

MEASUREMENT OF MYELOPEROXIDASE ACTIVITY IN WOUND FLUID USING A POLYVINYL ALCOHOL-STABILIZED, GLUCOSE OXIDASE-IMMOBILIZED PAPER-BASED PLATFORM

Pawarin AEKNAM¹, Voraphoj NILARATANAKUL^{2,3} and Wanida LAIWATTANAPAISAL^{1,4}

1 Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Thailand

2 Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Thailand

3 Excellence Center for Infectious Diseases, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Thailand

4 Center of Excellence for Biosensors and Bioengineering (CEBB), Chulalongkorn University, Thailand; Wanida.L@chula.ac.th (Corresponding Author)

ARTICLE HISTORY

Received: 10 April 2026

Revised: 24 April 2026

Published: 16 May 2026

ABSTRACT

Myeloperoxidase (MPO) is a key biomarker of inflammation and infection in wound fluids. This study presents the development of a paper-based colorimetric assay for MPO detection. The assay employs a TMB-based system with glucose oxidase (GOx) immobilized in polyvinyl alcohol (PVA), enabling stable hydrogen peroxide (H₂O₂) generation during analysis. The results demonstrated a linear response from 0 to 5 U/mL ($R^2 = 0.9812$), a detection limit of 0.027 U/mL, a quantitation limit of 0.055 U/mL, and good precision (%CV < 5%). While glucose and creatinine exhibited minimal interference, hemoglobin, uric acid, and ascorbic acid caused significant interference. Hemoglobin interference was minimized by applying a secondary wavelength of 415 nm for background subtraction. Analysis of wound fluid samples enabled clear differentiation between non-infected and infected cases. These findings indicate that the platform has potential as a point-of-care (POC) tool for monitoring clinical wound status. However, further studies with larger sample sizes and the implementation of dual-wavelength measurements or sample dilution techniques are required to address interference prior to clinical application.

Keywords: Wound Fluid, Myeloperoxidase, Paper-based Analytical Device (PADs), Glucose Oxidase Immobilization, Polyvinyl Alcohol

CITATION INFORMATION: Aeknam, P., Nilaratanakul, W., & Laiwattanapaisal, W. (2026). Measurement of Myeloperoxidase Activity in Wound Fluid Using a Polyvinyl Alcohol-Stabilized, Glucose Oxidase-Immobilized Paper-Based Platform. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 4(5), 37

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไมอีโกลเพอร์ออกซิเดสในสารน้ำจากแผล โดยใช้ การตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนกระดาษและเพิ่มความคงตัวด้วย พอลิไวนิลแอลกอฮอล์

ภาวรินทร์ เอกนาม¹, วรพจน์ นิลรัตน์กุล^{2,3} และ วนิดา หลายวัฒนไพศาล^{1,4}

1 คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

3 ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์โรคติดเชื้อ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

4 ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไบโอเซนเซอร์และวิศวกรรมชีวภาพ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; Wanida.L@chula.ac.th (ผู้ประพันธ์บรรณกิจ)

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไมอีโกลเพอร์ออกซิเดส (MPO) เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีความสำคัญในการระบุภาวะอักเสบและการติดเชื้อในสารน้ำจากแผล งานวิจัยนี้ได้พัฒนาชุดตรวจเชิงสีเพื่อตรวจวัด MPO Activity โดยใช้สาร TMB ร่วมกับการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GOx) ด้วยพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) บนกระดาษ (PADs) เพื่อสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) มาใช้ในปฏิกิริยาทันที ผลการศึกษาพบว่าชุดตรวจมีความเป็นเส้นตรงช่วง 0-5 U/mL ($R^2 = 0.9812$) มีขีดจำกัดในการตรวจวัด 0.027 U/mL ขีดจำกัดในการวัดปริมาณ 0.055 U/mL และมีความแม่นยำ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) < 5 % ผลการศึกษาพบว่ากลูโคสและครีเอตินีนไม่รบกวนปฏิกิริยา แต่ฮีโมโกลบินกรดยูริก และกรดแอสคอร์บิกส่งผลกระทบต่อการทำงานของชุดตรวจ ทั้งนี้การรบกวนจากฮีโมโกลบินสามารถแก้ไขได้โดยการวัดสองความยาวคลื่น โดยวัดที่ 415 nm เพื่อหักลบค่าการดูดกลืนแสงพื้นหลัง เมื่อทดสอบกับตัวอย่างจริง ชุดตรวจนี้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างแผลที่ไม่ติดเชื้อและติดเชื้อได้ ซึ่งมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นอุปกรณ์ตรวจวัด ณ จุดดูแลผู้ป่วย เพื่อติดตามสถานะของแผลในทางคลินิก อย่างไรก็ตาม ในอนาคตจำเป็นต้องขยายขนาดกลุ่มตัวอย่างและใช้เทคนิคการวัดความยาวคลื่นคู่หรือการเจือจางตัวอย่าง เพื่อลดผลกระทบจากสารรบกวนก่อนนำชุดตรวจไปใช้ในงานจริง

คำสำคัญ: สารน้ำจากแผล, เอนไซม์ไมอีโกลเพอร์ออกซิเดส, อุปกรณ์วิเคราะห์บนกระดาษ, การตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส, พอลิไวนิลแอลกอฮอล์

