

การเพิ่มความไวของเครื่องอ่านแอสเอฟเอสำหรับใช้กับเซนเซอร์ทางชีวภาพ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์และโฟตอนิกส์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2559

**SENSITIVITY IMPROVEMENT IN LATERAL FLOW  
IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAYS READERS  
FOR BIOSENSING APPLICATIONS**



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Engineering in  
Electronics and Photonics Engineering  
Suranaree University of Technology  
Academic Year 2016**

## การเพิ่มความไวของเครื่องอ่านแอลเอฟเอสำหรับใช้กับเซนเซอร์ทางชีวภาพ

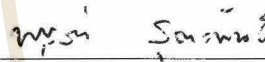
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์




(รศ. ดร.ชาญชัย ทองโสภณ)

ประธานกรรมการ



(ผศ. ดร.บุญส่ง สุตะพันธ์)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



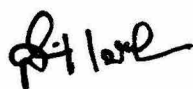
(ผศ. ดร.พนมศักดิ์ มีมนต์)

กรรมการ



(ศ. ภาคว. ดร.มณฑารพ ยมาภัย)

กรรมการ



(ศ. ดร.สันติ แม่นศิริ)

รักษาการแทนรองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ  
และพัฒนาคณาจารย์



(รศ. ร.อ. ดร.กนต์ธร ชำนิประศาสน์)

คณบดีสำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์

ลลิตา สายศิลป์ : การเพิ่มความไวของเครื่องอ่านแอลเอฟเอสำหรับใช้กับเซนเซอร์ทาง  
ชีวภาพ (SENSITIVITY IMPROVEMENT IN LATERAL FLOW  
IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAYS READERS FOR BIOSENSING  
APPLICATIONS) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.บุญส่ง สุตะพันธ์, 83 หน้า

ชุดทดสอบอย่างง่ายแบบแอลเอฟเอ (Lateral flow immunochromatographic assays, LFA) ได้รับความสนใจพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำหรับสารชีวภาพหลากหลายชนิด ในประเทศไทยเองได้มีการวิจัยและพัฒนาชุดทดสอบแอลเอฟเอสำหรับเป็นชุดทดสอบในทางการแพทย์ การตรวจสอบอาหาร และการเกษตร เป็นจำนวนมาก การแปลผลชุดทดสอบใช้การอ่านแถบสีด้วยตาเปล่า ซึ่งขึ้นอยู่กับแต่ละบุคคล วิธีการดังกล่าวจะมีปัญหามากขึ้นถ้าสารตัวอย่างมีความเข้มข้นต่ำ ส่งผลให้แถบทดสอบมีสีจาง จนบางครั้งไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างสีได้ ดังนั้นการพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบสำหรับการแปลผล จะสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้

เมื่อชุดทดสอบอย่างง่ายได้รับความน่าเชื่อถือจากผู้ใช้งาน การพัฒนาเครื่องมือสำหรับแปลผลอัตโนมัติจึงได้รับความสนใจมากขึ้นตามลำดับ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีที่ให้ค่า Detection limit ต่ำกว่าการแปลผลด้วยตา และออกแบบให้สามารถใช้งานกับชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในประเทศ ได้ทำการศึกษาแนวทางเบื้องต้นการออกแบบเครื่องอ่านแถบสีทดสอบ ได้เลือกใช้กล้องเว็บแคม และใช้กล้องโทรศัพท์แบบพกพาในการถ่ายภาพแถบสี เนื่องจากมีราคาไม่แพง และใช้ไดโอดเปล่งแสงเป็นแหล่งกำเนิดแสง งานวิจัยนี้ได้พัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผลและแสดงผลอ่านค่าความเข้มแสงที่แถบทดสอบแบบอัตโนมัติ ทำให้สะดวกและรวดเร็ว สามารถใช้งานกับชุดทดสอบแบบทั่วไปและชุดทดสอบแบบ Multiplex ได้

เมื่อนำเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่ายที่พัฒนาขึ้นไปทดสอบใช้งานกับชุดทดสอบที่จำเพาะต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) พบว่า Detection limit ของเครื่องอ่านต่ำกว่าการแปลผลด้วยตาเปล่าถึง 50 เท่า จากการศึกษาการตั้งค่า Exposure time ต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ซอฟต์แวร์เลือกให้อัตโนมัติจนภาพเกิด Under exposure ทำให้ผลการวัดดีขึ้น

เครื่องมือดังกล่าวมีต้นทุนการผลิตต่ำ สามารถผลิตใช้งานในประเทศไทยได้ เหมาะสำหรับผู้ผลิตชุดทดสอบที่ผลิตจำหน่ายในประเทศ

สาขาวิชาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนักศึกษา

ลลิตา สายศิลป์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

พ.ว. ร.น. น.น.น.

LALITA SAISIN : SENSITIVITY IMPROVEMENT IN LATERAL FLOW  
IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAYS READERS FOR BIOSENSING  
APPLICATIONS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. BOONSONG  
SUTAPUN, Ph.D., 83 PP.

### LATERAL FLOW IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAYS (LFA)

Lateral flow immunochromatographic assays (LFA) have been widely used as rapid diagnostic devices. In Thailand, several lateral-flow test kits have been developed for biosensing detection in medical, food quality and agriculture applications. However, visual interpretation of the test bands on the test strip with the naked eye is subject to human error. In some cases, development of a low concentration of the sample causes a faint test line and visualization of the test line will be problematic. Therefore, automatic test reader could improve the detection limit and reduce the uncertainty.

The objective of this research is to develop a test strip reader that has a detection limit is better than that of by visual interpretation with the naked eyes. The reader includes a green light emitting diode light source and a camera used to detect the color of the test line and control line in the test strip. Two types of cameras were employed in this work including a web camera and a mobile phone. The captured images were transferred to a computer for automatic image processing. A computer program was developed to analyse the captured images and calculated the intensity change at the test line. These readers can be used to read both a single-analyse test strip and a multiplex test strip.

The performance of the strip readers was evaluated by *Acidovorax avenae* subsp.*citrulli* (*Aac*) test kits. In this study, we found that by adjusting an exposure time of camera compared to the exposure time automatic mode improves the detection limit. The limit of detection of the system is better than that of by the naked eye approximately visualization to be under exposure 50-fold. These low-cost, lateral flow readers are suitable for use with the test kits manufactured locally.



School of Electronics Engineering

Academic Year 2016

Student's Signature ลลิตา อภัยศิลป์

Advisor's Signature นาย.ดร. สุเทพพันธ์

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับคำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งด้านวิชาการและด้านดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่อไปนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง สุตะพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ที่ให้ความรู้ อบรม สั่งสอน ชี้แนะ และช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ดร. อาโมทย์ สมบูรณ์แก้ว, นาย รัฐศาสตร์ อัมฤทธิ และ ดร.ศุภนิจ พรธีระภัทร ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีโฟโตนิกส์ หน่วยวิจัยระบบและอุปกรณ์อัจฉริยะ ศูนย์เทคโนโลยีและอิเล็กทรอนิกส์แห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่าง ๆ ในการทำวิจัยนี้

ดร. อรประไพ คชนันท์, ดร.อรรวรณ หิมานันโต และคณะห้องปฏิบัติการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ที่เตรียมตัวอย่างในการทดลองและคำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย ทองโสภิต, ศาสตราจารย์ เกศจักรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภักย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนมศักดิ์ มีมนต์ ที่กรุณาให้การแนะนำ และตรวจรูปแบบวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สัญญาเลขที่ TGIST 01-57-025 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ลลิตา สายศิลป์

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ณ
<b>บทที่</b>	
<b>1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	7
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	7
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	7
<b>2 ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>8</b>
2.1 ชุดทดสอบอย่างง่ายแบบ Lateral flow immunochromatographic assays.....	8
2.2 รูปแบบชุดทดสอบสำหรับการตรวจวัดสารทางชีวภาพ.....	10
2.3 เทคนิคที่ใช้สำหรับเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่าย.....	13
2.3.1 เทคนิคการวัดความเข้มแสงจากชุดทดสอบด้วยโฟโตดีเทกเตอร์.....	14
2.3.2 เทคนิคการถ่ายภาพชุดทดสอบและคำนวณหาความเข้มแสงด้วยกล้อง CCD หรือ กล้อง CMOS.....	15
2.3.3 เทคนิคการถ่ายภาพชุดทดสอบและคำนวณหาความเข้มแสงด้วยกล้องโทรศัพท์แบบพกพา.....	17
2.4 เทคนิคการเพิ่มความไว (Sensitivity) สำหรับเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่าย.....	19



## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.1	เทคนิคกำหนดมุมตกกระทบของแสงเพื่อลดแสงสะท้อน โดยตรงจากไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนบนชุดทดสอบ.....	19
2.4.2	เทคนิค Silver staining enhancement.....	21
2.4.3	เทคนิคโฟโตเทอร์มัลแบบไม่สัมผัส.....	22
2.4.4	เทคนิคประมวลผลภาพชุดทดสอบอย่างง่าย.....	24
<b>3</b>	<b>การออกแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่ายแบบแอลเอฟเอ.....</b>	<b>28</b>
3.1	การออกแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ โดยใช้กล้องเว็บแคมเป็นอุปกรณ์รับภาพ.....	28
3.2	กราฟ Line profile.....	31
3.3	การออกแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบโดยใช้ กล้องโทรทรรศน์แบบพกพาเป็นอุปกรณ์รับภาพ.....	33
3.4	การคำนวณค่าการสะท้อนแสงแบบ Line profile.....	35
3.5	โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับคำนวณหาตำแหน่ง แถบทดสอบและค่า $\Delta I_T$ .....	36
3.6	การพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีแบบ Multiplex.....	39
<b>4</b>	<b>การทดลองและผลการทดลอง.....</b>	<b>42</b>
4.1	ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง.....	42
4.1.1	ชุดตรวจโรคผลเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> .....	42
4.1.2	ชุดตรวจโรคผลเน่าแบคทีเรียแบบตรวจวัดพร้อมกัน (Multiplex detection).....	44
4.2	วิธีการทดลอง.....	45
4.3	การคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ (Detection limit).....	45

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 การปรับเวลาในการรับภาพของกล้อง (Exposure time).....	47
4.5 ผลการทดลองเบื้องต้น.....	48
4.6 Detection limit เมื่อ ใช้การอ่านค่าแบบ Under exposure.....	49
4.7 Detection limit ของชุดทดสอบกรณีระบุแถบสีด้วยตาเปล่า.....	51
4.8 ผลการวัดค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนเมื่อใช้จำนวนเฟรมภาพเฉลี่ยต่างกัน.....	55
4.9 ผลการปรับค่า Exposure time ของกล้องเว็บแคม.....	57
4.10 ผลการปรับค่า Exposure time ของกล้องโทรศัพท์แบบพกพา.....	59
4.11 ผลการปรับค่าพารามิเตอร์อื่นๆ ของกล้อง.....	61
4.11.1 ผลการปรับค่า Contrast ของกล้อง.....	62
4.11.2 ผลของการปรับค่า Gain ของกล้อง.....	64
4.12 ผลการทดลองกับชุดทดสอบแบบ Multiplex.....	65
4.13 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	68
<b>5 สรุป.....</b>	<b>75</b>
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. บทความที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในระหว่างการศึกษา.....	82
ประวัติผู้เขียน.....	83

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1	เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่ายที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์.....4
4.1	ผลการอ่านค่าแถบสีชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย Aac ที่ความเข้มข้น Healthy, $1 \times 10^5$ , $5 \times 10^5$ , $1 \times 10^6$ , $5 \times 10^6$ และ $1 \times 10^7$ CFU/mL (N=5) โดยใช้การระบุการเกิดแถบสีด้วยตาเปล่า จากผู้ทดสอบทั้งหมด 9 คน.....53
4.2	ค่า RGB ของแถบสีที่พิมพ์ขึ้นที่มีแถบสีใกล้เคียงกับแถบสีชุดทดสอบ Aac ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....62
4.3	ค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบของชุดทดสอบแบบ Multiplex.....68

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	โครงสร้างของ Lateral flow immunochemical assays ..... 9
2.2	(ก) การไหลของสารตัวอย่างสำหรับชุดทดสอบอย่างง่ายแบบ Lateral flow immunochemical assays (LFA) การเกิดสีที่แถบควบคุม (Control line) และแถบทดสอบ (Test line) และ (ข) การแปลผลชุดทดสอบ..... 10
2.3	(ก) การไหลของสารตัวอย่างสำหรับชุดทดสอบอย่างง่ายแบบ Sandwich assays และ (ข) การแปลผลชุดทดสอบ..... 12
2.4	การไหลของสารตัวอย่างสำหรับชุดทดสอบอย่างง่ายแบบ Competitive assays และ (ข) การแปลผลชุดทดสอบ..... 13
2.5	(ก) เทคนิคการวัดความเข้มแสงจากชุดทดสอบด้วยโฟโตดีเทกเตอร์ และ (ข) ค่าการสะท้อนแสงหรือ Line profile ที่อ่านได้จากโฟโตดีเทกเตอร์ สำหรับชุดทดสอบอย่างง่ายตรวจเชื้อไวรัสตับอักเสบบี..... 15
2.6	(ก) เทคนิคการถ่ายภาพชุดทดสอบอย่างง่ายด้วยกล้อง CMOS และ (ข) กราฟค่าการสะท้อนหรือ Line profile สำหรับชุดทดสอบอย่างง่าย..... 16
2.7	(ก) หลักการออกแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบด้วยกล้องโทรทรรศน์แบบพกพา และ (ข) ต้นแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบด้วยกล้องโทรทรรศน์แบบพกพา พร้อมหน้าจอหลักของแอปพลิเคชันที่ใช้ประมวลผลที่กลุ่มของวิจัยพัฒนาขึ้น..... 18
2.8	ค่าการสะท้อนแสงหรือ Line profile ที่อ่านได้แต่ละตำแหน่งบนชุดทดสอบ สำหรับหาปริมาณวิตามินบี 12 (ก) ชุดทดสอบสำหรับตัวอย่างที่ไม่มีวิตามินบี 12 ค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบและแถบควบคุมมีค่าใกล้เคียงกัน และ (ข) ชุดทดสอบสำหรับตัวอย่างที่ความเข้มข้น 369 pmol/L..... 19

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
2.9 (ก) จัดตำแหน่งของแหล่งกำเนิดแสงและ โฟโตดีเท็กเตอร์ทำมุมตั้งฉาก 90° กับชุดทดสอบ และ (ข) จัดตำแหน่งของแหล่งกำเนิดแสงทำมุม ( $\alpha$ ) และตำแหน่ง โฟโตดีเท็กเตอร์ทำมุม ( $\beta$ ) กับชุดทดสอบ.....	20
2.10 (ก) หลักการของ Silver staining enhancement สำหรับวิเคราะห์ชุดทดสอบอย่างง่าย .....	22
2.11 ผลการทดสอบของชุดทดสอบสำหรับตรวจหาเชื้อราฟูโมนิซิน บี1 ภาพทางซ้ายมือ แสดงผลก่อนการทำ Silver staining ส่วนภาพทางขวามือแสดงผลหลังทำ Silver staining ที่ชุดทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ.....	22
2.12 (ก) หลักการของเทคนิคโฟโตเทอร์มัลแบบไม่สัมผัสสำหรับใช้งานกับชุดทดสอบอย่างง่าย และ (ข) ตัวอย่างภาพถ่ายชุดทดสอบเชื้อรา CrAg ภาพบนจากกล้องดิจิทัล และภาพล่างจากกล้องโฟโตเทอร์มัลแบบอินฟราเรดที่ความเข้มข้น.....	24
2.13 ภาพถ่ายแถบสีชุดทดสอบสำหรับตรวจหาโปรตีน NT-proBNP ทั้ง 3 ช่วงความสว่าง จากนั้นทำการรวมภาพทั้ง 3 ช่วงด้วยเทคนิคการรวมภาพที่เรียกว่า HDR .....	25
2.14 กราฟค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงตามเวลา ตั้งแต่ภาพชุดทดสอบยังไม่ปรากฏแถบสี จนกระทั่งเกิดแถบสีบนชุดทดสอบตรวจหาโปรตีน NT-proBNP เส้นสีดำในกราฟ เป็นค่าการสะท้อนแสงของภาพปกติ ส่วนเส้นสีแดงในกราฟเป็นค่าการสะท้อนแสงของภาพ.....	26
3.1 สเปกตรัมการส่องสว่างของแหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสงสีเขียว (เส้นสีเขียว) สอดคล้องกับสเปกตรัมการกระเจิงแสงของอนุภาคนาโนของทองขนาด 40 nm (เส้นสีแดง).....	29
3.2 (ก) การจัดอุปกรณ์ของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบโดยใช้กล้องเว็บแคมเป็น อุปกรณ์รับภาพ (ข) ภาพต้นแบบภาคสนามเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบโดยใช้กล้องเว็บแคม และ (ค) รูปภาพต้นแบบพร้อมด้วยคอมพิวเตอร์ประมวลผล.....	30
3.3 หน้าจอประมวลผลของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ.....	31

