mahakkanukrauh, Siraphop Suwannaroj, Chingching Foocharoen..... **85**

18. **Mode of Deliveries and Perinatal Outcomes of Prenatal COVID-19 Infections**
Supakan Pongsatonwiwat, Bandit Chumworathayi, Chatuporn Duangkum..... **86**

19. **Prevalence and Characteristics of Renal Dysfunction in Children with Alpha-Thalassemia**
Kamonthip Chantarasakha, Patcharee Komvilaisak, Napat Laoaroon, Suwannee Wisanuyotin..... **87**

20. **Bloodstream Infection in Pediatric Oncology Patient: Causative Pathogens and Antimicrobial Susceptibility in a Tertiary Care Setting**
Thanachai Nithisaowapak, Lumyai Wonglakorn, Pagakrong Lumbiganon, Pope Kosalaraksa, Patcharee Komvilaisak, Kunanya Suwannaying, Nattakarn Tantawarak, Napat Laoaroon..... **88**

21. **Serum Procalcitonin and Procalcitonin Clearance as A Prognostic Biomarker in Pediatric Critical Care: A Tertiary Care Setting**
Apichaya Kriengwatanasiri, Rattapon Uppala..... **89**

บรรณาธิการแถลง

ศรีนครินทร์เวชสารฉบับนี้ เป็นปีที่ 38 ฉบับ Supplement ในงานประชุมวิชาการประจำปี พ.ศ. 2566 ครั้งที่ 37 ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้หัวข้อ Multidisciplinary เราเป็นทีมเพื่อประชาชน ในวันที่ 7-8 กันยายน 2566 ณ ห้องประชุมมอดินแดง และห้องประชุมมิตรภาพ ชั้น 3 อาคารเรียนรวม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยในงานดังกล่าวนี้มีปาฐกถาพิเศษ/การเสวนาวิชาการ มีการนำเสนอผลงานวิชาการภาคบรรยาย ภาคโปสเตอร์ และมีการประกวดผลงานวิจัยจากบุคลากร นักศึกษา ศิษย์เก่าคณะแพทยศาสตร์ และศูนย์แพทยศาสตร์ศึกษาชั้นคลินิกด้วย ศรีนครินทร์เวชสาร ขอแสดงความยินดีกับผู้ที่ได้รับรางวัลจากการประกวดผลงานวิจัย และต้องขอขอบพระคุณคณาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิ ซึ่งได้ให้ความอนุเคราะห์พิจารณางานวิจัย คัดเลือกและตัดสินจากผลงานที่นักวิจัยยื่นเสนอเข้ารับการพิจารณา ตลอดจนขอขอบคุณทีมงานในส่วนงานต่างๆที่เกี่ยวข้องจนทำให้งานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี การดำเนินงานดังกล่าวอย่างต่อเนื่องนี้ สะท้อนให้เห็นถึงความมุ่งมั่นของคณะแพทยศาสตร์ ในการส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัย เพื่อเป็นกำลังใจ เชิดชูเกียรตินักวิจัย และเป็นการกระตุ้นบรรยากาศด้านการวิจัย ให้บุคลากรผลิตผลงานวิจัยที่มีคุณประโยชน์ต่อวงการวิชาชีพและการบริการรักษาพยาบาลต่อไป

ศ.พญ.สุวรรณา อรุณพงค์ไพศาล
บรรณาธิการศรีนครินทร์เวชสาร
กันยายน 2566

นิพนธ์ต้นฉบับ . Original Article

เปปไทด์ progranulin ของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์และการผลิตไซโตไคน์ส่งเสริมการอักเสบของเซลล์ ท่อน้ำดี

ธนพัทธ เห็มบาสัตย์[1], สุจิตตรา ไชยเดช[2], วรรณพร อิทธิประเสริฐ[3], Michael J Smout[4], Neil D Young[5], Alex Loukas[4], Paul J Brindley[3], เทวราช หล้าหา[1],*

[1]สาขาวิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น ประเทศไทย

[2]สาขาวิชาเวชศาสตร์เขตร้อน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น ประเทศไทย

[3]ภาควิชาจุลชีววิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยา และเวชศาสตร์เขตร้อน โรงเรียนแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยจอร์จ วอชิงตัน กรุงวอชิงตัน ดีซี ประเทศสหรัฐอเมริกา

[4]ศูนย์โมเลกุลบำบัด สถาบันสุขภาพและเวชศาสตร์เขตร้อนออสเตรเลีย มหาวิทยาลัยเจมส์ คุก เมืองแคนส์ รัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย

[5]คณะสัตวแพทย์และเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเมลเบิร์น รัฐวิคทอเรีย ประเทศออสเตรเลีย

Peptide Derived from Progranulin of the Carcinogenic Liver Fluke, *Opisthorchis viverrini* Stimulates Cell Hyperproliferation and Proinflammatory Cytokine Production

Thanapat Hembasat[1], Sujittra Chaiyadet[2], Wannaporn Ittiprasert[3], Michael J Smout[4], Neil D Young[5], Alex Loukas[4], Paul J Brindley[3], Thewarach Laha[1],*

[1]Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand

[2]Department of Tropical Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand

[3]Department of Microbiology, Immunology and Tropical Medicine, and Research Center for Neglected Diseases of Poverty, School of Medicine & Health Sciences, George Washington University, Washington, D.C. 20037, USA

[4]Centre for Molecular Therapeutics, Australian Institute of Tropical Health and Medicine, James Cook University, Cairns, Queensland, 4878, Australia

[5]Faculty of Veterinary and Agricultural Sciences, The University of Melbourne, Victoria, Australia

*Corresponding author :Thewarach Laha, E-mail: thewa_la@kku.ac.th

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: โปรกรานูลินเป็นไกลโคโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการหายของแผล การอักเสบ การสร้างหลอดเลือดใหม่ และการเกิดเนื้องอกร้าย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนก วิเคราะห์โครงสร้าง และศึกษาบทบาทของโปรกรานูลินของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ในการก่อพยาธิสภาพในเซลล์ท่อน้ำดี

วิธีการศึกษา: ทำการจำแนกและวิเคราะห์โครงสร้างส่วนประกอบลำดับดีเอ็นเอและโปรตีนของโปรกรานูลิน ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* (*Ov*-PGRN)โดยเทคนิคทางชีวสารสนเทศ วัดระดับการแสดงออกของยีน *Ov*-PGRN ด้วยวิธี quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และการแสดงออกของโปรตีน *Ov*-PGRN ด้วยวิธี western blot และ immunolocalization ทำการทดสอบคุณลักษณะและบทบาทของ *Ov*-PGRN โดยใช้เปปไทด์จำเพาะของโปรตีน *Ov*-PGRN ในการกระตุ้นเซลล์ท่อน้ำดีของคนในหลอดทดลองเพื่อดูการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการแสดงออกของไซโตไคน์ส่งเสริมการอักเสบชนิดอินเตอร์ลิวคิน 6 และอินเตอร์ลิวคิน 8

ผลการศึกษา: สายดีเอ็นเอของยีน *Ov*-PGRN ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 36,463 คู่เบส ประกอบด้วย 13 เอ็กซอน และ 12 อินทรอน และโปรโมเตอร์ เอ็มอาร์เอ็นเอของโปรกรานูลินประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 2,768 คู่เบส แปลรหัสไปสู่ลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 846 กรดอะมิโน และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 91.61 กิโลดาลตัน โครงสร้างของยีน *Ov*-PGRN ประกอบด้วยกรานูลินหน่วยย่อยจำนวน 7.5 หน่วย การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับดีเอ็นเอของยีนกลุ่มโปรกรานูลินพบว่ายีน *Ov*-PGRN มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มพยาธิใบไม้ตับในตระกูลเดียวกัน ยีน *Ov*-PGRN มีการแสดงออกในระยะต่างๆของพยาธิใบไม้ตับโดยมีการแสดงออกสูงสุดในระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรีย แสดงว่า *Ov*-PGRN เป็นโมเลกุลสำคัญที่ใช้ในการเจริญเติบโตและพัฒนาการในวงจรชีวิตของระยะตัวอ่อน และสามารถตรวจพบโปรตีน *Ov*-PGRN ในสารคัดหลั่งจากตัวเต็มวัยของพยาธิ มีการแสดงออกของโปรตีน *Ov*-PGRN ที่เซลล์ผนังลำตัวของพยาธิ เมื่อใช้เปปไทด์จำเพาะของโปรตีน *Ov*-PGRN บ่มกับเซลล์ท่อน้ำดีปกติพบว่าสามารถกระตุ้นเซลล์ท่อน้ำดีให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากผิดปกติ และเซลล์ท่อน้ำดีที่บ่มกับเปปไทด์จำเพาะของโปรตีน *Ov*-PGRN จะมีการแสดงออกของไซโตไคน์ส่งเสริมการอักเสบชนิดอินเตอร์ลิวคิน 6 และอินเตอร์ลิวคิน 8 สูงขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้บ่ม

สรุป: *Ov*-PGRN เป็นโมเลกุลที่แสดงออกในระยะต่างๆในวงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *O.viverrini* และมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์ท่อน้ำดีของคนมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากผิดปกติซึ่งเป็นกลไกการก่อโรคมะเร็งท่อน้ำดีจากพยาธิใบไม้ตับ

คำสำคัญ: ออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิ, พยาธิใบไม้ตับ, โปรกรานูลิน, เซลล์ท่อน้ำดี, ไซโตไคน์

Abstract

Background and Objective: Progranulin (PGRN) is a secreted glycoprotein growth factor with roles in wound healing, inflammation, angiogenesis and malignancy. An orthologue of the gene encoding human PGRN was identified in the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*.

Methods: Sequence structure, general characteristics and possible function of *Opisthorchis viverrini* PGRN (*Ov*-PGRN) were analyzed using bioinformatics. Expression profiles were investigated with quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), western blot and immunolocalization. A specific peptide of *Ov*-PGRN was used to investigate a role for this molecule in pathogenesis.

Results: The structure of the gene coding for *Ov*-PGRN was 36,463 base pairs in length, and comprised of 13 exons, 12 introns, and a promoter sequence. The *Ov*-PGRN mRNA is 2,768 base pairs in length and encodes 846 amino acids with a predicted molecular mass of 91.61 kDa. *Ov*-PGRN exhibited one half and seven complete granulin domains. Phylogenetic analysis revealed that *Ov*-PGRN formed its closest relationship with PGRN of liver flukes in the Opisthorchiidae. Transcripts of *Ov*-PGRN were detected in several developmental stages, with highest expression in the metacercaria, indicating that *Ov*-PGRN may participate as a growth factor in the early development of *O. viverrini*. Western blot analysis revealed the presence of detected *Ov*-PGRN in both soluble somatic or excretory/secretory products, and immunolocalization indicated high levels of expression in the tegument and parenchyma of the adult liver fluke. Co-culture of a human cholangiocyte cell line and a peptide fragment of *Ov*-PGRN stimulated proliferation of cholangiocytes and upregulation of expression of the cytokines interleukins 6 (IL6) and interleukins 8 (IL8).

Conclusion: *Ov*-PGRN is expressed throughout the life cycle of liver fluke, and likely plays a key role in development and growth of human cholangiocytes.

Keywords: *Opisthorchis viverrini*, liver fluke, progranulin, cholangiocyte, cytokines

Introduction

Infection with the food-borne liver fluke, *Opisthorchis viverrini* has been classified as a group 1 biological carcinogen by the International Agency for Research on Cancer[1,2]. In regions where liver fluke infection is endemic, opisthorchiasis is the principal risk factor for cholangiocarcinoma (CCA)[3]. Focusing on the contribution of the excretory and secretory products (ES) of *O. viverrini* to carcinogenesis, we targeted the *O. viverrini* granulin-like growth factor, *Ov*-GRN-1, a prominent component of the ES complement that induces phenotypic hallmarks of cancer. *Ov*-GRN-1 and other ES components including extracellular vesicles enter cholangiocytes, the epithelial cells that line the biliary tract, and drive cellular signaling that promotes carcinogenesis, including cellular proliferation and migration, angiogenesis and wound healing [4-6]. We have confirmed the role of *Ov*-GRN-1 in driving proliferation of bile duct epithelial cells (cholangiocytes) by genetic manipulation of its expression in the liver fluke both by ribonucleic acid interference (RNAi) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) gene knockout. Moreover, we have shown that infection of hamsters with the gene-edited, infectious stage of the liver fluke was feasible and that proliferation of biliary epithelia is markedly suppressed during infection with the ΔOv-GRN-1 (*Ov*-GRN-1 knockout) flukes[4,6-9].

The genome of *O. viverrini* encodes three granulin-like genes including progranulin (*Ov*-PGRN) and two opisthorchiid-specific granulins (*Ov*-GRN-1 and *Ov*-GRN-2) that were identified in *in silico* generated ES products of *O. viverrini* [10]. Mammalian progranulin has been studied in depth; it is a secreted glycoprotein comprised of multiple granulin domains. Each granulin domain shows 12 conserved cysteine granulin/epithelin modules[11,12]. Cleavage of the signal peptide releases the mature granulin, which can be further cleaved into a slew of active, 6 kDa peptides[13]. The granulin/epithelin module (GEM) itself (contained within each unit) and intact PGRN protein can both regulate cellular proliferation[14,15]. The majority of the granulin family members across the web of life are in a multi-domain form mostly commonly as multiple granulin domains, similar to PGRN.

Opisthorchis and related species are unusual with single domain granulin genes, the most studied form being *Ov*-GRN-1 which has been shown to promote cell proliferation and wound healing[8,16-18]. Human PGRN plays a notable role in stimulating cellular proliferation and inflammation, which in turn promotes tumor metastasis[13,19]. Human PGRN is essential for a range of organs, and mutations lead to dementia-like disease in the brain[20].

Notwithstanding that *Ov*-GRN-1 has been studied extensively, *Ov*-PGRN from any of the liver flukes has yet to be investigated. Here, we describe the characteristics of the *Ov*-PGRN protein and investigate the properties of a synthetic peptide of *Ov*-PGRN-1 that lacks identity to the orthologous human protein and induced proliferation of the H69 cholangiocyte cell line, a model for normal biliary tract epithelium, and induced expression of cholangiocyte proinflammatory cytokines.

Methods

Ethics statement

Hamsters were reared at the animal facility, faculty of Medicine, Khon Kaen university. Study design protocols and standard operating procedures were approved by the Animal Ethics Committee of Khon Kaen university according to the Ethics of Animal Experimentation of the National Research Council of Thailand, approval number IACUC-KKU-92/63.

Developmental stages of *O. viverrini*

O. viverrini metacercariae were isolated from infected cyprinid fishes from natural sources by pepsin digestion as described[21]. Newly excysted-juvenile flukes (NEJ) were prepared from the encysted metacercariae by incubation in 0.25% trypsin in 1X Phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 2X 200U/ml penicillin, 200 µg/ml streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) for five min at 37°C in 5% CO_2 in air, after which NEJs were separated from the discarded cyst walls using mechanical passage through a 24G gauge needle. Flukes were recovered from the biliary tract of Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) at 2 weeks and 6 weeks after infection with 50-100 metacercariae per hamster by intragastric intubation, to recover juvenile and adult stages of the helminth, respectively[22].

Somatic adult worm extract (SAE) and excretory-secretory (ES) antigen preparation

A soluble lysate of adult worms or somatic adult worm extract (SAE) was prepared from fresh or frozen and homogenized adult worms as described 8. Briefly, adult worms (~20 worms) recovered from infected hamsters (described above) were washed in cold normal saline solution (NSS) containing 100 µg/ml penicillin-streptomycin. The worms were frozen in liquid nitrogen and homogenized with glasses tissue grinder in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1X proteases inhibitor. Lysate was lysed with ultrasonic homogenizer with amplitude 20% at 20 pulses/min for 10 min and centrifuged 10,000Xg for 30 min at 4°C. Supernatant was collected and concentration of protein determined by spectrophotometry at 280 nm. SAE was aliquoted and kept at -80°C until used.

For preparation of the ES products of adult *O.viverrini*, the live adult worms (~200 worms) collected from experimental hamsters described above were washed in sterile NSS containing antibiotics (100 µg/ml penicillin-streptomycin) and transferred into Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 culture medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 1% glucose, antibiotics and proteinases inhibitors and maintained in culture medium (200 µl/fluke) at 37°C, under 5% CO_2 in air. After incubation for 24 hr, the medium containing ES products was removed, clarified by centrifugation at 3,000Xg at 4°C for 10 min, the supernatant was concentrated using Amicon 8,050 ultrafiltration cell (Amicon, Miami, FL) equipped with a YM10 membrane (cutoff, 10,000 daltons), dialyzed against PBS pH 7.4, and sterilized by 0.22 µm filtration. The protein concentration was measured as above after which aliquots were stored at -80°C[23].

Phylogenetic analysis

Progranulin protein sequences were retrieved from GenBank. Sequence homologies were analyzed using the basic local alignment search tool (BLAST) search program[24]. Signal peptide and cleavage site was predicted with SignalP - 5.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0). Promoter sequence and transcription site was predicted at https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html. Asparagines predicted to be N-glycosylation sites were analyzed at https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0. The protein sequences of PGRN from diverse taxa were retrieved and compared to PGRN of *O. viverrini* by ClustalW multiple sequences alignment analysis using BioEdit version 7.2.6 25,26. The phylogenetic tree of PGRN protein sequences was analyzed and constructed with Maximum likelihood method with Jones-Taylor-Thornton (JTT) model with 1,000 bootstrap replication by using software MEGA version 11.0[27]. Progranulin protein sequences in phylogenetic tree including THD19177.1 *Fasciola hepatica*, TPP59761.1 *Fasciola gigantica*, KAA0196540.1 Fasciolopsis buski, VDP74698.1 *Echinostoma*

caproni, CDS24124.1 *Echinococcus granulosus*, CDI98749.1 *Echinococcus multilocularis*, VUZ39807.1 *Hymenolepis diminuta*, CAH8605806.1 *Schistosoma intercalatum*, CAH8636088.1 *Schistosoma haematobium*, CAH8621661.1 *Schistosoma bovis*, XP_018648777.1 *Schistosoma mansoni*, CAX73857.1 *Schistosoma japonicum*, CAH8659303.1 *Dicrocoelium dendriticum*, KAA3673437.1 *Paragonimus westermani*, KAF6780227.1 *Paragonimus kellicotti*, KAF5405781.1 *Paragonimus heterotremus*, TGZ71538.1 *Opisthorchis felineus*, KAG5441482.1 *Clonorchis sinensis*, XP_009174632.1 *Opisthorchis viverrini*, KRX87044.1 *Trichinella pseudospiralis*, XP_003371171.1 *Trichinella spiralis*, XP_024506721.1 *Strongyloides ratti*, KHN88158.1 *Toxocara canis*, NP_492981.1 *Caenorhabditis elegans*, XP_035590678.1 *Oncorhynchus keta (chum salmon)*, XP_028930903.1 *Ornithorhynchus anatinus (platypus)*, AAI05335.1 *Bos Taurus* and NP_002078.1 *Homo sapiens*.

A liver fluke specific peptide fragment of PGRN

The peptide LQSKKDISDAHRMQC (amino acids position 627 – 641) designated "*Ov*-PGRN-L627C641" was selected because it appeared to be liver fluke PGRN-specific (does not share identity to human PGRN) and was predicted to be highly immunogenic in rabbits, and therefore suitable for raising a specific polyclonal antiserum. The peptide was synthesized and was used to generate the polyclonal anti-*O. viverrini* progranulin antibodies by immunizing New Zealand rabbits (Genscript, Piscataway, NJ).The peptides used in cell culture were evaluated for the presence of lipopolysaccharide (LPS) using a chromogenic LAL endotoxin assay kit (GenScript, Piscataway, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. A standard curve was generated using LPS concentrations ranging from 0.1-0.01 endotoxin units (EU) per ml (0.01-0.001 ng/ml) for sample measurement. The absorbance of the reaction was measured at 545 nm using a microplate reader (Varioskan™ LUX microplate reader, Thermo Scientific, Waltham, MA USA).

RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR

Total RNA of flukes was extracted with TRIZOL reagents (ThermoFisher Scientific, Burlington, MA) following the manufacturer's instructions, and contaminating genomic DNA was removed by treatment with DNase I (ThermoFisher Scientific, Rockfort, IL). The RNA concentration was measured by Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE). Complementary DNA (cDNA) was converted from 500 ng of flukes total RNA by using a RevertAid first strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) for qPCR templates. qPCR was performed with biological duplicate samples using a SYBR Green kit (Takara Bio USA, Inc., Mountain View, CA) in a thermal cycler (Light Cycler 480 II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Each qPCR reaction consists of 1 µL of cDNA, 10 µL SYBR Green Master Mix, 10 mM forward and reverse primers for specific *Ov*-PGRN gene (forward primer, Ov-PGRN-out-f: 5'-TGTCGGTTC-GGGATCCATTG and reverse primer, Ov-PGRN-rev: 5'-ACTTACATTAACGAAAGGACAGC), and distilled water to a final volume of 20 µL. The thermal cycle was started with a single initiation cycle at 95°C for 10 min. The cycle was followed by 40 cycles quantification mode of PCR, each PCR cycle consists of denaturation at 95°C for 15 sec, annealing at 53°C, single acquisition mode for 30 sec, and extension at 72°C for 30 sec. After the final PCR step, the specificity of the real-time PCR reaction was confirmed using melting curve analysis. The evaluation of PGRN expression was performed by relative gene expression analysis using housekeeping genes. The endogenous actin gene (GenBank EL620339.1) was used as a reference control[28]. The control group was prepared the same qPCR

reaction as described above except for the difference in a pair of primers for liver fluke actin gene instead (forward primer, *Ov*-actin-F1: 5'-AGCCAACCGAGAGAAGATGA, and reverse primer *Ov*-actin-R1: 5'-ACCTGACCATCAGG-CAGTTC). The relative *Ov*-PGM mRNA expression from different developmental stages of *O. viverrini*, the fold change (R) was calculated by, $2^{-\Delta Ct}$ where ΔCt = Ct value of *Ov*-PGM – Ct of value *Ov*-actin[29].

Western blot analysis

To detect PGRN in somatic adult worm extract and ES product of *O. viverrini*, 2 µg of SAE and 5 µg ES products were separated in 15 % SDS-PAGE and probed with anti-*Ov*-PGRN-L627C641 peptide. In brief, electrophoresed proteins were transblotted onto nitrocellulose membrane, after which the membrane was cut into strips and blocked for non-specific binding with 5 % skim milk in PBST for 1 hr. The membranes were first incubated overnight with purified polyclonal anti-*O.viverrini* progranulin antibodies generated by immunizing a New Zealand rabbit with the peptide *Ov*-PGRN-L627C641 (see above) at dilution 1:300 then incubated for 120 min in goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (MerkMillipore, Tumecula, CA) diluted 1:2,000 in PBST. After additional washes with PBST, the membrane was exposed to enhanced chemiluminescence reagent (MerckMillipore, Billerica, MA) and reactive signals visualized using autoradiography using Kodak BioMax film (Millipore Sigma, Burlington, MA)

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded sections of adult *O. viverrini* were de-paraffinized using xylene. Sections were rehydrated in an ethanol series, serial solution, with two incubations for each stage; 100%, 90%, 80% and 70% ethanol, 5 min each. Sections were immersed in citrate buffer (pH 6) and autoclaved for 10 min for antigen unmasking, followed by blocking with 3% H_2O_2 in methanol. Thereafter they were incubated overnight at 4°C in rabbit anti-*Ov*-PGRN-L627C641 peptide sera diluted 1:10, or pre-immunized rabbit IgG in PBS. Sections were probed with anti-rabbit IgG Fc monoclonal secondary antibody (HRP conjugate) (GenScript, Cat. No. A01856, Piscataway, NJ) diluted 1:1,000 in PBS. Peroxidase reaction products were visualized with 3, 3′-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Counterstaining was performed with Mayer's hematoxylin for 5 min. A positive signal was indicated by a reddish-brown color under light microscopy.

Cellular proliferation

The human cholangiocyte cell line, H69 was maintained as described[30]. H69 cells were cultured in the presence of the *Ov*-PGRN-L627C-641specific peptide. Briefly, 1.5×10^3 H69 cells were seeded into wells of a 24 well cell culture plate (SPL Life Sciences, Korea) and cultured with complete medium for 24 hr. Complete medium is defined as Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham-F12 supplemented with 100 u/ml penicillin-streptomycin, 25 µg/ml adenine, 5 µg/ml insulin, 1 µg/ml epinephrine, 13.6 ng/ml T3-T, 10 ng/ml epidermal growth factor and 0.62 µg/ml hydrocortisone, sterile-filtered through a 0.22 µm membrane, and then 10% fetal bovine serum was added[31]. Cells were then fasted for 4–6 hr in low growth factor media (DMEM/Ham-F12 supplemented with 100 U/ml penicillin-streptomycin with one-twentieth of the growth factor contents of complete media). The cells were cultured with 0.8 and 1.6 µM PGRN peptide, or 0.2 µM recombinant *Ov*-GRN-1 [8,9], or vehicle control PBS in low growth factor media for 24 and 48 hours. The viable cell number was determined using an tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay with absorbance 570 nm as per manufacturer's

instructions (Invitrogen, Oregon, USA). The three replicate experiments were assayed for each condition. Cell number was determined at 570 nm using a plate reader (Asys UVM340, Biochrom, Cambridge, UK). The concentrations were established using a standard curve before transforming into relative proliferation compared to control groups. Cell proliferation assays were carried out in triplicate. The data were presented as the mean ± SE of three independent replicates using GraphPad Prism software. One-way ANOVA with a post-hoc tukey test was used for statistical significance comparison. $p \leq 0.05$.was considered to be statistically significant.

IL-6 and IL-8

IL-6 and IL-8 gene expression levels from the H69 cholangiocyte cell line co-cultured with *Ov*-PGRN specific peptide was measured by qRT-PCR. Briefly, H69 cells were treated with *Ov*-PGRN specific peptide as described above and subsequently total RNA of harvested cells incubated with 0.8, 1.6 μM of *Ov*-PGRN specific peptide was extracted using TriZol®Reagent following company instructions (ThermoFisher Scientific, Burlington, MA). 500 ng of total RNA was converted to cDNA by using a RevertAid first strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) for qPCR templates. cDNA was amplified using PCR with gene-specific primers designed to amplify a portion of the coding sequences. qPCR was performed with biological duplicate samples using a SYBR Green kit (Maxima SyBr green qPCR master mix, ThermoFisher Scientfic, Vilnius, EU) in a thermal cycler (Light Cycler 480 II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Detail of primer sequences for IL-6 (forward; 5'-ACCCCTGACCCAACCACAAAT-3', reverse; 5'-CCTTAAAGCTGCGCAGAATGAGA-3'), IL-8 (forward; 5'-GTGCAGTTTTGCCAAGGAGT-3', reverse; 5'-CTCTGCACCCAGTTTTCCTT-3')[31]. The gene expressions were normalized with internal control using Beta-actin (forward; 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA, reverse; 5'AGCACTGTGTTGGCGTACAG)28.PCR reactions consisted of 12.5 μl of SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific, Vilnius, EU), 0.5 μl (10 mM) each of forward and reverse primers, 1 μl (equivalent to 50 ng of total RNA) of first- stand cDNA and water to a final volume of 25 μl. PCR cycling conditions consisted of initiation with pre-heat for one cycle at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, extension at 72°C for 45 sec, and a final extension at 72°C for 10 min. Data are presented as the mean ± standard error. Differences between groups were assessed using Student's t-test (GraphPad Prism Software, www.graphpad.com); $p \leq 0.05$. was considered statistically significant.

Results

Characteristics of *Ov*-PGRN

The genomic sequence of *Ov*-PGRN was identified from the whole genome shotgun sequence database (Nucleotides 46,266-9,212 of GenBank Sequence ID: JACJ01021739.1)[10]. The genomic structure of *Ov*-PGRN was 36,463 nucleotides composed of 13 exons and 12 introns with an upstream promoter which is compatible with the expression of this gene (Fig. 1A). The *Ov*-PGRN mRNA sequence was identified from a partial mRNA sequence encoding a hypothetical protein (GenBank accession number XM_009176368)[10]. The mRNA sequence is 2,768 bp in length and encoded 846 amino acids with a signal peptide containing a predicted cleavage site between amino acids 38 and 39: VLS-GD. *Ov*-PGRN contains specific characteristics of one half and seven complete and highly conserved 12-cysteine granulin/epithelin motifs: C(X5-7)C(X5)CC(X7-9)CC(X5-6)CCXDXHCCP(X4)C(X4-6)C 11 (Fig. 1A and B). The individual granulin/epithelin motifs (A-G) show sequence similarities between 53-67%.

Phylogenetic relationship of *Ov*-PGRN and other PGRNs from various species indicated that *Ov*-PGRN formed the closest relationship with PGRN of the closely related carcinogenic flukes *Clonorchis sinensis* and *O. felineus* (Fig. 2). PGRN formed major branches in which the platyhelminthes, nematoda, and vertebrata all grouped within their clades.

Progranulin is highly expressed in distinct developmental stages of *O. viverrini*

The developmental expression profile of *Ov*-PGRM in *O. viverrini* was evaluated using quantitative RT-PCR, and protein expression profile was assessed using immunohistochemistry. *Ov*-PGRM mRNA was expressed in metacercaria, NEJ, J2W and adult fluke (Fig. 3). The highest *Ov*-PGRN gene expression level was shown in metacercaria and the lowest levels were in NEJ, J2W and adult, respectively (Fig. 3A). Western blot analysis detected a band of 100-110 kDa, slightly larger than the expected size of *Ov*-PGRN (92 kDa) in both worm lysate and ES products (Fig. 3B). The greater observed size is likely due to the 10 putative N-linked glycosylation sites identified in the predicted protein.

Immunohistochemical localization of the liver of infected hamster probed with rabbit anti-*Ov*-PGRN-L627C641 peptide revealed expression of *Ov*-PGRN on the tegument, parenchymal and eggs in the uterus of the adult fluke in hamster bile ducts (Fig. 4). The signal also was detected in bile duct cells of the infected hamster (Fig. 4).

Effect of *Ov*-PGRN peptide on human bile duct cell proliferation

Endotoxin in *Ov*-PGRN-L627C641 peptide used in cell culture was measured using LAL assay. The result showed that the LPS concentration in 0.8 and 1.6 μM of *Ov*-PGRN-L627C641 peptide was 0.003 ng/ml and 0.002 ng/ml respectively. These values fall within the acceptable range for cell culture, as outlined by the manufacturer's instructions.

H69 cells were incubated with 0.8 and 1.6 μM of *Ov*-PGRN-L627C641 peptide and cell proliferation was measured with the MTT assay at 24 and 48 h. H69 cells incubated with 0.2 μM of Ov-GRN-1 and culture media were used as a control groups. The results showed that H69 cells incubated with 0.8 and 1.6 μM of *Ov*-PGRN-L627C641 peptide underwent significantly increased cell proliferation only at 48 hrs (160 and 180%, respectively) when compared with culture media alone control (Fig. 5B). H69 cells incubated with 0.2 μM of *Ov*-GRN-1 recombinant protein also underwent significantly increased cell proliferation when compared with culture media alone, as described previously[9].

Pulsing cholangiocytes with *Ov*-PGRN peptide-stimulated expression of IL6 and IL8

To evaluate the inflammatory cytokine production that occurs in response to *Ov*-PGRN stimulation. The response of cultured human bile duct cell lines to *Ov*-PGRN-L627C641 peptide stimulation was investigated. Quantitative RT-PCR was applied to evaluate the mRNA expression level of cytokine from the cells. H69 cells were incubated with 0.8 and 1.6 μM of *Ov*-PGRN-L627C641 peptide. The relative expression was compared with actin housekeeping gene. The mRNA expression levels of IL-6 and IL-8 were slightly increased in H69 cells incubated with either 0.8 or 1.6 μM of *Ov*-PGRN -L627C641 peptide at 48 h incubation compared to controls without peptide (Fig. 6).

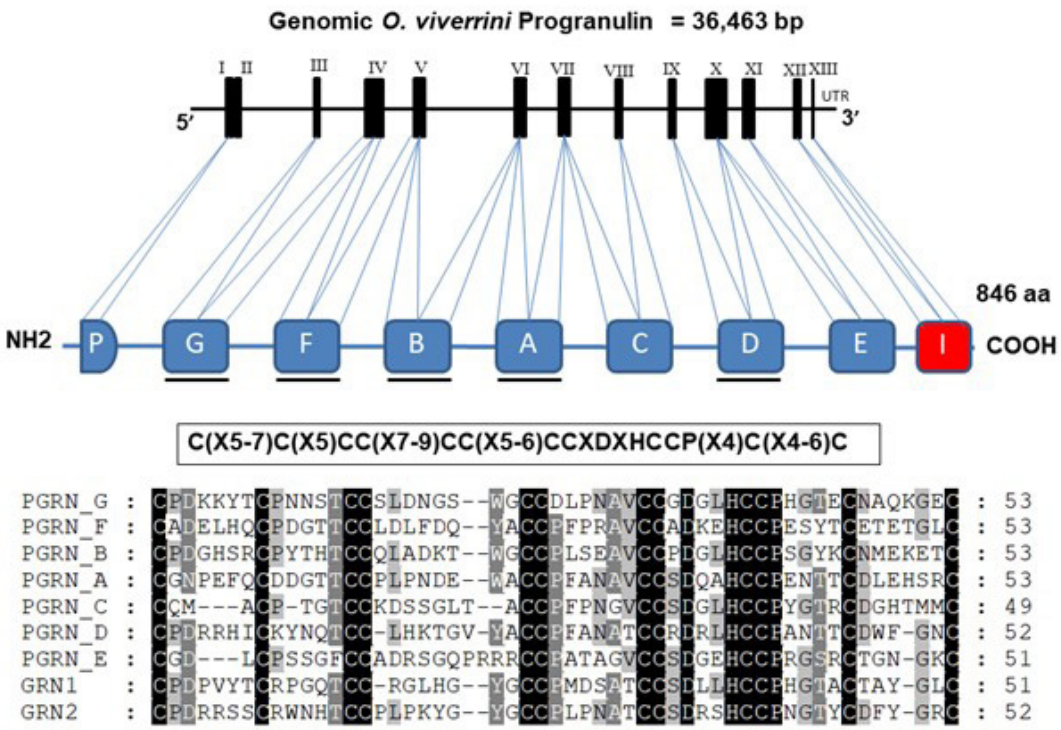


Figure 1 Secondary structure of *O. viverrini* progranulin gene and protein. (A) Structure of genomic sequence of *Ov*-PGRN consists of 13 exons and 12 introns and the schematic of *Ov*-PGRN protein composed of seven and a half repeats of the granulin/epithelin motif. One half granulin domain is indicated with a P, and the 7 complete granulin domains were designated A to G. Consensus sequences of 12-cysteine granulin/epithelin motif, C(X5-7) C(X5)CC(X7-9)CC(X5-6)CCXDXHCCP(X4)C(X4-6)C was identified in the complete domains A to G. An incomplete granulin/epithelin motif with 10-cysteine in exon 12-13 is indicated with I. Position of Ov-PGRN specific peptide (*Ov*-PGRN-L627C641) is indicated with black star between domain D and E. (B) Multiple sequence alignment of single granulin motif A to G compared with *Ov*-GRN-1 and *Ov*-GRN-2.

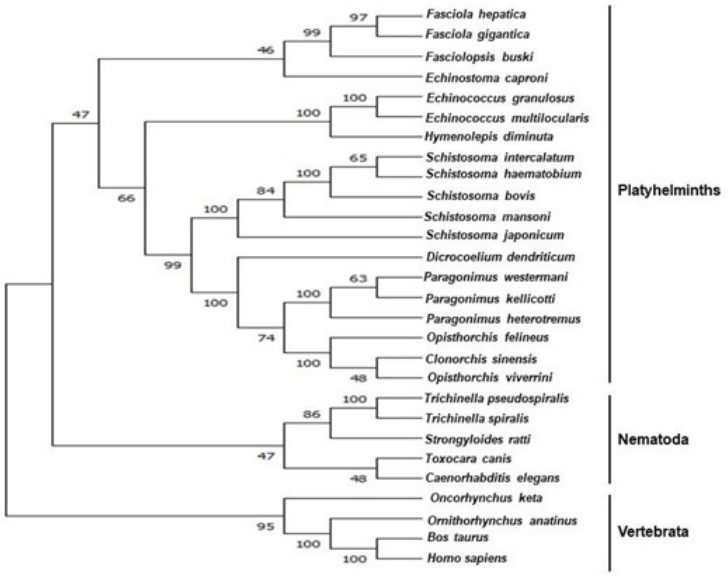


Figure 2 Maximum likelihood tree showing the relationship between progranulin of *O. viverrini* and homologous progranulin protein sequences from various helminths and vertebrates. Bootstrap values of 1,000 replicates are provided at the nodes of the branches.

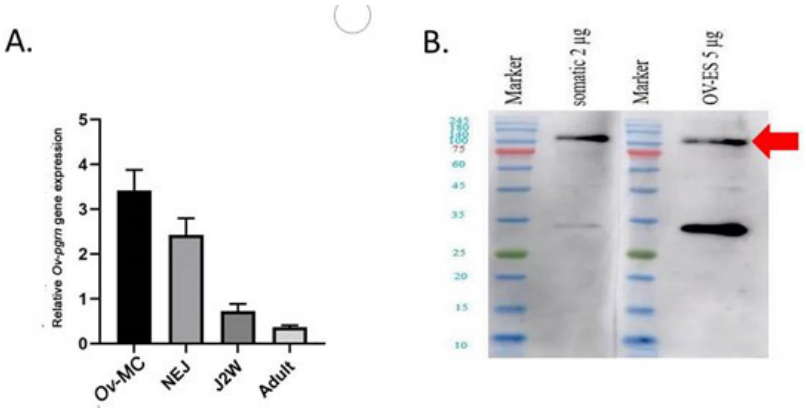


Figure 3 Detection of *Ov*-PGRN gene and *Ov*-PGRN protein in *O. viverrini*. (A) Relative expression by RT-qPCR of Ov-pgrn gene in adult, 2 weeks old fluke (J2W), newly excysted juvenile (NEJ) and metacercaria (*Ov-MC*). The evaluation of *Ov*-PGRN expression was performed by relative gene expression analysis using endogenous actin gene as a reference. (B) Detection of *O. viverrini* PGRN by western blot. Western blot shows somatic adult extract, SAE (2 ug) and ES (5 ug) from adult fluke on nitrocellulose membrane probed with anti-*Ov*-PGRN-L627C641 peptide followed by HRP-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody. A specific band was detected for progranulin/PGRN at approximately 92 kDa (as indicated by arrow). Molecular weight marker (MW) is indicated.

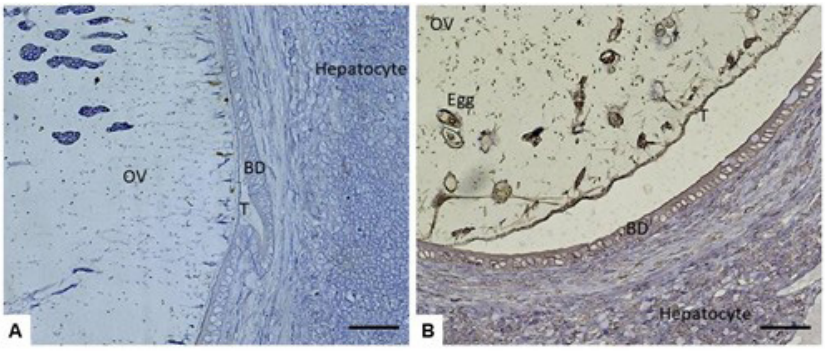


Figure 4 Immunohistochemical localization of *Ov*-PGRN in adult *O. viverrini*. Thin histological sections of adult *O. viverrini* in the bile ducts of infected hamsters probed with (A) with control IgG and (B) probed with rabbit anti-*Ov*-PGRN-L627C641 peptide. OV = worm, BD = bile duct epithelium, T= tegument. Scale bar = 50 µm.