ข้อมูลการอ้างอิง: ภาวรินทร์ เอกนาม, วรพจน์ นิลรัตน์กุล และ วนิดา หลายวัฒนไพศาล. (2569). การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไมอีโกลเพอร์ออกซิเดสในสารน้ำจากแผล โดยใช้การตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนกระดาษและเพิ่มความคงตัวด้วยพอลิไวนิลแอลกอฮอล์. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 4(5), 37

บทนำ

การติดเชื้อที่บาดแผลเป็นภาวะแทรกซ้อนรุนแรงที่อาจเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการรักษา ส่งผลให้การวินิจฉัยและการรักษาล่าช้า ปัจจุบันการวินิจฉัยการติดเชื้อยังอาศัยการประเมินอาการทางคลินิก เช่น รอยแดง บวม ร้อน และปวด ซึ่งมีความแปรผันตามประสบการณ์ของผู้ประเมิน ส่งผลให้ผลการวินิจฉัยไม่ชัดเจน (Tegl, 2015) ดังนั้นจึงได้มีงานวิจัยใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ใหม่ ๆ สำหรับประเมินสถานะของบาดแผล โดยเฉพาะเอนไซม์ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่ให้ผลรวดเร็วและเหมาะสมต่อการพัฒนาเครื่องมือตรวจวัดแบบง่าย (Mota, 2021)

เอนไซม์ไมอีโกลเพอรอกซิเดส (Myeloperoxidase; MPO) ซึ่งผลิตโดยเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ถือเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สำคัญของการอักเสบและการติดเชื้อ (Andrews & Krinsky, 1980; Nauseef, 1988) MPO ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนคลอไรด์ไอออน (Cl^-) ให้เป็นกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ในสถานะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Dale, 2008; Hampton, 1998) ซึ่งเป็นสารออกซิแดนต์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อสูง การเพิ่มขึ้นของ MPO ในเลือดหรือสารน้ำจากแผล (wound fluid) จึงสะท้อนการกระตุ้นของนิวโทรฟิลและภาวะการติดเชื้อในบาดแผล (Brennan & Hazen, 2003; Wu, 2005; Dechert 2006)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคหลายรูปแบบสำหรับตรวจวัดความสามารถในการทำงานของ MPO (MPO Activity) เช่น การวัดการเปลี่ยนแปลงสี (Suzuki, 1983; Bassegoda, 2019; Hoyo, 2022) วัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ (Majid, 2023) และเทคนิคเคมีไฟฟ้า (Hajsek, 2015; Permpoka, 2024) ในวิธีดังกล่าววิธีเชิงสีเป็นวิธีที่ง่าย เห็นผลด้วยตาเปล่า และไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดที่ต้องใช้ H_2O_2 ซึ่งมีความคงตัวต่ำ จำเป็นต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน (Hasmann, 2013)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GOx) ด้วยพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol: PVA) บนกระดาษ ซึ่งประยุกต์ใช้เทคนิคจากงานวิจัยก่อนหน้า (Boonpoempoon, 2019) เพื่อสร้าง H_2O_2 สำหรับเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาตรวจวัด MPO แทนที่ ซึ่งการตรึง GOx บนกระดาษเป็นการลดขั้นตอนและแก้ปัญหาความไม่คงตัวของ H_2O_2 และสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัด MPO จากสารน้ำจากแผลของผู้ป่วยได้พร้อมกันหลายตัวอย่าง

การทบทวนวรรณกรรม

แผลติดเชื้อเกิดจากการสะสมและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่เข้าสู่ร่างกายผ่านทางผิวหนัง สภาพแวดล้อม หรืออุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ไม่สะอาด (Puca, 2021) การติดเชื้อถือเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในผู้ป่วยผ่าตัดถึงร้อยละ 70 ถึง 80% โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา (Pallavalli, 2017) อาการมักปรากฏภายใน 2-3 วัน หรืออาจนานนับเดือนหลังเกิดแผล โดยมีสัญญาณบ่งชี้คือ ผิวหนังแดง ร้อน บวม ปวด มีกลิ่นเหม็น หรือมีหนองไหลจากบาดแผล ในปัจจุบันการวินิจฉัยแผลติดเชื้ออาศัย 3 วิธีหลัก ได้แก่ การประเมินทางคลินิกจากอาการพื้นฐาน, การตรวจเลือดเพื่อดูการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน และการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างหนอง (Li, 2021) อย่างไรก็ตาม วิธีการเหล่านี้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากต้องอาศัยความเชี่ยวชาญเฉพาะบุคคลของแพทย์ (Tegl, 2015) อีกทั้งกระบวนการทางห้องปฏิบัติการยังมีความซับซ้อนและใช้เวลานาน ไม่ตอบโจทย์ความต้องการวินิจฉัยที่รวดเร็ว ด้วยเหตุนี้ การตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้น โดยติดตามตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เช่น สารเมตาโบไลต์, โมเลกุลส่งสัญญาณ โดยเฉพาะเอนไซม์จากนิวโทรฟิลอย่าง MPO จึงมีความสำคัญในการบ่งชี้ภาวะพยาธิวิทยาและการอักเสบ (Pusta, 2021) เนื่องจากนิวโทรฟิลปรากฏขึ้นตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ การตรวจวัด MPO Activity จึงสามารถนำไปสู่มุมมองใหม่ในการติดตามสถานะของบาดแผล ซึ่ง สารน้ำจากแผล เป็นตัวอย่างที่ใช้มากที่สุดในการตรวจหาการติดเชื้อ เนื่องจากการวิเคราะห์โดยละเอียดจะหามุมมองของสภาพแวดล้อมนอกเซลล์ของแผลและสะท้อนถึงสถานะปัจจุบันของแผล