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.4 กราฟ Line profile จากชุดทดสอบเปรียบเทียบระหว่างไม่ชดเชยผล เนื่องจากความเข้มแสงกับชดเชยผลเนื่องจากความเข้มแสง.....	32
3.5 (ก) การจัดอุปกรณ์ของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบโดยใช้กล้องโทรทรรศน์แบบพกพา เป็นอุปกรณ์รับภาพ (ข) ต้นแบบภาคสนามของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ และ (ค) หน้าจอแสดงภาพแถบสีชุดทดสอบ.....	34
3.6 (ก) ภาพอ้างอิง (ข) ภาพเมื่อปิดแหล่งกำเนิดแสง และ (ค) กราฟ Line profile ค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่ตำแหน่งแถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ).....	36
3.7 การหาตำแหน่งของแถบทดสอบ และค่า $\Delta I_T$ ที่แถบทดสอบอัตโนมัติ.....	37
3.8 Flow chart การทำงานของโปรแกรมหาตำแหน่งของแถบทดสอบ และค่า $\Delta I_T$ ที่แถบทดสอบอัตโนมัติ.....	38
3.9 การหาตำแหน่งของแถบทดสอบ และค่า $\Delta I_T$ ที่แถบทดสอบอัตโนมัติ สำหรับชุดทดสอบ Multiplex.....	40
3.10 Flow chart การทำงานของโปรแกรมหาตำแหน่งของแถบทดสอบ และค่า $\Delta I_T$ ที่แถบทดสอบอัตโนมัติ.....	41
4.1 (ก) ชุดตรวจสอบโรคผลเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (Aac) (ข) ชุดทดสอบยังไม่ได้ใช้งาน และ (ค) ชุดทดสอบที่มีการใช้งานแล้ว.....	43
4.2 (ก) ชุดตรวจแบบรวดเร็วสำหรับตรวจเชื้อก่อโรคในพืชตระกูลแตง 3 ชนิดได้ ในคราวเดียวกัน และ (ข) ตัวอย่างชุดทดสอบที่มีการใช้งานแล้ว แถบ $T_A$ หมายถึงเชื้อ <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>Citrulli</i> , แถบ $T_p$ หมายถึงเชื้อ Potyvirus, แถบ $T_w$ หมายถึง Watermelon mosaic virus-2 และ แถบ Control line .....	44
4.3 การใช้งานเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้น สำหรับชุดตรวจ โรคผลเน่าแบคทีเรียของพืชตระกูลแตง ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.....	46

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.4 Line profile ของภาพถ่ายแถบสีชุดทดสอบเปรียบเทียบระหว่างภาพที่ตั้งค่า Exposure time แบบ Under exposure กับภาพ Automatic settings ของชุดทดสอบ เชื้อ Aac ที่ความเข้มข้น $1 \times 10^5$ CFU/mL, $5 \times 10^5$ CFU/mL และ $1 \times 10^7$ CFU/mL.....	48
4.5 Line profile จากชุดทดสอบที่สารตัวอย่างมีความเข้มข้นของแบคทีเรีย Aac ต่างกัน (ก) ตัวอย่างจากพืชที่ไม่เป็นโรค (Healthy samples) (ข) ตัวอย่างความเข้มข้น $5 \times 10^5$ CFU/mL และ (ค) ตัวอย่างความเข้มข้น $1 \times 10^7$ CFU/mL.....	50
4.6 ค่าการสะท้อนแสงลดลงเฉลี่ยที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) สำหรับสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย Aac ต่าง ๆ เมื่อใช้แหล่งกำเนิดแสงไดโอดเปล่งแสงสีเขียว ความเข้มข้น 0 CFU/mL ในรูป หมายถึงตัวอย่างจากพืชที่ไม่เป็นโรค (Healthy samples) ข้อมูลแต่ละความเข้มข้นได้จากการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง.....	51
4.7 การเกิดแถบสีชุดทดสอบของเชื้อแบคทีเรีย Aac ที่ความเข้มข้น Healthy, $1 \times 10^5$ , $5 \times 10^5$ , $1 \times 10^6$ , $5 \times 10^6$ และ $1 \times 10^7$ CFU/mL.....	52
4.8 Line profile จากชุดทดสอบที่สารตัวอย่างมีความเข้มข้นของแบคทีเรีย Aac เท่ากับ $1 \times 10^7$ CFU/mL (ก) 1 เฟรม (ข) 20 เฟรม และ (ค) 50 เฟรม.....	56
4.9 (ก) ภาพชุดทดสอบแบคทีเรีย Aac ที่ความเข้มข้น $1 \times 10^6$ CFU/mL แต่ละ Exposure time และ (ข) ค่าการสะท้อนแสงเฉลี่ยที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) แต่ละ Exposure time และที่ความเข้มข้นของแบคทีเรีย Aac ต่าง ๆ.....	58
4.10 (ก) ภาพชุดทดสอบแบคทีเรีย Aac ที่ความเข้มข้น $1 \times 10^6$ CFU/mL แต่ละ Exposure time และ (ข) ค่าการสะท้อนแสงเฉลี่ยที่ลดลงที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) ที่ความเข้มของแบคทีเรียต่าง ๆ แต่ละ Exposure time เมื่อใช้กล้องโทรศัพท์ที่กรณีนี้อยู่รูปแบบ Auto mode ค่า Exposure time จะเท่ากับ 0.03 s.....	60
4.11 ภาพชุดทดสอบที่พิมพ์ขึ้นทำการเทียบเคียงสีให้ใกล้เคียงกับแถบสีของชุดทดสอบ Aac.....	61

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.12 เปรียบเทียบค่าการสะท้อนแสงเฉลี่ยที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) แต่ละ Contrast จากการศึกษาทั้งหมด 5 ครั้ง กับชุดทดสอบที่พิมพ์ขึ้นมา Test0, Test1, Test2, Test3, Test4 และ Test5	63
4.13 เปรียบเทียบค่าการสะท้อนแสงเฉลี่ยที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) แต่ละ Gain จากการศึกษาทั้งหมด 5 ครั้ง กับชุดทดสอบที่พิมพ์ขึ้นมา Test0, Test1, Test2, Test3, Test4 และ Test5	65
4.14 Line profile ของชุดทดสอบแบบ Multiplex สำหรับตัวอย่างที่มีเชื้อ (ก) เชื้อ Aac, Potyvirus และ WMV-2 (ข) เชื้อ Potyvirus และ WMV-2 (ค) เชื้อ Potyvirus (ง) เชื้อ Aac และ (จ) ตัวอย่างของพืชที่ไม่เป็นโรค	67
4.15 เปรียบเทียบ Histogram จากภาพชุดทดสอบของชุดทดสอบ Aac ที่ความเข้มข้น $1 \times 10^6$ CFU/mL (ก) Exposure time เท่ากับ 0.015 s (ข) Exposure time เท่ากับ 0.031 s (ค) Exposure time เท่ากับ 0.062 s (ง) Exposure time เท่ากับ 0.125 s และ (จ) Exposure time เท่ากับ 0.015 s	70
4.16 เปรียบเทียบ Histogram จากภาพชุดทดสอบของชุดทดสอบ Aac ที่ความเข้มข้น $1 \times 10^6$ CFU/mL แต่ละ Exposure time (ก) 0.008 s (ข) 0.0167 s (ค) 0.022 s (ง) 0.097 s และ (จ) 0.03 s (Auto mode)	73
4.17 (ก) การปรับค่า Contrast และ Brightness ของกล้องแบบ S-Curve และ (ข) ความเข้มแสงเอาต์พุตที่ได้จากกราฟ S-Curve ในกรณีที Exposure time ต่ำ ๆ ความชันบริเวณดังกล่าวมีค่าสูง ส่งผลให้การขยายสัญญาณในช่วงนี้สูง ส่วนที่ Exposure time ค่าสูงความชันบริเวณนั้นมีค่าน้อยทำให้การขยายสัญญาณต่ำ	74