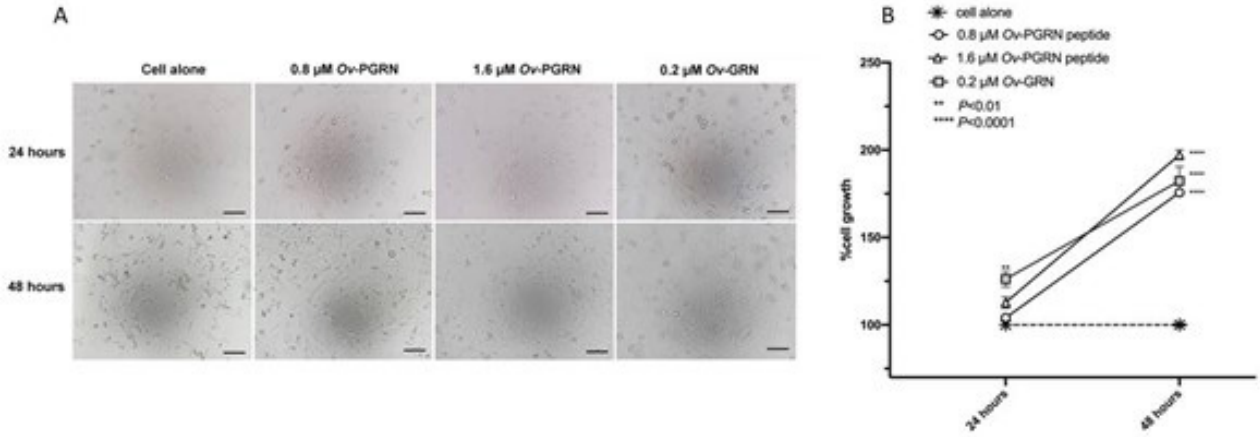


Figure 5 *Opisthorchis viverrini* progranulin peptide stimulates the proliferation of human cholangiocytes in *vitro.* H69 cells were incubated with 0.8 and 1.6 µm of *Ov*-PGRN synthetic peptide and observed cell relative proliferation at 24 and 48 h. Recombinant Ov-GRN-1 expressed from *E. coli* and refolded to an active form at 0.2 µm to stimulate cell proliferation is a positive control. (A) H69 cholangiocytes cultured in the presence or absence of progranulin peptide. Scale bar is 50 µm. (B) Percent cell proliferation from different concentrations of peptide on human H69 cholangiocytes using the MTT assay. Error bars reveal the standard error of triplicate biological replicates. The symbols ** and **** denote statistical significance at the level of $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.0001$, respectively.

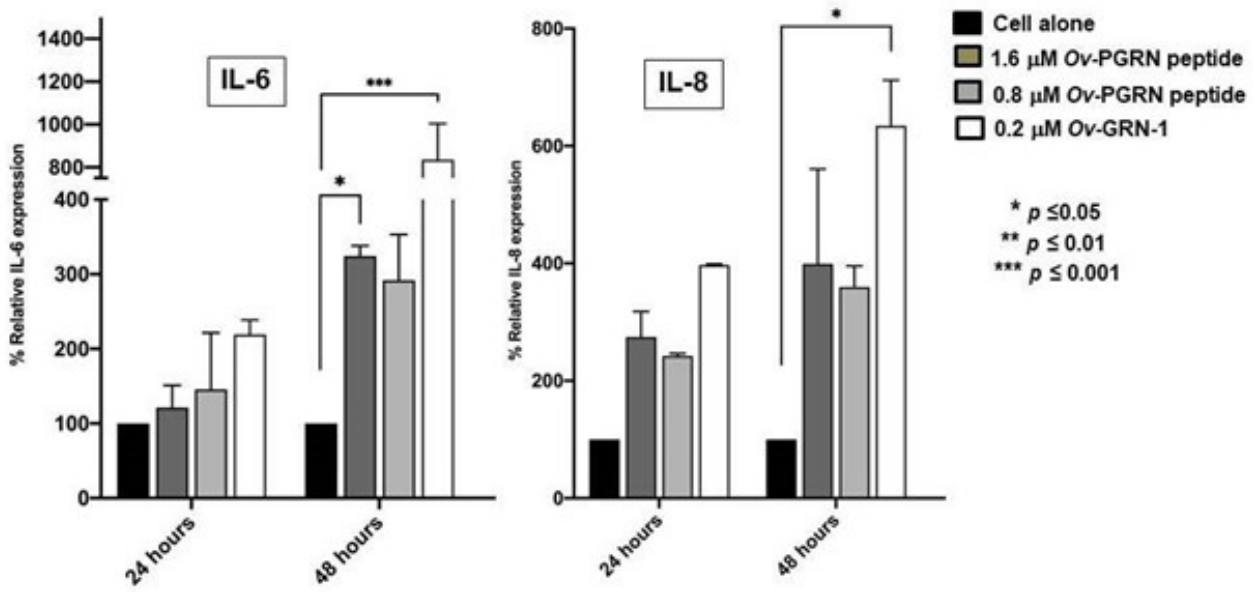


Figure 6 Quantitative RT-PCR detecting relative gene expression levels of IL6 and IL8 in human cholangiocytes, H69 incubated with *Ov*-PGRN -L627C641 peptide. The *O.viverrini* actin gene was used as an internal control. *, **, *** Denoted statistical significance at the level of p ≤ 0.05, p ≤ 0.01 and ≤ 0.001, respectively.

Discussion

It has been well established that *Ov*-GRN-1, liver fluke granulin, stimulates proliferation of cholangiocytes lining the biliary tract 7,8,32. The genome of *O. viverrini* contains two genes encoding single granulin domains termed *Ov*-GRN-1 and *Ov*-GRN-2 and also the multiple granulin domain gene, *Ov*-PGRN[10.] The *Ov*-PGRN glycoprotein exhibits homology to human progranulin which has seven and a half conserved granulin domains[11,20]. Here, we described the intact progranulin from the genome of *O. viverrini*, which we predict consists of one half and seven complete tandem repeats of a 12-cysteine module granulin domain and one incomplete granulin domain. In addition, we describe the predicted structure and likely roles of the liver fluke PGRN.

The *O. viverrini* PGRN showed typical characteristics of the repeat granulin motif. PGRN from other species stimulate cellular proliferation when intact or when cleaved into single granulin units[20,33]. Detection of PGRN transcripts in larval and adult stages of *O.viverrini* revealed that intact PGRN is active. Adult liver flukes graze on the biliary epithelium where they secrete ES products and stimulate a biliary mucosal immune response. Cell-mediated immune responses were investigated and showed that the animal infected with *O. viverrini* has granulomatous inflammation of bile duct by modified macrophage[23]. IL-6 and IL-8 were increased in hamster and human with hepatobiliary abnormalities[34-36].Treatment with PGRN showed decreasing of liver fibrosis and inflammation in mice and macrophage[37]. While intact human PGRN showed evidence of suppresses inflammation by blocking TNF-α receptors and signaling[13]. Proteolytic enzymes degrade PGRN to granulin domain peptides which may enhance inflammation by stimulating the secretion of the chemokine IL-8[13]. Our findings revealed that *Ov*-PGRN peptide increase expression of IL-6 and IL-8 that may involve inflammation of bile duct. We note that access to the genomic structure included the sequences of the introns and exons of *Ov*-PGRN gene will facilitate for programmed gene editing and functional genomics analysis, in like fashion to our studies of *Ov*-GRN-1[7].

The excretory and secretory molecules of the parasite directly promoting cell proliferation, both innate and adaptive host inflammatory responses in chronic infection contribute to infection-induced malignancy[38]. Molecules in ES products stimulate naïve T-cell with Toll-like receptor 4 signaling and express IL6 and IL8[31]. Upregulation of the proinflammatory transmembrane molecule, TLR4, has been reported in cholangiocytes (H69 cells) cocultured with ES products of *O.viverrini*[31]. TLR4 overexpression has also been observed in the biliary epithelium of *O. viverrini* infected humans in situ. The parasite products also induce IkB-a degradation in a MyD88-dependent manner and activate nuclear factor kappa B nuclear translocation, leading to the increased expression and secretion of the strong chemoattractant chemokine IL-8 and proinflammatory cytokine IL-6[31]. TLR4 is a transmembrane protein, member of the toll-like receptor family, which belongs to the pattern recognition receptor (PRR) family. Its activation leads to an intracellular signaling pathway NF-KB and inflammatory cytokine production which is responsible for activating the innate immune system.

Conclusion

These results demonstrated that *Ov*-PGRN stimulated human cholangiocytes and initiate innate mucosal immunity/inflammatory via TLR4 pathway. Given that progranulin of the *O. viverrini* was identified in ES product and seems involved in proliferation and inflammation, future research should explore if *Ov*-PGRN is involved in carcinogenesis similar to the single granulin protein, *Ov*-GRN-1.

Acknowledgments

We thank the laboratory staff of the Department of Parasitology and Tropical Medicine Graduate program, Faculty of Medicine, Khon Kaen University for technical support.

Funding

This study was supported by the National Cancer Institute, National Institutes of Health, award R01 CA164719 (TL, AL, MJS, and PJB) and Research and Graduate Studies, Khon Kaen University (TL and SC).

References

1. IARC. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2012;100(Pt B):1-441.
2. Brindley PJ, Loukas A. Helminth infection-induced malignancy. PLoS Pathog 2017;13(7):e1006393. doi.org/10.1371/journal.ppat.1006393.
3. Brindley PJ, Bachini M, Ilyas SI, Khan SA, Loukas A, Sirica AE, et al. Cholangiocarcinoma. Nat Rev Dis Primers 2021;7(1):65. doi.org/10.1038/s41572-021-00300-2.
4. Haugen B, Karinshak SE, Mann VH, Popratiloff A, Loukas A, Brindley PJ, et al. Granulin secreted by the food-borne liver fluke *Opisthorchis viverrini* promotes angiogenesis in human endothelial cells. Front Med (Lausanne) 2018;5:30. doi.org/10.3389/fmed.2018.00030.
5. Chaiyadet S, Sotillo J, Krueajampa W, Thongsen S, Smout M, Brindley PJ, et al. Silencing of *Opisthorchis viverrini* tetraspanin gene expression results in reduced secretion of extracellular vesicles. Front Cell Infect Microbiol 2022;12:827521. ddoi.org/10.3389/fcimb.2022.827521.
6. Chaiyadet S, Tangkawattana S, Smout MJ, Ittiprasert W, Mann VH, Deenonpoe R, et al. Knockout of liver fluke granulin, *Ov*-GRN-1, impedes malignant transformation during chronic infection with *Opisthorchis viverrini*. PLoS Pathog 2022;18(9):e1010839. doi.org/10.1371/journal.ppat.1010839.

7. Arunsan P, Ittiprasert W, Smout MJ, Cochran CJ, Mann VH, Chaiyadet S, et al. Programmed knockout mutation of liver fluke granulin attenuates virulence of infection-induced hepatobiliary morbidity. Elife 2019;8: e41463. doi.org/10.7554/eLife.41463.

8. Smout MJ, Laha T, Mulvenna J, Sripa B, Suttiprapa S, Jones A, et al. A granulin-like growth factor secreted by the carcinogenic liver fluke, Opisthorchis viverrini, promotes proliferation of host cells. PLoS Pathog 2009;5(10):e1000611. doi.org/10.1371/journal.ppat.1000611.

9. Smout MJ, Sotillo J, Laha T, Papatpremsiri A, Rinaldi G, Pimenta RN, et al. Carcinogenic parasite secretes growth factor that accelerates wound healing and potentially promotes neoplasia. PLoS Pathog 2015;11(10):e1005209. doi.org/10.1371/journal.ppat.1005209.

10. Young ND, Nagarajan N, Lin SJ, Korhonen PK, Jex AR, Hall RS, et al. The *Opisthorchis viverrini* genome provides insights into life in the bile duct. Nat Commun 2014;5:4378. doi.org/10.1038/ncomms5378.

11. Palfree RG, Bennett HP, Bateman A. The evolution of the secreted regulatory protein progranulin. PLoS One 2015;10(8):e0133749. doi.org/10.1371/journal.pone.0133749.

12. Bhandari V, Bateman A. Structure and chromosomal location of the human granulin gene. Biochem Biophys Res Commun 1992;188(1):57-63. doi.org/10.1016/0006-291x(92)92349-3.

13. Toh H, Chitramuthu BP, Bennett HP, Bateman A. Structure, function, and mechanism of progranulin; the brain and beyond. J Mol Neurosci 2011;45(3):538-48. doi.org/10.1007/s12031-011-9569-4.

14. He Z, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. J Mol Med (Berl) 2003;81(10):600-12. doi.org/10.1007/s00109-003-0474-3.

15. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. Cell 2002;111(6):867-78. doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01141-8.

16. Bansal PS, Smout MJ, Wilson D, Cobos Caceres C, Dastpeyman M, Sotillo J, et al. Development of a potent wound healing agent based on the liver fluke granulin structural fold. J Med Chem 2017;60(10):4258-66. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00047.

17. Dastpeyman M, Bansal PS, Wilson D, Sotillo J, Brindley PJ, Loukas A, et al. Structural variants of a liver fluke derived granulin peptide potently stimulate wound healing. J Med Chem 2018;61(19):8746-53. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00898.

18. Wang C, He Q, Yin Y, Wu Y, Li X. *Clonorchis sinensis* granulin promotes malignant transformation of hepatocyte through EGFR-mediated RAS/MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling pathways. Front Cell Infect Microbiol 2021;11:734750. doi.org/10.3389/fcimb.2021.734750.

19. Petkau TL, Leavitt BR. Progranulin in neurodegenerative disease. Trends Neurosci 2014;37(7):388-98. doi.org/10.1016/j.tins.2014.04.003.

20. Bateman A, Bennett HP. The granulin gene family: from cancer to dementia. Bioessays 2009;31(11):1245-54. doi.org/10.1002/bies.200900086.

21. Pinlaor S, Onsurathum S, Boonmars T, Pinlaor P, Hongsrichan N, Chaidee A, et al. Distribution and abundance of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in cyprinid fish in Northeastern Thailand. Korean J Parasitol 2013;51(6):703-10. doi.org/10.3347/kjp.2013.51.6.703.

22. Sripa B, Kaewkes S. Gall bladder and extrahepatic bile duct changes in *Opisthorchis viverrini*-infected hamsters. Acta Trop 2002;83(1):29-36. doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00052-9.

23. Sripa B, Kaewkes S. Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. Int J Parasitol 2000;30(6):735-40. doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00054-0.

24. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990;215(3):403-10. doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

25. Hall T. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 1999;41:95-8.

26. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 1994;22(22):4673-80.

27 Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Mol Biol Evol 2021;38(7):3022-7. doi.org/10.1093/molbev/msab120.

28. Papatpremsiri A, Smout MJ, Loukas A, Brindley PJ, Sripa B, Laha T. Suppression of Ov-GRN-1 encoding granulin of *Opisthorchis viverrini* inhibits proliferation of biliary epithelial cells. Exp Parasitol 2015;148:17-23. doi.org/10.1016/j.exppara.2014.11.004.

29. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc 2008;3(6):1101-8. doi.org/10.1038/nprot.2008.73.

30. Arunsan P, Chaidee A, Cochran CJ, Mann VH, Tanno T, Kumkhaek C, et al. Liver fluke granulin promotes extracellular vesicle-mediated crosstalk and cellular microenvironment conducive to cholangiocarcinoma. Neoplasia 2020;22(5):203-16. doi.org/10.1016/j.neo.2020.02.004.

31. Ninlawan K, O'Hara SP, Splinter PL, Yongvanit P, Kaewkes S, Surapaitoon A, et al. *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory products induce toll-like receptor 4 upregulation and production of interleukin 6 and 8 in cholangiocyte. Parasitol Int 2010;59(4):616-21. doi.org/10.1016/j.parint.2010.09.008.

32. Wang C, Lei H, Tian Y, Shang M, Wu Y, Li Y, et al. *Clonorchis sinensis* granulin: identification, immunolocalization, and function in promoting the metastasis of cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. Parasit Vectors 2017;10(1):262. doi.org/10.1186/s13071-017-2179-4.

33. Abella V, Pino J, Scotece M, Conde J, Lago F, Gonzalez-Gay MA, et al. Progranulin as a biomarker and potential therapeutic agent. Drug Discov Today 2017;22(10):1557-64. doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.006.

34. Sripa B, Mairiang E, Thinkhamrop B, Laha T, Kaewkes S, Sithithaworn P, et al. Advanced periductal fibrosis from infection with the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini* correlates with elevated levels of interleukin-6. Hepatology 2009;50(4):1273-81. doi.org/10.1002/hep.23134.

35. Sripa B, Thinkhamrop B, Mairiang E, Laha T, Kaewkes S, Sithithaworn P, et al. Elevated plasma IL-6 associates with increased risk of advanced fibrosis and cholangiocarcinoma in individuals infected by *Opisthorchis viverrini*. PLoS Negl Trop Dis 2012;6(5):e1654. doi.org/10.1371/journal.pntd.0001654.

36. Sripa B, Jumnainsong A, Tangkawattana S, Haswell MR. Immune response to *Opisthorchis viverrini* infection and its role in pathology. Adv Parasitol 2018;102:73-95. doi.org/10.1016/bs.apar.2018.08.003.

37. Yoo W, Lee J, Noh KH, Lee S, Jung D, Kabir MH, et al. Progranulin attenuates liver fibrosis by downregulating the inflammatory response. Cell Death Dis 2019;10(10):758. doi.org/10.1038/s41419-019-1994-2.

38. Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M, et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. PLoS Med 2007;4(7):e201. doi.org/10.1371/journal.pmed.0040201.

SMJ

นิพนธ์ต้นฉบับ . Original Article

การยับยั้งโอกลุคแนคทรานสเฟอเรสเพิ่มความไวต่อยาของเมลาโนมา

นพกมล กาญจนางกูร[1], ภาณุพงศ์ มหาลาภบุตร[1], สุกัญญา เลือง[1], วันชนะ สืบไวย[2,3], วรศักดิ์ แก้วก่อง[4], โสพิศ วงศ์คำ[1,3], อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์[1,3],*
[1]สาขาวิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2]สาขาวิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[3]ศูนย์การแพทย์ปริวรรต คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[4]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Suppression of O-GlcNAc Transferase Enhances Drug Sensitivity of Melanoma

Nopkamol Kanchanangkul[1], Panupong Mahalapbutr[1], Sukanya Luang[1], Wunchana Seubwai[2,3], Worasak Kaewkong[4], Sopit Wongkham[1,3], Atit Silsirivanit[1,3,*]
[1] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand
[2] Department of Forensic Medicine, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Thailand
[3] Center for Translational Medicine, Khon Kaen University, Thailand
4 Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Thailand

Abstract

Background and Objective: O-GlcNAcylation is an important O-linked glycosylation of nucleocytoplasmic proteins with a single molecule of N-acetylglucosamine. Aberrant O-GlcNAcylation was found to promote the development and progression of cancer. In this study, we have explored the role of O-GlcNAcylation in melanoma progression.

Methods: O-GlcNAcylation in MNT-1, a malignant melanoma cell line, was suppressed by a specific siRNA against N-acetylglucosaminyltransferase (OGT), compared with siControl. Cell proliferation and drug sensitivity were measured by SRB assay. Western blotting and immunofluorescent staining were used to determine the level of O-GlcNAcylated proteins (OGP). The molecular mechanism was explored by Western blotting.

Results: The level of OGP in MNT-1 was drastically reduced after treatment with siOGT compared with control siRNA (siControl). Knockdown of OGT significantly suppressed the cell proliferation ability of MNT-1 via inhibition of the Akt signaling pathway. The drug sensitivity assay revealed the synergistic effect of siOGT with cisplatin against MNT-1 melanoma cells, suggesting the potential of using OGT suppression for cisplatin sensitization for melanoma treatment.

Conclusions: This study has provided evidence to improve melanoma therapy via targeting O-GlcNAcylation, which is identified to be involved in melanoma cell proliferation and chemoresistance.

Keywords: O-GlcNAc transferase, O-GlcNAcylation, drug-sensitivity, melanoma

*Correspondence: Atit Silsirivanit, E-mail: atitsil@kku.ac.th

Introduction

Glycosylation, the post-translational modification of proteins and lipids by oligosaccharides, is an important process involved in many biological functions. Alteration of glycosylation is considered a hallmark of cancer, which play significant roles in tumor development, progression, and therapeutic resistance.[1,2] O-GlcNAcylation is a reversible O-linked glycosylation of proteins with a single molecule of N-acetylglucosamine (GlcNAc). This dynamic addition and removal of O-GlcNAc on serine or threonine residue of nucleocytoplasmic proteins are regulated by the function of O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA), respectively.[3] O-GlcNAcylation is a critical regulatory mechanism influencing various cellular processes, including transcription, signaling, protein stability, and cellular metabolism.[4,5] Dysregulation of O-GlcNAcylation has been implicated in many human diseases, including cancer. Aberrant O-GlcNAcylation was observed in various cancer types, and it exhibited a high impact on tumor igenesis, cancer progression, and therapeutic response.[4,6] O-GlcNAcylation was found to promote tumor progression by several mechanisms, such as increased cell proliferation, evasion of cell death, and angiogenesis.[7,8] Emerging evidence suggests that O-GlcNAcylation plays a crucial role in modulating drug sensitivity in leukemia, breast and liver cancer.[9]

In this study, we have explored the role of O-GlcNAcylation in melanoma progression. Specific siRNA against OGT was used to suppress the O-GlcNAcylation in MNT-1 melanoma cell line. Cell proliferation and chemosensitivity were measured after O-GlcNAcylation suppression. The information provided in our study may strengthen our understanding of melanoma biology and might be used as a basic knowledge for improvement of melanoma treatment in the future.

Material and methods

Melanoma cell line

MNT-1, a malignant melanoma cell line obtained from ATCC cell bank, was maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% heated inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY) and 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, Grand Island, NY). Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator and sub-cultured every 3 days using 0.25% w/v trypsin/EDTA.

Cell proliferation assay

The MNT-1 cells were seeded (10,000 cells/well) and overnight cultured in 24 well-plate, followed by transfection with 50 pmole of specific siRNA against OGT (siOGT, target sequence: 5'-GCGUGUUCCCAAUAGU-GUAtt-3') or negative siRNA control (siControl, Qiagen, Hilden, Germany) using lipofectamine-2000 (Invitrogen Corporation, Grand Island, NY) with the manufacture's recommendation. Cell proliferation was determined at 24, 48, and 72 hour after treatment using the sulforhodamine B (SRB) assay.[10] Briefly, the cells were fixed by cold 10% trichloroacetic acid (TCA) for 30 minutes (min) and washed 4 times with distilled water. The TCA-fixed cells were stained with SRB for 30 min and rinsed by 1% acetic acid to remove unbound dye. The bound dye was solubilized by 10 mM Tris buffer (pH 10.5) and an absorbance was measured at 540 nm.

Chemosensitivity assay

After siRNA treatment for 24 hour, the cells were treated by various concentrations (1, 10, 20, 50, 100 μM) of cisplatin (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Cell viability was measured at 48 hour after cisplatin treatments, using SRB assay, compared with vehicle control (0.2% DMSO treated cells). Combination index (CI) was calculated by The

Compu-Syn software (MIT, Cambridge, MA, USA). The CI < 0.9 means "synergistic effect", CI = 0.9-1.1 means "additive effect", and CI > 1.1 means "antagonist effect".

Immunocytofluorescence (ICF)

Cells were seeded into a 24-well plate followed by treatment with siOGT or siControl for 24 hour. The cells were fixed by 4% paraformaldehyde and permeabilized by 0.1% Triton-X. Non-specific reactivity was blocked by incubating with 3% BSA for 20 min. Cells were overnight incubated with 1:1000 mouse anti-O-GlcNAc (Clone RL-2, Thermo fisher scientific, Rockford, IL, USA) at 4°C. After washing by PBS, the cells were probed with 1:500 Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Thermo fisher scientific, Rockford, IL, USA). Nuclear staining was performed using 1:10,000 Hoechst 33342 (Thermo fisher scientific, Rockford, IL, USA) in PBS. The fluorescent signal was observed and photographed under a fluorescent OR confocal microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

SDS-PAGE and Western blot analysis

The MNT-1 cells were seeded (75,000 cells/well) and overnight cultured in 6 well-plate, followed by transfection with siOGT or siControl using lipofectamine-2000 (Invitrogen Corporation, Grand Island, NY) with the manufacture's recommendation. Cells were washed 3 times by PBS and lysed by RIPA buffer containing protease/phosphatase inhibitor and OGA inhibitor (PUGNAc). Cellular protein was separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto PVDF membranes. Membrane was blocked with 5% skim milk in 0.1% tween in tris-buffered saline (TBS-T) for 1 h at room temperature, followed by overnight incubated with a mouse anti-OGT (1:200) or mouse anti-OGP (1:1000), and rabbit anti-AKT (1:1000) at 4°C. After complete incubation, the membrane was washed by TBS-T and incubated with horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. The immunoreactivity was detected by Immobilon® Forte Western HRP Substrate (Millipore, Burlington, MA, USA), and visualized by Amersham ImageQuant 800 biomolecular imager (Cytiva, Marlborough, Results Way, USA). Band intensity was measured using ImageJ software.

Statistical analysis

Statistical comparisons between groups were tested using the student's t- test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Values were presented as the mean ± SD. The data was analyzed by GraphPad Prism® 9.0 software (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Knockdown of OGT by siRNA could suppress O-GlcNAcylation in MNT-1 melanoma cells.

To reveal the function of O-GlcNAcylation in MNT-1 melanoma cell, siOGT was used to suppress the expression of O-GlcNAc transferase (OGT), an enzyme responsible for O-GlcNAcylation. The results showed that, after treatment by siOGT for 48 h, the expression of OGT and O-GlcNAcylated protein (OGP) was dramatically reduced (Fig. 1A-B).

Suppression of O-GlcNAcylation significantly decreases cell proliferation via the AKT pathway.

The role of O-GlcNAcylation on cell proliferation was determined at 0 – 72 hour after siOGT treatment using SRB assay. The results showed that siOGT significantly suppresses the cell proliferation of MNT-1 melanoma cell at 48 and 72 hour (Fig. 2A). Moreover, Western blotting showed that phosphorylation of AKT (s473) was significantly suppressed after knock down of OGT (Fig. 2B).

O-GlcNAcylation was involved in chemoresistance of MNT-1 melanoma cells.

To study the role of O-GlcNAcylation in chemoresistance, combinatorial effect between siOGT and cisplatin was analyzed in MNT-1 cells. Cells were treated by siOGT for 24 h followed by cisplatin (20 and 80 μM) for additional 48 h. The results showed that siOGT could enhance the cytotoxic effect of cisplatin on MNT-1, significantly. The cell viability of MNT-1 treated by siOGT and 20 μM (69.25%) or 80 μM (51.43%) of cisplatin was significantly lower than those by siControl (94.36% of 20 μM cisplatin and 68.92% of 80 μM cisplatin) (Fig. 3).

The determine the degree of drug combination between siOGT and cisplatin, the combination index (CI) was calculated. The CI was 0.1 for combination of siOGT with 20 μM cisplatin and 0.005 for combination of siOGT with 80 μM cisplatin, this information suggested that siOGT and cisplatin showed a synergistic effect (Table 1).

Dose reduction index (DRI): DRI < 1 Not favorable dose-reduction, DRI = 1 No dose-reduction, DRI > 1 Favorable dose-reduction

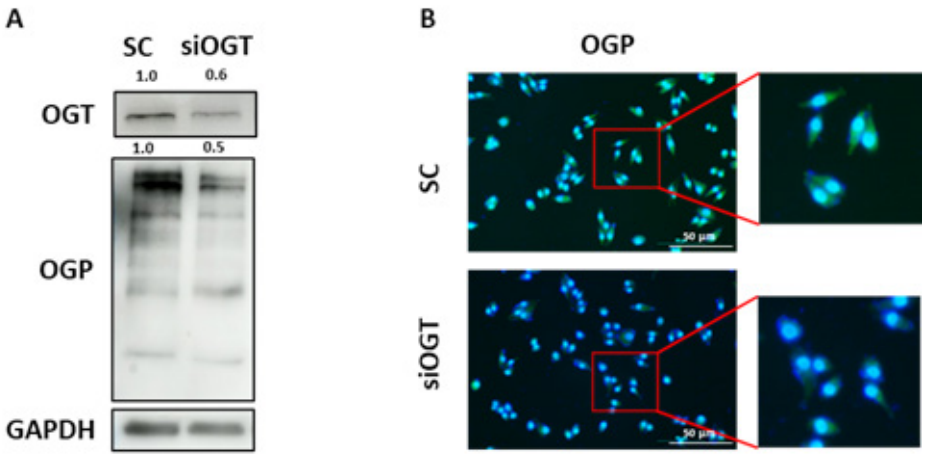


Figure 1 Effect of siOGT on O-GlcNAcylation in MNT-1 melanoma cell. After 48 h of siOGT treatment, compared with siControl (SC), the expression of OGT and OGP was determined by (A) Western blotting and (B) immunofluorescent staining demonstrated the expression of OGP (green). Hoechst 33342 (blue) was used for nuclear staining.

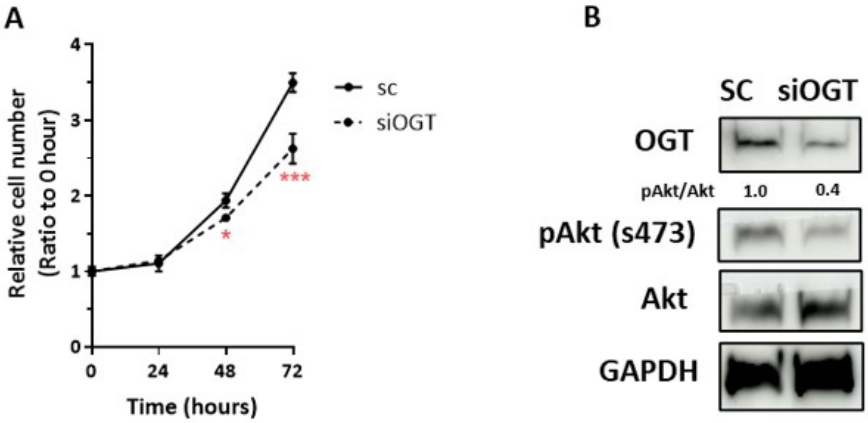


Figure 2 Effects of siOGT on cell proliferation of MNT-1. (1) SRB assay was used to determine the proliferation of MNT-1 cell after knockdown of OGT (0 – 72 hour, compared with siControl (SC). (B) After OGT knockdown for 24 h, Western blotting was used to determine the level of OGT, phosphor-Akt (s473), Akt, and GAPDH (internal control). The result presented here a representative from at least two independent experiments. * = $p < 0.05$, ***= $p < 0.001$.

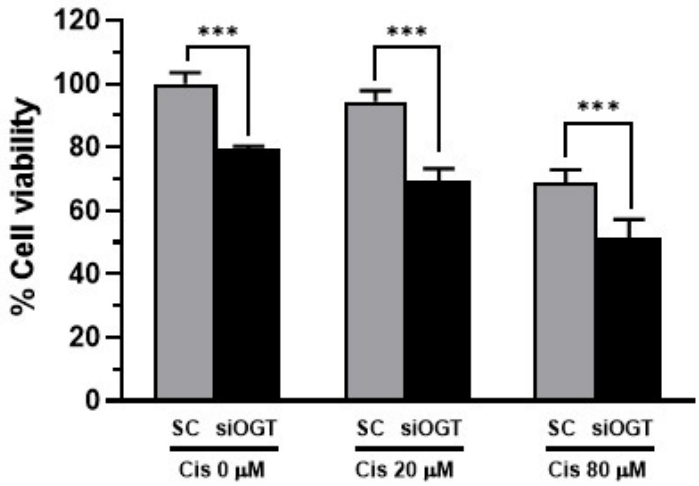


Figure 3 Combination effect of siOGT and cisplatin. MNT-1 cell were treated by 50 pmole siOGT 24 h followed by cisplatin (20 and 80 µM), cell viability was measured by SRB assay at 48 h after treatment. Cells treated with 50 pmole Control, instead of siOGT, we used as a control. Results showed here were averaged from three independent experiments. * = $p < 0.05$, compared with siControl treated cells.

Table 1 Combination Index (CI) between siOGT and cisplatin on MNT-1 cells

Cell lines	Dose siOGT (pMol)	Dose Cis (µM)	Fa	CI	Interpretation	DRI	
						siOGT	Cisplatin
MNT-1	50	20	0.307	0.11508	Synergistic effect	8.95	296.83
		80	0.486	0.00544	Synergistic effect	193.01	3918.30

Discussion

O-GlcNAcylation is important post-translational modification to regulate the function of nucleocytoplasmic proteins.[11] In this study we have explored the role of O-GlcNAcylation in melanoma. We found that O-GlcNAcylation was involved in proliferation of melanoma cells via regulation of Akt signaling pathway. Moreover, suppression of OGT could synergistically enhance the sensitivity of melanoma cell to cisplatin. This information suggested the potential of O-GlcNAcylation to be a target for treatment of melanoma.

Similar to our study in melanoma, the role of O-GlcNAcylation in cell proliferation was also previously reported in other cancer types, such lung cancer, colon cancer, and gastric cancer.[12,13] O-GlcNAcylation was found to regulate cell proliferation through Akt signaling pathway. Previous reports showed that the proliferation of cancer cells is controlled by Akt phosphorylation at s473.[14,15] Interestingly, Akt was previously found to be regulated by both phosphorylation and O-GlcNAcylation.[16,17] It is interesting to explore the mechanism by which O-GlcNAcylation regulates Akt signaling pathway in melanoma cells, this information may provide us the new information on melanoma biology, leading to the novel treatment strategy in the future.

O-GlcNAcylation was shown in our study to be involved in chemoresistance of melanoma. There are some reports showed that O-GlcNAcylation is involved in chemoresistance of leukemia, breast and liver cancer.[9] However, the mechanism by which O-GlcNAcylation regulates drug resistance is not clearly understood. The further study to explore how

O-GlcNAcylation regulates chemoresistance is needed.

In conclusion, we have demonstrated the roles of O-GlcNAcylation in proliferation and chemoresistance of melanoma. This information might be used as a basic knowledge for developing melanoma treatment strategy in the future.

Acknowledgments

Invitation Research Grant, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand (IN66010)

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Meany DL, Chan DW. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. Clin Proteom 2011;8(1):7. doi:10.1186/1559-0275-8-7
2. Munkley J, Elliott DJ. Hallmarks of glycosylation in cancer. Oncotarget 2016;7(23):35478-35489. doi:10.18632/oncotarget.8155
3. Joiner CM, Li H, Jiang J, Walker S. Structural characterization of the O-GlcNAc cycling enzymes: insights into substrate recognition and catalytic mechanisms. Current Opinion in Structural Biology 2019;56:97-106. doi:10.1016/j.sbi.2018.12.003
4. Ferrer CM, Sodi VL, Reginato MJ. O-GlcNAcylation in Cancer Biology: Linking Metabolism and Signaling. J Molecular Biology 2016;428(16):3282-3294. doi:10.1016/j.jmb.2016.05.028
5. Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. Nat Rev Mol Cell Biol 2017;18(7):452-465. doi:10.1038/nrm.2017.22
6. JÃ3Åowiak P, Forma E, BryÅ› M, KrzeÅ›lak A. O-GlcNAcylation and Metabolic Reprograming in Cancer. Front Endocrinol 2014;5. doi:10.3389/fendo.2014.00145
7. Chen YF, Shao GC, Li J, Yang AQ, Li J, Ye XS. O -GlcNAcylation of Blimp-1 in Lymphocytes Inhibits Its Transcriptional Function and Is Associated with Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. Mol Cancer Res 2022;20(4):650-660. doi:10.1158/1541-7786.MCR-21-0405
8. Xu Y, Sheng X, Zhao T, Zhang L, Ruan Y, Lu H. O-GlcNAcylation of MEK2 promotes the proliferation and migration of breast cancer cells. Glycobiology 2021;31(5):571-581. doi:10.1093/glycob/cwaa103
9. Liu Y, Cao Y, Pan X, et al. O-GlcNAc elevation through activation of the hexosamine biosynthetic pathway enhances cancer cell chemoresistance. Cell Death Dis 2018;9(5):485. doi:10.1038/s41419-018-0522-0
10. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. JNCI Journal of the National Cancer Institute 1990;82(13):1107-1112. doi:10.1093/jnci/82.13.1107
11. Lu Q, Zhang X, Liang T, Bai X. O-GlcNAcylation: an important post-translational modification and a potential therapeutic target for cancer therapy. Mol Med 2022;28(1):115. doi:10.1186/s10020-022-00544-y
12 Jiang M, Qiu Z, Zhang S, et al. Elevated O-GlcNAcylation promotes gastric cancer cells proliferation by modulating cell cycle related proteins and ERK 1/2 signaling. Oncotarget 2016;7(38):61390-61402. doi:10.18632/oncotarget.11359
13. Mi W, Gu Y, Han C, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 2011;1812(4):514-519. doi:10.1016/j.bbadis.2011.01.009

14. Gao Y, Moten A, Lin HK. Akt: a new activation mechanism. Cell Res 2014;24(7):785-786. doi:10.1038/cr.2014.57

15. Xu N, Lao Y, Zhang Y, Gillespie DA. Akt: A Double-Edged Sword in Cell Proliferation and Genome Stability. J Oncology 2012;2012:1-15. doi:10.1155/2012/951724

16. Laarse SAM, Leney AC, Heck AJR. Crosstalk between phosphorylation and O-Glc NA cylation: friend or foe. FEBS J 2018;285(17):3152-3167. doi:10.1111/febs.14491

17. Very N, Vercoutter-Edouart AS, Lefebvre T, Hardivillé S, El Yazidi-Belkoura I. Cross-Dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR Axis in Human Chronic Diseases. Front Endocrinol. 2018;9:602. doi:10.3389/fendo.2018.00602

SMJ

นิพนธ์ต้นฉบับ . Original Article

การระบุ genotypic ของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาหลายขนาน ทดสอบโดยการจัดลำดับจีโนมทั้งหมด

Voleak Vorn[1], ลำไย วงศ์ลคร[2], โยธิน หินวาน[1], สกาวรัตน์ กันทวงศ์[1], อุมาพร ยอดประทุม[1*]
[1]*สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

Genotypic Identification of Clinical Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates by Whole Genome Sequencing (WGS)

Voleak Vorn[1], Lumyai Wonglakorn[2], Yothin Hinwan[1], Sakawrat Kunthawong[1], Umaporn Yordpratum[1*]
[1]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University*
[2]*Srinagarind Hospital, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: *Klebsiella pneumoniae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาหลายขนาน เชื้อนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่สำคัญ ยา Colistin เป็นยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อแกรมลบที่มีประสิทธิภาพดีซึ่งเป็นยาสุดท้ายที่เลือกใช้ เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยา Colistin เป็นเชื้อที่ต้องเฝ้าระวังอย่างมาก จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้คือเพื่อชี้ชนิด *K. pneumoniae* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยด้วยจีโนไทป์

วิธีการการศึกษา: ความไวต่อยาปฏิชีวนะทดสอบโดยวิธี broth microdilution การจัดลำดับจีโนมทั้งหมดของ K. pneumoniae จำนวน 19 ตัวอย่าง และระบุสปีชีส์โดยใช้โปรแกรม 3 ชนิดได้แก่ Kraken2, 16s rRNA และ MLST

ผลการศึกษา: เชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 9 ตัวอย่างดื้อต่อยา colistin ในขณะที่อีก 10 ตัวอย่างมีความไวต่อยา colistin การชี้ชนิดของแบคทีเรียทั้ง 19 ตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Kraken, 16s rRNA พบว่ามี 2 เชื้อ คือ S9 และ S29 ที่ระบุว่าเป็นสปีชีส์อื่นนอกเหนือจาก *K. pneumoniae* โดยระบุเป็น K. quasipneumoniae เนื่องจากผลลัพธ์ที่ได้ไม่สอดคล้องกันระหว่างการวิเคราะห์ทั้ง 3 โปรแกรม โดยพบว่าผลจาก Kraken2 และ 16s rRNA เชื้อนี้ระบุว่าเป็น *K. quasipneumoniae* ในขณะที่ MLST ระบุ S9 เป็นเชื้อ *K. pneumoniae* ส่วน S29 ไม่สามารถระบุชนิดได้ ดังนั้นจึงวิเคราะห์สายวิวัฒนาการโดยผลสรุปพบว่าทั้ง S9 และ S29 คือ *K. quasipneumoniae* นอกจากนี้ยังพบว่าการวิเคราะห์ข้อมูล MLST พบเชื้อ K. pneumoniae ที่ดื้อต่อ colistin จำนวน 4 ใน 9 (ร้อยละ 44.44) เป็น ST147 ซึ่งเป็น *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่มีความเสี่ยงสูงซึ่งเป็นโคลนที่ต้องเฝ้าระวังในการแพร่กระจาย

สรุป: ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นถึงข้อจำกัดในวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการตามปกติในการระบุเชื้อ *K. pneumoniae* และกลุ่มไฟโลกรุ๊ปอื่นๆ ในขณะเดียวกัน การระบุจีโนไทป์โดยใช้ข้อมูลตาม WGS เน้นให้เห็นถึงศักยภาพในการเลือกปฏิบัติของกลุ่มไฟโลกรุ๊ปเหล่านี้ของ *K. pneumoniae* และควรคำนึงถึงการแพร่กระจายของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่มีความเสี่ยงสูงที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ

*Corresponding author : Umaporn Yordpratum, E-mail: umapornyo@kku.ac.th

Abstract

Background and objective: *Klebsiella pneumoniae* is a common multidrug resistant gram-negative bacterium basically causing majority of nosocomial infections. Colistin resistant *K. pneumoniae* has been posing a matter of a great concern because it is a resort drug treating gram-negative infection. The aim of this study was to determine genotypic identification of clinical isolates *K. pneumoniae*.