MPO เป็นฮีมโปรตีนที่พบใน Azurophilic granule ของนิวโทรฟิลซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีมากที่สุด มีหน้าที่ทำลายเชื้อโรคผ่านกระบวนการฟาโกไซโทซิส และฆ่าแบคทีเรียด้วยกรดไฮโปคลอรัส นอกจากนี้ MPO ยังมีบทบาทในการสร้าง

กับดักนิวโทรฟิล (NETs) เพื่อดักจับสิ่งแปลกปลอม ในปัจจุบันการตรวจวัด MPO Activity แม้จะมีวิธีมาตรฐานอย่าง ELISA หรือเทคนิคเคมีไฟฟ้าที่มีความไวสูง (Hajnsek, 2015; Permpoka, 2024) แต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องค่าใช้จ่ายและกระบวนการที่ซับซ้อน ส่งผลให้ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นาน นักวิจัยจึงมุ่งพัฒนาชุดตรวจการวัดสี (Colorimetric assay) ซึ่งประหยัด รวดเร็ว ประเมินผลเบื้องต้นได้ด้วยตาเปล่าและสามารถวัดด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader) เมื่อต้องการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ (Quantitative analysis) โดยมี 2 หลักการ คือ ปฏิกริยา 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB): HOCl ที่ได้จาก MPO จะเปลี่ยน TMB ที่ไม่มีสีให้กลายเป็น oxTMB ที่มีสีน้ำเงิน (Andrews & Krinsky, 1982) และปฏิกริยา TNB: HOCl จะทำปฏิกริยากับ Taurine เกิดเป็น Taurine chloramine ซึ่งจะเปลี่ยนสีเหลืองของ TNB ให้กลายเป็นไม่มีสี

โดยทั่วไประดับ MPO ในคนปกติจะอยู่ในระดับต่ำ (1.9 ± 1.8 U/mL) คนที่เป็นแผลไม่ติดเชื้อมักพบระดับ MPO Activity ในปริมาณต่ำถึงปานกลาง ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบตามปกติในระยะ Healing phase และคนที่เป็นแผลติดเชื้อ ระดับ MPO Activity จะสูงกว่าแผลปกติอย่างน้อย 2-10 เท่า (92.2 ± 45 U/mL) ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและระดับความรุนแรง (Hasmann, 2013) นอกเหนือจากการบ่งชี้สภาวะการอักเสบแล้ว MPO ยังถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในโรคอื่นๆ อีกหลายกลุ่ม เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ พบ MPO สูงในเลือด โรคอัลไซเมอร์และพาร์กินสัน พบการหลั่ง MPO สูงในเนื้อเยื่อสมอง โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ พบ MPO สูงในน้ำไขข้อ และ โรคทางเดินอาหารอักเสบ พบ MPO สูงในอุจจาระ (Khan, 2018)

วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อพัฒนาชุดตรวจวัดเชิงสีสำหรับการตรวจวัด MPO Activity โดยใช้ระบบการสร้าง H_2O_2 จาก GOx เพื่อลดขั้นตอนการเตรียมสารและแก้ปัญหาความคงตัว
- 2) เพื่อศึกษาผลของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อการเพิ่มความคงตัวของ GOx บนกระดาษ สำหรับการเก็บรักษาและการใช้งานในระยะยาว
- 3) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัด MPO Activity ในตัวอย่างสารน้ำจากแผล

สมมติฐานการวิจัย

ชุดตรวจที่อาศัยเทคนิคการตรึง GOx ด้วย PVA บนกระดาษ มีความคงตัว สามารถสร้าง H_2O_2 และใช้ในปฏิกริยาการตรวจวัด MPO Activity ในสารน้ำจากแผล โดยใช้วิธีการตรวจแบบสีเชิงปริมาณได้

วิธีดำเนินการวิจัย

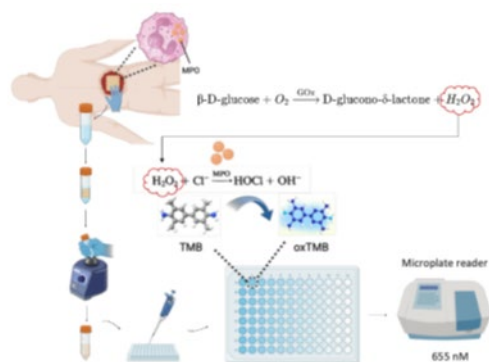
การเก็บสิ่งส่งตรวจ

งานวิจัยนี้ ตัวอย่างที่ใช้เป็นสารน้ำจากแผลที่ซึมอยู่ในผ้าก๊อชปิดแผลที่ใช้แล้ว (Used Wound-dressing gauze) ขนาด 4 x 4 นิ้ว จากผู้ป่วย 9 ราย ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โครงการวิจัยได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No. 0443/67) โดยตัวอย่างจากผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์เป็นกลุ่มแผลติดเชื้อ 3 รายและไม่ติดเชื้อ 6 ราย วิธีการสกัด MPO ทำโดยนำผ้าก๊อชที่ซับน้ำจากแผลแช่ในบัฟเฟอร์ PBS (pH 6.5) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สกัด MPO โดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บส่วนของเหลวใสสำหรับการวิเคราะห์หา MPO activity ต่อไป