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ชุดทดสอบอย่างง่ายแบบแอลเอฟเอ (Lateral flow immunochromatographic assays, LFA) ได้รับความสนใจพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำหรับสารชีวภาพหลากหลายชนิด (Mansfield et al. 2009; Posthuma et al. 2009) ยกตัวอย่างเช่น ชุดทดสอบอย่างง่ายที่ใช้ในทางการแพทย์สำหรับตรวจสอหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Peng et al. 2007) เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ท้องร่วง (Geginat et al. 2012) หรือใช้ทางด้านอาหารสำหรับตรวจสอบเชื้อราในธัญพืช (Venkataramana et al. 2014; Xiulan et al. 2006) ตรวจสอบสารเคมีปนเปื้อนในเนื้อ (Tang et al. 2011) หรือใช้ในทางเกษตรกรรมสำหรับตรวจหาสารเคมีกำจัดแมลงในพืช (Abe et al. 2009; Hua et al. 2010) เป็นต้น

ในประเทศไทยเองได้มีการวิจัยและพัฒนาชุดทดสอบแอลเอฟเอเป็นจำนวนมาก สำหรับเป็นชุดทดสอบทางการแพทย์ตรวจหาเชื้อมาลาเรีย (Coleman et al. 2002) เชื้อไข้เลือดออก (Wathanaworawit et al. 2011) ชุดทดสอบสารเร่งเนื้อแดงในเนื้อสัตว์ (Khamta et al. 2009) ชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรียในกุ้ง (Sithigorngul et al. 2007) และชุดทดสอบตรวจหาเชื้อแบคทีเรียของพืชตระกูลแตง (Himananto et al. 2011) เป็นต้น การแปลผลชุดทดสอบจะใช้การอ่านแถบสีด้วยตาเปล่าซึ่งมักจะขึ้นอยู่กับแต่ละบุคคลและสภาพแวดล้อม วิธีการอ่านแถบสีด้วยตาเปล่าจะมีปัญหามากขึ้นที่ตัวอย่างมีความเข้มข้นต่ำ ส่งผลให้แถบทดสอบมีสีจาง จนบางครั้งไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างสีได้ นอกจากนี้ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ บางตัวอย่างจะมีสีอื่นปน เช่น ตัวอย่างที่สกัดจากใบพืชมักจะมีสีเขียว ทำให้ชุดทดสอบมีพื้นสีเขียวตามไปด้วย ส่งผลให้การอ่านแถบสีทำได้ลำบากขึ้น

การใช้งานชุดทดสอบอย่างง่ายแอลเอฟเอขั้นแรกจะหยดสารตัวอย่างลงใน Sample pad เป็นบริเวณที่หยดตัวอย่างของชุดทดสอบ จากนั้นสารตัวอย่างจะแพร่ผ่าน Conjugate pad แถบควบคุม และแถบทดสอบ ตามลำดับ จนมาสิ้นสุดที่ Absorbing pad ซึ่งจะทำหน้าที่ดูดซับสารตัวอย่างไว้ ในส่วนของ Conjugate pad จะประกอบไปด้วยอนุภาคนาโนของทอง (Gold nanoparticles) ที่ติดผิวไว้ด้วยแอนติบอดีที่เหมาะสม (ซึ่งเป็นคนละชนิดกับแอนติบอดีที่แถบควบคุมและแถบทดสอบ) เมื่อหยดสารตัวอย่างที่มีแอนติเจน (Antigen) หรือสารที่เราต้องการทดสอบ แอนติเจนจะจับกับแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทอง

เมื่อสารตัวอย่างรวมทั้งแอนติเจน ที่จับกับแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทอง แพร่ผ่านแถบทดสอบ (Test line) แอนติเจนดังกล่าวจะถูกจับไว้ด้วยแอนติบอดีที่ตรึงไว้ที่แถบดังกล่าว ส่วนแอนติบอดีที่ติดผิวไว้ด้วยอนุภาคนาโนของทองที่เหลือ จะแพร่ผ่านมาจับกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้ที่แถบควบคุม (Control line) การเกิดแถบสีที่แถบควบคุม และแถบทดสอบบนชุดทดสอบแบบแอลอเฟอ เกิดจากคุณสมบัติเชิงแสงของอนุภาคนาโนของทอง ซึ่งอนุภาคนดังกล่าวจะดูดกลืนแสงและกระเจิงแสงในแต่ละความยาวคลื่นไม่เท่ากัน ส่วนความเข้มของแถบสีนั้นขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของอนุภาคนาโนของทอง ที่ถูกยึดจับไว้ที่บริเวณของแถบสีทั้งสอง การระบุการเกิดแถบสีที่เกิดบนแถบทดสอบด้วยตาเปล่า นั้น จะขึ้นกับการตัดสินใจของผู้ทดสอบ สภาพแสงขณะอ่านชุดทดสอบ และความสามารถในการมองเห็นของผู้ทดสอบ ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้ด้วยการใช้เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบแทนการแปลผลด้วยตาเปล่า นอกจากนี้การพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น อาจช่วยให้สามารถตรวจวัดสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำได้ดีกว่าการระบุแถบสีด้วยตาเปล่า

ผู้ใช้งานชุดทดสอบส่วนใหญ่ ต้องการเครื่องมือในการอ่านแถบสีเพื่อช่วยแปลผลโดยอัตโนมัติ นอกจากนั้นผู้ผลิตชุดทดสอบอย่างง่ายในต่างประเทศหลายบริษัทได้ผลิตเครื่องอ่านแถบสีใช้งานควบคู่ไปกับการแปลผลด้วยตาเปล่า เช่น LRE cPoC Reader ของบริษัท DNC Diagnostics (<http://www.dcn dx.com>) หรือ BD Veritor™ System ของบริษัท Becton, Dickinson and Company (<http://www.bd.com>) และ Mobile Diagnostic Reader ของบริษัท Mobile Assay เป็นต้น เมื่อชุดทดสอบอย่างง่ายได้รับความนิยมจากผู้ใช้งานสูงขึ้น การพัฒนาเครื่องมือสำหรับแปลผลอัตโนมัติจึงได้รับความสนใจมากขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามเครื่องอ่านเหล่านี้มีราคาสูง และมีข้อจำกัดในการปรับใช้

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีทดสอบ (Lateral flow immunoassays readers) แทนการอ่านแถบสีด้วยตาเปล่า เพื่อให้สามารถวัดความเข้มข้นได้ต่ำลง การแปลผลไม่ขึ้นกับผู้ใช้งาน และเพิ่มความมั่นใจให้กับผู้ใช้ เทคนิคที่ใช้ในเครื่องอ่านแถบสีทดสอบ แยกได้ 2 กลุ่ม (Mansfield et al. 2009) กลุ่มแรก (Kaylor et al. 2013; S. Kim et al. 2004) ใช้การวัดความเข้มแสงจากแถบทดสอบด้วยโฟโตดีเทกเตอร์ โดยจะสแกนไปตามแนวยาวของชุดทดสอบ ใช้สแตปมอเตอร์ในการเลื่อนตำแหน่งของอุปกรณ์ มีแหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสง ทำการวัดค่าการสะท้อนแสงบนชุดทดสอบ ประมวลผลและบันทึกผลด้วยซอฟต์แวร์ การวัดด้วยวิธีนี้จะมีความละเอียดสูง แต่วิธีนี้ยังไม่สามารถตรวจวัดสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำได้ดีกว่าการระบุแถบสีด้วยตาเปล่า และเป็นระบบที่มีความซับซ้อนมาก

กลุ่มที่สอง (Gollier et al. 2009; Gui et al. 2014; Yeh et al. 2014) ใช้กล้องซีซีดี (Charge-coupled device, CCD) หรือซีมอส (Complementary Metal-Oxide Semiconductor, CMOS) อ่านภาพแถบทดสอบและคำนวณหาความเข้มแสงจากแต่ละแถบสี เนื่องจากกล้องสามารถถ่ายภาพแถบทดสอบได้โดยไม่ต้องเลื่อนตำแหน่ง วิธีการนี้จึงได้รับความนิยมมากขึ้น แต่ไม่เหมาะกับการใช้งานที่มีความไวสูง เพราะฉะนั้นวิธีนี้จำเป็นต้องมีอุปกรณ์เพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงความไวของเครื่องอ่าน โดยใช้แหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสง และโฟโตดีเทกเตอร์วัดความเข้มแสง กำหนดมุมตกกระทบของแสงเพื่อลดการกระจายแสงจากในโทรเซลลูโลสเมมเบรนบนชุดทดสอบ หรือมีเทคนิคประมวลผลภาพที่มีความไวและความแม่นยำสูง แต่ราคาของเครื่องอ่านก็สูงเช่นกัน