Methods: Antibiotic susceptibility was determined by broth microdilution method. Whole genome sequencing was performed on nineteen *K. pneumoniae* isolates. Three different computational tools were used for species identification including Kraken2, 16s rRNA, and MLST.

Results: Based on phenotypically, nine of them are resistance to colistin while the other ten are sensitive to colistin. We found two isolates S9 and S29 that identified as other species rather than *K. pneumoniae*. Based on Kraken2 and 16s rRNA, S9 and S29 were identified as *K. quasipneumoniae*. Unfortunately, we found a non-concordant result between these analysis tools in one isolate. With Kraken2 and 16s rRNA results, S9 isolate identified as *K. quasipneumoniae* while MLST identified as *K. pneumoniae*. Based on phylogenetic analysis, S9 and S29 is actually *K. quasipneumoniae* since it is misidentified by MLST and other laboratory methods. Four of nine colistin-resistant *K. pneumoniae* isolates (44.44%) were ST147 which is an antimicrobial-resistant high risk *K. pneumoniae*.

Conclusions: These results suggested the limitation in routine laboratory methods in identifying *K. pneumoniae* and other phylogroups. At the same time, genotyping identification using WGS-based data highlights it potential in discrimination of these phylogroups of *K. pneumoniae*. The emerging of antimicrobial-resistant high-risk *K. pneumoniae* distribution should be concerned.

Introduction

Klebsiella pneumoniae is considered as a severe opportunistic pathogen contributing commonly to health care associated infections (HAI) which accounts up to 10% of all nosocomial infection. High mortality and morbidity rate due to *K. pneumoniae* infections in hospitalized patients or immunocompromised individuals were reported globally[1]. Notably *K. pneumoniae* was included in ESKAPE pathogens *(Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, K.pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Enterobacter* spp.) which considered a great threat as each of them resistance to one or more antibiotic due to horizonal gene transfer (HGT) and mutation on chromosome. Taken as an example, colistin which is a last resort antibiotic against gram-negative infection has been widely reported in *K.pneumoniae*[2]. *K.pneumoniae* is phylogenetically closely related to *K. quasipnuemoniae* and *K. variicola*. *K. pneumoniae* complex were taxonomically classified as KPI (*K. pneumoniae*), KPII (*K.quasipnuemoniae*), KIII (*K. variicola*)[3]. Some traditional microbiology laboratory methods are not able to correctly identify these phylogroups since their biochemical profiles are similar[4,5]. Incorrect identification of *K. pneumoniae* complex by MALDI-TOF has also been reported[6,7].

The advance approach of whole genome sequencing (WGS) has been improved in both cost and turnaround time gaining its accessible as a potential tool in microbiology either used in outbreak management, identifying pathogens, or surveillance in epidemiological[8,9]. In this study, our aim was to use WGS-based data to identify *K. pneumoniae* isolates.

Methods

Bacterial strains

Nine isolates of colistin-resistant *K. pneumoniae* and ten isolates of colistin-sensitive *K. pneumoniae* were isolated and identified by MULDI-TOF MS (Bruker) from clinical samples from Srinakarind Hospital, Khon Kaen University, Thailand and were stored in glycerol at -80°C. All isolates were subcultured on blood agar and incubated at 37 °C for 18-24 hr.

Antibiotic susceptibility test

Antimicrobial susceptibility test of *K. pneumoniae* isolates were performed using automatic broth microdilution (Sensititre, Thermo Fisher scientific). Briefly, a single colony was simply inoculated in 2 ml of Mueller Hinton broth (MHB) and incubated at 37°C for 2 h. Bacteria solution was then adjusted to McFarland no. 0.5 using normal saline. Ten microliters of the adjusted inoculum was added to 10 ml of commercial MHB. Fifty-microliter was subsequently added into a commercial 96-well plate. Bacteria growth was observed after 18-24 hr of incubation. According to CLSI M100- S30 regarding to colistin breakpoints, a MIC = 2 µg/ml was interpreted as intermediate susceptibility, and MIC of ≥ 4 µg/ml was considered as resistance (CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In:Edited by Institute CLS, 30th edn; 2020.)

DNA extraction and whole genome sequencing

Genomic DNA was obtained by cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) DNA extraction method [10]. This method primarily involves with the disruption of bacteria membrane by incubating with 10 µg/ml lysozyme overnight. Other lysis detergents were used including 10% sodium dodecylsulfate (SDS), proteinase K, and CTAB/NaCl. Chloroform/isoamyl and NaCl 5 M in CTAB protocol helped to remove and separate protein binding with DNA. Cold absolute ethanol was added to precipitate DNA. Precipitated DNA was suspended in TE buffer.

Extracted DNA was subjected for short read whole genome sequencing with Hiseq Illumina platform. Quality score of raw reads were checked by Fast QC. De novo assembly were performed with SPAdes (http://cab.spbu.ru/software/spades/). Kraken2 and 16s rRNA were used to identify organisms. Multilocus sequence typing (MLST) was determined using stringMLST (http://jordan.biology.gatech.edu/page/software/stringmlst/).

Results

Antibiotic susceptibility test

All *K. pneumoniae* was determined colistin resistant phenotype after subculture by microdilution method using Sensititre. Nine isolates *K. pneumoniae* (R1, R2, R3, R4, R6, R7, R8, R11, R14) showed MIC of colistin >8 µg/ml and reported as colistin resistant isolates. Ten isolates *K. pneumoniae* (S2, S4, S7, S8, S9, S14, S15, S22, S23, S29) showed MIC of colistin <2 µg/ml and reported as colistin sensitive isolates.

Genetic feature

The total genome sequences of nineteen *K. pneumoniae* strains are minimally of 14,433,184 to maximumly 18,483,536 bp with read depths 407x to 521x. The sequence length is 150 bp with percentage of G+C of 53 to 58. The overall average quality score of all sequences is 36.

Genotypic identification

Of all twenty *K. pneumoniae* isolates, Kraken2 and 16s rRNA identified as other species with two-isolate. Genotypic identification of two isolates (S9 and S29) were revealed as *K. quasipnuemoniae* (Table 1). However, the MLST result revealed an S9 as ST571 which classified in *K. pneumoniae* sequence type. Four of nine colistin-resistant *K. pneumoniae* isolates

Table 1 Species identification by routine laboratory methods and bioinformatic tools (Kraken2, 16s rRNA and MLST)

Isolates ID	Laboratory identification	Kraken2	16s rRNA	MLST (*K. pneumoniae*)
R1	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST147
R2	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST16
R3	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST147
R4	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST11
R6	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST340
R7	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST16
R8	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST147
R11	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST37
R14	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST147
S2	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST1741
S4	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST219
S7	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST1686
S8	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST54
S9	*K. pneumoniae*	*K. quasipneumniae*	*K. quasipneumniae*	ST571
S14	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST54
S15	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST163
S22	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST29
S23	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	ST37
S29	*K. pneumoniae*	*K. quasipneumniae*	*K. quasipneumniae*	unknown

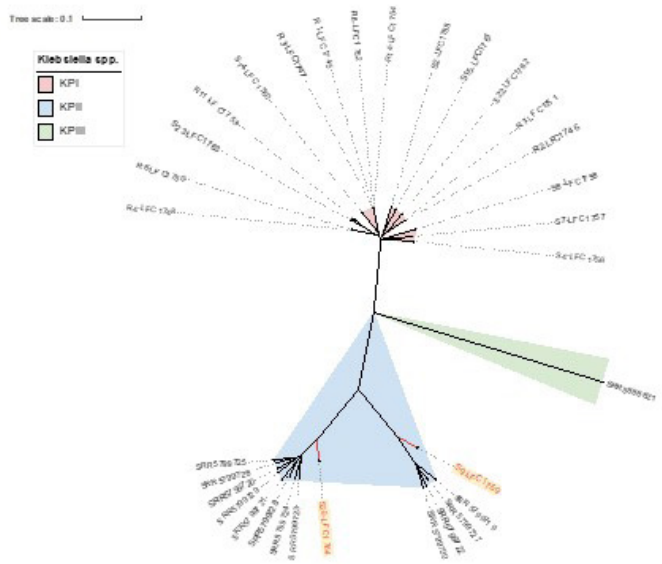


Figure 1 Phylogenetic analysis of *K. pneumoniae* isolates against reference genomes: KPI, KPII and KPIII. KPI (*K. pnuemoniae*) represents in pink, KPII (*K. quasipneumoniae*) shows in blue and KPII (*K. variicola*) displays in green.

(44.44%) were ST147 which is an antimicrobial-resistant high risk *K. pneumoniae*. Colistin-sensitive *K. pneumoniae* has various MLST type, it indicating they have high variation.

To construct phylogenetic tree, we used references genomes of *K. pneumoniae* (KPI), *K. quasipneumoniae* (KPII), and *K. variicola* (KPIII). The results of phylogenetic analysis demonstrated 17 isolates are closely related to KPI. Two isolates (S9 and S29) are phenotypically related to KPII that relevant with Kraken2 and 16s rRNA results as Figure 1.

Discussion

The worldwide spread of multidrug-resistant *K. pneumoniae* is a major global health issue. *K. pneumoniae* is one of the worrisome pathogens associating with high mobility and mortality due to limit of available antibiotic in pipeline to tackle such infections[10]. A precise identification of *K. pneumoniae* is a crucial factor to improve in both treatment and managing in tracking their source and spread. In our study, we performed short read whole genome sequencing to characterize on nineteen *K. pneumoniae* isolates.

All of nineteen *K. pneumoniae* isolates are phenotypically resistance to number of tested antibiotics. It is noteworthy that by using WGS-based datawe identified two isolates as *K. quasipneumoniae* by using Kraken2 and 16s rRNA. Part of genotypic identification, MLST is not able to distinguish *K. pneumoniae* and *K. quasipneumoniae* sequence type leading to misidentification of these two species. Both *K. quasipneumoniae* and *K.variicola* has been revealed with matching alleles as well as capsule genotype with *K. pneumoniae* that may contribute to an inaccurate identification[11]. Laboratory methods including MALDI-TOF and PCR remain restraining in detecting *K. pneumoniae* complex [7,12]. Only *K. pneumoniae* and *K. variicola* databases were included in Bruker database. Hence, this limitation makes it hard to distinguish other species or phylogroups of *K. pneumoniae* complex[7]. There is an enormous global public health burden due to antimicrobial resistant (AMR) *K. pneumoniae* high-risk clones i.e. ST147 and ST307. *K. pneumoniae* are increasing globally and both clones are associated with ESBLs and carbapenemases. ST147 is endemic in India, Italy, Greece, and certain North African countries and has been introduced into regions of non-endemicity, leading to worldwide nosocomial outbreak[13].

Conclusion

Our findings indicate a drawback in routine microbiology methods in identifying *K. pneumoniae* complex as *K. pneumoniae* is frequently masking the true causative pathogens. MLST may be mistakenly misidentify between *K. penumoniae* and *K. quasipneumoniae* although genotyping method is considered as a reliable tool to detect *K. pneumoniae* as well as other phylogroups. Overall, strategy and action are required to improve the detection methods and to control the spread of antibiotic resistance.

Acknowledgement

We express our sincere gratitude to all the faculties and laboratory assistants of department of microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. We acknowledge clinical microbiology laboratory, Srinakarind hospital for kindly providing bacterial strains in this study. This work was supported financially by Fundamental fund 2023.

References

1. Ashayeri-Panah M, Feizabadi MM, Eftekhar F. Correlation of Multi-drug Resistance, Integron and blaESBL Gene Carriage With Genetic Fingerprints of Extended-Spectrum β-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae*. Jundishapur J Microbiol [Internet]. 2014 [cited Jul 19, 2023];7(2):8747. Available from: /pmc/articles/PMC4138679/

2. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2018 Oct 1 [cited Jul 19, 2023];45:131–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29723841/

3. Baghbanijavid S, Kafil HS, Farajniya S, Moaddab SR, Hosainzadegan H, Sefidan FY, et al. The Association of the Phylogenetic Typing of the *Klebsiella pneumoniae* Isolates with Antibiotic Resistance. Emerg Med Int [Internet]. 2021 Nov 5 [cited Jul 19, 2023];2021:1–6. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34777863/

4. Effah CY, Sun T, Liu S, Wu Y. *Klebsiella pneumoniae*: An increasing threat to public health. Ann Clin Microbiol Antimicrob [Internet]. 2020 Jan 9 [cited Jul 19, 2023];19(1):1–9. Available from: https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-019-0343-8

5. Alves MS, Da Silva Dias RC, De Castro ACD, Riley LW, Moreira BM. Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol [Internet]. 2006 [cited Jul 19, 2023];44(10):3640. Available from: /pmc/articles/PMC1594763/

6. Long SW, Linson SE, Saavedra MO, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, et al. Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. mSphere [Internet]. 2017 Aug 30 [cited Jul 19, 2023];2(4):290–307. Available from: /pmc/articles/PMC5541162/

7. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Front Microbiol [Internet]. 2018 Dec 7 [cited Jul 19, 2023];9(DEC). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30581423/

8. Köser CU, Ellington MJ, Peacock SJ. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. Trends Genet [Internet]. 2014 [cited Jul 19, 2023];30(9):401–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25096945/

9. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, García-Cobos S, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. J Biotechnol [Internet]. 2017 Feb 10 [cited Jul 20, 2023];243:16–24. Available from: https://research.rug.nl/en/publications/application-of-next-generation-sequencing-in-clinical-microbiolog

10. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Ann Clin Microbiol Antimicrob [Internet]. 2017 Mar 29 [cited Jul 20, 2023];16(1):1–12. Available from: https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-017-0191-3

11. Donchev D, Ivanov IN, Stoikov I, Sabtcheva S, Kalchev Y, Murdjeva M, et al. Improvement and Validation of a Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA8+) for *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. Microorganisms [Internet]. 2023 Feb 1 [cited Jul 20, 2023];11(2). Available from: /pmc/articles/PMC9965953/

12. Fonseca EL, Ramos N da V, Andrade BGN, Morais LLCS, Marin MFA, Vicente ACP. A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 2017 Apr 1 [cited Jul 20, 2023];87(4):315–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28139276/

13. Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitouta JDD. Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2020 Oct 1 [cited Aug 1, 2023];64(10). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32747358/

SMJ

นิพนธ์ต้นฉบับ . Original Article

การสร้างไบโอฟิล์มของ *Burkholderia pseudomallei* สายพันธุ์ H777 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI), Dulbecco's Modified Eagle media (DMEM) และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย Luria-Bertani (LB)

วงศกร เสียงเลิศ[1,2 *], มุทิตา คำวงศ์[1], โสรัจสิริ เจริญสุดใจ[1,2]
[1]*สาขาวิชาจุลชีววิทยา, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น, ประเทศไทย*
[2]*ศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อระบาดใหม่, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น, ประเทศไทย*

Biofilm Formation of *Burkholderia pseudomallei* H777 Strain in Roswell Park Memorial Institute (RPMI), Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), and Luria-Bertani (LB)

Wongsakon Sainglers[1,2 *], Muthita Khamwong[1], Sorujsiri Chareonsudjai[1,2]
[1]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*
[2]*Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Disease (RCEID), Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: *Burkholderia pseudomallei* เป็นสาเหตุของโรคเมลิออยด์ ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อสำคัญที่เป็นปัญหาทั่วโลกและมีอัตราการเสียชีวิตสูงหากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม ไบโอฟิล์มของ *B. pseudomallei* ช่วยให้แบคทีเรียหลบการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและยาปฏิชีวนะ และสัมพันธ์กับโรคเมลิออยด์แบบกลับเป็นซ้ำ งานวิจัยก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *B. pseudomallei* ร่วมกับนิวโทรฟิลในอาหาร Roswell Park Memorial Institute (RPMI) สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลสร้างกับดักนิวโทรฟิลนอกเซลล์ แต่ไม่สามารถกำจัด *B. pseudomallei* ได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. pseudomallei* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ และปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น เพื่อนำไปใช้ศึกษาผลของดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบของ NETs ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. pseudomallei*

วิธีการศึกษา: เพาะเลี้ยง *B. pseudomallei* H777 ในอาหาร RPMI หรือ Dulbecco's Modified Eagle media (DMEM) ที่มีหรือไม่มีส่วนผสมของซีรัมลูกวัว 10% เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย Luria-Bertani (LB) และการใช้จำนวนเชื้อเริ่มต้นของ *B. pseudomallei* ที่ optical density 600 นาโนเมตร (OD_{600}) = 1 และ 0.1 และตรวจวัดปริมาณไบโอฟิล์ม

ผลการศึกษา: *B. pseudomallei* H777 ในอาหาร RPMI และ DMEM ที่มีและไม่มีซีรัม ไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์ม แต่ *B. pseudomallei* ในอาหาร LB สามารถพบการสร้างไบโอฟิล์มได้ และผลของเชื้อเริ่มต้นของ *B. pseudomallei* ที่ OD_{600} = 1 และ 0.1 ในอาหาร LB สามารถสร้างไบโอฟิล์มไม่แตกต่างกัน ($p = 0.0799$)

สรุป: อาหาร LB และแบคทีเรียเริ่มต้นที่ OD_{600} 0.1 เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *B. pseudomallei* ร่วมกับนิวโทรฟิล เพื่อศึกษาผลของ NETs ในการส่งเสริมให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. pseudomallei* ในงานวิจัยที่จะทำต่อไป

คำสำคัญ: อาหารเลี้ยงเซลล์ การสร้างไบโอฟิล์ม

*Corresponding author: Wongsakon Sainglers, E-mail: wongsakon.saing@kkumail.com

Abstract

Background and objective: *Burkholderia pseudomallei* is the causative agent of melioidosis, a potentially fatal infectious disease worldwide. The disease has a high mortality rate if appropriate treatment is delayed. *B. pseudomallei* biofilm has been reported as a virulence factor to promote pathogen resistance against host immune response and antibiotics and correlate with relapse melioidosis. Previous research has shown that *B. pseudomallei* H777, a biofilm producing strain co-cultured with human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium induced neutrophil extracellular traps (NETs) but failed to eradicate the pathogen. The aim of this study was to examine the biofilm formation ability of *B. pseudomallei* in cell culture medium and optimize the bacterial inoculum for further study to investigate the effects of NETs on *B. pseudomallei* biofilm formation.

Method: *B. pseudomallei* was cultured in RPMI or Dulbecco's Modified Eagle media (DMEM) with or without 10% calf bovine serum, in comparison to Luria-Bertani (LB) broth. The inoculum of *B. pseudomallei* H777 at optical density 600 nm (OD_{600}) of 1 and 0.1 were examined to determine the optimal conditions for further study in the co-cultivation with PMNs, considering the potential enhancement through constitutive DNA effects from NETs.

Results: *B. pseudomallei* H777 cultured in RPMI or DMEM with or without serum, failed to exhibit biofilm formation. In contrast, biofilm formation was observed when cultured in the control LB medium. Additionally, a similar biofilm formation was demonstrated when using *B. pseudomallei* starter culture at OD_{600} 0.1 and 0.1 in LB medium ($p = 0.0799$).

Conclusion: LB medium promotes biofilm formation of *B. pseudomallei*, while RPMI and DMEM media, with or without serum, do not. Cultivating *B. pseudomallei* starter cultures at OD_{600} 0.1 is suitable for co-cultivation with PMNs to investigate the impact of NETs on biofilm promotion in *B. pseudomallei*.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, cell culture medium, biofilm formation

Introduction

Melioidosis is a potentially fatal infectious disease that affects people and animals in Southeast Asia and Northern Australia[1]. This disease is caused by the environmental Gram-negative bacterium *Burkholderia pseudomallei*, which enters the human body through various routes of exposure including skin wounds, inhalation, or ingestion[1]. The presentation of the disease can vary widely, ranging from mild localized infection to severe sepsis, pneumonia, and abscesses in multiple organs [2]. *B. pseudomallei* has been reported to possess various virulence factors including biofilms, which have been associated with antibiotic resistance[3] and relapse melioidosis[4]. This indicates the important roles of biofilms in the persistence and resistance of *B. pseudomallei*, which significantly impacts treatment difficulty and disease severity. Furthermore, extracellular DNA (eDNA) was evidenced as a fundamental component during bacterial cell attachment and biofilm-forming steps of *B. pseudomallei*[5].

Neutrophils are the initial line of defense cells against bacterial infection through phagocytosis, degranulation, and the release of neutrophil extracellular traps (NETs)[6]. The formation on NETs, which contain DNA, histones, and antimicrobial proteins trap pathogens and eradicate the pathogen by the action antimicrobial proteins[7]. Recently, Khamwong and colleagues demonstrated that *B. pseudomallei* biofilm phenotype stimulated NETs that contain a higher amount of extracellular DNA (eDNA) compared to the biofilm mutant[8]. However, *B. pseudomallei* entrapped with NETs escaped neutrophil killing. Currently, there is no data on the impact of eDNA from NETs on *B. pseudomallei* biofilm formation ability. Therefore, further investigation is required, involving the co-cultivation of *B. pseudomallei* with PMNs to induce NETs formation and release eDNA, potentially leading to the stimulation of biofilm formation. The objective of this study was to compare the *B. pseudomallei* biofilm formation when culture in the commonly utilized nutrient-rich media for mammalian cells, Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 and Dulbecco's Modified Eagle media (DMEM), with Luria-Bertani (LB) broth. In addition, the study examined the two different starting cultures of at OD_{600} 1, commonly employed for biofilm formation assays, and 0.1, which suitable for co-cultivation with polymorphonuclear cells (PMNs). These experimental investigations here provide the optimize conditions of co-cultivation between *B. pseudomallei* and PMNs for further examination of the influence of NETs in promoting biofilm development of *B. pseudomallei*.

Materials and methods

Ethics approval

This study was approved by Khon Kaen University Ethics Committee for Human Research (HE651392).

Bacterial strain and growth curve

B. pseudomallei H777, a moderate biofilm-producing clinical isolate (Melioidosis Research Center, Khon Kaen University)[9] was cultured from glycerol stock (-80 °C) on Ashdown agar at 37°C for 48 h. A single colony was then inoculated into 3 ml LB broth and incubated at 37 °C, 200 rpm for 18 h. The bacterial suspension was adjusted to OD_{600} 0.1 (approximately 10^7 colony forming unit per milliliter (CFU/ml)) as the inoculum. The 2% inoculum was then grown in 50 ml LB broth and further incubated at 37 °C, 200 rpm. The bacterial culture was taken at 0, 2, 4, 6 and 8 h to obtain OD_{600} measurements and enumeration by the drop plate technique on LB agar plates, which were incubated at 37 °C for 24 h. The OD_{600} and CFU/ml data were then used to construct a bacterial growth curve.

RPMI-1640 and DMEM preparation

RPMI-1640 and Dulbecco's DMEM powdered media (GibcoTM CellCite) were prepared and adjusted to pH 7.0-7.4 with 1 M HCl or 1 M $NaHCO_3$ before filtered sterile and checked for the sterility incubation at 37 °C for 48 h. Complete media RPMI (cRPIM) and DMEM (cDMEM) were prepared by adding 10% heat-inactivated (56 °C for 30 min) fetal bovine serum (FBS, GibcoTM CellCite).

***B. pseudomallei* biofilm formation assay using crystal violet staining**

The biofilm formation of *B. pseudomallei* was assessed following the methodologies established in previous publications by Taweechaisupapong, et al.[9] and Kunyanee, et al.[10] with slightly modifications. In summary, *B. pseudomallei* was cultured in LB broth at 37 °C, 200 rpm for 18 h to obtain an OD_{600} 1 (approximately 1×10^8 cells/ml). The bacterial suspension was centrifuged at 3,000× g for 5 min and washed twice with 1× phosphate-buffered saline (PBS). The cells were then resuspended in LB, RPMI, cRPMI, DMEM and cDMEM, and adjusted to an OD_{600} approximately 1 and 0.1 as the biofilm inoculum.

Two hundred µl of *B. pseudomallei* in LB, RPMI, cRPMI, DMEM and cDMEM at OD_{600} 1 and 0.1 were added into each well of a 96-well plate. Following an incubation for 3 h, the planktonic bacterial cells were carefully removed. The adhered biofilm was washed with 200 µl of 1× PBS. Subsequently, 200 µl of fresh media was added to each well, and the plate was incubated for an additional 21 h. After discarding the planktonic cells and another round of washing using sterile distilled water, 200 µl of fresh media was added to each well, and the plate was further incubated for an additional 24 h. The quantification of 48-h *B. pseudomallei* biofilm formation was performed using crystal violet staining.

The 48-h biofilm formation was fixed with 200 µl of 99% methanol per well for 15 min before air-dried at room temperature. Then, the biofilm was stained with 200 µl of 2% crystal violet for 5 min. The excess stain was removed with running tap water. After air-drying, the dye bound to the adherent bacterial cells in each well was solubilized using 200 µl of 33% (v/v) glacial acetic acid. Subsequently, the solubilized solution was examined at the absorbance 620 nm (A_{620}) using Varioskan Flash Multimode Reader (Singapore) with SkanIt Software 2.4.3 RE for Varioskan Flash.

***B. pseudomallei* growth in LB, RPMI, and DMEM media**

The bacterial suspension of *B. pseudomallei* H777 (OD_{600} 0.1) was inoculated at a concentration of 2% into LB medium and incubated at 37°C with agitation at 200 rpm for 6 h. Following incubation, the bacterial suspension was centrifuged and washed twice with PBS before being resuspended in LB, RPMI, and DMEM media, utilizing an initial inoculum of OD_{600} 1 and 0.1. Subsequently, two hundred µl of *B. pseudomallei* in LB, RPMI, and DMEM were added into each well of a 96-well plate and incubated at 37°C, for 48 h. Bacterial growth measurements were determined at 0, 3, 24, and 48 h using Varioskan Flash Multimode Reader (Singapore) with SkanIt Software 2.4.3 RE for Varioskan Flash.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using Statistics Package for the Social Sciences (SPSS) program version 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data was analyzed for statistical significance using the one-way ANOVA. A statistically significant difference will be considered at * $p < 0.05$.

Results

B. pseudomallei H777 growth curve in LB media

The growth kinetics of *B. pseudomallei* H777 in LB media were examined at 0, 2, 4, 6 and 8 h. The CFU/ml and OD_{600} values were recorded and represented in Fig. 1A and 1B. The bacterial mid-log phase of *B. pseudomallei* H777 in LB was demonstrated between 4 and 8 h. The regression analysis of CFU/ml and OD_{600} exhibited a strong and significant correlation (R-square of 0.9866).

The *B. pseudomallei* H777 inoculum of OD_{600} 1 and 0.1 exhibited similar biofilm formation ability

The biofilm formation ability of *B. pseudomallei* H777 using the start inoculum of OD_{600} 1 and 0.1 exhibited similar biofilm formation ($p = 0.0799$) (Fig. 2). Based on these results, it can be concluded that *B. pseudomallei* H777 at OD_{600} 0.1 is suitable for further investigation regarding to the biofilm formation assay after co-cultivation with PMNs.

B. pseudomallei H777 biofilm formation in LB but not in RPMI, and DMEM media with and without 10% FBS

The ability of *B. pseudomallei* H777 to form biofilm was examined in different media, including LB, RPMI, cRPMI, DMEM, and cDMEM. The results demonstrated that *B. pseudomallei* H777 biofilm formation was observed in the control LB medium, whereas it was not detected at A_{620} in RPMI, cRPMI, DMEM and cDMEM media (Fig. 3 and 4).

B. pseudomallei H777 growth in LB, RPMI, and DMEM media

The growth of *B. pseudomallei* H777 was observed during incubation in LB, RPMI, and DMEM media to assess its growth ability in different conditions. The OD_{600} measurements were taken at 0, 3, 24, and 48 h. The results demonstrated that *B. pseudomallei* H777 in LB showed an increase in OD_{600}, while *B. pseudomallei* H777 in RPMI, and DMEM remained stable (Fig. 5). The results indicated that *B. pseudomallei* H777 can grow in LB but not in RPMI and DMEM media.

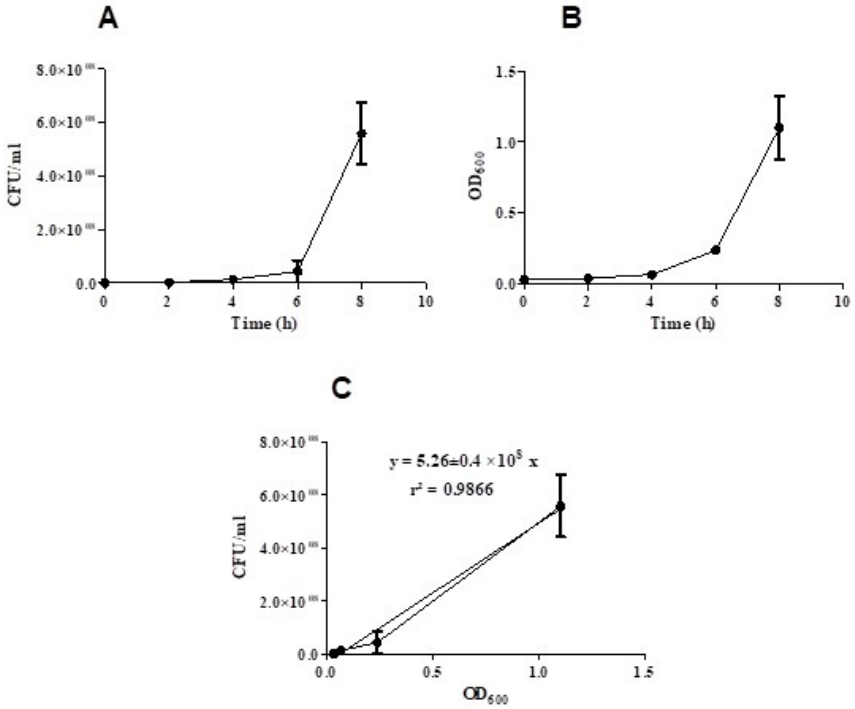


Figure 1 *B.pseudomallei* H777growth curves measured as CFU /ml versus time (A), OD_{600} versus time (B) and the regression graph of CFU/ml and OD_{600} (C).

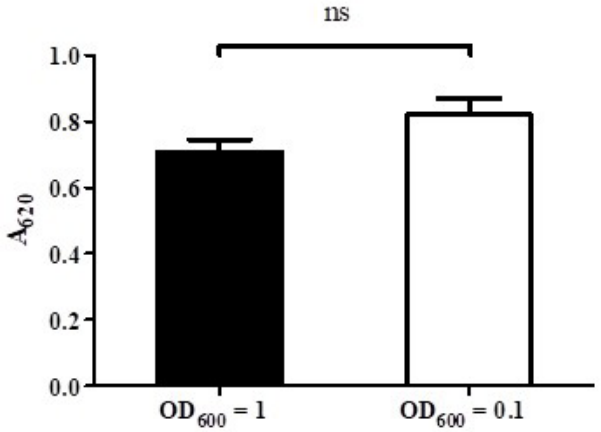


Figure 2 The 48-h *B. pseudomallei* H777 biofilm formation in LB using start inoculums of OD_{600} 1 and 0.1.

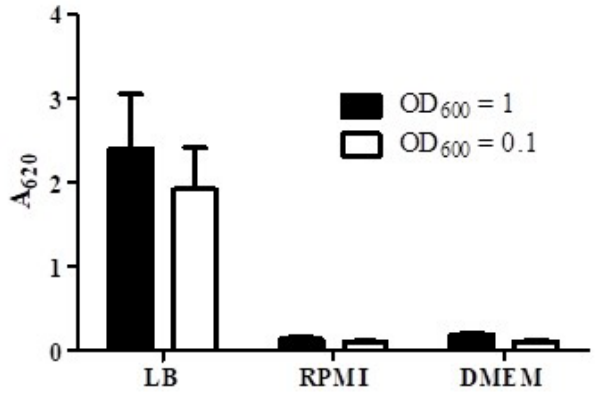


Figure 3 Biofilm formation of *B. pseudomallei* H777 in LB, RPMI, and DMEM media at 48 h using start inoculum of OD_{600} = 1 and 0.1.

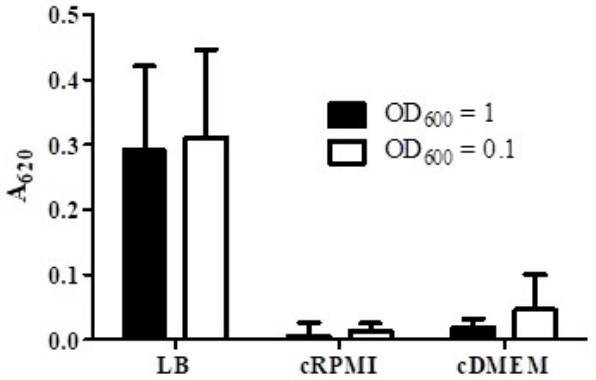


Figure 4 Biofilm formation of *B. pseudomallei* H777 in LB, cRPMI, and cDMEM media at 48 h using start inoculums of OD_{600} = 1 and 0.1.

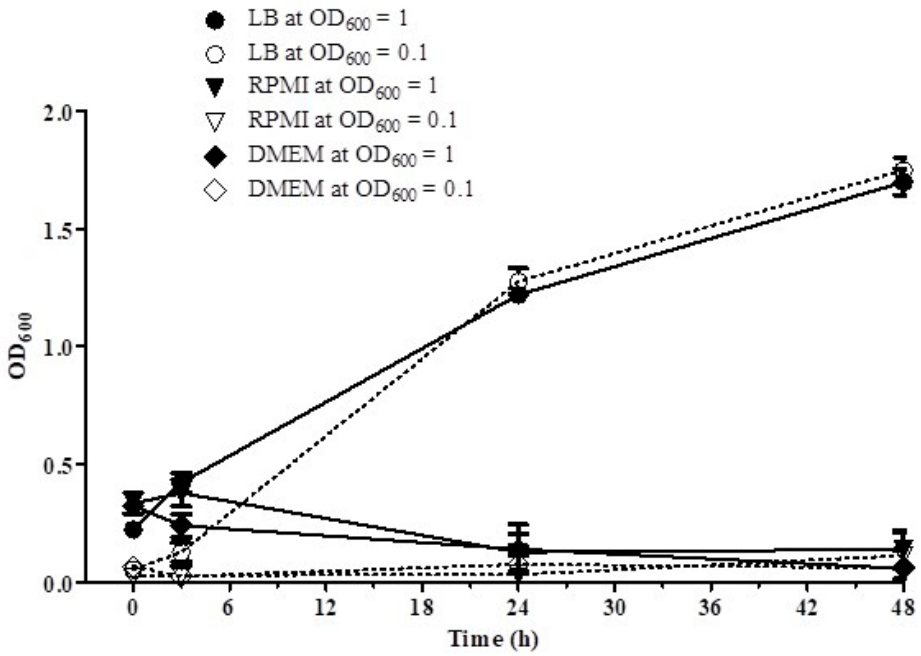


Figure 5 *B. pseudomallei* H777 growth measurement while cultured in LB, RPMI, and DMEM at 0, 3, 24, and 48 h using initial inoculum at OD_{600} = 1 and 0.1.

Discussion

Co-cultivation of *B. pseudomallei* with PMNs in RPMI medium resulted in the induction of NETs[8, 11]. However, despite the formation of NETs, the pathogen was not eradicated[8]. This study demonstrated that *B. pseudomallei* biofilm formation was observed when cultured in LB but not in RPMI or DMEM. Nevertheless, a starting inoculum of *B. pseudomallei* at OD_{600} 0.1 can be used for the co-cultivation with PMNs. The biofilm formation of *B. pseudomallei* in LB in this study is consistent with previous reports [5, 10]. However, the inability to form biofilm formation when cultured in RPMI and DMEM with or without 10% FBS, may due to the presence of abundant amino acids, vitamins, and inorganic salts that not favorable for bacterial growth and biofilm formation[12] that corroborate with previous observation by Kaewpan and colleagues[13]. Additionally, the presence of fetal bovine serum significantly reduced the biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* when cultured in M9 minimal medium[14]. Ding and colleagues also demonstrated a significant decrease in biofilm development of *Candida albicans* in RPMI medium, with or without 3-5% human serum[15]. These findings indicate that RPMI and DMEM media, with or without 10% FBS, are not suitable for conducting the biofilm formation assay for *B. pseudomallei*. Therefore, the co-cultivation experiments of *B. pseudomallei* and PMNs will be conducted in cRPMI medium using an initial inoculum of OD_{600} 0.1 to stimulate NETs formation. Subsequently, LB medium will be substituted for the purpose of *B. pseudomallei* biofilm formation.

Conclusion

An initial inoculum of *B. pseudomallei* at OD_{600} 0.1 will be employed for the co-cultivation with PMNs to stimulate NETs formation. Subsequently, LB medium will be replaced in order to enhance the formation of *B. pseudomallei* biofilm to elucidate the potential influence of PMN on biofilm formation of *B. pseudomallei* in our further investigation.

Reference

1. Limmathurotsakul D, Kanoksil M, Wuthiekanun V, Kitphati R, deStavola B, Day NP, et al. Activities of daily living associated with acquisition of melioidosis in northeast Thailand: a matched case-control study. PLoS Negl Trop Dis 2013;7(2):e2072.
2. Wiersinga WJ, Virk HS, Torres AG, Currie BJ, Peacock SJ, Dance DAB, et al. Melioidosis. Nat Rev Dis Primers 2018;4:17107.
3. Pibalpakdee P, Wongratanacheewin S, Taweechaisupapong S, Niumsup PR. Diffusion and activity of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei* biofilms. Int J Antimicrob Agents 2012;39:356– 9.
4. Limmathurotsakul D, Paeyao A, Wongratanacheewin S, Saiprom N, Takpho N, Thaipadungpanit J, et al. Role of *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation and lipopolysaccharide in relapse of melioidosis. Clin Microbiol Infect 2014;20(11):O854-6.
5. Pakkulnan R, Anutrakunchai C, Kanthawong S, Taweechaisupapong S, Chareonsudjai P, Chareonsudjai S. Extracellular DNA facilitates bacterial adhesion during *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation. PLoS One 2019;14(3):e0213288.
6. Wang J, Arase H. Regulation of immune responses by neutrophils. Ann N Y Acad Sci 2014;1319:66-81.
7. Nel JG, Theron AJ, Pool R, Durandt C, Tintinger GR, Anderson R. Neutrophil extracellular traps and their role in health and disease. South African J Sci 2016;112(1-2):01-9.