วิธีทดสอบ

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยผลิตอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ (Paper-based analytical device: PADs) โดยใช้เทคนิคการพิมพ์ไข (Wax printing) (Carrilho, 2009) ให้มีทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มม. ลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และให้ความร้อนที่ 120 °C เพื่อสร้างขอบเขตไม่ชอบน้ำ เตรียม GOx ที่มีส่วนผสมของ PVA จากนั้นตรึงลงบนกระดาษ ทิ้งไว้จนแห้งสนิท ณ อุณหภูมิห้อง นำ PADs วางลงในหลุมของไมโครเพลทชนิด 96 หลุม โดยแบ่งสภาวะการทดลองเป็นสองส่วน ได้แก่ ชุดควบคุม (Sample blank) ที่ไม่มีการเติมกลูโคส และชุดทดสอบที่มีการเติมกลูโคส

แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดการผลิต H_2O_2 อย่างสมบูรณ์ ในขั้นตอนสุดท้ายทำการเติม TMB 1 mg/mL ร่วมกับ MPO จากสิ่งตัวอย่าง บ่มปฏิกิริยา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 655 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กระบวนการตรวจวิเคราะห์ MPO Activity ในสารน้ำจากแผลของผู้ป่วย

ผลการวิจัย

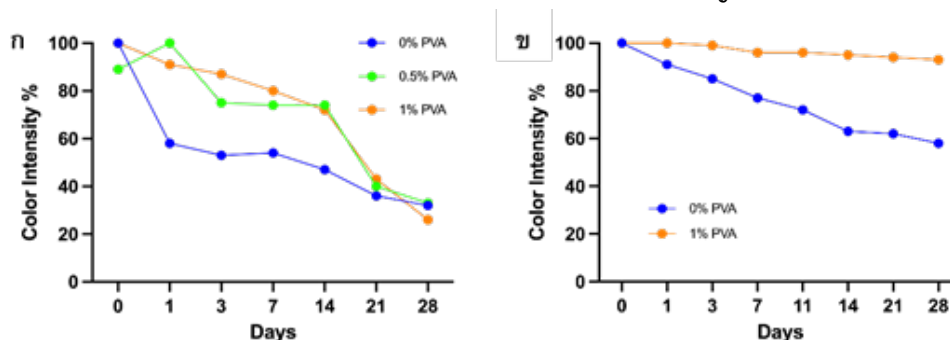
ผลการศึกษาความคงตัวของ H_2O_2

1) การตรึง H_2O_2 ด้วย PVA

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการใช้ PVA ความเข้มข้นต่างๆ ในการเพิ่มความคงตัวของ H_2O_2 ที่ถูกตรึงบนกระดาษและนำไปใช้ในปฏิกิริยาตรวจวัด MPO ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 2ก แสดงให้เห็นว่า ในสภาวะที่ไม่มี PVA ความเข้มข้นของปฏิกิริยาตกลงอย่างรวดเร็วเหลือต่ำกว่า 60% ภายใน 3 วัน ในทางตรงกันข้าม เมื่อเติม PVA ที่ความเข้มข้น 0.5% และ 1% ลงใน H_2O_2 พบว่า PVA ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นช่วยเพิ่มความคงตัวของ H_2O_2 อย่างไรก็ดีตาม 1% PVA สามารถรักษาความคงตัวของ H_2O_2 ได้นาน เพียง 7 วัน เนื่องจาก PVA ไม่สามารถป้องกันการสลายตัวของ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ตามเวลาได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตรึง H_2O_2 โดยตรงยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่ใช้วัด MPO Activity

2) การตรึงเอนไซม์ GOx สำหรับสร้าง H_2O_2

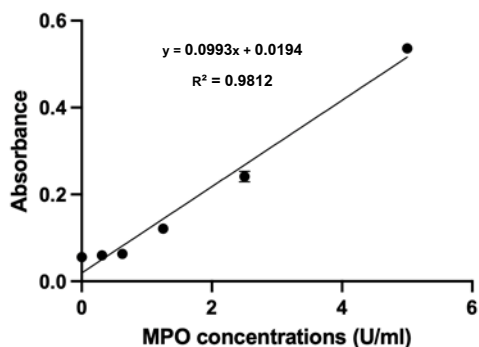
เพื่อแก้ปัญหาความคงตัวของ H_2O_2 จึงมีการใช้ GOx เพื่อสร้าง H_2O_2 ใช้ในปฏิกิริยาตรวจวัด MPO แทนที่ ในปฏิกิริยาประกอบด้วย GOx 0.0375 mg/ml (5.625 U/mL) ที่ถูกตรึงบน PADs ด้วย 1%PVA จากนั้นเติมกลูโคส 1.25 mM ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที เพื่อสร้าง H_2O_2 เติม TMB 1 mg/mL และ MPO เพื่อวัดความเข้มข้นของปฏิกิริยา จากภาพที่ 2ข เมื่อตรึงเอนไซม์ GOx ด้วย PVA และเก็บรักษาในตู้เย็น พบว่า สามารถรักษาความคงตัวของ GOx ได้นานอย่างน้อย 28 วัน แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ยังสามารถผลิต H_2O_2 สำหรับการตรวจวัด MPO โดยมีความเข้มข้นของปฏิกิริยาคงเหลือมากกว่า 90% ซึ่งนานกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้ตรึงด้วย PVA อย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความคงตัวของชุดตรวจ โดยวัดความเข้มข้นของปฏิกิริยา MPO ในช่วงเวลา 28 วัน ก) ในสภาวะที่มีการตรึง H_2O_2 ด้วย PVA ที่ความเข้มข้น 0%, 0.5% และ 1% ข) ในสภาวะที่มีการตรึง GOx ด้วย 1% PVA บน PADs เทียบกับไม่มี PVA