กลุ่มที่สาม (Jakoby et al. 2010; Jung et al. 2015; S. C. Kim et al. 2017; Lee et al. 2016; Preechaburana et al. 2014; Scherr et al. 2016; Yetisen et al. 2014; You et al. 2013) ใช้โทรศัพท์แบบพกพานำมาประยุกต์ทำเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบกันอย่างแพร่หลาย เพื่อให้ได้เครื่องอ่านที่มีราคาถูกลง วิธีการนี้จะเหมือนกับวิธีที่กล่าวมาก่อนหน้า โดยจะใช้กล้องที่ติดมากับโทรศัพท์เป็นตัวรับภาพชุดทดสอบ ใช้ไดโอดเปล่งแสงเป็นแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งออกแบบซอฟต์แวร์ให้สามารถหักการสะท้อนแสงแต่ละตำแหน่งบนชุดทดสอบแล้วแปลผลไปเป็นความเข้มขั้นของสารตัวอย่าง ในชุดทดสอบนั้น ทำงานผ่านแอปพลิเคชัน Android และ iOS อย่างไรก็ตามยังไม่พบข้อมูลที่ระบุอย่างชัดเจนว่า มีการปรับพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของกล้องรับภาพชุดทดสอบเพื่อเพิ่มความไวของเครื่องอ่านแถบสีให้สามารถตรวจวัดความเข้มขั้นต่ำดีกว่าการระบุแถบสีด้วยตาเปล่าได้ ซึ่งเครื่องอ่านแถบสีที่จำหน่ายเชิงพาณิชย์จำนวนมากพัฒนาโดยใช้เทคนิคที่กล่าวมาข้างต้น ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่ายที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

รุ่นผลิตภัณฑ์และบริษัทผู้ผลิต	เทคนิคการอ่านแถบสีชุดทดสอบ	คุณสมบัติทางเทคนิค
ESEQuant Lateral Flow Reader/QIAGEN ( <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a> , Germany)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ใช้ระบบเชิงแสงแบบ Confocal 2 channel</li> <li>• ใช้ LED และ Photodiode อ่านค่าความเข้มแสงบนชุดทดสอบ</li> <li>• ใช้ Fluorescent photodiode วัดการเรืองแสงของชุดทดสอบ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• อ่านได้ 10 แถบสีสำหรับชุดทดสอบตรวจวัดหลายเชื้อพร้อมกัน</li> <li>• มีซอฟต์แวร์ประมวลผลและจัดเก็บข้อมูล ส่งทางอีเมล ตำแหน่ง GPS เป็นต้น</li> </ul>
LRE cPOC Lateral Flow Test Strip Reader/LRE medical ( <a href="http://www.esterline.com">http://www.esterline.com</a> , Germany)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ใช้ LED และกล้อง CMOS รับภาพ วัดค่าการสะท้อนแสง</li> <li>• วัดการเรืองแสง Fluorescent หรือ Chemiluminescence ของชุดทดสอบ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• อ่านได้ครั้งละหลายชุดทดสอบพร้อมกัน และอ่านได้หลายแถบสีในชุดทดสอบเดียวกัน</li> <li>• มี Barcode สำหรับระบุชนิดของชุดทดสอบ</li> </ul>
SkanSmart, SkanMulti/SCANNEX BioAssay Reader Systems ( <a href="http://www.skannex.com">http://www.skannex.com</a> , Norway)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ใช้ LED เป็นแหล่งกำเนิดแสง และกล้องรับภาพในการวัดค่าการสะท้อนแสง</li> <li>• ทำการสแกนภาพชุดทดสอบในการอ่านค่าแถบสี</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• มีทั้งรุ่นสำหรับอ่านครั้งละชุดทดสอบและอ่านพร้อมกันที่หลายชุดทดสอบ</li> <li>• มี Barcode สำหรับระบุชนิดของชุดทดสอบ</li> <li>• มี Wi-Fi ส่งข้อมูลทางอีเมลได้</li> </ul>

ตารางที่ 1.1 เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่ายที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ (ต่อ)

<p>aQzen™ RDT-G v1/ MEDISENSOR (<a href="http://medisensor.com">http://medisensor.com</a>, Korea)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ใช้ LED เป็นแหล่งกำเนิดแสง และกล้อง CMOS ถ่ายภาพ วัดค่าการสะท้อนแสงของชุดทดสอบ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• อ่านได้หลายแถบสีสำหรับชุดทดสอบตรวจวัดหลายเชื้อพร้อมกัน</li> <li>• มีซอฟต์แวร์ประมวลผลและจัดเก็บข้อมูล</li> </ul>
<p>TSR-100 Test Strip Reader/ Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd. (<a href="http://www.allsheng.com">http://www.allsheng.com</a>, China)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ใช้ LED เป็นแหล่งกำเนิดแสง และใช้ Photodiode วัดค่าการสะท้อนแสง สแกนแต่ละตำแหน่งบนชุดทดสอบ เพื่ออ่านค่า Line profile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• อ่านได้ 5 แถบสีสำหรับชุดทดสอบตรวจวัดหลายเชื้อพร้อมกัน</li> <li>• มีซอฟต์แวร์ประมวลผลและจัดเก็บข้อมูล</li> </ul>
<p>Axxin AX-2X/ Axxin (<a href="http://www.axxin.com">http://www.axxin.com</a>, USA)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ใช้ LED เป็นแหล่งกำเนิดแสง และกล้องรับภาพอ่านค่าแถบสีชุดทดสอบ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• อ่านได้ 5 แถบสีสำหรับชุดทดสอบตรวจวัดหลายเชื้อพร้อมกัน</li> <li>• มีซอฟต์แวร์ประมวลผลและจัดเก็บข้อมูล</li> <li>• สามารถอ่านค่าการสะท้อนแสงระหว่างการหยดตัวอย่างแบบ Real time ได้</li> </ul>
<p>RDS-1500 PRO/ Detekt Biomedical (<a href="http://idetekt.com">http://idetekt.com</a>, USA)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ใช้ LED เป็นแหล่งกำเนิดแสง และกล้องรับภาพอ่านค่าแถบสีชุดทดสอบ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• มี Barcode สำหรับระบุชนิดของชุดทดสอบ</li> <li>• มีซอฟต์แวร์ประมวลผลและจัดเก็บข้อมูล</li> </ul>

ตารางที่ 1.1 เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่ายที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ (ต่อ)

<p>opTrilyzer®Med/opTricon (<a href="http://www.optricon.de">http://www.optricon.de</a>, Germany)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ใช้ LED เป็นแหล่งกำเนิดแสง และกล้องรับภาพอ่านค่าแถบสีชุดทดสอบ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• อ่านได้หลายแถบสีสำหรับชุดทดสอบตรวจวัดหลายเชื้อพร้อมกัน</li> <li>• มีซอฟต์แวร์ประมวลผลและจัดเก็บข้อมูล</li> </ul>
<p>Dipstick Reader/Abcam (<a href="http://www.abcam.com">http://www.abcam.com</a>, USA)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ใช้ LED เป็นแหล่งกำเนิดแสง และใช้ Photodiode วัดค่าการสะท้อนแสง</li> <li>• ใช้มอเตอร์เลื่อนตำแหน่งชุดทดสอบ เพื่ออ่านค่า Line profile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• อ่านได้หลายแถบสีสำหรับชุดทดสอบตรวจวัดหลายเชื้อพร้อมกัน</li> <li>• มีซอฟต์แวร์ประมวลผลและจัดเก็บข้อมูล</li> </ul>
<p>AgraVision/Romer Labs (<a href="https://www.romerlabs.com">https://www.romerlabs.com</a>, Austria)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ใช้ LED เป็นแหล่งกำเนิดแสง และกล้องรับภาพอ่านค่าแถบสีชุดทดสอบ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• สามารถอ่านพร้อมกันที่ละหลายชุดทดสอบ</li> <li>• มี Barcode สำหรับระบุชนิดของชุดทดสอบ</li> <li>• มีซอฟต์แวร์ประมวลผลและจัดเก็บข้อมูล</li> </ul>

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีที่ให้ค่า Detection limit ดีกว่าการดูด้วยตา ซึ่งออกแบบให้สามารถใช้งานกับชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในประเทศได้ การศึกษาแนวทางเบื้องต้นการออกแบบเครื่องอ่านแถบสีทดสอบ ในเบื้องต้นผู้วิจัยเลือกใช้กล้องเว็บแคมในการบันทึกภาพแถบสี เนื่องจากมีราคาไม่แพง และใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็นไดโอดเปล่งแสง เครื่องมือดังกล่าวจะเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ผ่านพอร์ต USB เพื่อประมวลผลและแสดงผล เครื่องมือในรูปแบบนี้ ผู้ใช้ต้องใช้งานร่วมกับคอมพิวเตอร์ทำให้สะดวกและรวดเร็ว ทั้งนี้เครื่องมือวัดดังกล่าวยังสามารถศึกษาผลกระทบจากการปรับค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ บนกล้องได้ เช่น Contrast,