8. Khamwong M, Phanthanawiboon S, Salao K, Chareonsudjai S. *Burkholderia pseudomallei* biofilm phenotypes confined but surviving in neutrophil extracellular traps of varying appearance. Front Immunol 2022;13:926788.

9. Taweechaisupapong S, Kaewpa C, Arunyanart C, Kanla P, Homchampa P, Sirisinha S, et al. Virulence of *Burkholderia pseudomallei* does not correlate with biofilm formation. Microbial Pathogenesis 2005;39(3):77-85.

10. Kunyanee C, Kamjumphol W, Taweechaisupapong S, Kanthawong S, Wongwajana S, Wongratanacheewin S, et al. *Burkholderia pseudomallei* Biofilm Promotes Adhesion, Internalization and Stimulates Proinflammatory Cytokines in Human Epithelial A549 Cells. PLoS One 2016;11(8):e0160741.

11. Nithichanon A, Rinchai D, Gori A, Lassaux P, Peri C, Conchillio-Sole O, et al. Sequence- and Structure-Based Immunoreactive Epitope Discovery for *Burkholderia pseudomallei* Flagellin. PLoS Negl Trop Dis 2015;9(7):e0003917.

12. Agnieszka Bogut A, Agnieszka Magrys AJEJoC, Medicine E. Analysis of the bacterial biofilm formation in different models of the *in vitro* culture. Eur J Clin Exp Med 2021;19 (1): 40–5.

13. Kaewpan A, Duangurai T, Rungruengkitkun A, Muangkaew W, Kanjanapruthipong T, Jitprasutwit N, et al. *Burkholderia pseudomallei* pathogenesis in human skin fibroblasts: A Bsa type III secretion system is involved in the invasion, multinucleated giant cell formation, and cellular damage. PLoS One 2022;17(2):e0261961.

14. Hammond A, Dertien J, Colmer-Hamood JA, Griswold JA, Hamood AN. Serum inhibits *P. aeruginosa* biofilm formation on plastic surfaces and intravenous catheters. J Surg Res 2010;159(2):735-46.

15. Ding X, Liu Z, Su J, Yan D. Human serum inhibits adhesion and biofilm formation in *Candida albicans*. BMC Microbiol 2014;14:80.

SMJ

นิพนธ์ต้นฉบับ . Original Article

การลดระยะเวลาการตรวจ serum protein electrophoresis และ serum immunofixation test เพื่อวินิจฉัยโรคมะเร็ง Multiple Myeloma

ทิพาพร จรูญศิริมณีกุล[1*], ปริญญา ประสงค์ดี[1], จันทร์เพ็ญ ศรีพรรณ์[2], คัชรินทร์ ภูนิคม[3], ปภาวดี หงษ์อาจ[1]

[1] หน่วยภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก [2]งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[3] ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Reduction of Turnaround Time for Serum Protein Electrophoresis and Serum Immunofixation Test in Multiple Myeloma Diagnosis

Thipaporn Jaroonsirimaneekul[1*], Prinya. Prasongdee[1], Chanpen Sriphan[2], Kutcharin Phunikhom[3], Papawadee Hongart[1]

[1] Department of Immunology and [2]Clinical Chemistry, Laboratory, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

[3] Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: นโยบายมะเร็งรักษาได้ทุกที่ (cancer anywhere) ของสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ ช่วยให้ผู้ป่วยมะเร็งเข้าถึงการรักษาเร็วขึ้น โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มีศักยภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งชนิด multiple myeloma (MM) โดยใช้ผลตรวจ serum protein electrophoresis (SPE) และ serum immunofixation test (IFX) มีระยะเวลารายงานผล (turnaround time :TAT) ของ SPE 30 วัน ทำให้ผู้ป่วยใหม่เสียโอกาสการรักษาอย่างรวดเร็ว การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบการตรวจและลดระยะเวลารายงานผลของ SPE และ IFX ภายใน 14 วัน เพื่อช่วยให้การวินิจฉัย การรักษา และติดตามผลได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

วิธีการศึกษา: เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา ในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่ส่งตรวจ SPE และ IFX ระหว่างเดือน ส.ค.65-ม.ค. 66 โดยวิเคราะห์ปริมาณงาน การตรวจอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เลือกใช้เทคโนโลยีและลีนที่เหมาะสม นำมาพิจารณาปรับลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน

ผลการศึกษา: พบว่าในผู้ป่วยที่ส่งตรวจ SPE และ IFX ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา จากผู้ป่วยจำนวน 205 ราย เป็นผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิด MM 116 ราย (ร้อยละ 56.6) มีการส่งตรวจ SPE และ IFX จำนวน 327 และ 236 ครั้ง ตามลำดับ หลังการพัฒนาระบบการตรวจ ปรับรูปแบบการรายงานผล SPE และ IFX ให้สมบูรณ์ใน 1 ใบรายงานผลเพิ่มการรายงานผล M-protein เพื่อติดตามการรักษา เปรียบเทียบ TAT แบบเดิม (ม.ค.-มิ.ย. 65) และแบบใหม่ (ส.ค.65-ม.ค. 66) สามารถลด TAT เหลือ 14 วัน ระดับความสำเร็จร้อยละ 92.3 จากเดิมที่ TAT= 30 วัน รายงานผลได้ร้อยละ 40 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สรุป: การปรับวิธีการปฏิบัติงานทำให้ TAT การรายงานผล SPE และ IFX ลดลง ผู้ป่วยสามารถเข้าถึงการรักษาที่เร็วขึ้นสอดคล้องกับนโยบายของกระทรวงสาธารณสุข

*Corresponding author: Thipaporn Jaroonsirimaneekul, E-mail: thinga@kku.ac.th

Abstract

Background and objective: The Cancer Anywhere policy of the National Health Security Office is offered for cancer patients to access treatment faster. Srinagarind hospital has the potential for diagnosis, treatment, and monitoring of various types of cancer. In multiple myeloma (MM), it is necessary to test serum protein electrophoresis (SPE) and immunofixation test (IFX) to support the diagnosis. Turnaround time (TAT) for SPE 30 days was a negative effect in new cases of MM. The objective of this study was to develop the process of analysis and reducing the TAT for completing report SPE and IFX within 14 days, that effectively support the diagnosis, treatment, and monitoring.

Methods: The study was descriptive study in patients who has SPE and IFX test between January to June 2023 for workload analysis, related other laboratory tests, and appropriate technology and lean were considered for improvement of the duration time of the detection and report.

Results: A total request of 205 patients from SPE and IFX, the most common diagnosis was MM (56.6%, N=116). SPE and IFX did 327 and 326 test, respectively. The systematic improvement, SPE and IFX could be concluded and reported in a one-page report, also with M-protein level for treatment monitoring. The comparison of two periods, January to June 2022: SPE had TAT 30 days, reported on schedule 40%. While the new system started in August 2022 to January 2023: SPE had TAT 14 days, reported on schedule 92.3% which was a significant difference ($p<0.05$).

Conclusion: The reduction of TAT could maximize the benefits for MM patients to an early start of the therapeutic, in accordance with the policy of the Ministry of Public Health.

Keywords: serum protein electrophoresis, immunofixation test, Multiple myeloma turnaround time

บทนำ

กระทรวงสาธารณสุขและสปสช.ได้ร่วมกันจัดระบบบริการให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งไปรับบริการที่ไหนก็ได้ หรือเป็นมะเร็งรักษาทุกที่ โดยใช้นโยบายที่มีชื่อว่า cancer anywhere กล่าวคือ เมื่อรู้ตัวว่าเป็นมะเร็งสามารถไปรักษาได้ทุกที่ที่มีความพร้อมในการให้บริการ ไม่จำเป็นต้องรอการรักษาหรือการส่งตัวจากหน่วยบริการใกล้บ้าน โรคมะเร็งเป็นภาวะเจ็บป่วยที่ต้องได้รับการรักษาโดยเร็วเพื่อควบคุมระยะและการแพร่กระจายของโรค แต่ด้วยขั้นตอนการส่งตัวตามระบบเครือข่าย และความหนาแน่นของปริมาณผู้ป่วยที่แตกต่างกันในแต่ละโรงพยาบาล ทำให้เป็นอุปสรรคในการเข้าถึงการรักษาได้โดยเร็ว อย่างไรก็ดี ก่อนหน้านี้การเข้ารับการรักษามะเร็งในโรงพยาบาลที่ผู้ป่วยมีสิทธิการรักษา ปกติแล้วจะต้องรอตรวจ รอการรักษาตามคิวของผู้ป่วย ขั้นตอนเหล่านี้มักจะใช้เวลานาน หลายขั้นตอน แต่ละขั้นตอน ใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน ซึ่งกว่าจะได้ผลชิ้นเนื้อว่าเป็นมะเร็งจริงๆ หรือทราบว่าเป็นมะเร็งชนิดใด ซึ่งถือว่าเป็นคอขวดที่ทำให้กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเข้าถึงการรักษาได้ช้า ทั้งในเรื่องระบบส่งตัวและวินิจฉัย อาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการมากขึ้นและเพิ่มระยะของมะเร็งได้

การมีนโยบายมะเร็งรักษาทุกที่เกิดขึ้น ได้ช่วยอำนวยความสะดวกรวดเร็วให้กับผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็ง ให้ได้รับบริการการรักษาครอบคลุมทุกวิธีการรักษา เช่น ผ่าตัด เคมีบำบัด รังสีรักษา ฮอร์โมน ทั้งตามโปรโตคอลการรักษาโรคมะเร็ง 20 ชนิด และการรักษามะเร็งทั่วไปในโรงพยาบาลที่มีศักยภาพและใกล้บ้านโดยเร็วที่สุด สามารถรักษาข้ามเขต ข้ามจังหวัดได้ ในปีงบประมาณ 2565 ตั้งแต่วันที่ 1 ต.ค. 2564 – 30 มิ.ย. 2565 มีผู้ป่วยโรคมะเร็งรับบริการที่ไหนก็ได้ จำนวน 603,060 ครั้ง[1] จากเป้าหมายที่ได้รับจัดสรร 339,371 ครั้ง[2] ซึ่งตัวเลขสถิติข้างต้น ก็สะท้อนให้เห็นว่าผู้ป่วยมะเร็งสามารถเข้าถึงบริการการรักษาได้มากขึ้น เร็วขึ้น ทำให้ผลการรักษาดีขึ้นตามไปด้วย[3]

โรคมะเร็งทางโลหิตวิทยา[4-6] ที่เกิดจากความผิดปกติของพลาสมาเซลล์ หรือที่เรียกว่า Multiple Myeloma นั้น พลาสมาเซลล์มีการเจริญผิดปกติ โดยพลาสมาเซลล์ที่เติบโตผิดปกติจะเกิดขึ้นในไขกระดูก ซึ่งในไขกระดูกมีหน้าที่สร้างเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด หากเกิดความผิดปกติขึ้นที่บริเวณนี้ จะส่งผลให้ร่างกายขาดเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ทำให้เกิดภาวะต่าง ๆ ตามมา ได้แก่ หากร่างกายขาดเม็ดเลือด

แดง จะเกิดอาการซีด อ่อนเพลีย และเหนื่อยง่าย หากขาดเกล็ดเลือดจะเกิดภาวะเลือดออกมากผิดปกติ เพราะเกล็ดเลือดมีหน้าที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด และเมื่อร่างกายขาดเม็ดเลือดขาว จะทำให้เกิดภูมิคุ้มกันบกพร่อง ส่งผลให้ร่างกายเกิดการติดเชื้อได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้พลาสมาเซลล์ที่เติบโตผิดปกติยังส่งผลให้ภูมิคุ้มกันสร้างโปรตีนมากขึ้น ทำให้เลือดมีลักษณะข้นหนืดและก่อให้เกิดภาวะอุดตันที่ส่วนต่าง ๆ ตามมา หากอุดตันที่สมอง จะทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง หากอุดตันที่ไตอาจส่งผลให้ไตวายได้ในที่สุด ไม่เพียงเท่านั้น MM ยังทำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนได้ อันเนื่องมาจากการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์ ส่งผลให้เกิดการสร้างสารเคมีชนิดหนึ่งที่ไปกระตุ้นการสร้างเซลล์ชนิดที่ทำลายกระดูก

สถิติของการเกิดโรคในประเทศไทย พบผู้ป่วยรายใหม่โดยเฉลี่ยต่อปี 300-400 ราย และพบผู้ป่วยด้วยโรคดังกล่าวเป็นอัตราร้อยละ 0.5-1 ของประชากรทั้งประเทศ อัตราที่พบในเพศหญิงและชายเท่ากัน และอายุโดยเฉลี่ยที่พบคือ 59 ปี ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคมะเร็ง MM มักพบภาวะกระดูกพรุนหรือกระดูกผุ ไตวายเฉียบพลัน เกิดภาวะซีด เลือดออกผิดปกติ และร่างกายติดเชื้อได้ง่าย ผู้ป่วยที่มาพบแพทย์มักพบด้วยอาการอ่อนเพลีย เหนื่อยง่าย ภาวะซีด หรืออาการอื่น ๆ และตรวจพบว่าเป็น MM ซึ่งแพทย์จะทำการประเมินความรุนแรงและทำการรักษา สามารถรักษาได้ 3 วิธี ได้แก่ การให้ยาเคมีบำบัด การฉายแสง และการปลูกถ่ายไขกระดูก ตลอดทั้งความพยายามจัดการระบบให้ง่ายโดยการนำลีนมาใช้ ซึ่งการนำลีนมาใช้ในบริการสุขภาพ[7] การดูแลสุขภาพที่เป็นอยู่ หรือวิธีการที่เราได้รับการฝึกอบรมมาในการให้บริการสุขภาพ มีลักษณะที่เป็นข้อด้อยสำคัญบางประการ ได้แก่ เป็นการจัดบริการเพื่อตอบสนองต่อแต่ละครั้ง (episode) ของการเจ็บป่วย เป็นบริการแบบตั้งรับที่ผู้ป่วยต้องช่วยตนเองในการเข้าหาบริการ ผู้ป่วยต้องรอคอยเป็นเวลานาน มีปัญหาในเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยละผู้ให้บริการ การสื่อสารระหว่างทีมผู้ให้บริการเป็นไปอย่างลุ่มๆ ดอนๆ กระบวนการดูแลมีความไม่แน่นอน มีการใช้ดุลยพินิจตัดสินใจจำนวนมากและแตกต่างหลากหลาย มีความเสี่ยงที่จะเกิดความผิดพลาดในกระบวนการดูแลจำนวนมากโดยที่ระบบไม่ได้ออกแบบเพื่อป้องกัน ไม่มีการวัดผลลัพธ์ของการทำงานที่สอดคล้องกับคุณค่าที่ผู้ป่วยต้องการ มีราคาแพง ดังนั้นจำเป็นต้องใช้แนวคิดแบบใหม่เพื่อผู้ป่วยและบุคลากร โดยร้อยละ 80 ของความบกพร่องทางการแพทย์มาจากระบบ วิธีการที่ได้ผลที่สุดในการแก้ไขข้อบกพร่องดังกล่าวคือ การแก้ไขที่ระบบและระเบียบปฏิบัติ ซึ่งโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ก็เป็นอีกหนึ่งหน่วยงานที่มีความพร้อม ทั้งในด้านการตรวจวินิจฉัย การรักษาและติดตามผลในทุกชนิดของมะเร็ง รวมถึงการวิจัยเพื่อพัฒนาการรักษามะเร็ง และในส่วนของหน่วยภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิกเมื่องานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร มีการตรวจจำเพาะหรือการตรวจพิเศษหลายส่วน เพื่อช่วยในการวินิจฉัย เพื่อประเมินระยะ หรือติดตามการรักษามะเร็ง MM[8] โดยในการศึกษาครั้งนี้ มุ่งเน้นไปที่การหาระบบเพื่อลดระยะเวลาการรอผล โดยการนำลีนมาปรับใช้เพื่อลดระยะเวลาในการรอผลตรวจดังกล่าวและเพิ่มศักยภาพของเครื่องมือและบุคลากร ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อลดระยะเวลาการรอคอยผลการตรวจ SPE และ IFX ที่ส่งตรวจในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิธีการศึกษา

ระเบียบวิธีวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา โดยรวบรวมข้อมูลจากกลุ่มตัวอย่างในลักษณะตัวเลขเป็นข้อมูลเชิงประจักษ์ในด้านระยะเวลาการรอผลการตรวจ SPE และ IFX มาวิเคราะห์ตามหลักการทางสถิติ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจ SPE และ IFX ทั้งหมด ในช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา คือ ส.ค.65– ม.ค.66 นำมาศึกษาความถูกต้องและระยะเวลาการรอคอยผล turnaround time; TAT ในการรายงานผลการตรวจ

การเก็บข้อมูล

เก็บข้อมูลจากระบบ Hospital Objects (HO) และ laboratory information system (LIS) ของโรงพยาบาล ในด้านผลการวินิจฉัย ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ขั้นตอนการดำเนินงาน

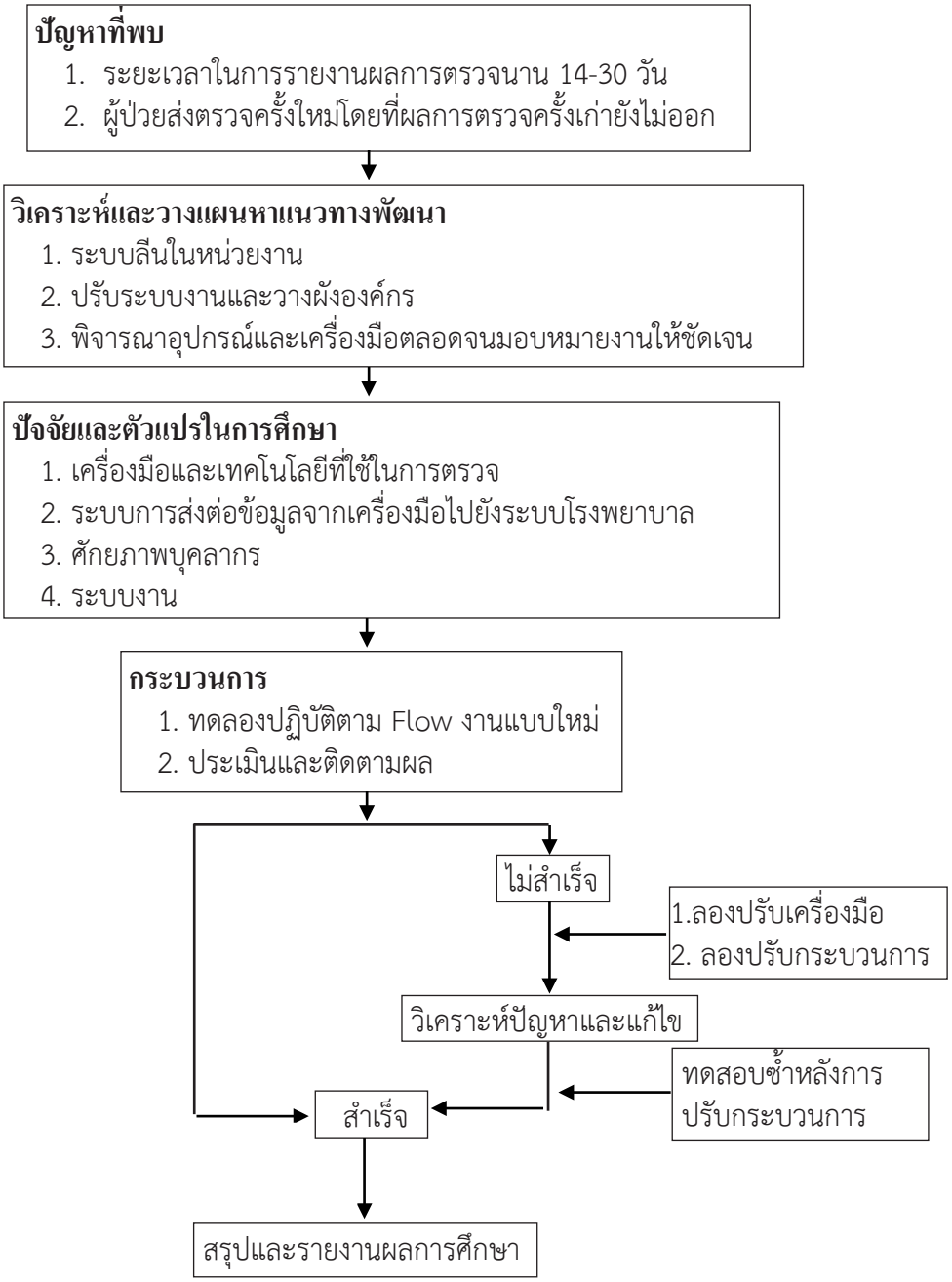
- นำระบบลีนมาใช้จัดการระบบงาน
- ปรับระบบงานและวางผังองค์กร
- พิจารณาอุปกรณ์ เครื่องมือ และเทคโนโลยีเพื่อใช้ในการตรวจ
- ออกแบบรูปแบบของการใช้ software หรือ program ที่มีในเครื่องมือเพื่อให้สามารถรายงานผลการตรวจ SPE และ IFX ในผู้ป่วยรายเดียวกัน ให้แสดงผลผ่านใบรายงานผลพร้อมกัน

- ดำเนินการตามกระบวนการที่กำหนด
- ทดลองปฏิบัติงานตาม flow ใหม่
- ถ้าเกิดอุปสรรค ปรับตัวแปรที่เป็นไปได้ และบันทึกข้อมูลโดยกำหนดปัจจัยและตัวแปรในการศึกษาวิจัยให้ชัดเจน

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างในด้านสัดส่วน ระยะเวลาการรอคอยผลการตรวจที่ลดลง และ 95 percentile ในการรายงานผลได้สำเร็จในระยะเวลาที่กำหนดไว้ โดยใช้ t-test

ขั้นตอนการดำเนินงาน



ผลการศึกษา

การตรวจ SPE

ข้อมูลก่อนทำการศึกษาเพื่อพัฒนาระบบทำการรวบรวมในช่วงเดือน ม.ค.-มิ.ย.65 (6 เดือน) จำนวนผู้ป่วยที่ส่งตรวจ SPE มีจำนวนรวมทั้งหมด 337 ราย เมื่อแยกสถานการณ์รายงานผลที่แสดงในระบบโรงพยาบาล พบว่า ในผู้ป่วยในจำนวน 137 ราย และผู้ป่วยนอกจำนวน 200 ราย พบผลการตรวจและรายงานผลในระบบโรงพยาบาล จำนวน 115 ราย (ร้อยละ 91.2) และ 192 ราย (ร้อยละ 96.0) โดยยังจำนวนผู้ป่วยที่ไม่พบการรายงานผลการตรวจในผู้ป่วยใน และผู้ป่วยนอกร้อยละ 8.8 และ 4.0ตามลำดับ และสามารถรายงานผลโดยรวมได้ 307 ราย (ร้อยละ 91.1) (ตารางที่ 1)

จากจำนวนผู้ป่วยดังกล่าว พบว่า ผู้ป่วยทั้งหมดในช่วงม.ค.-มิ.ย.65 (6 เดือน) มีจำนวนทั้งหมด 337 ราย แยกเป็นผู้ป่วยใน และผู้ป่วยนอก จำนวน 137 และ 200 ราย โดยมี TAT เฉลี่ยที่สามารถรายงานผลได้ในผู้ป่วยใน 86 วัน และผู้ป่วยนอก 60 วัน TAT ที่น้อยที่สุด คือ 11-21 วัน และ TAT ที่นานที่สุดในการรายงานผล คือ 110-151 วัน ระดับความสำเร็จของการรายงานผลที่สามารถรายงานผลภายใน 30 วัน อยู่ที่ร้อยละ 33.3-39.7 และรายงานผลนานเกิน 30 วัน ร้อยละ 60.3-66.7 (ตารางที่ 2)

หลังจากการวิเคราะห์ปัญหา วางแผน และทดสอบการพัฒนาและปรับระบบ โดยการใช้ลีน ใช้การประมวลผลจาก software เพื่อให้สามารถรายงานผลในรูปแบบที่ต้องการ จัดทีมบุคลากร ในการปฏิบัติหน้าที่ ดูแล กำกับ ติดตามผล ร่วมกับการเลือกใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสม พบว่า จากจำนวนผู้ป่วยที่ส่งตรวจในช่วงเดือน ส.ค. 65-ม.ค.66 มีการส่งตรวจ SPE ทั้งหมด 227 ราย สามารถรายงานผลในระบบโรงพยาบาลได้ครบทุกราย โดยเป็นผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอก 127 ราย และ 200 ราย ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

โดยมี turnaround time (TAT) เฉลี่ยที่สามารถรายงานผลได้ในผู้ป่วยใน 7.3 วัน และผู้ป่วยนอก 7.6 วัน TAT ที่น้อยที่สุด คือ ในผู้ป่วยนอก 2.6 วัน ผู้ป่วยใน 2.7 วัน และ TAT ที่นานที่สุดในการรายงานผล คือในผู้ป่วยใน 12 วัน ผู้ป่วยนอก 12.9 วัน ระดับความสำเร็จของการรายงานผลที่สามารถรายงานผลภายใน 7 วัน ได้ร้อยละ 41.5-43.3 รายงานผลใน 10 วัน ได้ร้อยละ 83.4-94.5 รายงานผลใน 14 วัน ได้ร้อยละ 98.0-100.0 (ตารางที่ 4)

ผลการเปรียบเทียบ TAT ของ SPE ก่อนและหลังทำการพัฒนาระบบงาน พบว่า สามารถลด TAT จาก 30 วัน เป็นสามารถรายงานผล SPE ได้สมบูรณ์ภายใน 14 วัน โดยมีระดับความสำเร็จร้อยละ 92.3 และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วย T-test ของ TAT ของการศึกษาทั้ง 2 ช่วงเวลา พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.00002) (ตารางที่ 5)

การตรวจ IFX

ข้อมูลการตรวจ IFX ในเดือน ม.ค.- มิ.ย.65 (6 เดือน) มีการตรวจ IFX ในผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยในจำนวน 170 และ 66 ราย ตามลำดับ รวมเป็นมีการสั่งตรวจ IFX จำนวน 236 ครั้ง พบว่า สามารถรายงานผล IFX ในระบบโรงพยาบาลได้ โดยมี TAT เฉลี่ย 6.5+4.5 และ 5.8+4.4 วัน ตามลำดับ ซึ่งหลังจากการปรับระบบงานและจัดตั้งทีมรับผิดชอบตามรูปแบบงานใหม่ที่กำหนดขึ้น พบว่าในระยะเวลาที่ทำการกำกับและติดตามผล ระยะเวลา 11 เดือน (ก.ค.65- พ.ค.66) พบว่า มีการตรวจ IFX ในผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยใน จำนวน 254 และ 132 ราย ตามลำดับ รวมเป็นมีการสั่งตรวจ IFX จำนวน 386 ครั้ง พบว่า สามารถรายงานผล IFX ในระบบโรงพยาบาลได้ โดยมี TAT เฉลี่ย 5.6+3.4 และ 7.3+4.8 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 1 การส่งตรวจ SPE ก่อนการพัฒนาระบบ ในเดือน ม.ค.-มิ.ย.65

ประเภทผู้ป่วย	จำนวนผู้ป่วย จำนวน (ร้อยละ)	สถานะออกผล จำนวน (ร้อยละ)	สถานะไม่ออกผล จำนวน (ร้อยละ)
ผู้ป่วยใน	137 (40.7)	115 (91.2)	12 (8.8)
ผู้ป่วยนอก	200 (59.3)	192 (96.0)	8 (4.0)
จำนวนรวม	337 (100)	307 (91.1)	20 (5.9)

ตารางที่ 2 TAT ของการรายงานผลการตรวจ SPE ในเดือน ม.ค.-มิ.ย.65

ประเภทผู้ป่วย	จำนวน (ราย)	TAT			รายงานผลภายใน 30 วัน จำนวน (ร้อยละ)	รายงานผลเกิน 30 วัน จำนวน (ร้อยละ)
		Mean ± SD (วัน)	Minimum (วัน)	Maximum (วัน)		
ผู้ป่วยใน	137	86±65	21	151	22 (16.1)	115 (83.9)
ผู้ป่วยนอก	200	60±49	11	110	48 (24.0)	152 (76.0)
รวม	337	65±66	17	114	70 (20.7)	267 (79.3)

ตารางที่ 3 จำนวนการส่งตรวจและการรายงานผล SPE หลังการพัฒนาระบบ ในเดือน ส.ค.65 -ม.ค.66

ประเภทผู้ป่วย	จำนวน (ราย)	ออกผล จำนวน (ร้อยละ)	ไม่ออกผล จำนวน (ร้อยละ)
ผู้ป่วยใน	127	127 (100.0)	0 (0.0)
ผู้ป่วยนอก	200	200 (100.0)	0 (0.0)
รวม	327	327 (100.0)	0 (0.0)

ตารางที่ 4 TAT การส่งตรวจ SPE หลังการพัฒนาระบบ ในเดือน ส.ค.65 -ม.ค.66

ประเภทผู้ป่วย	จำนวน (ราย)	Mean ± SD (วัน)	Minimum (วัน)	Maximum (วัน)	รายงานผลภายใน 7 วัน จำนวน (ร้อยละ)	รายงานผลภายใน 10 วัน จำนวน (ร้อยละ)	รายงานผลภายใน 14 วัน จำนวน (ร้อยละ)
ผู้ป่วยใน	127	7.3±4.6	2.7	12	55 (43.3)	106 (83.4)	118 (92.9)
ผู้ป่วยนอก	200	7.7±5.2	2.6	12.9	83 (41.5)	189 (94.5)	184 (92.0)
รวม	327	7.4±4.9	2.6	12.8	138 (42.2)	295 (90.2)	323 (92.3)

ตารางที่ 5 ผลเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของ TAT ก่อนและหลังการพัฒนาระบบตรวจ SPE

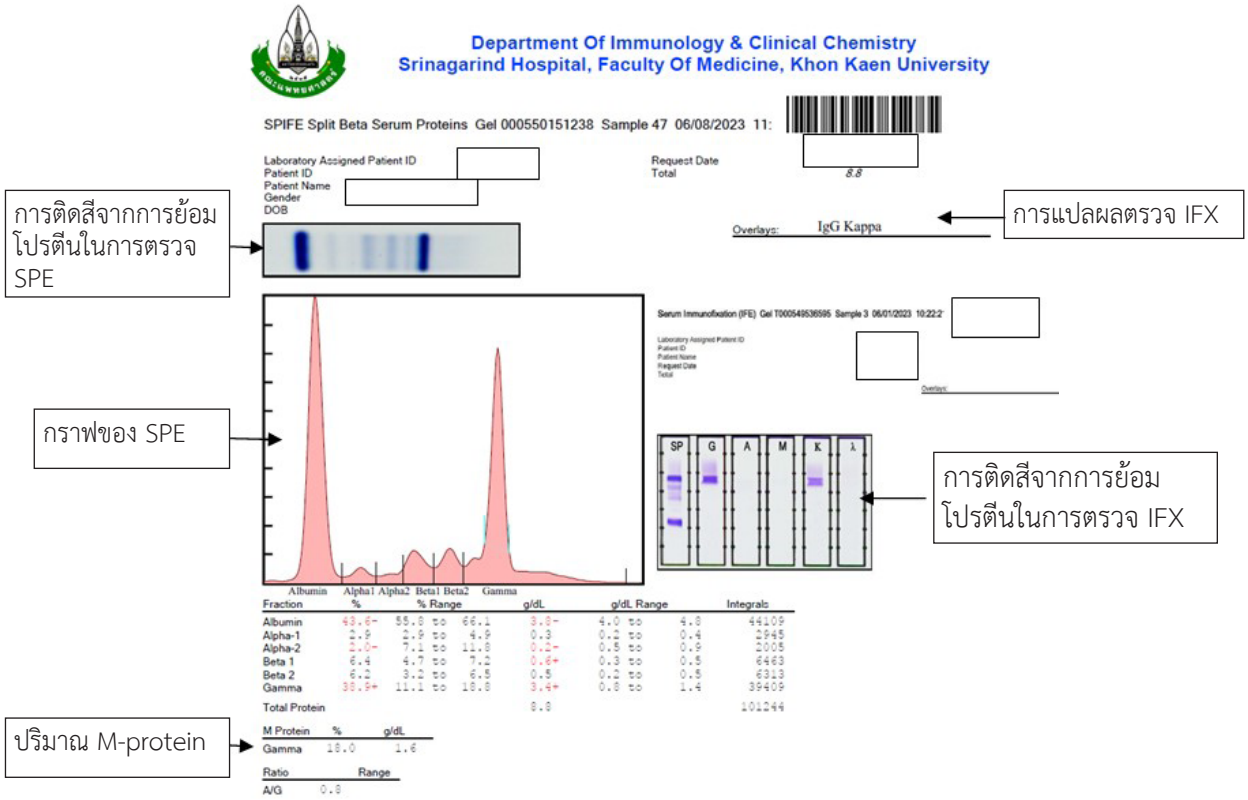
ช่วงเวลา	จำนวน (ราย)	ค่าเฉลี่ยของ SPE TAT	p-value
ม.ค.-มิ.ย.66	337	65	0.00002
ส.ค.65-ม.ค.66	227	7.4	

ตารางที่ 6 TAT ของการตรวจ IFX

ประเภทผู้ป่วย	ม.ค.-มิ.ย.65 (6 เดือน)		ก.ค.65-พ.ค.66 (11 เดือน)	
	จำนวน (ราย)	TAT: Mean±SD (วัน)	จำนวน (ราย)	TAT: Mean±SD (วัน)
ผู้ป่วยใน	66	5.8±4.4	132	7.3±4.8
ผู้ป่วยนอก	170	6.5±4.5	254	5.6±3.4
รวม	236	6.2±4.5	386	6.5±4.1

รูปแบบใบรายงานผลที่ได้จากการพัฒนาและปรับปรุงระบบงาน

สามารถปรับรูปแบบการรายงานผลให้แสดงได้ทั้งกราฟ SPE ปริมาณของโปรตีนชนิดต่างๆ แถบสีของการย้อมติดอิมมูโนโกลโบลินชนิดต่างๆ ปริมาณหรือสัดส่วนของ M-protein (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ใบรายงานผล SPE และ IFX ที่ปรับปรุงใหม่

สรุป

ในการตรวจ SPE อาจมีความจำเป็นต้องตรวจร่วมกับ IFX ในกรณีที่การเกิดปฏิกิริยา ไม่ได้อยู่ใน gamma zone ซึ่ง IFX จะช่วยในการวินิจฉัยได้แม่นยำมากขึ้น และกรณีใช้ประโยชน์ของการตรวจ SPE ในด้านการติดตามผลการรักษานั้น การตรวจ SPE สามารถรายงานระดับ paraprotein หรือ M-protein ซึ่งเป็นอิมมูโนโกลบูลินผิดปกติที่สำคัญ ที่ใช้ฝนการติดตามการรักษาร่วมด้วยได้ และ SPE มีราคาถูกกว่า IFX และ SPE สามารถตรวจในโรงพยาบาลทั่วไปที่ยังไม่เปิดให้บริการตรวจ IFX ได้

จากการพัฒนาระบบ สามารถส่งมอบระบบที่ดีขึ้นในการตรวจ SPE และ IFX ในการปฏิบัติงานได้ โดยสามารถลด TAT ในการตรวจ SPE ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ จากเดิมต้องใช้เวลาในการรายงานผล SPE เฉลี่ยนานถึง 65 วัน และระดับความสำเร็จน้อยกว่าร้อยละ 50 เมื่อปรับระบบโดยการลีน การประยุกต์ใช้ software ให้สามารถรายงานผลได้ตามต้องการ โดยประกอบด้วย กราฟของ SPE แถบสีหรือ band ของ immunoglobulin สัดส่วนและปริมาณของ M-protein และวางระบบกำกับติดตามผลการตรวจค้างในระบบโรงพยาบาล ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง และสามารถรายงานผลตรวจได้ภายในระยะเวลาไม่เกิน 14 วัน ส่งผลให้แพทย์ได้รับผลการตรวจที่ถูกต้องรวดเร็ว นำไปสู่การวินิจฉัยและวางแผนการรักษา หรือติดตามการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ ลดระยะเวลาการรอคอยผล

การตรวจจาก 14-30 วันเป็น 7.4 วัน (ตารางที่ 5) สามารถใช้ศักยภาพของเครื่องมือและบุคลากรผู้เชี่ยวชาญจากห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ในการตรวจและรายงานผลอย่างเต็มศักยภาพ เพื่อสนับสนุนนโยบายมะเร็งรักษาได้ทุกที่ หรือ cancer anywhere policy ในภูมิภาคของประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายแพทย์พิสาข์ พิพิธพร อาจารย์แพทย์ประจำภาควิชาอายุรศาสตร์ สาขาโลหิตวิทยา

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ. สปสช.เผยครึ่งปี 65 มีผู้ป่วยรับบริการมะเร็งตามนโยบายมะเร็งรักษาทุกที่กว่า 6 แสนครั้ง. [สืบค้นเมื่อ 5 ก.พ.2566]. สืบค้นจาก https://www.nhso.go.th/news/3725
2. Rojanamatin J, Ukranun W, Supaattagorn P, Chaiwiriyabunya I, Wongsena M, Chaiwrawattana A, et al eds. Cancer in Thailand Volume X, 2016-2018. Bangkok; 2021.
3. นิยามตัวชี้วัด Service Plan สาขาโรคมะเร็ง ปี 2561 – 2565. [สืบค้นเมื่อ 1 มิ.ย.2566]. สืบค้นจาก http://tcb.nci.go.th
4. Mayo M, Johns G. Serum free light chains in the diagnosis and monitoring of patients with plasma cell dyscrasias. Contrib Nephrol 2007; 153:44-65.
5. อัษฎาศ์ ลีฬหวนิชกุล. โรคที่มีการเจริญเติบโตขึ้งเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมากผิดปกติ. ใน:ดิเรกฤทธิ์ เชี่ยวเชิงชล, บรรณาธิการ. ภูมิคุ้มกันวิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2559. หน้า 350.
6. อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์. อิมมูโนลโกลบูลิน. ใน:อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, บรรณาธิการ. วิทยาภูมิคุ้มกันพื้นฐานและคลินิก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2552. หน้า 85-6.
7. Lean management. What, how. [สืบค้นเมื่อ 5 ก.พ.2566]. สืบค้นจาก https://science.swu.ac.th/Portals/22/Lean/2015/LeanManagement.pdf
8. Test to find Multiple Myeloma. [สืบค้นเมื่อ 1 มิ.ย.2566]. สืบค้นจาก https://www.cancer.org/cancer/types/multiple-myeloma/detection-diagnosis-staging/testing.html

SMJ

นิพนธ์ต้นฉบับ . Original Article

การพัฒนาระบบ Business Intelligence (BI) ในห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ด้วย Web Application

ปริญญา ประสงค์ดี*, ปภาวดี หงส์อาจ, ทิพาพร จรูญศิริมณีกุล, ณภิทตา บัวศรี
หน่วยภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตรโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Development of Business Intelligence (BI) for Clinical Chemistry and Immunology Laboratory at Srinagarind Hospital by Web Application

Prinya Prasongdee*, Papawadee Hongart ,Thipaporn Jaroonsirimaneekul, Napitta Buasri
Clinical Immunology and Chemistry unit, Clinical Laboratory Section, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand.