ผลการศึกษาคณสมบัติของชุดตรวจ

ผู้วิจัยได้ทำการเตรียมสารมาตรฐาน MPO ในความเข้มข้นต่าง ๆ (ช่วง 0-5 U/mL) เพื่อจำลองระดับการติดเชื้อ และนำมาเป็นตัวอย่างในปฏิกิริยาการตรวจวัด แต่ละความเข้มข้นถูกทดสอบ อย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อประเมินช่วงความเป็นเส้นตรงและความไว และสร้างกราฟมาตรฐาน โดยพล็อตค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับความเข้มข้นของ MPO ผลลัพธ์ที่แสดงในภาพที่ 3 พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน MPO โดยค่า $R^2 = 0.9812$ ซึ่งสมการเชิงเส้น คือ $Y = 0.0993X + 0.0194$ มีค่า LOD (3SD/Blank) และ LOQ (6SD/Blank) เท่ากับ 0.027 U/mL และ 0.055 U/mL ตามลำดับ ผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่า ชุดตรวจมีความไวสูงเพียงพอสำหรับการตรวจวัด MPO Activity ในระดับความเข้มข้นต่ำได้ และมีศักยภาพในการจำแนกผลติดเชื้อและไม่ติดเชื้อได้



ภาพที่ 3. กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัด MPO ช่วงความเข้มข้น 0-5 U/mL (Error bar แทนค่า SD จากการทดลอง 2 ซ้ำ)

1) ผลการประเมินความแม่นยำ (Precision)

ดังที่แสดงใน ตารางที่ 1 การทดสอบความแม่นยำของชุดตรวจ ทำโดยการเตรียม PADs 10 ชุดในวันเดียวกัน และนำมาทดสอบกับตัวอย่างสารน้ำจากแผล พบว่า ตัวอย่างสารน้ำจากแผลที่ไม่ได้ติดเชื้อ ($n = 10$) วัดค่า MPO Activity โดยมีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเฉลี่ย 0.116 ± 0.004 (%CV = 4%) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 48 U/mL และตัวอย่างสารน้ำจากแผลที่ติดเชื้อ ($n = 10$) วัดค่า MPO Activity โดยมีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเฉลี่ย 0.710 ± 0.023 (%CV = 3%) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 347 U/mL เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งสองประเภท ชุดตรวจมีค่า %CV ต่ำกว่า 5% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ความน่าเชื่อถือสำหรับการวิจัยและการปฏิบัติทางคลินิก (Shechtman, 2013) บ่งชี้ว่า ชุดตรวจนี้มีความแม่นยำ

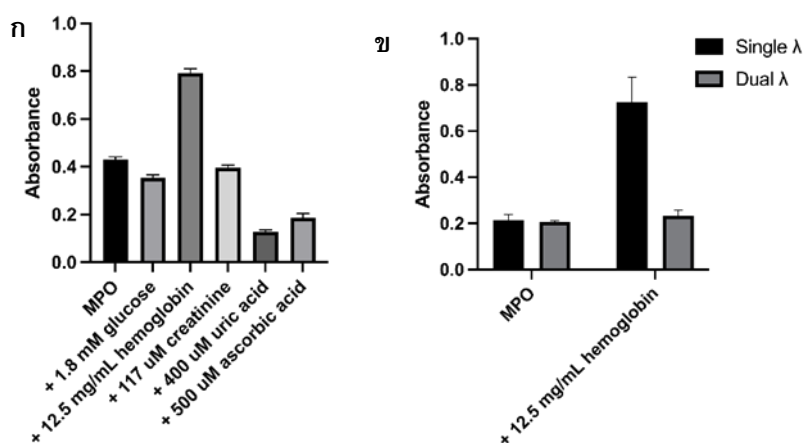
ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยและระดับความแปรปรวนของ MPO ในสารน้ำจากแผลที่ไม่ติดเชื้อและแผลที่ติดเชื้อ

	แผลไม่ติดเชื้อ ($n = 10$)	แผลติดเชื้อ ($n = 10$)
Mean	0.116 (48 U/mL)	0.710 (347 U/mL)
SD	0.004	0.023
%CV	4%	3%

2) ผลการทดสอบสารรบกวน (Interference)