Exposure time หรือ Gain เป็นต้น เนื่องจากยังไม่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้าถึงการปรับค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวว่าส่งผลต่อการวัดความเข้มแสงหรือไม่ ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาเครื่องอ่านโดยใช้โทรศัพท์แบบพกพาเป็นตัวบันทึกภาพแถบสีชุดทดสอบ โดยใช้เทคนิคเหมือนที่กล่าวมาข้างต้นประมวลผลภาพ ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่า เทคนิค Line profile เมื่อใช้งานกับชุดทดสอบอย่างง่ายที่จำเพาะต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) ชุดทดสอบดังกล่าวพัฒนาโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สามารถใช้อ่านค่าความเข้มแสงของแถบสีได้ง่ายและสะดวก ผู้วิจัยคาดหมายว่าเทคนิคดังกล่าวมาแล้ว จะทำให้สามารถเพิ่มความไวของเครื่องอ่านแถบสีให้สามารถอ่านค่าความเข้มขั้นที่ต่ำกว่าการดูด้วยตาเปล่า

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 พัฒนาเครื่องอ่านแถบสีสำหรับชุดทดสอบแบบพกพา ที่มีความไวสูงและสามารถใช้งานกับชุดทดสอบที่มีการพัฒนาขึ้นใช้งานเองในประเทศ
- 1.2.2 เพื่อศึกษาผลกระทบพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการรับภาพของกล้อง ว่าส่งผลต่อการตรวจวัดความเข้มขั้นของสารตัวอย่างหรือไม่

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การพัฒนาต้นแบบภาคสนามของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ จะใช้กล้อง CMOS เป็นอุปกรณ์ในการรับภาพ (Logitech HD C525 และ iPhone 5S) ซึ่งกล้องดังกล่าวผู้ใช้สามารถตั้งค่าพารามิเตอร์เองได้ รวมทั้งมีราคาถูก เหมาะสำหรับการพัฒนาเป็นเครื่องมือวัด การเปรียบเทียบความสามารถของเครื่องอ่านที่พัฒนาขึ้น ว่ามีประสิทธิภาพการใช้งานสูงกว่าการดูด้วยตาเปล่าหรือไม่นั้น จะใช้ชุดทดสอบแบบแอลเอฟเอที่มีใช้งานในประเทศเป็นตัวอย่างในการทดสอบ และใช้ Detection limit เป็นพารามิเตอร์หลักในการเปรียบเทียบ ใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็นไดโอดเปล่งแสงทำการเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผลและแสดงผล

## 1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้เครื่องอ่านแถบสีสำหรับชุดทดสอบที่มีความไวสูง สามารถผลิตใช้งานจริงได้ สามารถนำไปปรับใช้กับชุดทดสอบทางชีวภาพที่พัฒนาขึ้นเองในประเทศได้ ซึ่งจะช่วยให้อ่านค่าได้แม่นยำขึ้น และเพิ่มความน่าเชื่อถือให้กับชุดทดสอบ

## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

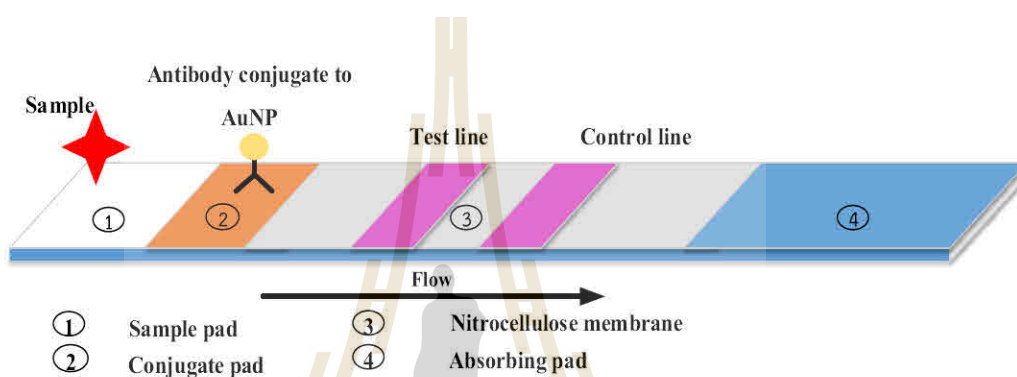
#### 2.1 ชุดทดสอบอย่างง่ายแบบ Lateral flow immunochromatographic assays

ชุดทดสอบอย่างง่ายแบบแอลเอฟเอ (Lateral flow immunochromatographic assays, LFA) ใช้หลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane) ชุดทดสอบดังกล่าวจะแสดงผลในรูปแบบเส้นหรือจุดที่ถูกเคลือบไว้อย่างน้อยสองเส้นหรือสองจุด โครงสร้างของชุดทดสอบอย่างง่ายแบบแอลเอฟเอ แสดงดังรูปที่ 2.1 ประกอบไปด้วย ส่วนแรกคือ Sample pad เป็นส่วนที่ใช้ในการหยดสารตัวอย่าง ส่วนที่สอง คือ Conjugate pad เป็นบริเวณที่บรรจุแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับแอนติเจนของตัวอย่างติดผิวด้วยอนุภาคที่ทำให้เกิดสี ซึ่งเป็นคนละชนิดกับแอนติบอดีที่แถบควบคุมและแถบทดสอบ ตัวอย่างอนุภาคที่ทำให้เกิดสี เช่น Gold nanoparticles, Latex particles หรือ Fluorescent particles (Koczula et al. 2016) ส่วนใหญ่จะนิยมใช้อนุภาคนาโนของทอง เพราะไม่จำเป็นต้องใช้กระบวนการทำให้เกิดสี มีความเสถียร และสามารถกระเจิงแสงได้ดี ทำให้มองเห็นเป็นเส้นสีทึบขนาดอนุภาคนาโนของทองที่ใช้ประมาณ 40 nm ส่วนที่สาม คือไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนเป็นพื้นที่แสดงตำแหน่งแถบควบคุมและตำแหน่งแถบทดสอบ โดยจะตรึงแอนติบอดีหรือแอนติเจนไว้ที่แถบดังกล่าว และส่วนสุดท้าย คือ Absorbing pad ซึ่งจะทำหน้าที่ดูดซับสารตัวอย่างให้การไหลผ่านไปยังส่วนต่าง ๆ

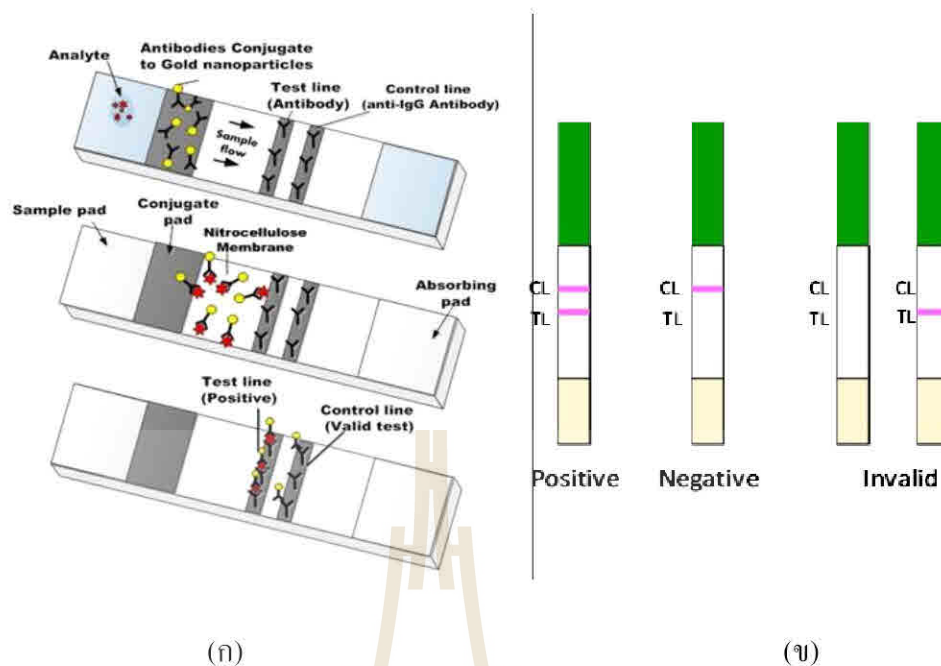
การใช้งานชุดทดสอบอย่างง่ายแบบแอลเอฟเอ แสดงดังรูปที่ 2.2 เมื่อหยดสารตัวอย่างที่มีแอนติเจน (Antigen) หรือสิ่งที่เราต้องการทดสอบ ลงไปใน Sample pad ของชุดทดสอบ จากนั้นแอนติเจนของตัวอย่างจะแพร่ผ่าน Conjugate pad แอนติเจนจะจับกับแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทอง เมื่อสารตัวอย่างรวมทั้งแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทอง แพร่ผ่านแถบทดสอบ แอนติเจนดังกล่าวจะถูกจับไว้ด้วยแอนติบอดีที่ตรึงไว้ที่แถบล่างกล่าว ส่งผลให้อนุภาคนาโนของทองถูกจับไว้ที่แถบทดสอบด้วย อนุภาคนาโนของทองนี้สามารถการกระเจิงแสงได้ดี ทำให้มองเห็นเป็นเส้นสี ความเข้มของแถบสีจะขึ้นกับความเข้มข้นของแอนติเจนในสารตัวอย่าง ส่วนแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทองบน Conjugate pad แพร่ผ่านแถบควบคุมจับกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้ที่แถบล่างกล่าว เกิดเป็นเส้นสีทึบ ซึ่งแถบ