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: หน่วยภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร รพ.ศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ เป็นห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ระดับตติยภูมิที่ได้รับมาตรฐานระดับนานาชาติ (ISO15189 และ ISO15190) โดยให้บริการตรวจวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจ ด้วยเทคโนโลยี total lab automation (TLA) ซึ่งต้องอาศัยระบบโปรแกรม laboratory information system (LIS) รวมถึงชุดโปรแกรมคอมพิวเตอร์อีกหลายรายการ จากข้อมูลที่มีจำนวนมากจึงมีความจำเป็นต้องมีระบบบริหารจัดการข้อมูลเชิงสรุปที่ดีสำหรับประกอบการตัดสินใจเชิงบริหารต่าง ๆ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพัฒนาระบบ business intelligence (BI) application ในห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร ด้วย web application สำหรับเตรียมข้อมูลสนับสนุนการตัดสินใจ (decision supporting system; DSS) ในการบริหารจัดการระบบบริการทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

วิธีการศึกษา: ผู้ศึกษาใช้ภาษา JavaScript , MySQL และTableau สำหรับการพัฒนา web applications และเปรียบเทียบผลการสรุปข้อมูลต่าง ๆ ระหว่าง application ที่ได้พัฒนาขึ้น กับ วิธีสรุปข้อมูลจากการบันทึกด้วยเอกสาร และข้อมูลสรุปที่ได้จากระบบ LIS โดยคิดเป็นร้อยละความแตกต่างกัน ตั้งแต่ เดือน มกราคม 2565 ถึง เดือนธันวาคม 2565

ผลการศึกษา: ผู้ศึกษาได้เขียน application จำนวน 2 ระบบ ได้แก่ 1) ระบบ BI สำหรับแสดงข้อมูลสรุปการวิเคราะห์ด้าน KPI (key performance index) จากระบบ LIS โดยกำหนด URL คือ https://www.rocheflexstat.com 2) ระบบ BI สำหรับการบันทึก และแสดงข้อมูลสรุปการวิเคราะห์ ด้านระบบสนับสนุนการบริการต่าง ๆ โดยกำหนด URL คือ https://laboratorymis.com ซึ่งระบบ BI ทั้ง 2 ระบบสามารถบันทึก และสรุปข้อมูลได้ 6 รายการดังนี้ 1) สรุป ข้อมูลระยะเวลาการรอคอยผลวิเคราะห์ทั้งระบบบริการ 2) สรุปสถิติอัตราการให้บริการตรวจทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก 3) สรุปสถิติของสิ่งส่งตรวจประเภทต่าง ๆ ที่ให้บริการ 4) สรุปข้อมูลสรุปต้นทุน รายรับและผลกำไร 5) บันทึกและแสดงผลสรุปข้อมูลความเสี่ยงต่าง ๆ 6) ระบบบริหารจัดการคลังน้ำยาตรวจวิเคราะห์ ซึ่ง BI ทั้ง 2 ระบบให้ผลการคำนวณสอดคล้องกับระบบ LIS และระบบสรุปงานจากเอกสารได้ร้อยละ100 โดยคณะผู้ศึกษาได้ประยุกต์ใช้ระบบ BI ที่พัฒนาขึ้นนี้ สำหรับเตรียมข้อมูลสนับสนุนการตัดสินใจ (decision supporting system; DSS) ต่าง ๆ

สรุป: ภายหลังจากการพัฒนาระบบ BI นี้ ทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก สามารถลดภาระงานด้านการบันทึก และสรุปข้อมูลต่าง ๆ ได้ รวมถึงมีเครื่องมือสำหรับสรุปตัวชี้วัด (KPI) ต่าง ๆ ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว และครบถ้วน ซึ่งจะเป็นพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการกำหนดทิศทางการทำงานในระบบบริการทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม

*Corresponding author: Prinya Prasongdee, E-mail:pparin@kku.ac.th

Abstract

Background and Objective: The Immunology and Clinical Chemistry Laboratory in Srinagarind Hospital were worked under the total lab automation (TLA) that were certified international standards (ISO15189/ISO15190). Moreover, all laboratory processing was used the many special software such as hospital information system (HIS) and laboratory information system (LIS) that the big data of service system need to summarized for data visualization setting and performance metrics reporting. This study aimed to develop the business intelligence (BI) application of clinical chemistry and immunology laboratory for preparation of the decision supporting system (DSS) data.

Materials and Methods: We used the JavaScript language, MySQL and the Tableau for web applications development. The difference percentage of the data conclusion between BI application and LIS (plus paper document) were compared in Jan to Dec 2022.

Result: Developed two BI applications: 1) www.rocheflexstat.com for key performance index (KPI) reporting from the LIS system and 2) www.laboratorymis.com for visualization setting from the document data. Both of BI were summarized the data in 6 items as follows: 1) Laboratory turnaround time 2) Rate of laboratory testing 3) Rate of specimen containers consuming 4) Profit and cost summary 5) conclusion of the risk management system 6) stock management system. Therefore, the data correlation between BI application and LIS (plus paper document) were correlated to 100%. All the conclusion data were prepared to the decision supporting system (DSS) data.

Conclusion: This BI application were used for reducing of laboratory workload and correctly summarized various KPI data. Moreover, the transformation of documentation to complete visualization will be an important for proper direction of medical laboratory service system

Keyword: business intelligence (BI), total lab automation (TLA), laboratory information system (LIS)

ศรีนครินทร์เวชสาร 2566; 38(Suppl): 000-000. ● Srinagarind Med J 2023; 38(Suppl): 000-000.

บทนำ

หน่วยภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ เป็นห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ระดับตติยภูมิที่ได้รับมาตรฐานระดับนานาชาติ (ISO15189 และ ISO15190) โดยให้บริการตรวจวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจในด้านเคมีคลินิก และภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ด้วยระบบบริการที่อาศัยเทคโนโลยีระดับสูงเรียกว่า ระบบ total lab automation (TLA)[1] โดยระบบดังกล่าวประกอบด้วยเครื่องเตรียมสิ่งส่งตรวจอัตโนมัติ เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติที่มีลักษณะเชื่อมต่อกัน และอาศัยระบบโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ช่วยในการตรวจสอบ และรายงานผลวิเคราะห์ เรียกว่า laboratory information system (LIS)[2] นอกจากนี้ในระบบบริการยังต้องอาศัยชุดโปรแกรมคอมพิวเตอร์อีกหลายรายการ เพื่อช่วยสนับสนุนการทำงานให้มีประสิทธิภาพตามข้อกำหนด ได้แก่ ระบบโปรแกรม web lab service[3] (สำหรับบริการข้อมูลผลการตรวจสู่ผู้รับบริการผ่านระบบ internet) ระบบโปรแกรม auto- validation (สำหรับช่วยคัดกรองและรายงานผลวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ) ระบบโปรแกรมบริหารจัดการผลการตรวจสอบสารควบคุมคุณภาพ (IQC-inter lab management application) สำหรับประเมินผลการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ทั้งภายใน (internal quality control) และภายนอก (external quality control) ซึ่งหน่วยภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก ได้อาศัยเทคโนโลยีดังกล่าวในการให้บริการผู้ป่วยและงานวิจัยทางคลินิกต่าง ๆ รวมเป็นจำนวนเท่ากับ 4,227,501 รายการตรวจต่อปี (จากสถิติ ม.ค.–ธ.ค. 2565) ซึ่งปัจจุบันการสรุปข้อมูล และการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีปริมาณมากและซับซ้อนนั้น ต้องใช้ระยะเวลานานในการดำเนินการ จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีระบบบริหารจัดการข้อมูลเชิงสรุปที่ดีในการดำเนินงาน ซึ่ง business intelligence หรือ BI เป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องพัฒนาขึ้นมาสำหรับรองรับกิจกรรมบริหารต่าง ๆ โดยที่ BI หมายถึงเทคโนโลยีหรือซอฟท์แวร์ที่ช่วยนำข้อมูลที่ผ่านการตกผลึกและวิเคราะห์ในมิติต่าง ๆ มาแสดงผลในรูปของรายงาน กราฟ ตารางสรุป และบทวิเคราะห์ ใช้เพื่อการตัดสินใจสำหรับผู้ปฏิบัติงาน (operation staff) ผู้บริหารระดับกลาง (manager level) และผู้บริหารระดับสูง (executive level) ซึ่ง BI จะมีการนำเสนอข้อมูลและการแสดงผลในหลากหลายมิติ (multidimensional representation) ทั้งนี้ก็เพื่อสะท้อนผลการดำเนินงานในช่วงเวลาที่ต้องการ (time span) หรือตามการคัดกรองซึ่งจัดกลุ่มไว้ดีแล้ว อีกทั้งยังช่วยในวิเคราะห์ข้อมูลของกิจกรรมบริการในภาพรวม และสามารถใช้เป็นระบบเพื่อสนับสนุนทางเลือกในการตัดสินใจ (decision support system) ในปัจจุบันพบว่าระบบ BI ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในโรงพยาบาลสำหรับสร้างรายงานที่เป็นปัจจุบัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์และการวางแผนกลยุทธ์ของการรักษากลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (NCDs)[4] และในกลุ่มโรคมะเร็งเต้านมที่มีการกลายพันธุ์ของจีน BRCA[5] อย่างไรก็ตามในระบบบริการทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ แม้จะมีข้อแนะนำให้ใช้ข้อมูลสถิติการสั่งตรวจผู้ป่วย ข้อมูลสรุปรายรับและต้นทุนต่าง ๆ มาจัดทำ BI[6] แต่มีข้อจำกัดด้านความสอดคล้องกับความต้องการของแต่ละห้องปฏิบัติการที่มีบริบทการทำงานที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ผู้ศึกษาจึงพัฒนาระบบ BI สำหรับนำมาใช้ในหน่วยภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิกเพื่อเสริมสร้างศักยภาพในระบบบริการได้อย่างต่อเนื่อง และมั่นคง โดยมุ่งพัฒนาระบบ BI ในห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร ด้วย Web Application และประยุกต์ใช้สำหรับเตรียมข้อมูลสนับสนุนการตัดสินใจ (Decision Supporting System ; DSS) ในการบริหารจัดการระบบบริการทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

วิธีการศึกษา

การเก็บข้อมูล ผู้ศึกษาสรุปข้อมูลในด้านต่าง ๆ ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือน ธันวาคม 2565 ทั้งในรูปแบบเอกสารต่าง ๆ และข้อมูลในระบบ LIS

การออกแบบ web application ดำเนินการออกแบบระบบการเก็บข้อมูล และรูปแบบการนำเสนอข้อมูลเชิงสรุป โดย คัดเลือกใช้โปรแกรม พัฒนาระบบคือภาษา JavaScript เป็นภาษาสำหรับพัฒนาเว็บแอพพลิเคชั่น และระบบจัดการฐานข้อมูล MySQL และใช้วงจรการพัฒนาระบบ SDLC (system development life cycle)[7] ส่วนในการพัฒนาระบบ BI นั้นผู้ศึกษาใช้โปรแกรม Tableau ซึ่งครอบคลุมข้อมูลด้านต่าง ๆ ได้แก่ ด้านระยะเวลาการรายงานผลวิเคราะห์, ด้านการคำนวณสถิติอัตราการให้บริการตรวจ, ด้านการคำนวณสรุปความเสี่ยง ด้านการคำนวณข้อมูลต้นทุนและรายรับ และด้านการสรุปคลังน้ำยาตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ การวิเคราะห์ข้อมูล ใช้ข้อมูลจากแบบบันทึกอุบัติการณ์ต่าง ๆ และจากฐานข้อมูลในโปรแกรม LIS ภายในห้องปฏิบัติการ

การตรวจสอบข้อมูล

สำหรับนำเข้าสู่ระบบ BI และสอบทวนความถูกต้องของข้อมูลระหว่าง ข้อมูลเอกสาร รวมถึงข้อมูลในระบบ LIS เปรียบเทียบกับข้อมูลจากระบบ BI โดยสรุปความสอดคล้องกันเป็นค่าร้อยละ

ผลการศึกษา

ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิกได้พัฒนาระบบ business intelligence (BI) application สำหรับบันทึก และสรุปข้อมูล ในด้านต่าง ๆ โดยได้พัฒนาระบบ BI ผ่าน web application จำนวน 2 ระบบ ได้แก่

1. ระบบ BI สำหรับแสดงข้อมูลสรุปการวิเคราะห์ด้าน KPI (key performance index) จากระบบบริการด้วย total lab automation (TLA) โดยกำหนด URL คือ https://www.rocheflexstat.com/web/login ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1.1 ระบบ BI สำหรับแสดงข้อมูลระยะเวลาการรอคอยผลวิเคราะห์ทั้งหมด ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมสิ่งส่งตรวจ ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ และ ขั้นตอนการตรวจสอบและรายงานผลวิเคราะห์ โดยกำหนดเวลาที่ระดับ 90 เปอร์เซ็นไทล์ (percentile) (รูปที่ 1) ซึ่งพบว่า ระยะเวลาเฉลี่ยในการรายงานผลวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก และทางภูมิคุ้มกันวิทยาอยู่ระหว่าง 52-65 นาทีและ 70-95 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้ระบบ BI ยังสามารถเลือกเงื่อนไขสำหรับการคัดกรองข้อมูลต่าง ๆ ได้แก่ คัดกรองตามหอผู้ป่วยที่สั่งตรวจ และคัดกรองตามช่วงเวลาต่าง ๆทั้งเวรเช้า เวรบ่าย และเวรดึก

1.2 ระบบ BI สำหรับแสดงข้อมูลรายการตรวจวิเคราะห์เป็นค่าร้อยละ ที่สามารถรายงานผลได้ภายในเวลา 60 นาที (รูปที่ 2) ซึ่งพบว่า รายการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก และทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่สามารถรายงานผลได้ภายใน 60 นาทีโดยเฉลี่ย อยู่ระหว่างร้อยละ 87.1 – 94.4 และ ร้อยละ 73.6 –84.9 ตามลำดับ นอกจากนี้ระบบ BI ยังสามารถเลือกเงื่อนไขสำหรับการคัดกรองข้อมูลต่าง ๆ ได้แก่ คัดกรองตามหอผู้ป่วยต่าง ๆ คัดกรองตามช่วงเวลาต่าง ๆ และคัดกรองตามรายการตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ

1.3 ระบบ BI สำหรับแสดงข้อมูลระยะเวลาการรายงานผลวิเคราะห์ แยกตามรายการตรวจต่าง ๆ (รูปที่ 3) ซึ่งสามารถแสดงข้อมูลระยะเวลาการรายงานผลโดยเฉลี่ย (นาที) และ แสดงข้อมูลระดับนาทีที่สามารถรายงานผลร้อยละ 90 ของรายการที่สั่งตรวจทั้งหมด (90 เปอร์เซ็นไทล์) โดยสามารถแสดงตัวอย่างเช่น รายการตรวจ Glucose ซึ่งพบว่าห้องปฏิบัติการสามารถรายงานผลการตรวจรายการนี้ โดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 33-47 นาที และสามารถรายงานผลตรวจของผู้ป่วยจำนวนร้อยละ 90 ของจำนวนผู้ป่วยที่สั่งตรวจรายการ glucose ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 41-63 นาที เป็นต้น

1.4 ระบบ BI สำหรับแสดงข้อมูลสรุปสถิติอัตราการให้บริการตรวจทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิกในแต่ละเดือนได้ (รูปที่ 4)

1.5 ระบบ BI สำหรับแสดงข้อมูลสรุปสถิติของสิ่งส่งตรวจประเภทต่าง ๆ ในระบบบริการตรวจทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิกในแต่ละเดือน (รูปที่ 5)

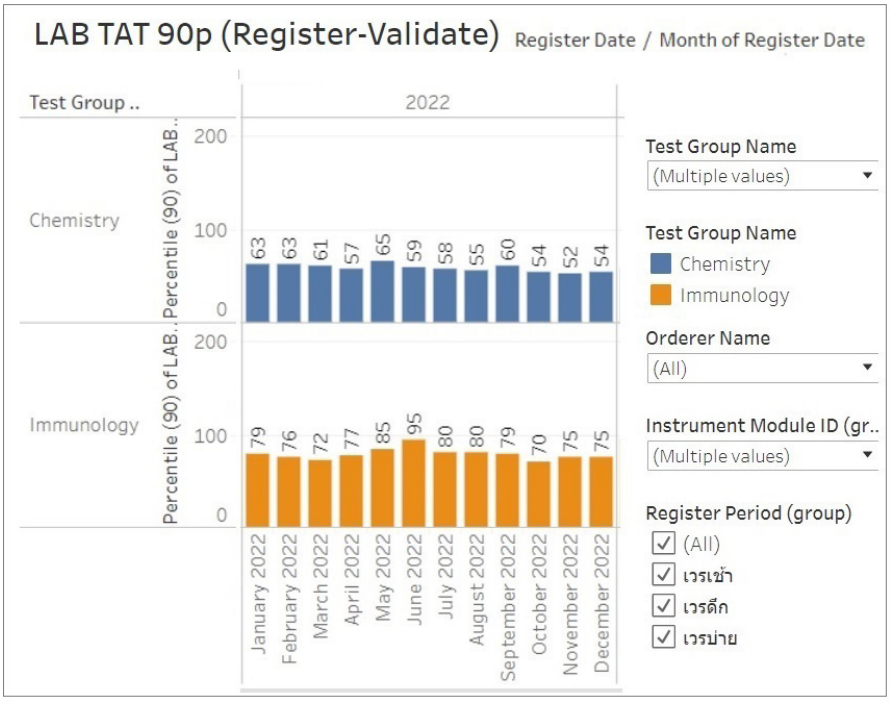
1.6 ระบบ BI สำหรับแสดงข้อมูลสรุปต้นทุน และรายรับ ในระบบบริการทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิกได้ (รูปที่ 6) โดยในเดือน มกราคม 2565 มีจำนวนรายการส่งตรวจเท่ากับ 447,729 รายการ ซึ่งมีต้นทุนเท่ากับ 12,930,689.13 บาท และสามารถเรียกเก็บเงินได้เท่ากับ 25,469,300 บาท คิดเป็นกำไรเท่ากับ 12,538,610.87 บาท

2. ระบบ BI สำหรับการบันทึก และแสดงข้อมูลสรุปการวิเคราะห์ ด้านระบบสนับสนุนการบริการต่าง ๆ ได้แก่ ระบบบริหารจัดการความเสี่ยง และระบบบริหารจัดการสต๊อกน้ำยาตรวจวิเคราะห์ โดยกำหนด URL คือ https://laboratorymis.com ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

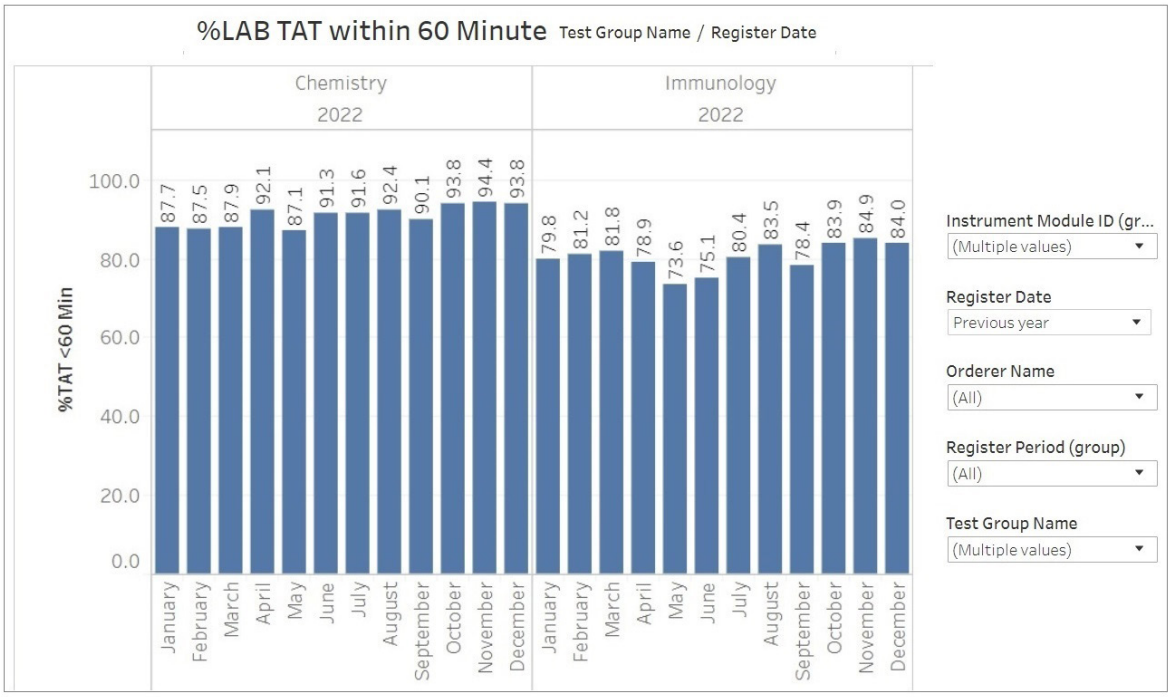
2.1 ระบบ BI สำหรับการบันทึก และแสดงข้อมูลความเสี่ยงและข้อผิดพลาดระดับต่าง ๆ ในระบบบริการทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก (รูปที่ 7) โดยระบบสามารถแสดงสัดส่วนอุบัติการณ์ต่าง ๆ ที่ผิดข้อกำหนดคุณภาพ ในรูปแบบร้อยละความผิดพลาด

2.2 ระบบ BI สำหรับการบันทึก และแสดงข้อมูลคลังน้ำยาตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ โดยสามารถแสดงรายการน้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่จะหมดอายุภายใน 3 เดือน และแสดงรายการน้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่ไม่เพียงพอต่อการให้บริการภายใน 3 เดือน ได้ รวมถึงสามารถแสดงประวัติการเบิกจ่ายรายการน้ำยาต่าง ๆ ได้อย่างครบถ้วน (รูปที่ 8)

3. ผลการตรวจสอบข้อมูลที่นำเข้าสู่ระบบ BI โดยได้เปรียบเทียบกับข้อมูลในด้านจำนวน และความความถูกต้องของข้อมูลในระบบ LIS และเอกสาร โดยสรุปความสอดคล้องกันดังตารางที่ 1ซึ่งพบว่าข้อมูลทั้ง 2 ส่วนสอดคล้องกันร้อยละ 100



รูปที่ 1 แสดงระยะเวลารอคอยผลวิเคราะห์ (นาที) ที่ระดับ 90 เปอร์เซ็นไทล์ (Percentile) ของรายการตรวจต่าง ๆ ทางเคมีคลินิก และทางภูมิคุ้มกันวิทยา ตั้งแต่เดือน มกราคม 2565 ถึง ธันวาคม 2565



รูปที่ 2 แสดงร้อยละของผลตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก และทางภูมิคุ้มกันวิทยา ที่สามารถรายงานผลได้ภายใน 60 นาที ตั้งแต่เดือน มกราคม ถึง ธันวาคม 2565

Lab TAT by Test (AVG and 90p) Register Date / Month of Register Date

Test Name		2022 January..	Februar..	March 2..	April 20..	May 20..	June 20..	July 20..	August ..	Septem..	October..	Novem..	Decemb..
Glucose (NaF) *	Avg. LAB TAT	47	46	45	38	40	36	36	36	36	34	35	33
	Percentile (90) of LAB TAT	63	63	60	47	57	46	47	46	47	41	41	42
Glucose T0	Avg. LAB TAT	64	50	51	53	63	33	33	68	60	35	56	48
	Percentile (90) of LAB TAT	101	63	71	53	86	47	36	135	94	45	71	64
Glucose T120	Avg. LAB TAT	167	174	167	160	155	168	148	178	165	181	158	145
	Percentile (90) of LAB TAT	215	238	180	160	188	179	199	235	205	204	179	172
Glucose T240	Avg. LAB TAT	291	284	306	285	270	306	535	286	282	358	263	275
	Percentile (90) of LAB TAT	329	319	343	285	338	340	1,051	311	314	484	281	300
Haptoglobin	Avg. LAB TAT	86	67	62	2,812	341	73	51	61	49	53	51	554
	Percentile (90) of LAB TAT	129	105	119	12,989	290	149	91	97	75	76	68	1,141

รูปที่ 3 แสดงข้อมูลระยะเวลาการรายงานผลโดยเฉลี่ย (นาที) และแสดงข้อมูลระดับนาทีที่สามารถรายงานผลร้อยละ 90 ของรายการที่สั่งตรวจทั้งหมด (90 เปอร์เซ็นไทล์) ตั้งแต่เดือน มกราคม ถึง ธันวาคม 2565

Test Count/Month Register Date

Test Group Na..	Test Name	2022 January	February	March	April	May	June	July	August	Septem..	October	Novem..	Decemb..
Chemistry	%Transferin sa..	754	467	649	594	619	664	752	723	693	797	852	698
	Albumin *	16,171	14,329	17,339	14,777	16,523	17,320	16,014	19,576	18,385	17,886	19,074	18,053
	Alkaline Phosp..	12,702	11,233	13,716	11,236	13,315	13,663	12,598	15,787	14,090	13,949	14,866	13,695
	ALT (SGPT) *	15,178	13,548	16,358	13,643	15,535	15,858	14,579	18,164	16,537	16,185	17,243	15,948
	Ammonia	23	27	37	29	84	51	57	91	54	40	52	57
	Amylase *	362	282	339	248	291	339	289	377	344	293	305	347
	AST (SGOT) *	14,924	13,336	16,082	13,428	15,308	15,642	14,348	17,903	16,338	15,912	17,007	15,713
Immunology	ACTH	43	52	58	42	55	37	46	71	60	57	54	47
	AFP *	1,455	1,334	1,571	1,278	1,558	1,673	1,376	1,672	1,541	1,485	1,690	1,558
	Aldosterone	35	36	31	31	36	50	29	28	45	51	34	57
	Amphetamines	106	76	120	85	99	126	108	100	104	76	96	91
	ANF/ANA	179	23	174	72	99	316	277	401	343	309	354	304
	Anti-beta2-Gly..	63	35	45	2	33	110	93	93	91	99	118	70
	Anti-beta2-Gly..	62	35	45	2	32	109	94	93	90	100	117	71

รูปที่ 4 แสดงข้อมูลสรุปสถิติอัตราการให้บริการตรวจทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิกตั้งแต่เดือน มกราคม ถึง ธันวาคม 2565

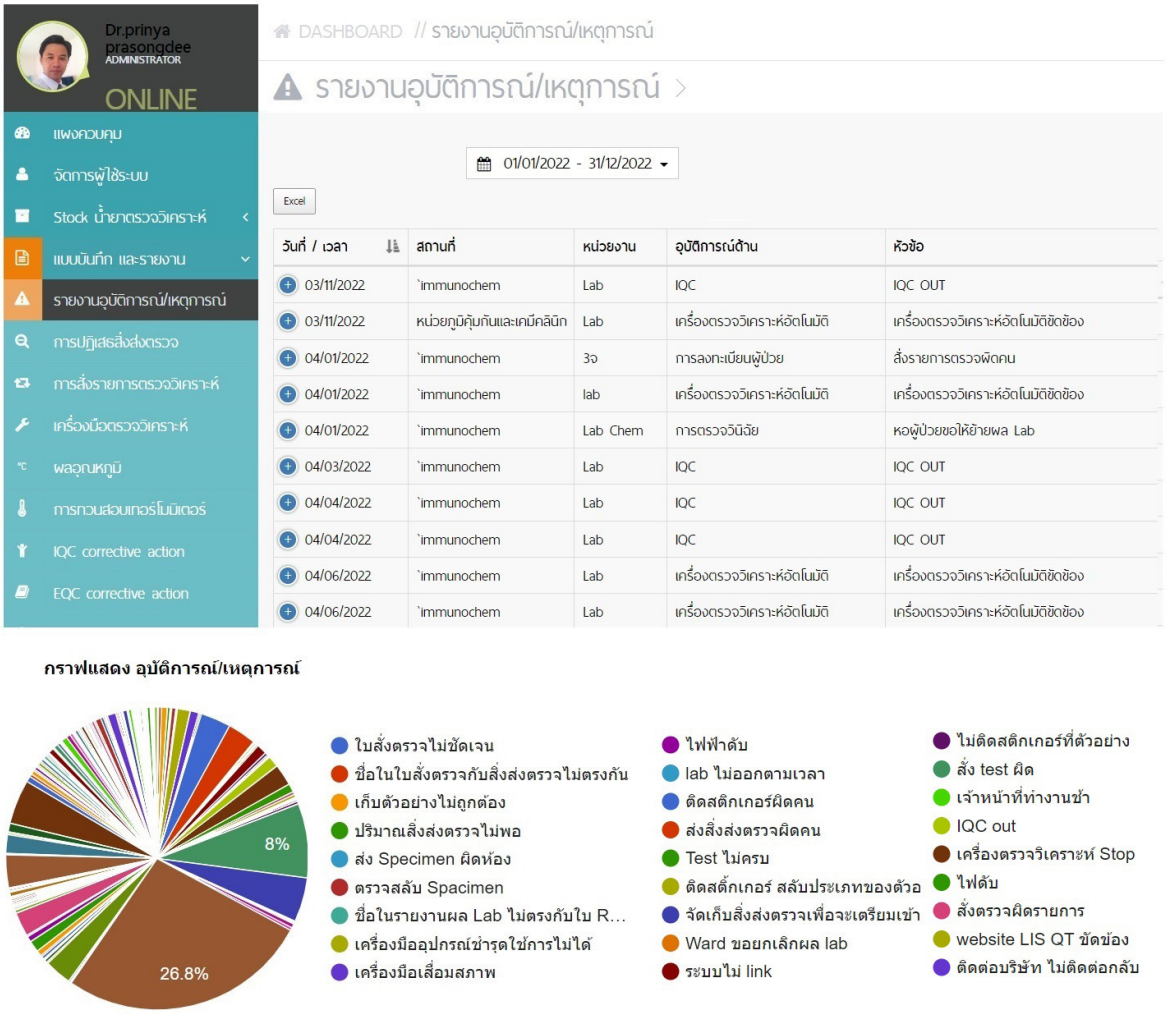
Specimen count Register Date

Specimen Abrr ..	2022 January	February	March	April	May	June	July	August	Septem..	October	Novem..	Decemb..
EDTA_A1C	6,898	6,379	7,738	6,081	7,373	7,354	6,490	8,160	7,310	7,061	8,185	7,340
Fluid	362	297	353	413	379	375	477	418	413	466	424	474
NaF	10,435	9,637	11,607	9,495	11,090	11,069	10,244	12,785	11,634	11,099	12,053	11,357
Serum	37,836	32,760	39,906	33,210	37,408	39,079	36,952	43,877	41,428	39,874	42,764	39,591
Tissue					1	1		6	2			1
U24Hr	364	281	362	257	296	276	236	337	331	294	344	281
Urine	2,533	2,102	3,217	2,124	2,558	2,486	2,405	2,720	2,608	2,564	2,946	2,360
CSF	79	117	124	78	97	153	135	121	153	141	151	135
EDTA	584	525	746	596	676	792	652	812	783	819	878	693

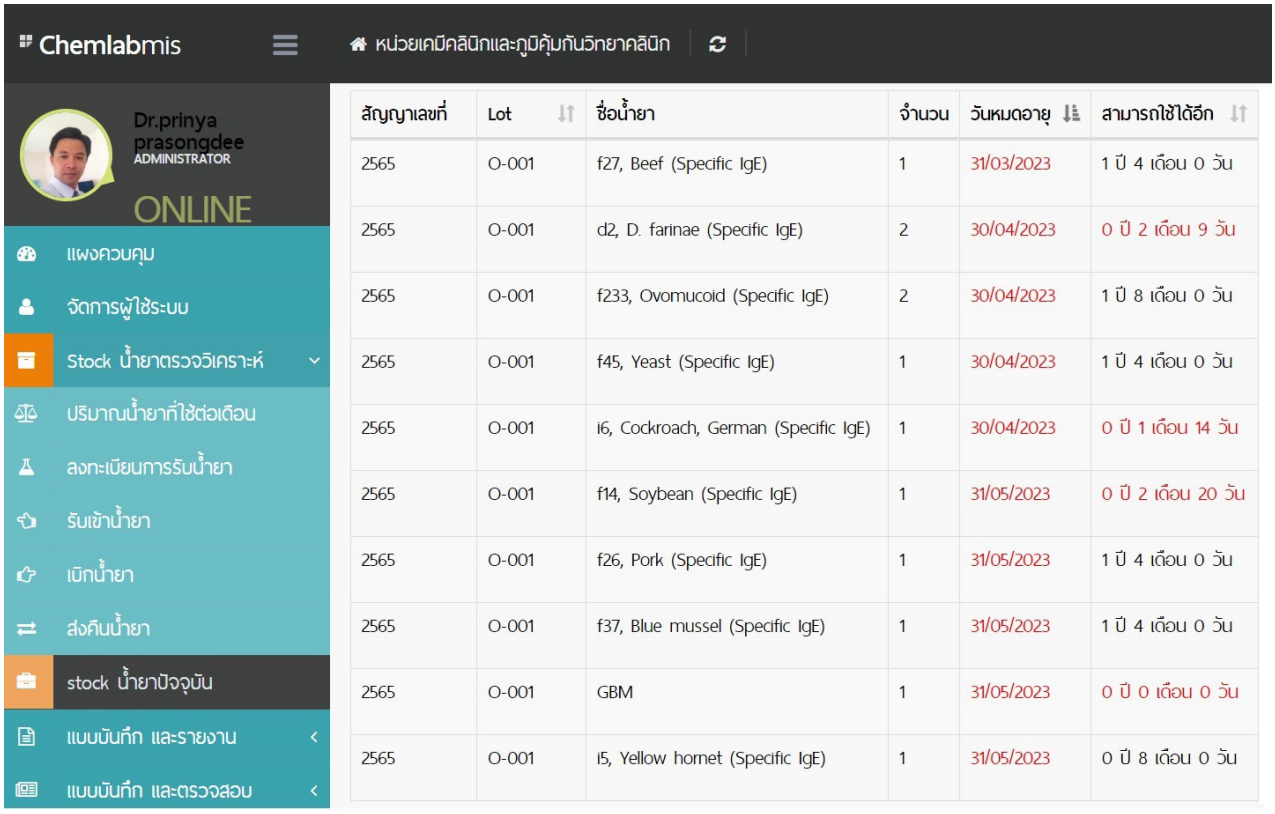
รูปที่ 5 แสดงข้อมูลสรุปสถิติของสิ่งส่งตรวจประเภทต่าง ๆตั้งแต่เดือน มกราคม ถึง ธันวาคม 2565

Test Group Na..	Test N..	January			
		Count of Key T..	Test Real Price	Test Standard ..	Test Profit Price
	T3 *	226	27,788.96	33,900.00	6,111.04
	T4 *	198	24,346.08	29,700.00	5,353.92
	Tacrolimus(..	414	226,722.96	414,000.00	187,277.04
	Testostero..	165	38,596.80	31,350.00	-7,246.80
	Testostero..	1	233.92	190.00	-43.92
	Testostero..	1	233.92	190.00	-43.92
	Testostero..	1	233.92	190.00	-43.92
	Testostero..	1	233.92	190.00	-43.92
	Tetrahydro..	34	1,659.54	4,930.00	3,270.46
	Thyroglobu..	374	75,159.04	149,600.00	74,440.96
	Thyroglobu..	395	125,787.75	158,000.00	32,212.25
Grand Total		447,729	12,930,689.13	25,469,300.00	12,538,610.87

รูปที่ 6 แสดงข้อมูลสรุปต้นทุน รายรับ และผลกำไร ในระบบบริการทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันในเดือน มกราคม 2565



รูปที่ 7 แสดงระบบการบันทึก และแสดงข้อมูลความเสี่ยงและข้อผิดพลาดระดับต่าง ๆ ตั้งแต่เดือน มกราคม ถึงี ธันวาคม 2565



สัญญาเลขที่	Lot	ชื่อน้ำยา	จำนวน	วันหมดอายุ	สามารถใช้ได้อีก
2565	O-001	f27, Beef (Specific IgE)	1	31/03/2023	1 ปี 4 เดือน 0 วัน
2565	O-001	d2, D. farinae (Specific IgE)	2	30/04/2023	0 ปี 2 เดือน 9 วัน
2565	O-001	f233, Ovomucoid (Specific IgE)	2	30/04/2023	1 ปี 8 เดือน 0 วัน
2565	O-001	f45, Yeast (Specific IgE)	1	30/04/2023	1 ปี 4 เดือน 0 วัน
2565	O-001	i6, Cockroach, German (Specific IgE)	1	30/04/2023	0 ปี 1 เดือน 14 วัน
2565	O-001	f14, Soybean (Specific IgE)	1	31/05/2023	0 ปี 2 เดือน 20 วัน
2565	O-001	f26, Pork (Specific IgE)	1	31/05/2023	1 ปี 4 เดือน 0 วัน
2565	O-001	f37, Blue mussel (Specific IgE)	1	31/05/2023	1 ปี 4 เดือน 0 วัน
2565	O-001	GBM	1	31/05/2023	0 ปี 0 เดือน 0 วัน
2565	O-001	i5, Yellow hornet (Specific IgE)	1	31/05/2023	0 ปี 8 เดือน 0 วัน

รูปที่ 8 แสดงข้อมูลคลังรายการน้ำยาตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ ตั้งแต่เดือน มกราคม ถึง ธันวาคม 2565

วิจารณ์

การดำเนินงานวิจัยด้านการพัฒนาระบบ business intelligence (BI) application สำหรับสนับสนุนการบริการของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ระดับตติยภูมิในส่วนงานห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร รพ.ศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในช่วงระยะเวลาตั้งแต่ เดือน มกราคม 2565 ถึงเดือน ธันวาคม 2565 โดยคณะผู้ศึกษาได้อาศัยโปรแกรม Tableau และ JavaScript สำหรับสร้าง web application จำนวน 2 ระบบ ได้แก่ 1) ระบบ BI สำหรับแสดงข้อมูลสรุปการวิเคราะห์ด้าน KPI (key performance index) โดยกำหนด URL คือ https://www.rocheflexstat.com 2) ระบบ BI สำหรับการบันทึก และแสดงข้อมูลสรุปการวิเคราะห์ ด้านระบบสนับสนุนการบริการต่าง ๆ โดยกำหนด URL คือ https://laboratorymis.com ซึ่ง BI ทั้ง 2 ระบบนั้น สามารถให้ผลสรุปข้อมูลตรงกับ ข้อมูลในระบบ LIS และตรงกับข้อมูลที่สรุปงานจากเอกสารได้ร้อยละ 100 ซึ่งระบบ BI ทั้ง 2 สามารถบันทึก และสรุปข้อมูลได้ ดังนี้ 1) สรุปข้อมูลระยะเวลาการรอคอยผลวิเคราะห์ทั้งระบบบริการ 2) สรุปสถิติอัตราการให้บริการตรวจทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก 3) สรุปสถิติของสิ่งส่งตรวจประเภทต่าง ๆ ที่ให้บริการ 4) สรุปข้อมูลสรุปต้นทุน รายรับและผลกำไร 5) บันทึกและแสดงผลสรุปข้อมูลความเสี่ยงต่าง ๆ 6) ระบบบริหารจัดการคลังน้ำยาตรวจวิเคราะห์ ทั้งนี้คณะผู้ศึกษาได้ประยุกต์ใช้ระบบ business intelligence (BI) application ที่พัฒนาขึ้นนี้ สำหรับเตรียมข้อมูลสนับสนุนการตัดสินใจ (decision supporting system; DSS) ในการบริหารจัดการระบบบริการทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ในด้านต่าง ๆ ดังนี้ 1) สามารถใช้ข้อมูลสรุประยะเวลาในการรายงานผลวิเคราะห์รายเดือนสำหรับดำเนินโครงการการพัฒนาต่าง ๆ เช่น นำข้อมูลสรุประยะเวลาในการรายงานผลวิเคราะห์ในเดือนมกราคม 2565 ถึงเดือน มีนาคม 2565 เป็นพื้นฐาน (base line) สำหรับดำเนินโครงการติดตั้งระบบโปรแกรมตรวจสอบและรายงานผลการตรวจวิเคราะห์โดยอัตโนมัติ (auto validation) ในเดือน เมษายน ถึง พฤษภาคม 2565 ซึ่งภายหลังการดำเนินโครงการดังกล่าว ส่งผลให้สามารถลดระยะเวลารายงานผลวิเคราะห์ลงได้ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานของ Vladimira Rimac และคณะ[8] เป็นต้น 2) สามารถใช้ข้อมูลของอัตราการใช้ภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจประเภทต่าง ๆ หรือ ข้อมูลอัตราการใช้น้ำยา

ตรวจวิเคราะห์ ต่าง ๆ ในระบบคลัง มาประกอบการพิจารณาตัดสินใจการวางแผนการจัดซื้อประจำปี ซึ่งจะสามารถประมาณการจัดซื้อได้อย่างแม่นยำ ส่งผลให้การบริหารงบประมาณรายจ่ายมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อลดผล กระทบจากการจัดซื้อเกินจำนวน หรือการจัดซื้อที่ไม่เพียงพอโดยอาศัยระบบการแจ้งเตือนรายการน้ำยาใกล้หมด และแจ้งเตือนน้ำยาไม่พอใช้ ซึ่งระบบนี้ถูกพัฒนาขึ้นมาใหม่ใน application นี้ ซึ่งไม่พบในงานของ Marut Phoophaniat[9] 3) สามารถใช้ข้อมูลสรุปต้นทุน รายรับ และผลกำไร มาประกอบการพิจารณากำหนดนโยบายบริการ ทั้งในด้านการขยายตลาดบริการให้กว้างขึ้นในกลุ่มรายการตรวจบางรายการ หรือลดการบริการลง ในบางรายการตรวจที่จะส่งผลต่อภาระงบประมาณของ โรงพยาบาล 4) สามารถใช้ข้อมูลสรุปความเสี่ยงและข้อผิดพลาดต่าง ๆ ในระบบบริการทางห้องปฏิบัติการ มาประกอบการพิจารณา จัดทำกิจกรรม CQI (continuous quality improvement) เพื่อลดอุบัติการณ์ที่ไม่พึงประสงค์ต่อไป อย่างไรก็ตามการพัฒนาระบบ BI ที่ใช้สำหรับสนับสนุนระบบบริการทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ยังไม่เป็นที่เผยแพร่มากนัก เนื่องจากต้องใช้เวลา และต้นทุนในการพัฒนาที่ค่อนข้างสูง ประกอบกับต้องมีทักษะ ความรู้ด้านโปรแกรมบริหารจัดการข้อมูลเป็นอย่างดี โดยทั่วไปจะพบเการพัฒนาในรูปแบบ application เพียงด้านเดียวเช่น การพัฒนาเว็บแอปพลิเคชัน การรายงานผลทางห้องปฏิบัติการผู้ป่วยโรคเบาหวาน[10] เป็นต้น ซึ่งยังคงไม่ครอบคลุมเหมือนการศึกษานี้

สรุป

ภายหลังจากการพัฒนาระบบ BI นี้ ทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก สามารถลดภาระงานด้านการบันทึก และสรุปข้อมูลต่าง ๆ ได้ รวมถึงมีเครื่องมือสำหรับสรุปตัวชี้วัด (KPI) ต่าง ๆ ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว และครบถ้วน ซึ่งจะเป็นพื้นฐานที่สำคัญ สำหรับการกำหนดทิศทางการทำงานในระบบบริการทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ผู้บริหารยังสามารถวางแผนการดำเนินงานต่าง ๆ บนข้อมูลจริงที่เป็นปัจจุบัน ส่งผลให้สามารถค้นหาข้อผิดพลาด ในระบบบริการได้โดยง่าย ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาที่มั่นคง และยั่งยืน อย่างไรก็ตามต้องมีการติดตามประเมินผลการใช้ BI อย่างต่อเนื่องเพื่อประเมินประสิทธิภาพต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ระบบ BI ที่พัฒนาขึ้นนี้ยังต้องพัฒนาเพิ่มเติมสำหรับการใช้งานทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในสาขาวิชาต่าง ๆ ได้แก่ ห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์วินิจฉัย ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก และห้องปฏิบัติการระดับชีวโมเลกุลวินิจฉัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Lippi G, Da Rin G. Advantages and limitations of total laboratory automation: a personal overview. Clin Chem Lab Med. 2019;57(6):802-11.
2. McCudden CR, Henderson MPA, Jackson BR. Chapter 18 - Laboratory information management. In: Clarke W, Marzinke MA, editors. Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition): Academic Press; 2020: 301-21.
3. Papawadee H, Thipaporn J, Prinya P. Auto Verification in Clinical Chemistry and Immunology Laboratory at Srinagarind Hospital. Srinagarind Med J 2022;37(Suppl): 41-48.
4. Patthama T, Nivet C. Business Intelligence systems to support executive forecasting and decisions making case study: Healthcare. Science and Technology Silpakorn University. 2018;5(4):16-30.
5. Luigi JB, Nunzia C, Roberta P, Umberto P. Business intelligence in the healthcare industry: The utilization of a data-driven approach to support clinical decision making, Technovation.2023;120;102482
6. Azadmanjir Z, Torabi M, Safdari R, Bayat M, Golmahi F. A Map for Clinical Laboratories Management Indicators in the Intelligent Dashboard. Acta Inform Med. 2015;23(4):210-214.
7. Kenneth E, Julie E. Kendall. Systems analysis and design te, Upper Saddle River PH. (2005).