เพื่อประเมินความจำเพาะของเทคนิคตรวจวัด MPO ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบสารรบกวนของปฏิกิริยา MPO โดยเลือกสารที่พบทั่วไปในสารน้ำจากแผล ได้แก่ ครีเอตินีน ($117 \mu\text{M}$) กลูโคส (1.8 mM) ฮีโมโกลบิน (12.5 mg/mL) กรดยูริก ($400 \mu\text{M}$) และกรดแอสคอร์บิก ($500 \mu\text{M}$) (Jarošová, 2019) สารรบกวนแต่ละชนิดถูกเติม (spike) ลงในตัวอย่างสารน้ำจากแผลและวิเคราะห์โดยใช้ชุดตรวจที่พัฒนาในงานวิจัยนี้ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากปฏิกิริยา MPO ในตัวอย่างที่มีการ spike ถูกเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมสารรบกวน ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4ก พบว่า

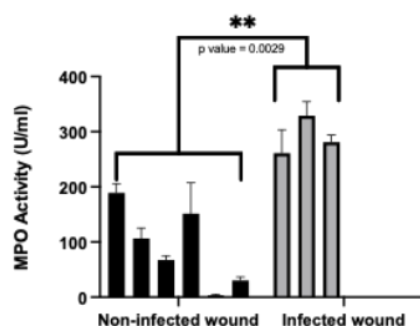
กลูโคสและครีเอตินีนไม่รบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัด โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) อยู่ที่ 85% และ 92% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐานทางอาหารและยา (AOAC) (85-115%) อย่างไรก็ตาม ฮีโมโกลบินรบกวนปฏิกิริยา ทำให้ตรวจวิเคราะห์ค่าได้มากกว่าความเป็นจริง (184% Recovery) ในทางตรงกันข้ามกรดยูริก และ กรดแอสคอร์บิก รบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัดอย่างชัดเจน โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ที่ 30% และ 53% ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Chavengprasert, 2020) ในงานวิจัยได้ทดลองประยุกต์ใช้เทคนิคการตรวจวัดแบบสองความยาวคลื่น (Dual wavelength measurements) เพื่อกำจัดการรบกวนจากฮีโมโกลบิน โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm และหักลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยา (655 nm) ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4 ข พบว่า สามารถแก้ปัญหารบกวนจากฮีโมโกลบินได้ โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (109%)



ภาพที่ 4 ก) การศึกษาสารรบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัด MPO ข) การเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา MPO ในสารน้ำจากแผลที่มีการเติมฮีโมโกลบิน ระหว่างการวัดแบบความยาวคลื่นเดี่ยว (655 nm) และแบบสองความยาวคลื่น (655 และ 415 nm) (Error bar แทนค่า SD จากการทดลอง 2 ซ้ำ)

ผลการทดสอบกับสิ่งตัวอย่าง

จากการตรวจวัด MPO Activity ในกลุ่มตัวอย่างแผลที่ไม่ติดเชื้อเปรียบเทียบกับแผลที่ติดเชื้อ ($n = 9$) ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 6 พบว่า ค่าเฉลี่ย MPO Activity ของแผลที่ไม่ติดเชื้อ ($n = 6$) มีค่าเท่ากับ 91.4 U/mL และค่าเฉลี่ย MPO Activity ของแผลที่ติดเชื้อ ($n = 3$) มีค่าเท่ากับ 260.8 U/mL โดยผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ยเท่ากับ 198.9 ± 44.6 U/mL ผลการวิเคราะห์โดยใช้ Independent t-test พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสองกลุ่ม ($t = 4.463$, $df = 7$, $p = 0.0029$) บ่งชี้ว่า ชุดตรวจนี้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแผลที่ไม่ติดเชื้อและแผลที่ติดเชื้อได้



ภาพที่ 5 ผลการตรวจวัดระดับ MPO Activity ในตัวอย่างสารน้ำจากแผลที่ไม่ติดเชื้อ (Non-infected wound) และแผลที่ติดเชื้อ (Infected wound) (Error bar แทนค่า SD จากการทดลอง 2 ซ้ำ)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาชุดตรวจ สำหรับวัด MPO activity ด้วยหลักการการวัดการเปลี่ยนแปลงสี ในสารน้ำจากแผลที่สามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกันหลายตัวอย่างด้วยเครื่อง Microplate reader โดยชุดตรวจนี้อาศัยเทคนิคการสร้าง H_2O_2 จากเอนไซม์ GOx ที่ถูกตรึงด้วย 1%PVA บนกระดาษ ช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ได้อย่างน้อย 28 วัน ซึ่งงานวิจัยนี้ช่วยลดความจำเป็นในการเตรียม H_2O_2 ใหม่ทุกครั้ง จากการสร้าง H_2O_2 ใช้ทันทีด้วย GOx ทำให้ลดขั้นตอนและใช้เวลาวิเคราะห์สั้นลง จากผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง H_2O_2 คือ การใช้ GOx 0.0375 mg/ml ร่วมกับกลูโคส 1.25 mM บ่มปฏิกิริยา 10 นาที

ผลการศึกษาคุณสมบัติของวิธีการทดสอบ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวิเคราะห์ MPO 0-5 U/mL มีค่า $R^2 = 0.9812$, LOD = 0.027 U/mL และ LOQ = 0.055 U/mL บ่งชี้ว่า ชุดตรวจมีความไวสูงเพียงพอสำหรับการตรวจวัด MPO Activity ในระดับความเข้มข้นต่ำได้ อีกทั้งชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ค่าความแม่นยำ โดยมีค่า %CV < 5% ทั้งในตัวอย่างแผลที่ไม่ติดเชื้อ (%CV = 4) และแผลที่ติดเชื้อ (%CV = 3) จากการศึกษาสารรบกวนการตรวจวัด พบว่า กลูโคสและครีเอตินีนในสารน้ำจากแผลไม่ส่งผลกระทบต่อวิเคราะห์ MPO โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ อย่างไรก็ตาม ฮีโมโกลบินและสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กรดยูริกและกรดแอสคอร์บิก มีอิทธิพลต่อผลการตรวจวัด เนื่องจากฮีโมโกลบินมีคุณสมบัติเป็นเพอร์ออกซิเดสเทียม (pseudoperoxidase) จึงทำให้ MPO Activity ที่ตรวจวัดได้มีค่าสูงปลอม (Kapralov, 2009) ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติเป็น Reducing agent จะเข้าขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชันของ TMB ส่งผลให้ความเข้มข้นของปฏิกิริยาลดลงและทำให้ผลการวิเคราะห์ต่ำกว่าปกติ (Carvalho, 2018; Meng, 2005) โดยทั่วไปตัวอย่างสารน้ำจากแผล อาจมีการปนเปื้อนของฮีโมโกลบินจากเม็ดเลือดแดงที่แตก การใช้เทคนิค dual wavelength measurements โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ซึ่งเป็นจุดดูดกลืนแสงสูงสุดของฮีโมโกลบิน (Huynh, 2017) มาหักลบจากสัญญาณหลัก สามารถลดการรบกวนได้ ทำให้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

อย่างไรก็ตาม แม้งานวิจัยนี้จะแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของชุดตรวจในการแยกความแตกต่างระหว่างแผลที่ไม่ติดเชื้อและแผลที่ติดเชื้อ แต่เนื่องจากการศึกษานี้ ยังมีข้อจำกัดด้านขนาดตัวอย่างที่ค่อนข้างเล็ก ควรได้มีการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้น และศึกษาช่วงอ้างอิง (reference ranges) ของทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง การพัฒนาในประเด็นเหล่านี้ จะช่วยยกระดับความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสู่มาตรฐานการตรวจวัด ณ จุดดูแลผู้ป่วย (Point-of-care testing) ที่สมบูรณ์ในอนาคตได้

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีค่าอ้างอิง (reference range) ของ MPO ในสารน้ำจากแผลติดเชื้อ ดังนั้นควรมีการศึกษาต่อในกลุ่มตัวอย่างแผลไม่ติดเชื้อและแผลติดเชื้อ โดยใช้จำนวนประชากร (sample size) ขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อได้ข้อมูลค่าอ้างอิงของ ระดับ MPO ในสองกลุ่มตัวอย่าง และศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมเพื่อลดสารรบกวนในสิ่งตัวอย่างต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไบโอเซนเซอร์และวิศวกรรมชีวภาพ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Adányi, N., Barna, T., Emri, T., Miskei, M., & Pócsi, I. (2007). Hydrogen peroxide producing and decomposing enzymes: Their use in biosensors and other applications. In J. Polaina & A. P. MacCabe (Eds.), *Industrial Enzymes* (pp. 491-512). Springer.

- Andrews, P. C., & Krinsky, N. I. (1981). The reductive cleavage of myeloperoxidase in half, producing enzymically active hemi-myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 256(9), 4211-4218.
- Arshi, S., Xiao, X., Belochapkine, S., & Magner, E. (2022). Electrochemical Immobilisation of Glucose Oxidase for the Controlled Production of H₂O₂ in a Biocatalytic Flow Reactor. *ChemElectroChem*, 9(17), e202200319.
- Bassegoda, A., Ferreres, G., Pérez-Rafael, S., Hinojosa-Caballero, D., Torrent-Burgués, J., & Tzanov, T. (2019). New myeloperoxidase detection system based on enzyme-catalysed oxidative synthesis of a dye for paper-based diagnostic devices. *Talanta*, 194, 469-474.
- Bauer, J. A., Zámocká, M., Majtán, J., & Bauerová-Hlinková, V. (2022). Glucose oxidase, an enzyme "Ferrari": Its structure, function, production and properties in the light of various industrial and biotechnological applications. *Biomolecules*, 12(3), 472.
- Boonpoempon, T., Wonsawat, W., & Kaneta, T. (2019). Long-term stabilization of hydrogen peroxide by poly(vinyl alcohol) on paper-based analytical devices. *Scientific Reports*, 9, 12951.
- Brennan, M. L., & Hazen, S. L. (2003). Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. *Current Opinion in Lipidology*, 14(4), 353-359.
- Carrilho, E., Martinez, A. W., & Whitesides, G. M. (2009). Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical Chemistry*, 81(16), 7091-7095.
- Carvalho, L. A. C., Lopes, J. P. P. B., Kaihami, G. H., Silva, R. P., Bruni-Cardoso, A., Baldini, R. L., & Meotti, F. C. (2018). Uric acid disrupts hypochlorous acid production and the bactericidal activity of HL-60 cells. *Redox Biology*, 16, 179-188.
- Chavengprasert, R., Boonsiri, P., Sae-ung, N., Kitcharoen, S., Pinlaor, P., & Tavichakorntrakool, R. (2020). The interference effect on determination of myeloperoxidase levels by developed assay kit. In *The 21st National Graduate Research Conference* (pp. MMP4-1-6). Khon Kaen University.
- Dale, D. C., Boxer, L., & Liles, W. C. (2008). The phagocytes: Neutrophils and monocytes. *Blood*, 112(4), 935-945.
- Dechert, T. A., Ducale, A. E., Ward, S. I., & Yager, D. R. (2006). Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 14(3), 252-258.
- Hajnsek, M., Schiffer, D., Harrich, D., et al. (2015). An electrochemical sensor for fast detection of wound infection based on myeloperoxidase activity. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209, 265-274.
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9), 3007-3017.
- Hasmann, A., Wehrsuetz-Sigl, E., Marold, A., Wiesbauer, H., Schoeftner, R., Gewessler, U., Kandelbauer, A., Schiffer, D., Schneider, K. P., Binder, B., Schintler, M., & Guebitz, G. M. (2013). Analysis of myeloperoxidase activity in wound fluids as a marker of infection. *Annals of Clinical Biochemistry*, 50(3), 245-254.
- Hoyo, J., Bassegoda, A., Ferreres, G., Hinojosa-Caballero, D., Gutiérrez-Capitán, M., Baldi, A., Fernández-Sánchez, C., & Tzanov, T. (2022). Rapid colorimetric detection of wound infection with a fluidic paper device. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9129.