8. Rimac V, Lapic I, Kules K, Rogic D, Miler M. Implementation of the Autovalidation Algorithm for Clinical Chemistry Testing in the Laboratory Information System. Laboratory Med 2018;49(3):284-91.

9. Marut Phoophaniat. Development of Web Application for Management of Medicine and Medical Materials : Case Study Mstock Application. The Sci J Phetchaburi Rajabhat University 2018;15(1):66-76

10. Pitchwara J, Uthai T, Wattana O and Watcharin S. Development of a Web Application for Reporting Laboratory Results to Patients with Diabetes in Health Promoting Hospitals of Suphanburi. College Network J Nurs Public Health 2021;8(3):296-308.

SMJ

นิพนธ์ต้นฉบับ . Original Article

การศึกษาความคงตัวของระดับ Glucose , Total Bilirubin และ Direct Bilirubin ในระบบ Total lab automation พร้อมด้วยระบบตู้เย็นเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

ปภาวดี หงส์อาจ * , ปริญญา ประสงค์ดี , ทิพาพร จรูญศิริมณีกุล, นภิทตา บัวศรี
หน่วยภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Stability Levels of Serum Glucose, Total Bilirubin and Direct Bilirubin in Total Lab Automation with Refrigerated Sample Store

Papawadee Hongart *, Prinya Prasongdee , Thipaporn Jaroonsirimaneekul, Napitta Buasri
Clinical Immunology and Chemistry unit, Clinical Laboratory Section, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand.

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: Total lab automation (TLA) ที่มีส่วนประกอบการจัดเก็บตัวอย่างหลังการตรวจวิเคราะห์เป็นระบบเก็บถาวรแบบแช่เย็น (P501) เพิ่มความสะดวกในการใช้งานและรักษาความเสถียรของตัวอย่างที่มากกว่า เมื่อเทียบกับระบบจัดเก็บแบบแมนนวล TLA ที่มี P501 มีข้อบ่งชี้การเคลื่อนที่อย่างต่อเนื่องของตัวอย่าง และอาจทำให้ตัวอย่างมีความผันผวนของอุณหภูมิได้ง่าย การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์คือศึกษาความคงตัวของระดับ glucose , total bilirubin และ direct bilirubin ในซีรั่มภายใต้ระบบ total lab automationc พร้อมด้วยระบบตู้เย็นเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

วิธีการศึกษา: เป็นการออกแบบเชิงทดลองในขั้นทดลอง โดยทำการทดสอบ internal quality control (IQC), external quality assurance (EQA) และ laboratory total error of glucose, total bilirubin และ direct bilirubin เก็บตัวอย่างจำนวน 64 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยนอกที่เข้ามารับบริการที่หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยาและเคมีคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE661363) ตัวอย่างเลือดถูกปั่นแยกและตรวจวิเคราะห์ภายใน 30 นาทีหลังจากเจาะเลือดแล้วทำการตรวจอีกครั้งที่เวลา 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมงหลังจากการเก็บหลอดเลือดที่ p501 โดยใช้ pair t test เป็นการทดสอบ

ผลการศึกษา: พบว่าระดับของ serum glucose, total bilirubin และ direct bilirubin ในตัวอย่างเลือดที่เก็บไว้ที่ P501 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากตัวอย่างเลือดที่ตรวจวัดทันที

สรุป: การศึกษานี้ให้การสนับสนุนที่เชื่อถือได้ว่าสามารถทำการสั่งการทดสอบเพิ่มเติมสำหรับ serum glucose, total bilirubin และ direct bilirubin นานถึง 24 ชั่วโมง

คำสำคัญ: ค่าคงตัว,ระดับสารเคมี,เวลา,อุณหภูมิ

*Corresponding author: Papawadee Hongart, E-mail: ttayat@kku.ac.th

Background and Objectives: Total Lab Automation (TLA) with post-analytical units are refrigerated archiving systems (p501) offer more practical and sample stability benefits. In contrast to manual storage systems, TLA with P501 indicate continuous motion of samples and may leave samples prone to temperature fluctuations. This study investigates analyses stability of glucose, Total bilirubin and Direct bilirubin in serum within an automated storage module.

Materials and Methods: This was an experimental design prospective study in which internal quality control (IQC), external quality assurance (EQA) and Laboratory total error of glucose, total bilirubin and direct bilirubin were tested. The 64 samples were collected from patients who underwent examination in the immunology and clinical chemistry unit, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kean University (HE661363). The blood samples were centrifuged and analyzed within 30 minutes after collecting and left standing for 2, 4, 6, 8 and 24 hours at p501. After standing, the samples were analyzed again that pair t test were test for comparison.

Results: The results showed that the value of serum glucose, total bilirubin and direct bilirubin in blood samples left to stand for 24 hours at p501 were not significant different from the immediately measured samples.

Conclusions: This study provides reliable support for ordering additional tests for serum glucose, total bilirubin and direct bilirubin for up to 24 hours.

Key word: stability, blood chemical lever, time and temperature

บทนำ

หน่วยภูมิคุ้มและเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ให้บริการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีและสารคัดหลั่งของผู้มารับบริการทั้งภายในและภายนอกโรงพยาบาล รวมทั้งงานวิจัยและคลินิกเอกชลทั่วทั้งจังหวัดขอนแก่นและทั่วภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีปริมาณงานวันละ 2,000 – 2,500 ราย (เฉลี่ย 2,250 ราย) ในจำนวนนี้ร้อยละ 4 (80 ราย/วัน) มีการสั่งตรวจการทดสอบบางรายการเพิ่มเติมโดยแพทย์ขอใช้สิ่งส่งตรวจ (ซีรัม) เดิมที่ใช้ตรวจตอนแรก แต่พบปัญหาว่าบางรายการทดสอบนั้นไม่สามารถทำการทดสอบให้ได้ ในกรณีที่สิ่งส่งตรวจถูกทิ้งไว้นานกว่า 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหลังจากเจาะเลือด เนื่องจากปัจจัยการรบกวนต่าง ๆ จะส่งผลให้ค่าการทดสอบ glucose ลดลงได้[1] ส่วนความคงตัวของรายการ total bilirubin และ direct bilirubin นั้นจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และสภาวะของการสัมผัสแสงสว่าง โดยที่ total bilirubin และ direct bilirubin มีความคงตัวที่ 4 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 24 ชม. และไม่เกิน 1 ชั่วโมงตามลำดับ[2] ฉะนั้นถ้ามีการขอเพิ่มรายการตรวจทางหน่วยภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิกจึงต้องขอเจาะเลือดผู้ป่วยเพื่อทำการทดสอบใหม่ จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับสารเคมีในเลือดที่มีผู้ศึกษาไว้ พบว่าการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในเวลาต่าง ๆ กันของแต่ละการทดสอบจะมีการเปลี่ยนแปลงไม่เท่ากัน ถ้าทิ้งไว้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และชนิดของหลอดเลือดต่างกัน[3] ทั้งนี้ในระบบบริการของหน่วยภูมิคุ้มและเคมีคลินิกในปัจจุบันใช้การเก็บด้วยหลอดเก็บชนิด serum separated Tube (SST) โดยเก็บหลอดเลือดไว้ที่ระบบตู้เย็นอัตโนมัติ รุ่น P501 (post-analytical units are refrigerated archiving systems) หลังจากที่ทำการทดสอบเสร็จสิ้นแล้ว และเก็บไว้ใน P501 นาน 3 วัน สำหรับกรณีที่มีความประสงค์ขอสั่งตรวจวิเคราะห์เพิ่มเติม หรือ กรณีที่มีความผิดผลาดที่ต้องการตรวจวัดซ้ำ อย่างไรก็ตามการทดสอบที่จำเป็นต้องตรวจเพิ่มบ่อย ๆ ได้แก่ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin ผู้ศึกษาจึงได้ดำเนินการศึกษาความคงตัวของระดับ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ในระบบ Total lab automation พร้อมด้วยระบบตู้เย็นอัตโนมัติ รุ่น P501 ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความคงตัวของระดับ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin ที่เวลา 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง ในระบบ total lab automation พร้อมด้วยระบบตู้เย็นอัตโนมัติ รุ่น P501 ณ หน่วยภูมิคุ้มและเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์

วิธีการศึกษา

รูปแบบการศึกษา

เป็นการศึกษาทดลอง โดยตัวอย่างเลือดที่จัดเก็บจากกลุ่มผู้ป่วยนอกนำมาปั่นแยกซีรัมด้วยระบบ Total lab automation โดยเครื่อง Cobas 8,100 ที่ความเร็วรอบในการปั่น 3,500 rpm เป็น เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นระบบ automation ทำการตรวจวิเคราะห์ภายในเวลาไม่เกิน 30 นาที แล้วจัดเก็บหลอดเลือดไว้ที่ตู้เย็นเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ (P501) และเมื่อครบเวลาที่ 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง จะทำการวิเคราะห์ ตรวจ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin

กลุ่มประชากรศึกษา

กลุ่มผู้ป่วยนอกที่มารับบริการตรวจที่หน่วยภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ.2566 จำนวน 64 ราย (HE661363) โดยคำนวณขนาดตัวอย่างจากความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่าง 2 กลุ่ม (detecting the difference between 2 population means) เพื่อความสะดวกในการเก็บข้อมูลและความถูกต้องของการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เลือดที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์และเลือกช่วงค่าต่ำ ค่ากลาง และค่าสูง ครอบคลุมเกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินใจของแพทย์ (medical decision levels) วันละ 20 ตัวอย่าง

สารควบคุมคุณภาพ

สารควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control : IQC) เพื่อศึกษาความแม่นยำและความถูกต้อง คือ ระดับปกติ และระดับผิดปกติ ของบริษัท BIO-RAD ใช้กับการทดสอบglucose, total bilirubin และ direct bilirubin โดยทำการตรวจสอบทุกวันในช่วงการศึกษานี้ ซึ่งกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation; %CV) ไม่เกิน 1 ใน 3 ของ allowable total error

สารควบคุมคุณภาพโดยองค์กรภายนอก (external quality assurance : EQA) โดยการศึกษานี้ใช้ของ randox international quality. assessment scheme (RIQAS) ในโปรแกรม general clinical chemistry ซึ่งกำหนดให้ค่าการยอมรับความถูกต้องของ SDI (standard division index) อยู่ในช่วง -1.5 ถึง 1.5

ความผิดพลาดรวม (total error; TE) ของการตรวจคำนวณโดยใช้สูตร % TE = (1.65 × % CV) + % bias4 เมื่อกำหนดให้ %bias =[(lab result - EQA mean) / EQA mean] x 100 และค่า TE ที่คำนวนได้ต้องมีค่าน้อยกว่า TE ของ clinical laboratory improvement amendments (CLIA) ในรายการตรวจ glucose และ total bilirubin และ น้อยกว่า TE ของ desirable BV: eesirable specifications for allowable total error, based on biological variability (BV) ในรายการตรวจ direct bilirubin

ขั้นตอนการทดสอบ

1. ใช้สิ่งส่งตรวจเป็นเลือด โดยใช้หลอดสุญญากาศ (serum separated tube ; SST) ขนาด 13 x 75 มิลลิเมตร ที่เป็นหลอดเก็บชนิด (serum separated Tube ; SST) ปริมาตรเลือด 5 มิลลิลิตร จำนวน 64 ราย โดยบันทึกเวลาที่เจาะเลือดเป็นการเริ่มนับเวลาของตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ แล้วนำตัวอย่างมาปั่นแยกชั้นน้ำเหลืองและเม็ดเลือดโดยใช้ระบบ total lab automation โดยใช้ความเร็ว 3,500 รอบ/นาที ใช้เวลาปั่น 10 นาที ควบคุมอุณหภูมิ 25°C หลังจากปั่นแยกชั้นระหว่างน้ำเหลืองกับเม็ดเลือดนำซีรัมมาตรวจ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin ทันทีภายใน 30 นาที ด้วยระบบ total lab automation ตรวจวิเคราะห์ที่เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas c702 โดยควบคุมคุณภาพการตรวจวัดด้วยสารควบคุมคุณภาพ (control material) ทุกครั้งก่อนทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง
2. ทำการวิเคราะห์ ตรวจ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin ซ้ำอีกครั้ง หลังจากจัดเก็บหลอดตัวอย่างที่ตู้เย็นเก็บตัวอย่างอัตโนมัติที่ 2 , 4 , 6 , 8 และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 2-8°C เริ่มนับเวลาหลังจากเจาะเลือด
3. วิธีการตรวจวัดของแต่ละการทดสอบ

3.1 การทดสอบ glucose เป็นวิธี enzymatic method ใช้ enzyme hexokinase และ G-6-PDH โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัทโรช ไดแอกโนสติกส์ (ประเทศไทย) จำกัด เป็นน้ำยาผลิตจากประเทศเยอรมัน

3.2 การทดสอบ total bilirubin เป็นวิธี ใช้ enzymatic assay without pyridoxal phosphate activation โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัทโรช ไดแอกโนสติกส์ (ประเทศไทย) เป็นน้ำยาผลิตจากประเทศเยอรมัน

3.3 การทดสอบ direct bilirubin เป็นวิธี ใช้ enzymatic assay without pyridoxal phosphate

activation โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัทโรช ไดแดกโนสติกส์ (ประเทศไทย) เป็นน้ำยาผลิตจากประเทศเยอรมัน

4. เปรียบเทียบค่าผลการตรวจที่ได้ในเวลาต่าง ๆ กับค่าที่วิเคราะห์ทันทีหลังจากเจาะเลือด (กำหนดเป็น 0 ชั่วโมง) โดยใช้ Pair t test ($p < 0.05$)

ผลการศึกษา

การทดสอบสารควบคุมคุณภาพภายใน (IQC) รายการ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin พบว่าทุกการทดสอบสารควบคุมคุณภาพนั้นค่าที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วงค่าที่ยอมรับได้ทั้ง 3 การทดสอบ และค่าความแม่นยำ ของการทดสอบซึ่งดูผลจากค่าร้อยละ สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation; %CV) โดยรายการตรวจ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin มีค่า %CV เท่ากับ 1.15-1.18 , 1.16-1.32 และ 1.74-1.98 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 1 ใน 3 ของ allowable total error และผลการทดสอบ EQA พบว่าค่า SDI (standard division index) ของรายการตรวจ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin เท่ากับ 0.02, -0.12 และ 0.16 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง -1.5 ถึง 1.5 นอกจากนี้ค่า lab total allowable error (%) ยังน้อยกว่าค่า total allowable error (%) ของ CLIA และของ BV (ตารางที่ 1)

การทดสอบ glucose โดยการเปรียบเทียบการตรวจ serum glucose ที่ชั่วโมงต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ NaF glucose ที่ 0.5 ชั่วโมง พบว่าการตรวจ serum glucose ที่ 0.5, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (pair t test : $p<0.05$) ที่ p value เท่ากับ 0.273, 0.914, 0.965, 0.339, 0.468 และ 0.193 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

การทดสอบ total bilirubin โดยการเปรียบเทียบการตรวจ total bilirubin ที่ชั่วโมงต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ total bilirubin ที่ 0.5 ชั่วโมง พบว่าการตรวจ total bilirubin ที่ 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (pair t test : $p<0.05$) ที่ $p= 0.280$, 0.461, 0.070, 0.102, และ 0.073 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

การทดสอบ direct bilirubin โดยการเปรียบเทียบการตรวจ direct bilirubin ที่ชั่วโมงต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ direct bilirubin ที่ 0.5 ชั่วโมง พบว่าการตรวจ direct bilirubin ที่ 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (pair t test : $p<0.05$) ที่ $p= 0.238$, 0.089, 0.051, 0.921, และ 0.638 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และ %CV ของสารควบคุมคุณภาพภายใน และแสดงค่า ค่าเฉลี่ยกลุ่ม (mean group) ค่า lab result และค่า SDI ของสารควบคุมคุณภาพภายนอก รวมถึงค่า total allowable error (%) และค่า medical decision level

การทดสอบ	สารควบคุมคุณภาพ	N	Mean	SD	%CV	lab result	SDI	%Bias*	Total Allowable Error (%)	Lab Total Allowable Error (%)
Glucose	IQC - Biorad Normal	32	113.29	1.311	1.15	-	-	-		
	IQC - Biorad Abnormal	32	347.09	4.12	1.18	-	-	-	10[a]	2.41
	EQA-RIQAS	149	274.73	-	-	275	0.02	0.1		
Total bilirubin	IQC - Biorad Normal	39	2.73	0.06	1.32	-	-	-		
	IQC - Biorad Abnormal	39	6.34	0.19	1.16	-	-	-	20[a]	3.67
	EQA-RIQAS	78	4.55	-	-	4.5	-0.12	-1.09		
Direct bilirubin	IQC - Biorad Normal	42	1.62	0.03	1.98	-	-	-		
	IQC - Biorad Abnormal	42	3.23	0.05	1.74	-	-	-	44.5[b]	7.12
		31	1.85	-	-	1.91	0.16	3.24		

* %bias = [(Lab result - EQA mean) / EQA mean] x 100 [a] Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA), [b] desirable BV: Desirable specifications for allowable total error, based on biological variability (BV)

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจวัด serum glucose ที่ชั่วโมงต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ NaF glucose ที่ 0.5 ชั่วโมง

N=64	NaF Glucose (mg%)	Serum Glucose (mg%)					
	0.5 hr.	0.5 hr.	2 hr.	4 hr.	6 hr.	8 hr.	24 hr.
Mean	104.24	104.50	104.25	104.20	103.96	103.85	104.58
SD	28.26	28.23	28.68	28.23	28.59	28.31	28.65
Max	207.60	208.20	209.00	209.20	210.20	211.70	210.70
Min	74.90	76.10	75.90	75.80	74.90	75.00	76.30
Pair T- test		0.273*	0.914*	0.965*	0.339*	0.468*	0.193*

* การเปรียบเทียบ Serum Glucose (mg%) ที่ชั่วโมงต่าง ๆ กับ NaF glucose ที่ 0.5 hr.

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจวัด total bilirubin ที่ชั่วโมงต่าง ๆ เปรียบเทียบกับที่ 0.5 ชั่วโมง

N=64	Serum Total Bilirubin (mg%)					
	0.5 hr.	2 hr.	4 hr.	6 hr.	8 hr.	24 hr.
Mean	1.15	1.14	1.15	1.14	1.14	1.14
SD	2.42	2.41	2.43	2.44	2.43	2.44
Max	15.49	15.47	15.61	15.71	15.61	15.64
Min	0.20	0.21	0.19	0.18	0.19	0.20
Pair T- test		0.280**	0.461**	0.070**	0.102**	0.073**

** การเปรียบเทียบ Serum Total Bilirubin (mg%) ที่ชั่วโมงต่าง ๆ กับที่ Serum Total Bilirubin (mg%) 0.5 hr.

ตารางที่ 4 ตารางแสดงผลการตรวจวัด Direct Bilirubin ที่ชั่วโมงต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ ที่ 0 ชั่วโมง

N=64	Serum Total Bilirubin (mg%)					
	0.5 hr.	2 hr.	4 hr.	6 hr.	8 hr.	24 hr.
Mean	0.74	0.75	0.75	0.75	0.75	0.74
SD	2.06	2.06	2.06	2.06	2.04	2.04
Max	12.50	12.41	12.41	12.33	12.26	12.32
Min	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04
Pair T- test		0.238***	0.089***	0.051***	0.921***	0.638***

*** การเปรียบเทียบ Serum Direct Bilirubin (mg%) ที่ชั่วโมงต่าง ๆ กับที่ Serum Direct Bilirubin (mg%) ที่ 0.5 hr.

วิจารณ์

การให้บริการตรวจวิเคราะห์รายการ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin หน่วยภูมิคุ้มและเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มีความแม่นยำและถูกต้อง โดยมีค่า % ความผิดพลาดรวม (total error; TE) ของ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin เท่ากับ 2.41%, 3.67% และ 7.12% ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าค่าความผิดพลาดรวมที่กำหนด และผลการทดสอบความคงตัวของ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin ที่อุณหภูมิ 2-8°C ในระบบตู้เย็นอัตโนมัติ รุ่น P501 (post-analytical units are refrigerated archiving systems) ที่เวลา 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมงนั้นให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการตรวจที่ 0.5 ชั่วโมง (30 นาที) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Carlos Fernando และคณะ ที่ศึกษาความคงตัวของ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin ใน Serum และ K3EDTA plasma ที่อุณหภูมิ 4-8°C โดยสามารถเก็บได้นานถึง 15 วัน[5] โดยทั่วไปการตรวจระดับ glucose ในเลือดนั้นมักจะใช้ NaF เป็นสารยับยั้งกระบวนการ glycolysis ของเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้เพื่อให้ระดับ glucose ใน plasma นั้นมีความคงที่ ไม่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป อย่างไรก็ตามการตรวจ glucose ใน serum ก็ยังคงมีความจำเป็นเนื่องจากสิ่งส่งตรวจที่มีสาร NaF นั้นจะมีข้อจำกัดในการตรวจสาร chemistry parameter อื่น ๆ นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยเด็กที่ไม่สามารถเจาะเก็บเลือดในปริมาณมากได้ จึงมักจะพบการส่ง serum มาตรวจเท่านั้น ในส่วนของการตรวจรายการ total bilirubin และ direct bilirubin นั้นมักจะพบความคงตัวที่แตกต่างกันไปในแต่ละการศึกษา ทั้งนี้ปัจจัยที่สำคัญของความคงตัวคือ การสัมผัสแสงของสิ่งส่งตรวจ เนื่องจาก bilirubin นั้นจะมีการสลายไปเมื่อสัมผัสแสงโดยเฉพาะแสง fluorescence ซึ่งการศึกษานี้ได้ทดสอบหาความคงตัวของ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin ที่อุณหภูมิ 2-8°C ในระบบ P501 ซึ่งระบบดังกล่าวจะเก็บตัวอย่างภายหลังการตรวจวิเคราะห์ไว้ในที่มืด และระบบรางในการส่งตัวอย่างไปตรวจ ณ เครื่องตรวจต่าง ๆ ก็มีลักษณะพรางแสง จึงมีผลทำให้สามารถรักษาปริมาณของ bilirubin ไว้ได้ การศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนที่น่าเชื่อถือสำหรับการสั่งเพิ่มรายการตรวจวิเคราะห์ glucose, total bilirubin และ direct bilirubin ได้นานถึง 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้ศึกษาในระบบบริการตรวจด้วย Total lab automation พร้อมด้วยระบบตู้เย็นเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ (p501) เท่านั้นหากเกิดการชำรุดของระบบตู้เย็นเก็บตัวอย่างอัตโนมัติก็ไม่สามารถเพิ่มการตรวจวิเคราะห์รายการดังกล่าวได้ นอกจากนี้ควรศึกษาถึงความคงตัวของรายการตรวจวิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันและเคมีคลินิกอื่น ๆ เพิ่มเติมสำหรับเพิ่มประสิทธิภาพในระบบบริการต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Phattanapong Choosongsang, Panudda Musigavon, Boonlert Wilairat, Pittaya Nubtueboon. Changes in Levels of Glucose, BUN, Creatinine, Na+, K+, Cl- and TCO2 in Centrifuged Blood After Being Left to Stand at Room Temperature. Songkla Med J 2011;29(5):203-14.
2. Pattanapong Chusongsang, Panadda Musikawan, Pensiri Chusongsang, Boonlert Wilairat, Anothai Phokathikorn. Changes in the levels of biological substances for liver function tests and lipid profiles in the centrifuged blood in 72 hours. Archives of Allied Health Sciences 2013;25(3):213-26.
3. Oddoze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. Clin Biochem 2012;45(6):464-9. doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.01.012.
4. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Invest 1999;59(7):491-500. doi.org/10.1080/00365519950185229.
5. Flores CFY, de Las Mercedes Hurtado Pineda Á, Bonilla VMC, Sáenz-Flor K. Sample management: stability of plasma and serum on different storage conditions. EJIFCC 2020;31(1):46-55.

SMJ

นิพนธ์ต้นฉบับ . Original Article

การประเมินคุณภาพของ Pooled Leukocyte Depleted Platelet Concentrates และ Pooled Leukocyte Poor Platelet Concentrates ใน Platelet Additive Solutionโดยการตรวจหา Isohemagglutinin titer ที่มีระดับต่ำ

เจตนิพัทธิ์ มาตรา[1], รณฤทธิ์ บุญรัตน์[1*],จงกล อรรคฮาต[1], ภัทรพล เทียนศรี[1], วิยะดา ปัญจรัก[1,2], เกรียงศักดิ์ เจนวิถีสุข[1,4]

[1]คลังเลือดกลาง [2] สาขาวิชาสรีรวิทยา [3]สาขาวิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

An Evaluation of Pooled Leukocyte Depleted Platelet Concentrates and Pooled Leukocyte Poor Platelet Concentrates in Platelet Additive Solution with Emphasis on Anti-A and Anti-B Titer Levels in Group O Blood

Chetniphat Mattra[1], Ronnarit Boonyarat[1*], JongkolAkahat[1], Pattarapon Tiensri[1], Wiyada Panjaruk[1,2], Kriangsak Jenwitheesuk[1,3]

[1] Blood Transfusion Centre, [2]Department of Physiology, [3]Department of Surgery, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: ปัญหาการขาดแคลนของ platelet component เป็นปัญหาที่พบได้ทุกธนาคารเลือดเนื่องจากมีอายุจำกัดเพียง 5-7 วัน โดยการใช้เกล็ดเลือดต้องพิจารณาใช้กับหมู่เลือดที่เข้ากันได้กับหมู่เลือดของผู้ป่วย แต่โดยทั่วไปมักจะเลือกใช้ตรงตามหมู่เลือด ABO แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากปัญหาการขาดแคลนในธนาคารเลือดหลายแห่งได้มีการเตรียม platelet component ชนิด low anti-A/anti-B titer (isohemagglutinin titer) เพื่อใช้สำหรับให้กับผู้ป่วยที่เป็น ABO incompatible ได้อย่างปลอดภัยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในหมู่เลือด O มักจะมีระดับของ isohemagglutinin titer ที่สูงกว่าประชากรที่มีหมู่เลือด ABO ชนิดอื่น ในปัจจุบันคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นได้มีการเตรียมเกล็ดเลือดที่มีการเติมน้ำยา PAS ในอัตราส่วนร้อยละ 60 ซึ่งจะช่วยลดปริมาณพลาสมาและช่วยลด isohemagglutinin titer ให้ต่ำลงการศึกษาครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อการตรวจหา isohemagglutinin ที่ low titer ในเตรียม Pooled Leukocyte Depleted Platelet Concentrates (LDPPC) และ Pooled Leukocyte Poor Platelet Concentrates (LPPC) ใน Platelet Additive Solution (PAS) หมู่เลือด O

วิธีการศึกษา: เตรียม plasma ที่ได้จาก LDPPC และ LPPC โดยนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และนำไปเจือจาง 1:64 และ 1:128 Label หลอดทดลองที่ใช้ทดสอบสำหรับ Anti-A/Anti-B อย่างละชุด ดูด plasma ที่เจือจาง 1: 64 ปริมาตร 100 µl ใส่ทั้งสองหลอดทดลอง จากนั้น หลอดทดลอง A เติม 3% A cell ปริมาตร 50 µl หลอดทดลอง B เติม 3% B cell ปริมาตร 50 µl จับเวลา 5 นาที ปั่นอ่านผล และบันทึกผลการทดสอบ 1:128 ทำเช่นเดียวกับ 1:64

ผลการศึกษา: จากการตรวจ titer ของ LDPPC 92 ชุด และ LPPC 33 ชุด ที่เตรียมใน PAS รวมทั้งหมด 125 ชุด พบว่า ค่า titer anti- A น้อยกว่าหรือเท่ากับ 64 จำนวน 123 ชุด (ร้อยละ 98.4) anti-B 125 ชุด (ร้อยละ 100) ชุดตามลำดับ

สรุป:จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า LDPPC และ LPPC หมู่เลือด O ที่เตรียมในน้ำยา PAS ช่วยลดระดับของplasma ที่ผสมอยู่ใน platelet component ได้และทำให้มีระดับ isohemagglutinin titer ที่ต่ำลงเช่นกัน โดยพบว่าส่วนใหญ่มีระดับของ titer ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 64 (low titer) จะสามารถนำไปจ่ายให้กับผู้ป่วยได้ทุกหมู่เลือดโดยจะทำให้เกิดประโยชน์ในการบริหารจัดการและทำให้คนไข้ได้รับ platelet component ที่เพียงพอทั้ง ขนาด และปริมาณตามการรักษาของแพทย์

คำสำคัญ: เม็ดเลือดขาว, เกล็ดเลือด, ความเข้มข้นของเกล็ดเลือด, ส่วนประกอบของเกล็ดเลือด

*Corresponding author: Ronnarit Boonyarat, E-mail: ronnbo@kku.ac.th

Abstract

Background and Objective: The shortage of platelet components is a frequent issue in every blood bank due to a limited shelf-life of 5-7 days. Platelet component transfusion necessitates consideration of ABO blood group compatibility. Generally, ABO-identical platelet components are firstly selected. However, during platelet shortage, Minor incompatible platelet components with low-titer Anti-A/Anti-B (isohemagglutinins) can be safely utilized, particularly if they are Group O components with low-titer isohemagglutinins. Such utilization could alleviate the platelet shortage. Currently, Blood Transfusion Centre of the Faculty of Medicine at Khon Kaen University prepares platelets by mixing them with a Platelet Additive Solution (PAS) in a 60% ratio to reduce plasma volume, thereby reducing isohemagglutinin titer. This research aimed to determine the percentage of Group O platelet components with low-titer isohemagglutinins prepared with the current Leukocyte Depleted Platelet Concentrates (LDPPC) and Pooled Leukocyte Poor Platelet Concentrates (LPPC) in PAS methods.

Methods: A retrospective study of Blood Transfusion Centre data from the Faculty of Medicine at Khon Kaen University to establish the percentage of Group O platelet components prepared with LDPPC and LPPC in PAS methods that have anti-A and anti-B titers less than or equal to 1:64.

Results: Out of 92 sets of LDPPC and 33 sets of LPPC prepared in PAS, totaling 125 sets, 123 (98.4%) and 125 (100%) sets respectively had Anti-A and Anti-B titers less than or equal to 64.

Conclusion: This study found that LDPPC and LPPC from Group O prepared in PAS reduced the plasma volume mixed in the platelets, thus decreasing the titer levels. The majority had titer levels less than or equal to 64 (low titer), allowing for transfusion to patients of any blood group. This can benefit resource management and ensure patients receive sufficient platelets, both in size and volume, according to the doctor's treatment.

Keywords: Pooled Leukocyte Depleted Platelet Concentrates (LDPPC), Pooled Leukocyte Poor Platelet Concentrates (LPPC), low titer isohemagglutinin.

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของประเด็นการวิจัย

ปัญหาการขาดแคลนของ platelet component เป็นปัญหาที่พบได้ทุกธนาคารเลือดและพบมาตลอดตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากอายุการเก็บรักษาของ platelet component มีอายุเพียง 5-7 วัน และการใช้กับผู้ป่วยมักจะเลือกใช้ตรงตามหมู่เลือด ABO ของผู้ป่วย (ABO identical) ในหลายสถานพยาบาลและธนาคารเลือดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศได้มีการใช้ ABO incompatible platelet component แก่ผู้ป่วยเพื่อลดปัญหาเรื่องการขาดแคลน platelet component แต่ก็มีรายงานของการเกิดปฏิกิริยาแพ้เลือดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง acute hemolysis transfusion reaction (AHTR) อยู่บ้างถึงแม้จะพบได้ไม่บ่อยนัก เพื่อไม่ให้เกิดภาวะแทรกซ้อนดังกล่าว ในหลายธนาคารเลือดได้มีการเตรียม platelet component ชนิด low anti-A/anti-B titer (isohemagglutinin titer) เพื่อใช้สำหรับให้กับผู้ป่วยที่เป็น ABO incompatible ได้อย่างปลอดภัย ปัจจุบันแนวทางการให้ platelet component isohemagglutinin ที่ low titer ยังไม่มี standard guideline ที่ชัดเจน ซึ่งได้มีการศึกษาใน international multicenter 10 แห่ง พบว่ามีเกณฑ์ของ high-titer ที่หลากหลายซึ่งมีตั้งแต่ titer ≥ 50 ถึง ≥ 256[1] แต่ได้มีคำแนะนำให้ใช้ platelet component ที่เป็นหมู่เลือด O เนื่องจาก ABO แอนติเจนเข้าได้กับ ABO แอนติบอดีทุกหมู่เลือด และมีจำนวนประชากรในสัดส่วนที่สูงกว่าหมู่เลือดชนิดอื่น โดยใช้ระดับของ isohemagglutinin titer IgM anti-A/B ≤ 64 หรือ IgG anti- A/B ≤ 256 (ในกรณีที่ตรวจหา IgG antibodies titer ด้วย) เพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาแทรกซ้อนในผู้ป่วย[2,3] ปัจจุบันคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นได้มีการเตรียม platelet component ทั้งจาก single donor platelet apheresis และจาก whole blood derived platelet component ได้แก่ Pooled Leukocyte Depleted Platelet Concentrates (LDPPC) และ Pooled Leukocyte Poor Platelet Concentrates (LPPC) และได้มีการใช้ Platelet Additive Solution (PAS) เพื่อยืดอายุการทำงานและลดระดับของ plasma ลง ซึ่งจะส่งผลให้มีระดับ isohemagglutinin titer ใน platelet component ลดลงด้วย[4]โดยจากการศึกษาของจงกลและคณะในเรื่องการพัฒนาคุณภาพ platelet component เข้มข้นชนิด LPPC พบว่าการใช้ PAS ร่วมด้วยจะทำให้มีระดับของ isohemagglutinin titer ที่ต่ำลงในระดับ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1:64 ร้อยละ 80[5] เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดสำหรับการนำมาใช้กับผู้ป่วยที่เป็น ABO incompatible คือ การใช้ platelet component group O low isohemagglutinin titer (Universal platelet component) ซึ่งสามารถใช้ได้กับผู้ป่วยทุกหมู่ ABO ได้อย่างปลอดภัยอย่างไรก็ตามประชากรที่มีหมู่เลือด ชนิด O มักจะมีระดับของ isohemagglutinin titer ที่สูงกว่าประชากรที่มีหมู่เลือด ABO ชนิดอื่น[2] และจากการศึกษาของจงกลและคณะยังมี platelet component หมู่เลือด O low titer ยังมีปริมาณค่อนข้างน้อยทางคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการเตรียม LDPPC และ LPPC in PAS หมู่เลือด O ว่าการเตรียมด้วยวิธีปัจจุบันนั้นสามารถจะทำให้มี Universal platelet componentได้มากน้อยเพียงใด สำหรับวิธีที่ใช้ในการตรวจหา isohemagglutinin ที่ low titer นั้นได้ใช้วิธี conventional tube technique (CTT) ที่ อุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นมาตรฐาน ทำได้สะดวกและสามารถทำได้ทุกธนาคารเลือด

วิธีการศึกษา

การเก็บข้อมูล

เป็นการศึกษาแบบ retrospective study โดยเก็บข้อมูลตรวจหาตรวจหาระดับ titer ของ anti-A/anti-B หมู่เลือด O ที่ระดับTiter 1:64 และ 1:128 ในช่วงเดือนเมษายน 2564- กันยายน 2565 ของตัวอย่างที่เตรียมในงานประจำของคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

แบบฟอร์มการเก็บข้อมูล

เป็นแบบฟอร์มที่ใช้ในการบันทึกข้อมูลผลการระดับ titer ของ anti-A/anti-B ในช่วงเดือนเมษายน 2564- กันยายน 2565 ของตัวอย่างที่เตรียมในงานประจำของของคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิธีการทดสอบ

การตรวจหาค่า titer ของ anti-A และ anti-B ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน เตรียม 3% A1 cells/ B cells

1. เตรียม plasma ที่ได้จาก LDPPC และ LPPC ปริมาตร 1-2 ml นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และนำไปเจือจางด้วย normal saline solution (NSS) ในอัตราส่วน 1:64 และ 1:128

2. เติม NSS ปริมาตร 1,970 µl ใส่หลอดทดลอง 1:64 และปริมาตร 200 µl ใส่หลอดทดลอง 1:128 จากนั้นเติมplasmaปริมาตร 30 µl ใส่หลอดทดลอง 1:64 ผสมให้เข้ากันดีจากนั้นนำ plasma ที่เจือจางจากหลอดทดลอง 1:64 ปริมาตร 200 µlใส่หลอดทดลอง 1:128 ผสมให้เข้ากันดี Label หลอดทดลองที่ใช้ทดสอบสำหรับ Anti-A/Anti-B อย่างละชุด ดูด plasma ที่เจือจาง 1: 64 ปริมาตร 100 µl ใส่ทั้งสองหลอดทดลองจากนั้นหลอดทดลอง A เติม 3% A cell ปริมาตร 50 µl หลอดทดลอง B เติม 3% B cell ปริมาตร 50 µl จับเวลา 5 นาที ปั่นอ่านผลบันทึกผลการทดสอบ 1:128 ทำเช่นเดียวกับ 1:64

การวิเคราะห์ข้อมูล

เป็นวิจัยแบบพรรณนา ใช้สถิติร้อยละ โดยโปรแกรม Excel 2007

ผลการศึกษา

จากการตรวจ titer ของ LDPPC และ LPPC หมู่เลือด O ที่เตรียมในน้ำยา PAS รวมทั้งหมด 125 ชุดพบว่า ค่าtiter anti- A น้อยกว่าหรือเท่ากับ 64 จำนวน 123 (ร้อยละ 98.4) ชุด anti-B 125 (ร้อยละ 100) ชุดตามลำดับ

จากตารางที่ 1 สามารถแยกเป็น LDPPC 92 ชุด และ LPPC 33 ชุด สำหรับ LPPC พบว่าค่า titer anti- A และ anti- B น้อยกว่าหรือ เท่ากับ 64 ทั้งหมด 32 ชุด (ร้อยละ 96.9) แต่สำหรับ LDPPC ค่า titer anti- A ทั้งหมด 91 ชุด (ร้อยละ 98.9) anti- B น้อยกว่าหรือเท่ากับ 64 ทั้งหมด 92 ชุด (ร้อยละ 100)

วิจารณ์

ปัจจุบันมีการใช้ ABO incompatible platelet component ในหลายสถานพยาบาลซึ่งมีการศึกษาใน 2 สถาบันได้มีการรายงานอุบัติการณ์การเกิด hemolytic transfusion reaction สูงถึง 1 ใน 9,700 และ1 ใน 647[6] ใน United States (US) ได้มีการให้ ABO incompatible platelet component แก่ผู้ป่วยประมาณร้อยละ 10-40 ของการใช้ platelet component ซึ่งสามารถก่อให้เกิด clinically significant hemolysis ได้ แต่พบไม่มากนัก โรงพยาบาลใน US Level 1 trauma centerได้มีการจ่ายหมู่เลือด A ให้กับผู้ป่วย trauma ที่ไม่ทราบหมู่เลือด ABO ถึง ร้อยละ 79 โดยไม่ได้มีการตรวจระดับ titer-B 7 ขณะที่ United Kingdom(UK) และประเทศในสหภาพยุโรป มีแนวทางป้องกัน hemolytic transfusion reaction จากการใช้การใช้ ABO incompatible platelet component โดยการตรวจและกำหนดระดับของ titer ที่ยอมรับได้และมีการบันทึกในผู้บริจาคโลหิตที่ high-titer ซึ่งจะนำไปใช้กับผู้ป่วยหมู่เลือด O เท่านั้นในทางตรงกันข้าม US ไม่ได้กำหนดระดับของ titer ที่ยอมรับได้และไม่ได้มีการตรวจระดับ Titer ก่อนใช้ ABO incompatible platelet component ซึ่งอาจเกิดจากการที่ยังมีรายงาน clinically significant hemolysis ที่ต่ำอยู่และเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต8 คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีการใช้มีการใช้ ABO incompatible platelet component เช่นเดียวกัน ในปัจจุบันมีการใช้ SDP in PAS isohemagglutinin ที่ low titer ในช่วงที่มีการขาดแคลน platelet component

การตรวจหาระดับไตเตอร์ของ anti-A / anti-B ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานเป็นวิธีมาตรฐาน ที่ได้รับการ

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนผลการตรวจระดับ titer ของ anti-A/anti-B LDPPC 92 ชุด และ LPPC 33 ชุด

ชนิดของ platelet component	anti-A		anti-B	
	≤64 (low titer)	>64 (High titer)	≤64 (low titer)	>64 (High titer)
LPPC (N=33)	32	1	33	0
LDPC (N=92)	91	1	92	0

ยอมรับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มีข้อดีคือทำได้ง่าย ราคาถูก และสามารถตรวจหา IgM ได้ ซึ่งเป็นตัวแปรสำคัญในการเกิด AHTR ได้ แต่มีข้อเสียคือ เป็นวิธีที่ใช้ manual ทั้งหมด มีหลายขั้นตอนในการทดสอบจึงอาจทำให้เกิดความผิดพลาดขึ้นได้ รวมทั้งในขั้นตอนการอ่านผลซึ่งใช้การเขย่าอาจขึ้นอยู่กับความชำนาญและประสบการณ์ของผู้อ่านผลทำให้เกิดความแตกต่างของผลการทดสอบได้[9]

ในปี ค.ศ. 2018 ได้มีการศึกษาใน international multicenter พบความชุกของ high-titer anti-A และ/หรือ anti-B หมู่เลือด O apheresis platelet ร้อยละ 2.3–65.7 หมู่เลือด O whole bloods ร้อยละ 6.4–20.7[1] และมีการศึกษาในผู้บริจาคโลหิตจังหวัดหนองคาย พบว่าหมู่เลือด O มี ค่า IgM anti-A และ anti-B 76% และ 50% มี anti-A titer < 64 และ < 128 ตามลำดับ 2 และผู้บริจาคโลหิตหมู่เลือด O ชาวไทยในกรุงเทพพบ 84% มี anti-A titer ≤ 64 และ ร้อยละ 73 มี anti-B titer ≤64[10] อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้พบ high-titer anti-A, anti-B เพียง ร้อยละ 1.6 และ 0 ตามลำดับซึ่งมีความต่างจากงานวิจัยข้างต้นค่อนข้างสูง อาจเกิดจากวิธีการตรวจที่ต่างกันในแต่ละสถาบันและระดับของ titer ที่ใช้ต่างกัน อนึ่งงานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาที่ใช้น้ำยา PAS ร่วมด้วยและเป็นการเตรียมแบบ pooled 4 ยูนิต ซึ่งจะช่วยลดระดับของพลาสมาที่ผสมอยู่ใน platelet component ด้วย

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า LDPPC และ LPPC หมู่โอที่เตรียมในน้ำยา PAS ช่วยลดระดับของ plasma ที่ผสมอยู่ใน platelet component ได้และทำให้ระดับ isohemagglutinin titer ต่ำลงเช่นกันโดยพบว่าส่วนใหญ่มีระดับของ titer ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 64 (low titer) ซึ่งจะสามารถนำไปจ่ายให้กับคนไข้ได้ทุกหมู่เลือด โดยจะทำให้เกิดประโยชน์ในการบริหารจัดการและทำให้คนไข้ได้รับ platelet component ที่เพียงพอต่อ ขนาดและปริมาณตามการรักษาของแพทย์

ข้อเสนอแนะ

ข้อจำกัดในการศึกษาครั้งนี้คือ การตรวจโดยใช้ปริมาตรที่คำนวณไว้แล้วในระดับ titer ที่ต้องการแล้วเติมplasma และ NSS ลงไปไม่ได้มีการตรวจวิธี serial two-fold dilution เป็นวิธีกึ่งปริมาณ (semi-quantitative method) ซึ่งจะช่วยให้เราทราบถึง ระดับของ titer ที่แท้จริงของ platelet component และในการอ่านผลต้องมีการเขย่า อาจต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์ในการอ่านผลโดยในแต่ครั้งของการทดสอบอาจได้ผลที่แตกต่างกัน และการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพียงการตรวจหาระดับ Isohemagglutinin titer เท่านั้น ไม่ได้มีการศึกษาถึงการใช้กับผู้ป่วย ABO incompatible platelet component ว่ามี transfusion reaction หรือไม่ ในอนาคตควรมีการศึกษาถึงผลข้างเคียงเมื่อนำไปใช้กับผู้ป่วยเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดกับผู้ป่วยต่อไป

platelet component เป็นส่วนประกอบโลหิตที่มีอายุการเก็บรักษาได้เพียง 5 วัน ที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียสและมีต้นทุนการผลิตที่ค่อนข้างสูง หากความต้องการของผู้ใช้ไม่เหมาะสมกับการผลิต ถึงแม้จะสามารถจ่ายให้ผู้ป่วยได้ทุกหมู่เลือดก็ตามอาจทำให้ platelet component อาจหมดอายุได้ ดั้งนั้นจึงต้องมีการควบคุมการผลิตให้เหมาะสมและเพียงพอต่อความต้องการของผู้ใช้บริการ

เอกสารอ้างอิง

1. Harm SK, Yazer MH, Bub CB, Cohn CS, Jacob EK, Kutner JM, et al. Seasonal variability is not observed in the rates of high anti-A and anti-B titers in plasma, apheresis platelet, and whole blood units tested by different methods. Transfusion (Paris). 2019;59(2):762–7.
2. Yupa Urwijitaroon. The importance of detecting antibodies in the system ABO. J HematolTransfus Med. 2015;25(4):347–54.
3. Oytip Nathalang. Significance of determining ABO antibody titers in transfusion and transplantation. J HematolTransfus Med 2020;30(2):113–5.
4. Sasitorn Bejrachandra. Platelet Additive Solutions (PAS). J HematolTransfus Med 2016 ;26(3):175–7.
5. Akahat J, Jaroonsirimaneekul T, Mongkunkhamchaw N, Phunikhom K. The Primary Role of Development LPPC in PAS in Blood Transfusion Centre, Faculty of Medicine Khon Kaen University, Thailand. Srinagarind Med J 2017;32(4):86–9.

6. Yazer MH, Seheult J, Kleinman S, Sloan SR, Spinella PC. Who's afraid of incompatible plasma? A balanced approach to the safe transfusion of blood products containing ABO-incompatible plasma. Transfusion (Paris) 2018;58(2):532–8.

7. Dunbar NM, Yazer MH, on behalf of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative and the STAT Study Investigators. Safety of the use of group A plasma in trauma: the STAT study. Transfusion (Paris). 2017;57(8):1879–84.

8. Josephson CD, Castillejo MI, Grima K, Hillyer CD. ABO-mismatched platelet transfusions: Strategies to mitigate patient exposure to naturally occurring hemolytic antibodies. TransfusApher Sci. 2010 Feb 1;42(1):83–8.

9. Sunisa Onpuns, Jutaluk Jaipian, Nattarat Lorucharoen, Yuda Chongpison. Comparative study of ABO antibody titers using conventional tube technique and automated column agglutination technique. J HematolTransfus Med 2020;30(2):137–46.

10. Weerawaroon Mavichak, Pimol Chiewsilp, Jintana Tubrod, Phuraya Ovataga. ABO Antibodies Among Group O Thai Blood Donors. J HematolTransfus Med 2013;23(3):203–9.

SMJ

นิพนธ์ต้นฉบับ . Original Article

การเปรียบเทียบค่า platelet count ในผู้ป่วยที่ได้รับเกล็ดเลือดที่มีหมู่เลือด ABO ตรงกันและไม่ตรงกัน ในคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ชไมพร สิงหะ[1*], ธเนต ทนุการ[1], ธีรภัทร ป้องทัพไทย[1], ศุทธหทัย เฉลียวไว[1], ฉลาวรรณ บุตรโยจันโท[1], รณฤทธิ์ บุญรัตน์[1], กฤษดา สิงหะ[3], เกรียงศักดิ์ เจนวิถีสุข[2]
[1]คลังเลือดกลาง และ [2]ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[3]คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Comparison of Platelet Count between ABO-compatible and ABO-incompatible Platelet Transfusions in Blood Transfusion Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Chamaiporn Singha[1*], Thanet Thanukarn[1], Teerapat Pongtapthai[1], Suthatai Chaliawwai[1], Chalawan Butryojantho[1], Ronnarit Boonyarat[1], Kritsada Singha[3], Kriangsak Jenwitheesuk[2]
[1]Blood Transfusion Center and [2]Surgery, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand.
[3]Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Thailand.

Abstract

Background and objective: ABO-incompatible platelet transfusion is an alternative platelet therapy in situations with insufficient platelet. Single donor platelets in platelet additive solutions (PAS) with low antibody titer of anti-A and/or anti-B less than 64 are considered to use in this situation. The objective of this study is to compare platelet count and transfusion reactions among ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions.

Methods: A retrospective study of 330 patients of pediatric, medical and surgical patients transfused with ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions collected from blood transfusion Center, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, was analyzed. The platelet count of patients was analyzed before and after platelet transfusion by using an automated blood cell counter. Platelet transfusion reactions were also recorded.

Results: The average changed platelet counts after transfusion of ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions were 22.5±30.7, 24.0±29.3, and 24.2±29.7 x 10^3 /mm^3, respectively. No significant difference in changed platelet count after transfusion among all patients of ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions was observed. Moreover, no significant difference in changed platelet count after transfusion within pediatric, medical, and surgical patients with ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions was observed. Three events with two medical patients had transfusion reactions, including an event with ABO-compatible platelet transfusion and two events with minor ABO-incompatible platelet transfusion. No serious adverse transfusion reaction or acute hemolytic transfusion reaction (AHTR) were observed.

Conclusion: This study indicated that ABO-compatible and ABO-incompatible platelet transfusions have no different results. ABO-incompatible single donor platelet transfusions with low antibody titer should be a choice in situations with insufficient platelet and for effective platelet management to avoid expiration.

Keyword: low antibody titer, major ABO-incompatible, minor ABO-incompatible, single donor platelets in Platelet Additive Solutions (PAS)

*Corresponding author : Chamaiporn Singha, email: chamho@kku.ac.th

Introduction

Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University is a tertiary hospital in northeastern Thailand. Blood transfusion center is responsible for procuring and preparing standard blood components sufficiently[1] for the patients admitted to the hospital. Blood components are helpful for the prevention and treatment of many diseases. However, blood transfusion reactions may occur, such as infection, hemolytic transfusion reactions, febrile non-hemolytic transfusion reactions, transfusion-related acute lung injury, transfusion-associated circulatory overload, allergic reactions, transfusion-associated hypotension, and transfusion-associated graft versus host disease[2]. Therefore, selective blood component usage must be considered for necessity, indication, and appropriate dose for individuals effectively.

Platelet transfusion is indicated for the prevention and treatment of bleeding in patients with thrombocytopenia or platelet dysfunction[2]. Single donor platelet (SDP) is prepared by plateletpheresis from a donor with platelets about 30-50x10^{10}/bag and a volume of 200-300 mL[2], whereas pooled random donor platelet concentrates are prepared by pooling 4-6 platelet bags to be 1 dose, including pooled leukocyte poor platelet concentrate (LPPC) and pooled leukocyte depleted platelet concentrate (LDPC)[3]. In normal situations, ABO-compatible platelet transfusion, the same between the donor and the patient ABO blood group, is recommended for prolonged survival of platelets[2]. However, a big problem in blood transfusion center is platelet management due to its short shelf life of about 4-7 days and expensive[2]. ABO-incompatible platelet transfusions, the difference between the donor and the patient ABO blood group, are the choice for platelet management in situations of platelet shortage to give platelet to patients sufficiently and reduce unused platelet. Unlike red blood cell transfusion, platelet transfusions are not at risk for platelet intravascular destruction when transfused with ABO-incompatibility. However, the SDP and pooled platelet concentrates containing ABO antibodies may cause an acute hemolytic transfusion reaction[4].

Platelet additive solutions (PAS)[5] are crystalloid nutrient media used in plasma replacement for platelet storage to dilute anti-A and/or anti-B antibody titers leading to reduce risk of transfusion reactions. SDP in PAS with low anti-A and/or anti-B antibody titer[6] of less than 64 is an alternative to use in ABO-incompatible platelet transfusions. There are two types of ABO-incompatible platelet transfusions, major and minor ABO-incompatibility. Major ABO-incompatible platelet transfusion is transfusion out of the ABO blood group and patient plasma containing anti-A and/or anti-B antibodies, reacting with ABO antigens presented on the red cells and platelets of the donor, for example, a group O patient containing anti-A and anti-B antibodies in plasma transfused to Group A donor containing A antigen on red cells and platelets surfaces[7]. Next, minor ABO-incompatible platelet transfusion is a different ABO blood group transfusion between patient and donor, but donor plasma containing anti-A and/or anti-B antibodies react with ABO antigens presented on the red cells and platelets of the patient. For example, a group O donor containing anti-A and anti-B antibodies in plasma was transfused to group A patient containing A antigen on red cells and platelets surfaces. This study aimed to compare platelet count and transfusion reactions among ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions.

Methods

Ethical approval for this study was obtained from the Institutional Review Board (IRB) of Khon Kaen University, Thailand (HE661208). A

retrospective study of 330 patients of pediatric (n=21), medical (n=181), and surgical (n=128) patients transfused with ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions were collected from blood transfusion center, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. Based on the work instructions (WI) at blood transfusion center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, SDP, LPPC, and LDPC in PAS are used for ABO-compatible platelet transfusions, whereas only SDP in PAS with low antibody titer of anti-A and/or anti-B less than 64 is used for ABO-incompatible platelet transfusions. Averages of age received platelet, changed platelet count after transfusion, duration of platelet count after transfusion, and number of patients with transfusion reactions in each group were calculated. Platelet transfusion reactions were also recorded. Patients with transfusion reactions were investigated by clerical error check, repeating ABO and Rh blood grouping, antibody screening, direct antiglobulin test, and crossmatching in pre- and post-patient tubes and the donor bag, reporting the result into the Health Object system, and sending hemoculture of the donor bag when suspected for bacterial sepsis. Comparisons of changed platelet count after transfusion within the group of patients and type of platelet transfusion were analyzed by STATATM version 10.0 (Stata Crop., Texas, USA) using the Mann-Whitney test due to non-normal distribution data. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Comparisons of age, the dose of received platelet, changed platelet count after transfusion, duration of platelet count after transfusion, and the number of patients with transfusion reaction of pediatric, medical, and surgical patients with ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions were shown in Table 1. The average changed platelet counts after transfusion of ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions were 22.5±30.7, 24.0±29.3, and 24.2±29.7 x 10^3 /mm^3, respectively. No significant difference in changed platelet count after transfusion among all patients of ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions was observed. When comparing changed platelet count after transfusion within pediatric, medical, and surgical patients with ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions, no significant difference was observed within the three groups. A box plot compared among ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions in pediatric, medical, and surgical patients was created in Figure 1. The average changed platelet count after transfusion in all patients was 23.2±30.3x 10^3 /mm^3. Some patients with decreased or unchanged platelet count after the transfusion in three types of platelet transfusions may cause diseases at that time.

Three events with two patients had transfusion reactions. First, a 68-year-old woman medical patient was rectal cancer, hyperthyroidism, and upper respiratory infection with fever, headache, vomited, anemia and thrombocytopenia. She got many blood and blood components during admission at the hospital. Second platelet transfusion reaction events were found in the same patient at different times, transfusion-associated dyspnea (TAD) found in ABO-compatible platelet transfusion with group A in both patient and donor, and chill found in minor ABO-incompatible platelet transfusion with donor group O and patient group A. Last, a 66-year-old woman medical patient was diabetes mellitus, hypertension, chronic kidney disease stage 5, and non-ST elevation myocardial infarction (NSTEMI). She underwent surgery and got a lot of blood and blood components. Febrile non-hemolytic transfusion reaction (FNHTR) with

minor ABO-incompatible platelet transfusion with donor group B and patient group AB was found in the patient. It is most likely that the chill and FNHTR of the two patients may result from residual white blood cells transfused by SDP with unfiltered white blood cells, whereas TAD may cause by the underlining diseases of the first patient. However, no serious adverse transfusion reaction and acute hemolytic transfusion reaction (AHTR) were observed in the three types of platelet transfusions.

As shown in Table 2, the changed platelet counts after transfusion in all pediatric, medical, and surgical patients were 41.2±35.1, 24.7±23.8, and 18.2±35.9 x10^3 /mm^3, respectively. Only changed platelet counts after transfusion between all pediatric and surgical patients had a significant difference (p = 0.0097). When comparing changed platelet count after transfusion between ABO-compatible and ABO-incompatible platelet transfusions in each patient and donor blood group, as shown in

Table 1 Comparisons of age, dose of received platelet, changed platelet count after transfusion, duration of platelet count after transfusion, and number of patients with transfusion reaction of pediatric, medical, and surgical patients with ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusion. Values are presented as mean ± standard deviation or as raw data where appropriate. Changed platelet count after transfusion within the group of patients and type of platelet transfusion was compared using the Mann-Whitney test.

Type of platelet transfusion	Group of patients	n	Sex (M/F)	Age (years)	Dose of received platelet (unit)	Changed platelet count after transfusion (x 10^3 /mm^3)	Duration of platelet count after transfusion (hours)	Number of patients with transfusion reaction
ABO-compatible platelets transfusion	Pediatric patients	13	10/3	9.6±6.0	4.6±1.6	39.6±23.1[b]	15±21.9	0
	Medical patients	116	58/58	54.6±15.0	6.1±0.9	24.2±23.8[c]	8.0±7.5	1
	Surgical patients	68	48/20	57.9±15.7	6.1±0.9	16.5±40.0[d]	3.8±3.9	0
	Total	**197**	**116/81**	**52.8±18.8**	**6.0±1.0**	**22.5±30.7[a]**	**7.0±8.7**	**1**
Major ABO-incompatible platelets transfusion	Pediatric patients	1	0/1	16	6	5[b]	37	0
	Medical patients	4	4/0	35.0±15.0	5.8±0.5	30.0±23.8[c]	8.3±4.3	0
	Surgical patients	3	2/1	63.0±20.2	6.7±2.6	22.3±43.7[d]	5.2±1.3	0
	Total	**8**	**6/2**	**43.0±23.1**	**6.2±1.5**	**24.0±29.3[a]**	**10.7±11.1**	**0**
Minor ABO-incompatible platelets transfusion	Pediatric patients	7	5/2	7.7±6.5	3.9±2.1	49.4±52.3[b]	8.7±7.3	0
	Medical patients	61	30/31	63.0±9.5	5.9±0.9	25.3±24.2[c]	5.2±5.4	2
	Surgical patients	57	44/13	56.4±15.9	6.4±1.9	20.0±30.6[d]	3.5±4.0	0
	Total	**125**	**79/46**	**57.8±16.3**	**6.0±1.6**	**24.2±29.7[a]**	**4.6±5.0**	**2**

[a]No significant difference in changed platelet count after transfusion between all patients of ABO-compatible and major ABO-incompatible platelets transfusion (p = 0.9346), ABO-compatible and minor ABO-incompatible platelets transfusion (p =0.5973), and major and minor ABO-incompatible platelets transfusions (p = 0.9208).

[b]No significant difference in changed platelet count after transfusion between pediatric patients of ABO-compatible and major ABO-incompatible platelets transfusion (p = 0.1720), ABO-compatible and minor ABO-incompatible platelets transfusion (p = 0.9368), and major and minor ABO-incompatible platelets transfusion (p = 0.5127).

[c]No significant difference in changed platelet count after transfusion between medical patients of ABO-compatible and major ABO-incompatible platelets transfusion (p = 0.5011), ABO-compatible and minor ABO-incompatible platelets transfusion (p = 0.8289), and major and minor ABO-incompatible platelets transfusion (p = 0.5756).

[d]No significant difference in changed platelet count after transfusion between surgical patients of ABO-compatible and major ABO-incompatible platelets transfusion (p = 0.8638), ABO-compatible and minor ABO-incompatible platelets transfusion (p = 0.6590), and major and minor ABO-incompatible platelets transfusion (p = 0.8520).

Table 2 Comparisons of age, received platelet, changed platelet count after transfusion, duration of platelet count after transfusion, and number of patients with transfusion reaction of pediatric, medical, and surgical patients. Changed platelet count after transfusion within the group of patients and type of platelet transfusion was compared using the Mann-Whitney test.

Group of patients	Total number	Age (years)	Dose of received platelet (unit)	Duration of platelet count after transfusion (hours)	Changed platelet count after transfusion ($x\ 10^3$ /mm^3)	Number of patients with transfusion reaction
All pediatric patients	21	9.3±6.2	4.4±1.8	14.2±18.8	41.2±35.1[a,b]	0
All medical patients	181	57.0±14.3	6.0±0.9	7.0±0.9	24.7±23.8[a,c]	3
All surgical patients	128	57.6±15.9	6.3±1.5	3.7±3.9	18.2±35.9[b,c]	0
Total	**330**	**54.2±18.7**	**6.0±1.3**	**6.2±7.7**	**23.2±30.3**	**3**

[a]No significant difference in changed platelet count after transfusion between all pediatric patients and all medical patients (p = 0.0699)

[b]Significant difference of changed platelet count after transfusion between all pediatric patients and all surgical patients (p = 0.0097)

[c]No significant difference in changed platelet count after transfusion between all medical patients and all surgical patients (p = 0.0597)

Table 3 Average of changed platelet count after transfusion in each patient and donor blood group. Values are presented as mean ± standard deviation or as raw data where appropriate.

Type of platelet transfusion	Patient blood group	Donor blood group	n	Average of changed platelet count after transfusion ($x\ 10^3$ / mm^3)	P-value when compared with all patients of ABO-compatible platelets transfusion using the Mann-Whitney test
ABO-compatible platelets transfusion	O	O	60	29.6±31.4	-
	A	A	60	19.7±24.8	-
	B	B	54	27.1±24.4	-
	AB	**AB**	**40**	**13.1±41.6**	**-**
	Total		**197**	**22.5±30.7**	**-**
Major ABO-incompatible platelets transfusion	O	B	5	24.0±25.1	0.8646
	A	AB	1	5	0.3769
	A	B	1	72	0.1018
	B	**AB**	**1**	**-5**	**0.1695**
	Total		**8**	**24.0±29.3**	**0.9346**
Minor ABO-incompatible platelets transfusion	A	O	31	19.7±28.2	0.2997
	B	O	23	27.0±18.9	0.4843
	AB	O	40	22.1±29.5	0.4842
	AB	**A**	**8**	**39.8±52.3**	**0.6637**
	AB	**B**	**23**	**25.8±31.4**	**0.8005**
	Total		**125**	**24.2±29.7**	**0.5973**

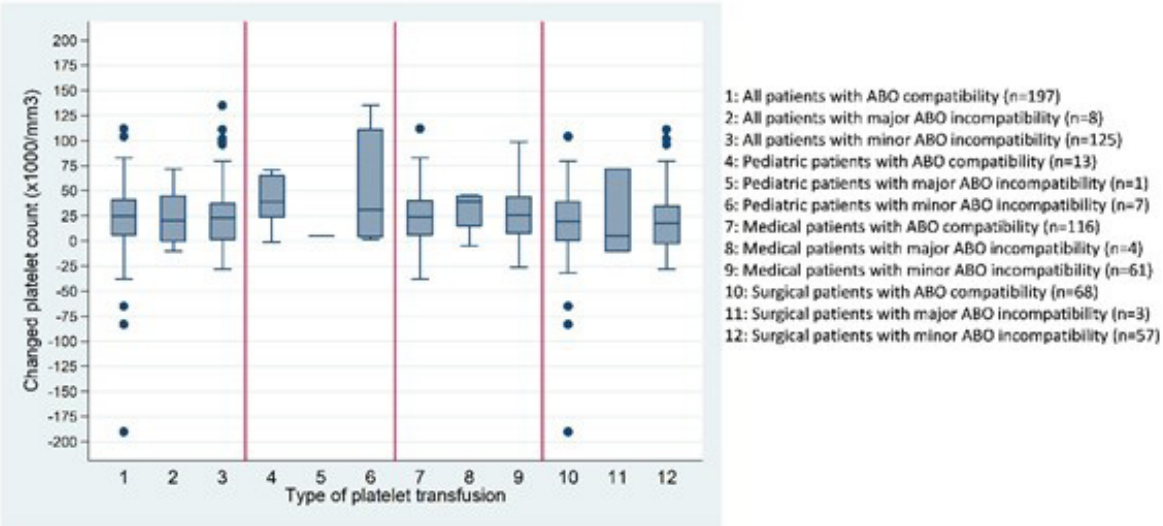


Figure 1 A box plot of comparison of changed platelet count after platelet transfusion among ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions in pediatric, medical, and surgical patients by using STATATM version 10.0.

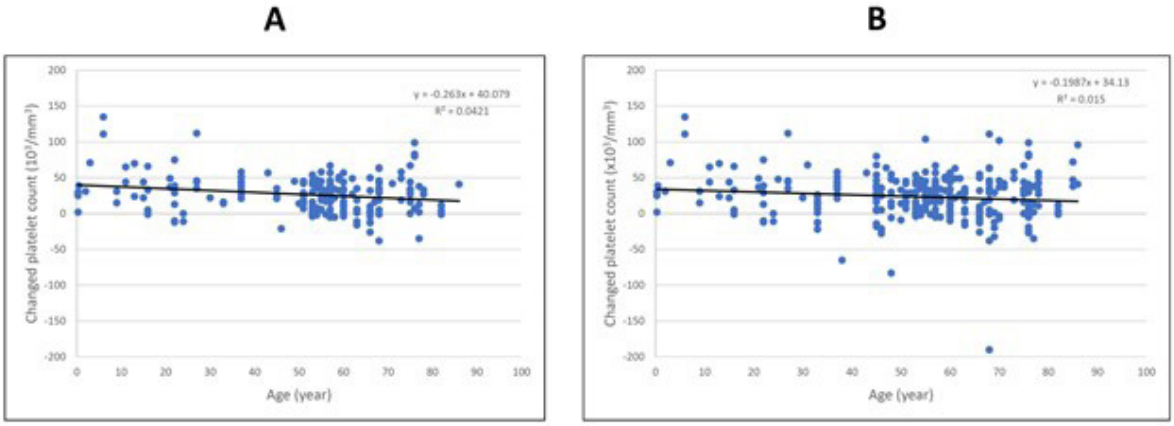


Figure 2 Reverse correlation between advanced age and changed platelet count after platelet transfusion of the pediatric and medical patient (A) and all patients (B) by using Microsoft Excel 2019.

Table 3, no significant difference was observed in all groups. Among 133 patients transfused with major and minor ABO-incompatible platelets transfusions by SDP in PAS with low anti-A and/or anti-B antibody titer of less than 64, 94 subjects were group O, 29 subjects were group B, 8 subjects were group A, and 2 subjects were group AB.

Discussion

No significant difference in changed platelet count after transfusion among all patients of ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions was observed. Moreover, no significant difference in changed platelet count after transfusion within pediatric, medical, and surgical patients with ABO-compatible, major, and minor ABO-incompatible platelet transfusions was observed. Three events with two medical patients had transfusion reactions, including an event with ABO-compatible platelet transfusion and two events with minor ABO-incompatible platelet transfusion. No acute hemolytic transfusion reaction (AHTR) was observed in the three types of platelet transfusions[8].

A study reported that high anti-A and anti-B titers in recipients affected platelet increment

in platelet transfusion and was worse than major ABO-incompatible platelet transfusion[9]. The changed platelet count after transfusion in pediatric patients was the highest compared with medical and surgical patients. As shown in Figure 2, a reverse correlation between advanced age and changed platelet count after transfusion was observed. Most of the pediatric patients were diagnosed to be neoplasia (16 in 21 patients, 76.2%) and treated by chemotherapy, which may lead to lower isohemagglutinin titers (anti-A and anti-B)[9]. This reason may explain the good response to platelet transfusion in pediatric patients. However, the limitation of this study is no data on anti-A and anti-B titers in our patients, which will be analyzed in further study. Furthermore, surgical patients had the lowest changed platelet count after transfusion because of platelet consumption due to operation.

In conclusion, this study indicated that platelet transfusions with ABO-compatibility and incompatibility have no different results. Therefore, ABO-incompatible single donor platelet transfusions with low antibody titer[10] should be an alternative choice in situations with insufficient platelet and for effective platelet management to avoid expiration[11].

Reference

1. National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Standards for blood banks and transfusion services 2558. Bangkok, Thailand.
2. Somjai Kanchanapongkul. Clinical uses of blood components. In: Wichai Prayoonwiwat, Thip Sripaisan, editor. Pattraporn symposium on hemostasis. Bangkok: The Thai Society of Hematology; 2561: 109-16.
3. Surachet Onseng, Janejira Insawang. Preparation of whole blood derived platelet component. J Hematol Transfus Med 2020;30:379-392.
4. Zulkeflee RH, Hassan MN, Hassan R, Saidin NIS, Zulkafli Z, Ramli M, Abdullah M, et al. Acute hemolytic transfusion reaction following ABO-mismatched platelet transfusion: Two case reports. Transfusion and Apheresis Science 2023;62(3):1-3.
5. Mathur A, Swamy N, Thapa S, Chakraborthy S, Jagannathan L. Adding to platelet safety and life: Platelet additive solutions. Asian J Transfus Sci 2018;12(2):136-140.
6. Kc G, Murugesan M, Nayanar SK, Malodan R, Padmanaban M. Comparison of ABO antibody levels in apheresis platelets suspended in platelet additive solution and plasma. Hematol transfuse cell ther 2021;43(2):179-184.
7. Valsami S, Dimitroulis D, Gialeraki A, Chimonidou M, Politou M. Current trends in platelet transfusions practice: The role of ABO-RhD and human leukocyte antigen incompatibility. Asian J Transfus Sci 2015;9(2):117–123.
8. National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Guideline on Hemovigilance 2558. Bangkok, Thailand.
9. Cid J, Harm SK, Yazer MH. Platelet transfusion - the art and science of compromise. Transfus Med Hemother. 2013;40(3):160-171.
10. Mavichak W, Chiewsilp P, Tubrod J, Ovataga P. ABO Antibodies among group O Thai Blood Donors. J Hematol Transfus Med 2013;23:203-209.
11. Guan L, Tian X, Gombar S, Zemek AJ, Krishnan G, Scott R, et al. Big data modeling to predict platelet usage and minimize wastage in a tertiary care system. Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114(43):11368-11373.

SMJ

นิพนธ์ต้นฉบับ . Original Article

การเตรียมเม็ดเลือดแดงเข้มข้นชนิด Leukocyte-depleted Red Cell (LDPRC) ด้วย BioR Flex Filter

จงกล อรรคฮาต[1*], เจตนิพัทธิ์ มาตรา[1], วิยะดา ปัญจรัก[1,2], เกรียงศักดิ์ เจนวิถีสุข[1,3]
[1]คลังเลือดกลาง, [2]สาขาวิชาสรีรวิทยา, [3]สาขาวิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Preparation of Leukocyte-depleted Red Cell (LDPRC) by the BioR Flex Filter

Jongkol Akahat[1*], Chetniphat Mattra[1], Wiyada Panjaruk[1,2], Kriangsak Jenwitheesuk[1,3]
[1]Blood Transfusion Centre, [2]Physiology, and [3]Surgery, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Abstract

Background and objective: The disease group of patients who are hospitalized at Srinagarind Hospital has specificity and complexity, such as leukemia, bone marrow transplant, and a group of radiation therapy, etc. In many cases of these patients have anemia from the pathology of the disease itself or the development of low red blood cell concentration from treatment, such as taking immunosuppressants, chemotherapy, and radiation are given. Blood Transfusion Centre, Faculty of Medicine, Khon Kaen University is the agency that supports such medical treatment, therefore has a policy to increase the safety of all types of blood components including red blood cell concentration as well. At present, the best quality of red blood cell concentration is leukocyte-depleted red cell (LDPRC) by fully automated blood separation: Reveos System which is the modern technology that we are producing. But the cost of production is very expensive and there is a limitation on the duration of drilling. This study aimed to study the production of LDPRC with good quality no less than using an automatic blender and also reduced cost of production by using the BioR flex filter.

Methods: The whole blood from double 450 ml bags (N = 22) were connected with the BioR flex filter by a sterile connecting device and hanged to allow the whole blood to flow through the BioR flex filter, then spin in the centrifugation with a strength of 3,900 rpm for 10 minutes. The LDPRC were separated from plasma by T-ACE II+ automatic extractor. The 0.5 ml of LDPRC was sampling and counted for hematocrit and white blood cell contamination by an automated hematology analyzer (Sysmex, XN-L Series, XN-550), and the ADAM-rWBC cell counting system respectively.

Result: The average of volume was 235-265 ml, hematocrit 69-72 % and white blood cell contamination 0.16 X 10^6 cells per unit. Standards for the preparation of LDPRC have been established by many institutions. The Council of Europe (EU) qualifications are set at volume 170-330 ml, that to be defined for the system used, hematocrit ≤ 80 % and white blood cell contamination < 1 X 10^6 cells per unit.

Conclusion: The LDPRC productions by using the BioR flex filter is affordable, easy to manage and reached the recommended quality of Council of Europe (EU).

Keywords: Leukocyte-depleted red cell (LDPRC), BioR flex filter, Council of Europe (EU)

*Corresponding author: Jongkol Akahat, E-mail: jonaka@kku.ac.th

Introduction

Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University is a large hospital. It is a medical graduate school and a research-oriented hospital as well as focuses on safety for specific patient groups of many types of diseases. The disease group of patients who are hospitalized at Srinagarind Hospital has specificity and complexity, such as leukemia, bone marrow transplant, and a group of radiation therapy, etc. In many cases of these patients have anemia from the pathology of the disease itself or the development of low red blood cell concentration from treatment, such as taking immunosuppressants, chemotherapy, and radiation are given.