- Huynh, T., Lai, M. J., Liu, Y. L., Ly, L., Gong, X., Rommel, K. R., & Young, D. L. (2017). Spectral Analysis Methods Based on Background Subtraction and Curvature Calculation Used in the Detection or Quantification of Hemolysis and Icterus in Blood-derived Clinical Samples. *Cureus*, 9(12), e1965.
- Jarosova, R., McClure, S. E., Gajda, M., Jovic, M., Girault, H. H., Lesch, A., ... & Swain, G. M. (2019). Inkjet-printed carbon nanotube electrodes for measuring pyocyanin and uric acid in a wound fluid simulant and culture media. *Analytical chemistry*, 91(14), 8835-8844.
- Khan, A. A., Alsahli, A., & Raharimanarivo, A. S. (2018). Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Medical Sciences*, 6(2), 33.
- Kapralov, A., Vlasova, I. I., Feng, W., Maeda, A., Walson, K., Tyurin, V. A., Huang, Z., Aneja, R. K., Carcillo, J., Bayir, H., & Kagan, V. E. (2009). Peroxidase activity of hemoglobin-haptoglobin complexes: Covalent aggregation and oxidative stress in plasma and macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30395-30407.
- Li, S., Renick, P., Senkowsky, J., Nair, A., & Tang, L. (2021). Diagnostics for wound infections. *Advances in Wound Care*, 10(6), 317-327.
- Majid, R., Al Talebi, Z. A., Al-Kawaz, H. S., et al. (2023). Novel fluorometric protocol for assessing myeloperoxidase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 171, 110320.
- Mota, F. A. R., Pereira, S. A. P., Araújo, A. R. T. S., Passos, M. L. C., & Saraiva, M. L. M. F. S. (2021). Biomarkers in the diagnosis of wounds infection: An analytical perspective. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 143, 116405.
- Nauseef, W. M. (1988). Myeloperoxidase deficiency. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2(1), 135-158.
- Odobasic, D., Kitching, A. R., & Holdsworth, S. R. (2016). Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: the role of myeloperoxidase. *Journal of immunology research*, 2016(1), 2349817.
- Pallavali, R. R., Degati, V. L., Lomada, D., Reddy, M. C., & Durbaka, V. R. P. (2017). Isolation and in vitro evaluation of bacteriophages against MDR-bacterial isolates from septic wound infections. *PLoS ONE*, 12(7), e0179245.
- Permpoka, K., Purinai, P., Cheerasiri, C., Rojpalakorn, W., Nilaratanakul, V., & Laiwattanapaisal, W. (2024). Smartphone-enabled 3D origami-fluidic paper-based electrochemical detection of myeloperoxidase activity for assessing wound infection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 398, 134712.
- Puca, V., Marulli, R. Z., Grande, R., et al. (2021). Microbial species isolated from infected wounds and antimicrobial resistance analysis: Data emerging from a three-years retrospective study. *Antibiotics*, 10(10), 1162.
- Pusta, A., Tertiş, M., Cristea, C., & Mirel, S. (2021). Wearable sensors for the detection of biomarkers for wound infection. *Biosensors*, 12(1), 1.
- Shechtman, O. (2013). The coefficient of variation as an index of measurement reliability. In S. Doi & G. Williams (Eds.), *Methods of Clinical Epidemiology* (pp. 39-49). Springer.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., & Fujikura, T. (1983). Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*, 132(2), 345-352.

- Tegl, G., Schiffer, D., Sigl, E., Heinzle, A., & Guebitz, G. M. (2015). Biomarkers for infection: Enzymes, microbes, and metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11), 4595-4614.
- White-Stevens, R. H. (1982). Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I. Reversible indicators and the effects of copper, iron, and mercury. *Clinical Chemistry*, 28(4 Pt 1), 578-588.
- Wu, C. C., Chen, J. S., Wu, W. M., Liao, T. N., Chu, P., Lin, S. H., ... & Lin, Y. F. (2005). Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20(6), 1134-1139.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2026 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).