Blood Transfusion Centre, Faculty of Medicine, Khon Kaen University is the agency that supports such medical treatment, therefore has a policy to increase the safety of all types of blood components including red blood cell concentration as well. There are many types of red blood cell concentration that can be produced, such as:

1) Packed red cells (PRC) are red blood cells that have been separated for blood transfusion. PRC 1 unit consists of condensed red blood cell, volume 150-200 ml with low plasma, hemoglobin not less than 45 g/unit (for 450 ml of blood) and not less than 35 g/unit (for 350 ml of blood), hematocrit not more than 80%. The packed cells are typically used in anemia that is either causing symptoms or when the hemoglobin is less than usually 70–80 g/L (7–8 g/dL). In adults, one unit brings up hemoglobin levels by about 10 g/L (1 g/dL). Repeated transfusions may be required in people receiving cancer chemotherapy or who have hemoglobin disorders.[1,2]

2) Leukocyte poor packed red cells (LPRC) refers to the red blood cells from which leukocytes are removed by centrifugation. The remaining white blood cell count must be less than 1.2 x 10^9 cells per unit and have hemoglobin not less than 40 g/unit, hematocrit 50-70%. The LPRC will reduce the incidence of febrile non-hemolytic transfusion reaction: FNHTR.[1-3]

3) Leukocyte-depleted red cells (LDPRC) means red blood cell component that the white blood cells are removed by means of leukocyte filtration, where the number of remaining white blood cells must be less than 5 x 10^6 cells per unit (AABB standard) or 1 x 10^6 cells per unit according to Council of Europe (EU). Hemoglobin not less than 40 g/unit or hematocrit not more than 80% in case of no additive solution, 50-70% with additive solution. Clinical data suggests that non-hemolytic febrile transfusion reactions can be prevented by leucodepletion. The procedure also prevents alloimmunization to HLA antigens in patients who will repeatedly require transfusion of blood/blood products.[3-5]

The preparation of LDPRC can be done in different ways depending on budget limitations and needs of the patient. Here are some ways in which this can be done:

1.) Pre-storage preparation is concentrated filtration of red blood cells before storage at a temperature of 2-6°C.

1.1 Preparation using a kit bag with a filter set attached after the donor's blood has been drawn, it will be left at room temperature for about 1-2 hours to allow the white blood cells to absorb bacteria (phagocytosis) that may have escaped during the blood collection. The blood is then filtered through a filter set and then centrifuged. The resulting blood components were filtered LDPRC and FFP. For FFP, stored below -18°C and LDPRC store at 2-6 °C.

1.2 Preparation of LDPRC by fully automated blood separation: Reveos System, which is the modern technology, that can automatically select the spinning program whether you want to spin out LDPRC or LPRC, depending on the type of bag (LR or NLR) used to collect the donor's blood.

2.) Post-storage preparation of LDPRC is the filtration of concentrated red blood cells after storage. The temperature is 2-6°C, most of which will be the use of PRC or LPRC as a filter, which must be filtered within a period of not more than 24 hours after drilling.

At present, the best quality concentrated red blood cells were the red blood cells that filter almost all white blood cells, which is LDPRC by fully automated blood separation: Reveos System which is the latest technology that we are producing. But the cost of production is very expensive and there is a limitation on the puncture time because after the puncture it must be left at least 2 hours in order for the phagocytosis to complete and the platelets to be well dispersed, then it can be centrifuged. Therefore, it is inconvenient if the donor arrives after 2:00 p.m. which is the scheduled time out for using bags for the fully automated blood separation: Reveos System.

The BioR flex filter is a new filter set developed from the Bed Side filter set to filter red blood cells before administering directly to the patient at the bedside. The advantage of using this new filter set is that patients who want to use filtered blood will receive the filtered blood and ready to use. Nurses will save time in doing the procedure. In addition, the preparation of blood components and the blood donation work will have more channels for preparing the LDPRC. Even if the donor arrives after 2:00 p.m., the bag of blood can be filtered with a BioR flex filter before being taken centrifuge. The filtering time is about 10-15 minutes only. In addition, this type of filter set can also prepare a post-storage LDPRC. The most interesting, it is not as expensive as a fully automated LDPRC blood separation: Reveos system. The objective of this study was to create the new protocol to produce LDPRC from the double 450 ml (D-450 ml) bags that meet the international standards and reduced the costs of productions.

Method

The whole blood, 450 ml bags (N=22) were connected to the BioR flex filter with sterile connecting device and allowed the blood filtered through the BioR flex filter for 10-15 minutes, then sealed the filtered blood bags and connected them to the original tow bags. The filtered blood bags were placed into a cup and balanced weight before put into the centrifuge. Centrifugation with 3,900 rpm for 10 minutes at 2-6°C. The centrifuged blood bags were separated with T-ACE II+ automated extractor to LDPRC and LDFFP. The LDPRC bags were weighed and placed on the shaker for 15 minutes. Sampling 0.5 ml of each LDPRC to test for complete blood count (CBC) and white blood cell (WBC) contamination. The weight of blood bags, hematocrit, WBC were recoded in the result record form.

Results

The results were shown in table 1 and 2. The average of volume were 235-265 ml the hematocrit was 69-72 % and WBC contamination were 0.16 X 10^6 cells per unit that quality control (QC) passed 100%.

Discussion

The production of LDPRC, which is currently considered the safest and best quality concentrated red blood cell component for patients with anemia or blood loss for various reasons. Of course, good quality products are often expensive and manufactured at high cost and state-of-the-art technology. But with the country's economic conditions deteriorating, lacking financial liquidity which affects all groups of people. The constantly studying and following up with new knowledge, there is an idea to find a way to obtain good quality products and produced at a low cost but equal in quality to modern equipment.

The production of LDPRC in this new way reduces the time constraints of donor blood

donation. Even if the donor arrives after 2:00 p.m., the bag of blood can be filtered with a BioR flex filter before being taken centrifuge.

Conclusion

Our QC data of LDPRC by the new protocol provides reached the recommended quality of the Council of Europe (EU).

Table 1 The data of LDPRC from D-450 ml bags production.

N	Average of volume (ml)	% Hematocrit	WBC contamination
22	235-265	69-72	0.16×10^6
% QC Passed	100	100	100

Table 2 The criteria of QC in blood components and KPI for our Blood Transfusion Centre[5]

Components (Standard reference)	Quality control	Target value	Key performance indication (KPI)
Leukocyte-depleted red cell	Volume	170-330 ml	
(LDPRC)	Hematocrit	≤ 80 %	≥ 90%
(EU)	Residual leukocyte	$< 1 \times 10^6$ cells/unit	

เอกสารอ้างอิง

1. Pandee Wattanaboonyongcharoen. Appropriate use of blood and blood components, “The Appropriate Use of Blood and Blood Components”, National Blood Service Center, Thai Red Cross Society, 2nd Edition, Chapter 3; Blood Components Inhibition of infection and irradiated blood; 2023.
2. Standards for blood banks and blood services. National Blood Center, Thai Red Cross Society. ISBN 978- 616-7829-29-6 4th edition, 2015.
3. World Health O. Educational modules on clinical use of blood. Geneva: World Health Organization; 2021.
4. AABB. Technical manual. 20th ed. Jorgenson M, editor. Bethesda, Maryland: AABB; 2020.
5. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion (CD-P-TS). EDQM 21th Edition 2023.

SMJ

Association of Potential Pharmacokinetic Drug Interaction of Non-vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants (NOACs) in Atrial Fibrillation Patients and Risk of Major Bleeding

Pansu Chumworathayi[1], Chaiyasith Wongvipaporn[1], Tapakorn Ainganu[2], Warinthorn Tooltham[2], Weeraya Sonakoo[2], Verawan Uchaipichat[2]

[1]*Srinagarind Hospital , Faculty of Medicine , Khon Kaen University*

[2] *Division of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University.*

Abstract

Background and objective: Non-vitamin K antagonist oral anticoagulants (NOACs), including dabigatran etexilate, rivaroxaban, apixaban, and edoxaban, may have pharmacokinetic interactions with CYP3A4 inhibitors and/or P-glycoprotein competitors, leading to increased levels of NOACs and the risk of major bleeding. The objective was to assess the association between using NOACs with and without receiving concurrent medications with potential pharmacokinetic interactions through CYP3A4 inhibitors and/or P-glycoprotein competitors, and the risk of major bleeding in patients with non-valvular atrial fibrillation.

Methods: This retrospective cohort study utilized data from the information database at Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. The subjects were patients with nonvalvular atrial fibrillation who have prescribed a NOAC during January 1st, 2016, to August 31st, 2023. The primary outcome was major bleeding, defined as hospitalization or emergency department visits with a first diagnosis of intracranial bleeding, gastrointestinal bleeding, or bleeding at other sites. Secondary outcomes included sub-outcomes of major bleeding and all-cause mortality. The association of the outcomes and concomitant use of NOACs and CY3A4 inhibitors and/or P-glycoprotein competitors were assessed using Poisson regression models and inverse probability of treatment weighting using propensity score calculated from the study's covariates.

Results: The study included 400 patients (mean age, 73.3 years; SD, 10.2), 227 males and 173 females. Among 400 patients, it contained 2,739 person-quarters receiving NOACs, dividing into apixaban 1,020 person-quarters (37.2%), rivaroxaban 871 person-quarters (31.8%), dabigatran etexilate 775 person- quarters (28.3%), and edoxaban 77 person- quarters (2.8%).Person-quarters of NOACs prescriptions with and without concurrent use of perpetrator medications were 1,529 (55.8%) and 1,210 (44.2%), respectively. The perpetrators included: atorvastatin (43.9%), digoxin (10.6%), amiodarone (5.2%), verapamil (1.7%), diltiazem (1.4%), naproxen (0.6%), ticagrelor (0.4%), tacrolimus (0.3%), and rifampicin (0.1%). Other perpetrators that were not given with NOACs included phenytoin, fluconazole, dronedarone, quinidine, HIV protease inhibitors (ritonavir, lopinavir, atazanavir, darunavir), other azoles (ketoconazole, itraconazole, posaconazole, or voriconazole), macrolide antibiotics (clarithromycin or erythromycin), and cyclosporine. Overall, major bleeding was observed 16 and 10 times in the group that received NOACs with and without perpetrator medications, respectively. The adjusted incidence rate ratio was 0.86 (95% CI, 0.46 -

1.60) with no statistically significant (p-value 0.634). Major bleeding was found in the group that received NOACs with atorvastatin, digoxin, and amiodarone with adjusted incidence rate ratios of 1.32 (95% CI, 0.55-3.18), 0.75 (95% CI, 0.10- 5.53), and 0.39 (95% CI, 0.02-2.92), respectively. However, there was no statistically significant (p-value, 0.535, 0.778, and 0.362, respectively). According to secondary outcomes, intracranial bleeding was found 5 and 4 times in the group that received NOACs with and without perpetrator medications, respectively. The adjusted incidence rate ratio was 0.54 (95% CI, 0.14-2.18). Of interest, an adjusted incidence rate ratio was 0.93 (95% CI, 0.20-4.37) in the group that received NOACs with atorvastatin. Gastrointestinal bleeding was found 11 and 6 times in the group that received NOACs with and without perpetrators, with an adjusted incidence rate ratio of 1.01 (95% CI, 0.50-2.12). The adjusted incidence rate ratio were 1.51 (95% CI, 0.53-4.29), 0.61 (95% CI, 0.08-4.57), and 1.16 (95% CI, 0.15-8.62) for the group that received NOACs with atorvastatin, digoxin, and amiodarone, respectively. All-cause mortality was observed 6 and 2 times in the group that received NOACs with and without perpetrators, respectively, with an adjusted incidence rate ratio of 1.77 (95% CI, 0.75 – 4.22). The adjusted incidence rate ratios were 2.86 (95% CI, 0.57-14.29) and 1.45 (95% CI, 0.18-11.76) in the group that received NOACs with atorvastatin and digoxin, respectively. All of these results did not show a statistically significant (p >0.200). The other sites of bleeding were not found in this study. None of the bleeding incidence was observed in the groups that received NOACs with verapamil, diltiazem, naproxen, ticagrelor, tacrolimus, and rifampicin.

Conclusion: In atrial fibrillation patients, CYP3A4 inhibitors and/or P-glycoprotein competitors which are commonly used with NOACs were atorvastatin, digoxin, and amiodarone. The incidence of major bleeding was higher in a group receiving CYP3A4 inhibitor and/or P-glycoprotein competitors. However, there was no statistically significant, possibly due to the small study population. Data from this study may be useful for conducting research in the future, and guiding for risk management, increased surveillance, and reducing the risk of major bleeding for patients receiving NOACs in the Srinagarind Hospital.

Keywords: non-vitamin K antagonist oral anticoagulants (NOACs), dabigatran, rivaroxaban, apixaban, edoxaban

Performance Assessment of Radiation Dose in Liver Cancer Patients Undergoing Transarterial Chemoembolization (TACE) in Comparison with International Diagnostic Reference Levels

Sirinart Pariyashartgesorn[1*], Utit Chaleeon[1], Sichon Khuanrubsuan[1], Soponwit Sriboonlert[1], Anucha Ahooja[1], Vivian Klungbounkrong[1], Jitraporn Wongwiwatchai[1], Siritorn Buranurak[2] Varaporn Pong-inwong[1]

[1]*Department of Radiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

[2]*Department of Physics, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

Abstract

Background and Objective: Performance assessment of radiation doses from interventional radiology procedures is visualized in this study. Significant dose parameters reported by Digital Subtraction Angiography (DSA) machine were collected from liver cancer patients undergoing Transarterial Chemoembolization (TACE). Measured doses were evaluated by comparison with the international diagnostic reference levels (DRLs).

Materials and Methods: All radiation doses were obtained from a retrospective study of TACE procedures between 1 September 2021 to 30 June 2023. A Philips Azurian 7 – DSA machine with integrated dosimetry software was used for invasive X-ray fluoroscopy guidance of 523 TACE patients. Sample size observations included 405 males (77.43%) and 118 females (22.56%) with an average age of 61 years (i.e., range 36-84 years) and an average weight of 62 kg (i.e., range 32 – 132 kg). Significant parameters, including fluoroscopy time, air Kerma, and dose area product (DAP), were monitored and further compared with the DRLs for performance evaluation of the treatment procedure used in this center.

Results: The study observed average values of Air Kerma, DAP, and Fluoroscopy time were 218.44 mGy, 97.3 Gy·cm^2, and 720 s, respectively. In order to compare the domestic TACE DRLs from this study and the international TACE DRLs, lower dose levels were observed.

Conclusion: In practice, the DRL is an essential parameter for evaluating dose optimization in patients undergoing interventional radiology (IR) procedures. Optimizing dose strategy will be achieved by performing a radiation management system suitable for each IR procedure, which includes DSA quality control and radiation safety protocol.

Keyword: interventional radiology, transarterial chemoembolization, digital subtraction angiography, dose area product, diagnostic reference levels

*Correspondence: Varaporn Pong-inwong, E-mail: varsil@kku.ac.th

บทคัดย่อ . Abstract

อัตราการใช้เลือดฝากของห้องผ่าตัด โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พุทธิดา ตันทนาภรณ์กุล[1], ฉลาวรรณ บุตรโยจันโท[1], นิลเนตร จันทา[1], ชไมพร สิงหะ[1], รัชฎาภรณ์ พิมพ์ภูมี[1], ธีรภัทร ป้องทัพไทย[1], ศุทธหทัย เฉลียวไว[1], ชนัญญู พัชรสวัสดิ์กุล[1], เกรียงศักดิ์ เจนวิถีสุข[2]

[1] *คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

[2] *ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

Rate of Blood Deposit Using at Operating Rooms in Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Putthida Tanthanapornkul[1], Chalawan Butryojantho[1], Nilnet Chantha[1], Chamaiporn Singha[1], Ratchataporn Pimpoomee[1], Teerapat Pongtapthai[1], Suttahathai Chaewwai[1], Chananyu Patcharasawatkul[1], Kriangsak Jenwitheesuk[2]

[1]*Blood Transfusion Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University*

[2]*Department of Surgery, Faculty of Medicine, Khon Kaen University*

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: การจองเลือดสำหรับการผ่าตัดของผู้ป่วยมีหลายลักษณะ ขึ้นอยู่กับภาวะความเสี่ยงชนิดโรค และการประเมินของแพทย์ ซึ่งโดยปกติคลังเลือดกลาง จะทำการตรวจหมู่เลือดเอบีโอ หมู่เลือดอาร์เอช และตรวจกรอง unexpected antibody ของผู้ป่วยขอเลือดสำหรับผ่าตัด และเตรียมเลือดร้อยละ 50 เพื่อจัดส่งไปยังห้องผ่าตัดสำหรับผู้ป่วยที่จะทำการผ่าตัดในวันนั้นๆ ส่วนเลือดที่เหลือและยังไม่ได้จัดส่งคือเลือดฝากสำหรับห้องผ่าตัด ซึ่งเมื่อแพทย์ประเมินแล้วว่าผู้ป่วยมีความจำเป็นต้องใช้เลือดเพิ่มก็สามารถติดต่อเพื่อใช้เลือดฝากที่จองไว้ได้เลย โดยการ นำจ่ายเลือดส่วนที่เหลือหรือเลือดฝากนั้น ทางคลังเลือดกลางจะจัดส่งผ่านระบบขนส่งเลือด โดยประกันเวลาการจัดส่งประมาณ 15-20 นาที เพื่อให้เลือดสำรองมีมากพอที่จะบริหารจัดการได้ โดยจัดเก็บไว้ในอุณหภูมิที่กำหนดในการเก็บเลือด ด้วยตู้เย็นเก็บเลือดที่ได้มาตรฐาน เพื่อมาตรฐานด้านคุณภาพของเม็ดเลือดแดงให้มีคุณภาพดีถึงผู้ป่วยไปจนถึงวันหมดอายุ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการใช้เลือดฝากของห้องผ่าตัด และข้อมูลด้านการบริหารจัดการเลือดสำรองของคลังเลือดกลาง

วิธีการศึกษา: เก็บข้อมูลจำนวนผู้ป่วยและจำนวนยูนิตของเลือดฝากของห้องผ่าตัดตามจำนวนเลือดที่จองไว้ และถูกแจ้งใช้เพิ่มระหว่างหรือหลังการผ่าตัดของห้องผ่าตัด โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ระหว่างเดือน มี.ค.-พ.ค. 2566 วิเคราะห์ข้อมูลในด้านอัตราส่วน หรือ cross matching : transfusion (C/T ratio) คือจำนวนยูนิตของเลือดที่เตรียมต่อจำนวนที่ใช้จริงของห้องผ่าตัด และวิเคราะห์ข้อมูลอัตราการขอใช้เลือดฝากของห้องผ่าตัด ระหว่างหรือหลังการผ่าตัดเปรียบเทียบกับจำนวนรายที่จองเลือดผ่าตัดแบบฝากทั้งหมด

ผลการศึกษา: มีการขอใช้เลือดสำหรับการผ่าตัด จาก 2 ลักษณะ คือ ขอใช้ 2 ยูนิต และ 3-4 ยูนิต พบว่า จากข้อมูล 3 เดือน (มี.ค.-พ.ค. 2566) กรณีขอใช้ 2 ยูนิต มีจำนวนที่ขอมาทั้งหมด 228 ยูนิต ใช้จริง 152 ยูนิต (C/T ratio=1.50) จากจำนวนผู้ป่วย 114 ราย มีจำนวนผู้ป่วยขอใช้จริง 49 ราย (ร้อยละ 42) กรณีขอใช้ 3-4 ยูนิต มีจำนวนที่ขอมาทั้งหมด 98 ยูนิต ใช้จริง 76 ยูนิต (C/T ratio =1.29) จากจำนวนผู้ป่วย 25 ราย มีจำนวนผู้ป่วยขอใช้จริง 11 ราย (ร้อยละ 44) โดยมีจำนวนผู้ป่วยที่ขอเลือดเพื่อการผ่าตัดทั้งหมด 636 ราย แต่มีผู้ป่วยที่ใช้เลือดตามจำนวนที่ขอและฝากไว้ 139 ราย คิดเป็นร้อยละ 21

สรุป: จากผลการศึกษาพบว่ามีการประเมินเพื่อจองเลือดสำหรับการผ่าตัดไว้มากกว่าที่ควรร้อยละ 56 ถ้าต้องเตรียมเลือดจริงตามจำนวนที่จองไว้ จะทำให้ต้องสำรองเลือดจำนวนมาก ส่งผลต่อความคุ้มค่าในการจัดหา เตรียมและบริหารจัดการเลือด โดยแพทย์และทีมผ่าตัดยังสามารถมั่นใจได้ว่า เมื่อต้องการใช้เลือดที่ฝากไว้จะยังมีสำรองอย่างพอเพียงและทันเวลา ตลอดทั้งในผู้ป่วยรายอื่นๆที่ไม่ได้ทำการผ่าตัดก็มีโอกาสได้รับการรักษาเมื่อต้องการใช้เลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: อัตราการใช้เลือด, การจองเลือดผ่าตัด

บทคัดย่อ . Abstract

ผลของการใช้สารละลายน้ำเกลือปราศจากเชื้อ นอร์มัลซาไลน์ (0.9% normal saline) กลั้วคอเพื่อลดอาการเจ็บคอในผู้ป่วยติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนบน

วิลาวัณย์ อุ่นเรือน

หน่วยปฐมภูมิ 123 มข. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Effects of Using Sterile 0.9% Normal Saline Solution Gargling to Reduce Sore Throat in Patients with Upper Respiratory Tract Infections

Wilawan Aunruean

Primary Care unit, Faculty of Medicine, Khon Kean University

Abstract

หลักการและวัตถุประสงค์:ประชาชนใช้เกลืออมเพื่อลดอาการเจ็บคอมานานแล้ว การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับคะแนนเจ็บคอในการใช้น้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.9% normal saline กลั้วคอและกลุ่มที่ได้รับคำแนะนำตามปกติ

วิธีการศึกษา:ผู้รับบริการไข้เจ็บคอตามเกณฑ์วินิจฉัยโรค Mclasaac's Score ไม่ได้ยาปฏิชีวนะมาก่อนจำนวน 88 ราย แบ่งเป็นกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม กลุ่มละ 44 ราย จะได้รับน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.9% normal saline กลั้วคอเช้าและก่อนนอนเป็นเวลา 10 วัน กลุ่มควบคุมได้รับคำแนะนำการกลั้วคอตามปกติ วัดคะแนนเจ็บคอก่อนและหลังการกลั้วคอ ด้วย Numerical Rating Scale (NRS) วิเคราะห์ข้อมูลด้วย ค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ย เปรียบเทียบคะแนนก่อนหลังหลังการกลั้วคอทั้งสองกลุ่มด้วยสถิติ T-test

ผลการศึกษา: พบว่าผู้มารับบริการวินิจฉัยโรคเป็น viral pharyngitis อาการหวัด เจ็บคอ ไอ ไข้ ร้อยละ 41.86, 39.53, 27.91 และ 20.93 ตามลำดับ มี Revisit ในกลุ่มศึกษาร้อยละ 6.88 กลุ่มควบคุมร้อยละ 2.33 และทั้งสองกลุ่มได้ยาปฏิชีวนะร้อยละ 2.33 คะแนน ก่อนกลั้วคอของทั้งสองกลุ่มเฉลี่ยอยู่ในระดับปานกลาง หลังจากกลั้วคอคะแนนลดลงเฉลี่ย 2 คะแนน และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สรุป: การกลั้วคอเพิ่มความชุ่มชื้นในลำคอ ลดอาการเจ็บคอสามารถใช้ได้ทั้งสองวิธีแต่การใช้น้ำเกลือ 0.9% normal saline ราคาแพงกว่าเกลือ

คำสำคัญ: การกลั้วคอ, เกลือผสมน้ำอุ่น, 0.9% normal saline, ลดอาการเจ็บคอ, ไข้เจ็บคอ

Suppression of Acetyl-CoA Carboxylase 1 Inhibits CCA Migration via AMPK-NF-κB-Snail Pathway

Saowaluk Saisomboon[1,2,3], Ryusho Kariya[2], Piyanard Boonnate[2], Kanlayanee Sawanyawisuth[1,3], Ubon Cha'on[1], Vor Luvira[4], Yaovalux Chamgramol[5], Chawalit Pairojkul[5], Wunchana Seubwai[3,6], Atit Silsirivanit[1,3], Sopit Wongkham[1,2,3], Seiji Okada[2], Sarawut Jitrapakdee[7], Kulthida Vaeteewoottacharn[1,2,3,*]

[1]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*

[2]*Division of Hematopoiesis, Joint Research Center for Human Retrovirus Infection and Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, 860-0811 Japan*

[3]*Cholangiocarcinoma Research Institute, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*

[4]*Department of Surgery, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*

[5]*Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*

[6]*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand*

[7]*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignant cancer of the biliary tract and a major health problem in Thailand. The reprogramming of tumor cell metabolism and the upregulation of lipogenic enzymes have been revealed in CCA. But the functional importance of the rate-limiting enzyme is limited. This study highlighted the significance of acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1), a rate-limiting enzyme in de novo lipogenesis, on CCA migration. ACC1 expression in human CCA tissues was determined by immunohistochemistry staining. The results showed that high ACC1 was correlated with shorter survival of CCA patients. ACC1-deficient cell lines (ACC1-KD) were generated by the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (cas9) system and were used for the comparative study. The expression of ACC1 was lower than in parental cells. Decreased ACC1 significantly reduced intracellular malonyl-CoA and neutral lipid contents. CCA cell proliferation, migration, and invasion were retarded in ACC1-KD cells. Reduced intracellular ATP levels, AMPK activation, lowered NF-κB p65 nuclear translocation, and snail expression were elucidated. Migration of ACC1-KD cells was restored by palmitic acid and malonyl-CoA supplementation. The current study highlights the importance of rate-limiting enzyme in de novo lipigenesis, ACC1, and AMPK-NF-κB-snail axis on CCA progression. These might be helpful for CCA drug design in the future.

Keywords: ACC1, AMPK, cholangiocarcinoma, de novo lipogenesis, NF-κB, palmitic acid

*Corresponding author: Kulthida Vaeteewoottacharn, E-mail: kulthidava@kku.ac.th

Correlation between CYP3A5and CYP2D6 Polymorphisms and Quetiapine Plasma Level in Thai Psychiatric Patients

Sootthikarn Mungkhunthod[1], Apichaya Paungperch[2], Pongsatorn Paholpak[3], Panita Limpawattana[4], Manchumad Manjavong[4], Nontaya Nakam[1], Chonlaphat Sukasem[2],Wichittra Tassaneeyakul[1], Suda Vannaprasaht[1]

[1]*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand*

[2]*Division of Pharmacogenomics and Personalized Medicine, Departments of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand*

[3]*Department of Psychiatry,4Department of Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand*

Abstract

Background and Objective: Quetiapine (QTP) has been widely used for the treatment of psychiatric problems in patients. QTP is metabolized primarily by CYP3A4/5 enzymes. Moreover, CYP2D6 also plays a minor role in QTP metabolism. Therefore, the inter-individual variation of CYP3A4/5 and CYP2D6 function may affect QTP plasma concentration and treatment outcomes. Previously reported genetic polymorphisms of CYP3A4/5 and CYP2D6 genes affect the enzyme functions. CYP3A4*22 was not found in Thais. However,CYP3A5*3 was the most common non-functional variant and caused loss of CYP3A5 activity. CYP3A5*3 and CYP2D6*10 were common mutant alleles in the Thai population. This study aimed to investigate the correlation between the genetic variation of CYP3A5 and CYP2D6 and QTP plasma levels in Thai psychiatric patients.

Method: Thirty-eight psy chiatric patients who received QTP at Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand, were enrolled in this study. QTP blood sample was collected at a steady state. CYP3A5 and CYP2D6 polymorphisms were determined by real-time PCR technique with a specific TaqMan®probe and primer. In addition, QTP blood concentrations were determined by LC-MS/MS method.

Results: Of the 38 psychiatric patients investigated for CYP3A5 polymorphism, only 5(13.16%) were CYP3A5*1/*1, 15 (39.47%) were CYP3A5*1/*3, and 18(47.37%) were CYP3A5*3/*3. Prevalence of CYP2D6 polymorphism were CYP2D6*1/*14 (10.53%), CYP2D6*1/*1023(60.53%), and CYP2D6*10/*1011(28.95%). Concentrationsper dose (C/D) ratio of QTPwas 2 times higher in CYP3A5*3/*3than wide-type and heterozygous patients (1.58±2.78, 0.64±0.61, 0.50±0.59, respectively) (p=0.276). Moreover, The C/D ratio of QTP for the patients carrying CYP2D6*10/*10 was higher than wide-type and heterozygous patients but had no statistical significance (1.49±3.04, 0.81±1.00, 0.85±1.49, respectively) (p=0.674).

Discussion and Conclusions: CYP3A5 and CYP2D6 heterozygous mutants had higher C/D ratios of QTP than wide-type but no statistical significance because of the low sample size.Therefore, CYP3A5 and CYP2D6 genotypes may need to be investigated to adjust the QTP dose regimen for psychiatric patients to reduce adverse effects and improve clinical outcomes.

Keywords: psychiatric patients, quetiapine, plasma level, CYP3A5 polymorphisms, CYP2D6 polymorphisms

Clinical Courses Comparison between Limited Cutaneous Systemic Sclerosis and Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis with Positive for Anti-Topoisomerase I Antibody: A Cohort Study

Chana Chaovanitkul, Tippawan Onchan, Patnarin Pongkulkiat, Ajanee Mahakkanukrauh, Siraphop Suwannaroj, Chingching Foocharoen*
Department of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand

Abstract

Background and Objective: There is recently no information whether the clinical courses of anti-topoisomerase I antibody (ATA) positive limited cutaneous systemic sclerosis (lcSSc) are similar to ATA positive diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc) or not. This study aimed to evaluate clinical courses comparison between lcSSc and dcSSc with positive for ATA.

Methods: This study was conducted a cohort study including 522 Thai adult SSc patients between January 2014 and December 2022. Patients with overlap syndrome and having only 1 visit of follow-up were excluded. Clinical courses between lcSSc and dcSSc with positive for ATA were investigated using the Chi-square test, student t-test, or Wilcoxon Rank Sum as appropriate.

Results: Female was common than male (319 vs 203 cases). DcSSc with ATA positive (dcSSc-pos ATA) was the most common presentation among Thais (321 cases; 61.5%), followed by lcSSc with ATA positive (lcSSc-pos ATA) (19.9%), lcSSc with ATA negative (lcSSc-neg ATA) (11.1%), and dcSSc with ATA negative (dcSSc-neg ATA) (7.5%). The risk of interstitial lung disease (ILD) of lcSSc-pos ATA was comparable with dcSSc-pos ATA and dcSSc-neg ATA (odd ratios (OR) 0.76; 95%CI 0.48-1.20 and 1.35; 95%CI 0.64-2.82). The median time of onset at ILD detection was comparable with dcSSc-pos ATA (1.0 vs 1.8 years, p=0.21) but less than dcSSc-neg ATA (1.0 vs 4.8 years, p=0.001). The mortality risk of lcSSc-pos ATA was comparable with dcSSc-neg ATA (hazard ratio (HR) 1.09; 95%CI 0.55-2.19) but less than dcSSc-pos ATA (HR 0.52; 95%CI 0.33-0.83). LcSSc-posATA still had less clinical features of dcSSc (tendon friction rub and hand deformity) than in dcSSc-pos ATA.

Conclusion: The patients with lcSSc-ATA pos had a similar risk of ILD development as in dcSSc irrespective to the presence of ATA but earlier ILD development than dcSSc-negATA. The prognosis seemed to be better than dcSSc-pos ATA.

Keywords: systemic sclerosis, scleroderma and related disorders, autoantibodies, scleroderma, anti-topoisomerase I antibody, prognosis

*Correspondence to: Professor Chingching Foocharoen, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 THAILAND Tel: 66-43-363-746, 66-43-363-664

Mode of Deliveries and Perinatal Outcomes of Prenatal COVID-19 Infections

Supakan Pongsatonwiwat, Bandit Chumworathayi, Chatuporn Duangkum
Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, THAILAND, 40002

Abstract

Objective: To compare the methods of delivery and its complications between pregnant women with COVID-19 infection and pregnant woman without the condition.

Methods: We retrospectively collected data of pregnant women prenatally infected with COVID-19 virus from 1 July 2021 to 31 October 2022, and compared them with pregnant women having antenatal care (ANC) during the same period who were not infected with COVID-19 virus until delivery, as a retrospective-cohort study. The control group was matched by timing (by the next day after the matched COVID-19 case came to the hospital) and gestational age at ANC (by the expected date of confinement [EDC] not differ from the matched COVID-19 case more than 7 days).

Results: A total of 252 participants were included in this study, 126 persons in each group. Demographic data among the two groups were comparable except for previous cesarean section. The cesarean section rate in COVID-19 group was significantly higher than control group (46.03% vs 30.95%, p-value = 0.02). Specifically, we found that indication for cesarean section in COVID-19 group was "COVID-19 infection" in 9/126 cases (7.14% vs 0%). However, there was no significant difference in length of hospital stay (LOS) between COVID-19 and control group (2.97 vs 2.81 days, p-value = 0.262). No serious postpartum maternal complications were reported. Perinatal outcomes were similar among the two groups.

Conclusion: Prenatal COVID-19 infections could result in increasing cesarean section rate, but not perinatal morbidities.

Keywords: prenatal COVID-19, cesarean section, perinatal morbidities

บทคัดย่อ . Abstract

Prevalence and Characteristics of Renal Dysfunction in Children with Alpha-Thalassemia

Kamonthip Chantarasakha, Patcharee Komvilaisak, Napat Laoaroon, Suwannee Wisanuyotin
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Abstract

Background and Objectives: Thalassemia is the most common hemoglobinopathy in Southeast Asia. In Thailand, thalassemia is mostly prevalent in the northeast population. However, renal dysfunction is an underreported sequelae in children with alpha-thalassemia. We conducted a retrospective study to identify the prevalence and associated factors of renal dysfunction in children with alpha-thalassemia.

Methods: A retrospective cohort study was carried out by reviewing medical records of children aged 1 to 18 years who were diagnosed with alpha-thalassemia and followed up at the Department of Pediatrics, Srinagarind Hospital between May 2021 and April 2022. Patients with congenital anomalies of the kidney and urinary tract, heart disease, liver disease, and incomplete medical records were excluded. Renal dysfunction was defined as a glomerular filtration rate (GFR) less than 90 ml/min/1.73 m^2, presence of proteinuria, or hematuria.

Results: Eighty-nine children were reviewed, with a mean age at the study initiation of 8.41 ± 4.83 years. Thirty-eight patients (42.69%) were female, and sixty-three patients (70.78%) had hemoglobin H-constant spring. Fifteen patients (16.85%) demonstrated renal dysfunction, with 13 patients (14.60%) having evidence of low glomerular filtration, 1 patient (1.12%) showing proteinuria, and 1 patient (1.12%) exhibiting microscopic hematuria. All patients with renal dysfunction were transfusion-dependent. Using multivariate analysis, deferasirox was a significant associated factor of renal dysfunction (OR, 4.12; 95% CI, 1.13-15.02; p = 0.03), while age (OR, 1.01; 95% CI, 0.89-1.16; p = 0.85), serum ferritin (OR, 1.00; 95% CI, 0.99-1.00; p = 0.95), pre-transfusion hemoglobin (OR, 1.27; 95% CI, 0.44-3.71; p = 0.65), and the interval of blood transfusion (OR, 1.14; 95% CI, 0.75-1.75; p = 0.52) were not.

Conclusion: A significant prevalence of renal dysfunction was observed in alpha-thalassemia children, particularly those treated with deferasirox. Children receiving deferasirox and regular blood transfusions require routine renal assessment for early detection and therapeutic interventions to preserve renal function.

Keywords: iron chelator, deferasirox, renal dysfunction, alpha-thalassemia

Bloodstream Infection in Pediatric Oncology Patient: Causative Pathogens and Antimicrobial Susceptibility in a Tertiary Care Setting

Thanachai Nithisaowapak[1], Lumyai Wonglakorn[2], Pagakrong Lumbiganon[1], Pope Kosalaraksa[1], Patcharee Komvilaisak[1] , Kunanya Suwannaying[1], Nattakarn Tantawarak[1], Napat Laoaroon[1]
[1] Department of Pediatrics, [2] Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Abstract

Background and Objective: Bloodstream infections (BSIs) are major life-threatening complications in children with cancer. Understanding the prevalence of causative pathogens and patterns of antimicrobial resistance will aid in selecting the most appropriate empirical antibiotics. This study primarily aimed to describe the causative pathogens and antimicrobial susceptibility of BSI in pediatric oncology patients. Secondary objectives including describing (1) clinical factors associated with BSI (2) clinical outcome of BSI in pediatric oncology patients.

Materials and method: This retrospective descriptive study was conducted at Srinagarind hospital, Khon Kaen University, including oncologic patients aged between 30 days to 18 years old from January 2017 to December 2021. Laboratory-confirmed BSI episodes, according to the Center for Disease Control and Prevention (CDC) criteria was obtained from the microbiology laboratory reports. Causative pathogens, antibiotics susceptibility, clinical information and outcomes were collected.

Results: A total of 61 BSI episodes from 51 patients is included. The causative pathogens consisted of 39 episodes (59.1%) of Gram negative bacteria, 22 episodes (33.3%) of Gram positive bacteria, and 5 episodes (7.8%) of fungus. The most common drug-resistant bacteria were methicillin-resistant coagulase negatice staphylococcus (MRCONS), Klebsiella pneumoniae , and Pseudomonas. The majority (46.15%) of Gram negative bacteria were multi-drug resistant, with low susceptibility to penicillins, cephalosporins and carbapenems. However, 76.47% and 84.62% of these drug-resistant Gram negative bacteria were susceptible to amikacin and colistin, respectively. No vancomycin-resistant Gram positive bacteria were found. BSI occurred in PICU, high-intensity chemotherapy, and fungal bloodstream infection were factors associated with higher mortality.

Conclusion: MRCONS and Gram negative bacteria were the most common pathogens causing BSI in pediatric oncology patients with a high proportion of antibiotic resistance.

Serum Procalcitonin and Procalcitonin Clearance as A Prognostic Biomarker in Pediatric Critical Care: A Tertiary Care Setting

Apichaya Kriengwatanasiri, Rattapon Uppala
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Abstract

Background and objective: Identification of reliable prognostic biomarkers is essential for assessing disease severity, guiding treatment strategies, and predicting patient outcomes. Serum procalcitonin (PCT) and PCT clearance rate have acquired attention as potential biomarkers for these purposes; however, there is a lack of data in children. The purpose of this study was to examine the potential of serum PCT levels and PCT clearance as prognostic biomarkers in pediatric intensive care.

Methods: A retrospective cohort study was conducted to determine the PCT level and the PCT clearance rate in order to predict the mortality of pediatric patients with sepsis aged 1 month to 18 years in pediatric intensive care units (PICU) of Srinagarind Hospital from 1 January 2016 to 31 October 2021. Electronic medical records and the hospital data set were the data sources. Mortality rate was the dependent variable, while clinical parameters and laboratory results were independent variables. The correlation between initial laboratories and mortality was assessed, and PCT clearance was analyzed using multi-regression analysis.

Results: A total of 242 cases were enrolled in the study, with 107 males and 135 females. The median age was 5.34 (interquartile range, 1.25-12.42). The mortality rate in the cohort was 64 out of 242 (26.4%). The analysis revealed that the initial PCT levels showed no significant correlation with mortality in pediatric critical care patients, but initial high lactate (>4 mmol/L) associated with mortality (adjusted odds ratio = 2.8; confidence interval 1.23-6.41, p = 0.015). However, PCT clearance with an increased level in 24 hours demonstrated a strong association with mortality (adjusted odds ratio = 3.31; confidence interval 1.12-9.84, p = 0.031).

Conclusions: Initial serum PCT levels did not correlate significantly with mortality in pediatric critical care, whereas initial lactate levels can predict mortality. Nevertheless, an increase in PCT clearance within 24 hours was significantly associated with mortality, indicating its potential as a prognostic biomarker in pediatric intensive care.

Keywords: Serum procalcitonin, procalcitonin clearance, prognostic biomarker, pediatric critical care, tertiary care.