ควบคุมต้องเกิดแถบสีทุกครั้งเพื่อตรวจสอบว่ามีการแพร่ของสารตัวอย่าง จนมาสิ้นสุดที่ Absorbing pad ซึ่งจะทำหน้าที่ดูดซับสารตัวอย่างไว้ การแปลผลชุดทดสอบ แสดงดังรูปที่ 2.2 (ข) จะแบ่งเป็น 3 กรณี กรณีแรกเกิดแถบสีทั้ง 2 แถบ จะแปลผลเป็นพบแอนติเจนหรือสารที่ต้องการทดสอบ กรณีที่สองเกิดแถบสีที่แถบควบคุมเพียงแถบเดียว แปลผลเป็น ไม่พบแอนติเจนหรือสารที่ต้องการทดสอบ และในกรณีที่ไม่มีเกิดแถบสีเลยหรือเกิดเพียงแถบสีเดียวที่แถบทดสอบจะแปลผลเป็นชุดทดสอบเสียหาย ต้องทำการทดสอบด้วยชุดทดสอบใหม่อีกครั้ง



**รูปที่ 2.1** โครงสร้างของ Lateral flow immunochematographic assays ประกอบด้วย Sample pad เป็นบริเวณหยดแอนติเจนของสารตัวอย่าง Conjugate pad ประกอบด้วยอนุภาคนาโนของทองคำติดผิวไว้ด้วยแอนติบอดีที่เหมาะสม Nitrocellulose membrane เป็นบริเวณที่แสดงแถบทดสอบและแถบควบคุม และ Absorbing pad ทำหน้าที่ดูดซับสารตัวอย่างให้การไหลผ่านไปยังส่วนต่างๆ



**รูปที่ 2.2** (ก) การไหลของสารตัวอย่างสำหรับชุดทดสอบอย่างง่ายแบบ Lateral flow immunochromatographic assays (LFA) การเกิดสีที่แถบควบคุม (Control line) และแถบทดสอบ (Test line) เกิดจากอนุภาคนาโนของทองที่ติดผิวด้วยแอนติบอดี ถูกจับไว้ที่แถบควบคุมและแถบทดสอบ และ (ข) การแปลผลชุดทดสอบ ถ้าเกิดแถบสีทั้ง 2 แถบ แปลผลเป็นมีสารที่ต้องการทดสอบ ถ้าเกิดแถบสีที่แถบควบคุมเพียงแถบเดียว แปลผลเป็นไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ ถ้าไม่เกิดแถบสีเลยหรือเกิดเพียงแถบสีเดียวที่แถบทดสอบจะแปลผลเป็นชุดทดสอบเสียหาย

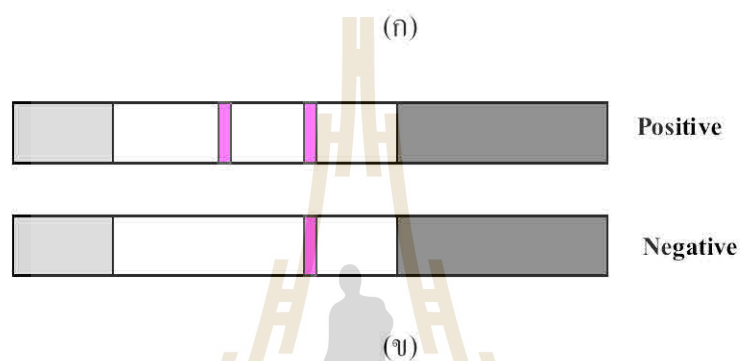
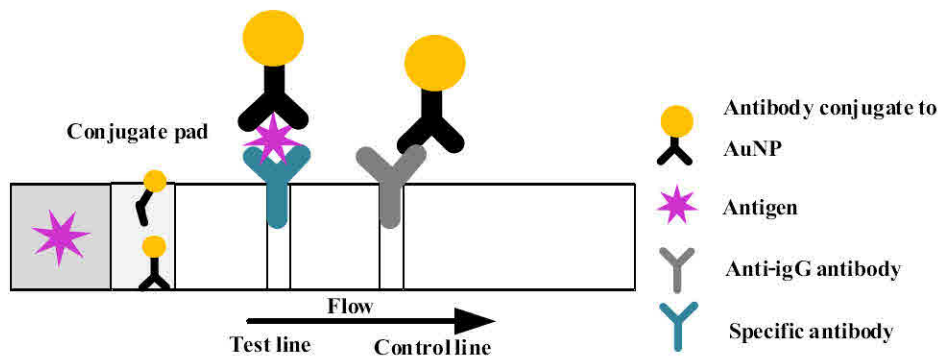
## 2.2 รูปแบบชุดทดสอบสำหรับการตรวจวัดสารทางชีวภาพ

รูปแบบของชุดทดสอบอย่างง่ายแบบ Lateral flow immunochromatographic assays หรือ LFA แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ (Mansfield et al. 2009) ได้แก่ รูปแบบ Direct assays หรือ Sandwich assays และรูปแบบ Competitive assays

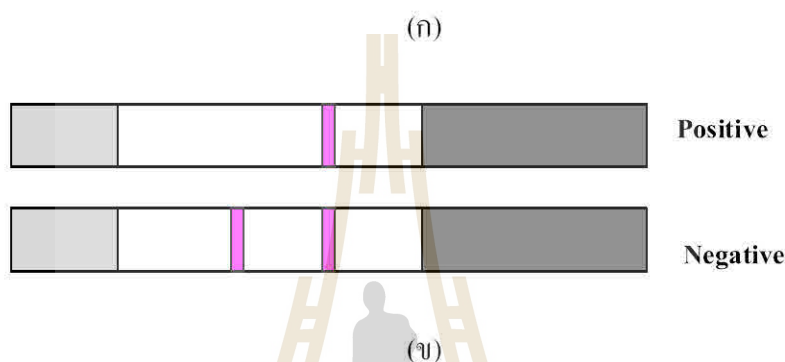
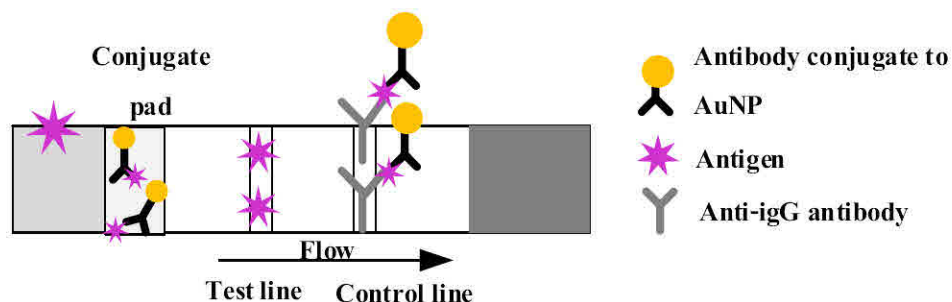
รูปแบบ Sandwich assays (Bahadir et al. 2016) เป็นรูปแบบที่นิยมใช้กับงานโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสมีแอนติบอดีที่ตรึงแอนติบอดีที่จับกับแอนติบอดีติดบนผิวด้วยอนุภาคนาโนของทอง (Anti-IgG antibody) และแถบทดสอบจะตรึงแอนติบอดีจำเพาะ (Specific antibody) ต่อแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโน

โนของทอง ปฏิกริยาการไหลของตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 2.3 (ก) เมื่อหยดสารตัวอย่างที่มีแอนติเจนที่ต้องการทดสอบลงบน Sample pad ของชุดทดสอบ จากนั้นสารตัวอย่างจะแพร่ผ่าน Conjugate pad แอนติเจนจะจับกับแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทอง เมื่อสารตัวอย่างรวมทั้งแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทอง แพร่ผ่านไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนแอนติเจนดังกล่าวจะถูกจับไว้ด้วยแอนติบอดีที่ตรึงไว้ที่แถบทดสอบมีรูปร่างการจับเหมือนแซนดวิช ความเข้มของแถบสีที่บริเวณแถบทดสอบจะขึ้นกับความเข้มข้นของแอนติเจนในสารตัวอย่าง ส่วนแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทองที่เหลือที่ไม่จับกับแอนติเจนจะแพร่มาจับกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้ที่แถบควบคุม ทำให้เห็นเป็นเส้นที่แถบดังกล่าว เพื่อเป็นการตรวจสอบว่ามีสารตัวอย่างแพร่ผ่านมาหรือไม่ การแปลผลว่ามีเชื้อตัวอย่างที่ทำการทดสอบนั้นให้ดูจากแถบสีที่ปรากฏบนแถบทดสอบ (รูป 2.3 (ข))

รูปแบบ Competitive assays (Sajid et al. 2015) เป็นรูปแบบที่นิยมใช้งานกับโมเลกุลขนาดเล็ก โดยรูปแบบนี้จะตรึงแอนติเจนของสารตัวอย่างไว้ที่แถบทดสอบ เพื่อป้องกันไม่ให้แอนติเจนของตัวอย่างจับกับแอนติบอดีได้สองตัวพร้อมกัน และตรึงแอนติบอดีที่จับกับแอนติบอดีติดบนผิวด้วยอนุภาคนาโนของทอง (Anti-IgG antibody) ที่แถบควบคุม ปฏิกริยาการไหลของตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 2.4 (ก) เมื่อหยดสารตัวอย่างที่มีแอนติเจนที่ต้องการทดสอบลงบน Sample pad ของชุดทดสอบ จากนั้นสารตัวอย่างจะแพร่ผ่าน Conjugate pad แอนติเจนของตัวอย่างจะจับกับแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทอง เมื่อแอนติบอดีดังกล่าวจับกับแอนติเจนแล้ว จะไม่สามารถจับกับแอนติเจนที่ตรึงไว้ที่แถบทดสอบได้อีก ดังนั้นถ้ามีแอนติเจนอยู่จำนวนมากในสารตัวอย่าง แอนติบอดีที่ Conjugate pad จะจับกับแอนติเจนในตัวอย่าง จนไม่เหลือแอนติบอดีที่สามารถจับแอนติบอดีที่ตรึงไว้ที่แถบทดสอบได้ ทำให้ไม่เกิดสีที่แถบทดสอบ อย่างไรก็ตามแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีแล้ว ยังสามารถจับกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้ที่แถบควบคุมได้อีก ทำให้เกิดสีขึ้นที่ตำแหน่งนี้ ในกรณีที่ไม่มีแอนติเจนในสารตัวอย่าง แอนติบอดีที่ Conjugate pad จะสามารถจับกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้ที่แถบทดสอบได้ ทำให้เกิดแถบสีขึ้น การแปลผลจะตรงข้ามกับรูปแบบที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ ดังนั้นการแปลผลว่ามีเชื้อตัวอย่างต้องไม่เกิดสีที่แถบทดสอบ (ดังรูป 2.4 (ข))



**รูปที่ 2.3** (ก) การไหลของสารตัวอย่างสำหรับชุดทดสอบอย่างง่ายแบบ Sandwich assays เมื่อแอนติเจนของสารตัวอย่างแพร่ผ่าน Conjugate pad ไปจับกับแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทอง แพร่ผ่านแถบทดสอบมาจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ตรึงบนแถบดังกล่าว จากนั้นแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทองที่เหลือจะแพร่มาจับกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้ที่แถบควบคุม และ (ข) การแปลผลชุดทดสอบ เกิดแถบสีทั้ง 2 แถบ หมายถึงมีเชื้อที่ทำการทดสอบ แต่ถ้าเกิดแถบสีเดียวที่แถบควบคุม หมายถึงไม่มีเชื้อที่ทำการทดสอบ



**รูปที่ 2.4** การไหลของสารตัวอย่างสำหรับชุดทดสอบอย่างง่ายแบบ Competitive assays โดยตรง แอนติเจนของตัวอย่างที่บนแถบทดสอบ และตรงแอนติบอดีที่จับกับแอนติบอดีติดบนผิวด้วยอนุภาคนาโนของทอง (Anti-IgG antibody) ที่แถบควบคุม เมื่อตัวอย่างที่มีแอนติเจนแพร่ผ่าน Conjugate pad แอนติเจนจะจับกับแอนติบอดีจำเพาะที่ติดผิวด้วยอนุภาคนาโนของทอง แพร่ผ่านมาจับกับแอนติบอดีที่แถบควบคุมโดยไม่จับกับแอนติเจนที่ตรงไว้ที่แถบทดสอบ และ (ข) การแปลผลชุดทดสอบ เกิดแถบสีที่แถบควบคุม หมายถึงมีเชื้อที่ทำการทดสอบ แต่ถ้าเกิดแถบสีทั้ง 2 แถบ หมายถึงไม่มีเชื้อที่ทำการทดสอบ

### 2.3 เทคนิคที่ใช้สำหรับเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่าย

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีทดสอบ (Lateral flow immunoassays readers) แทนการอ่านแถบสีด้วยตาเปล่า เพื่อให้สามารถวัดความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ การแปลผลไม่ขึ้นกับผู้ใช้ และเพิ่มความมั่นใจให้กับผู้ใช้ เทคนิคที่ใช้ในเครื่องอ่านแถบสี แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (Mansfield et al. 2009) กลุ่มแรกใช้เทคนิคการวัดความเข้มแสงจากแถบทดสอบด้วยโฟโตดีเท็กเตอร์ และกลุ่มที่

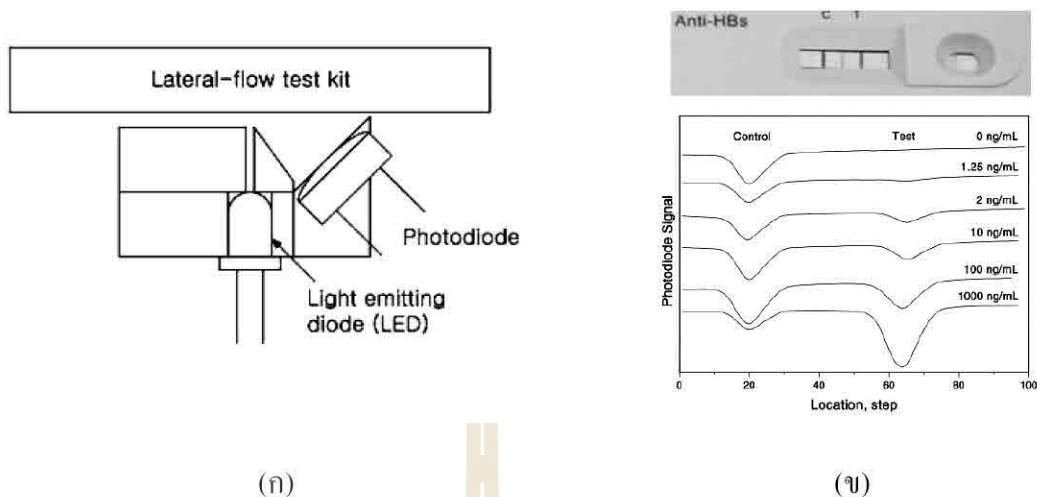
สองใช้กล้องซีซีดี (Charge-coupled device, CCD) หรือ ซีโมส (Complementary Metal-Oxide Semiconductor, CMOS) อ่านภาพแถบชุดทดสอบและคำนวณหาความเข้มแสงจากแต่ละแถบสี เมื่อเทคนิคดังกล่าวได้รับความนิยม ได้มีการประยุกต์ใช้กล้องโทรทรรศน์แบบพกพาถ่ายภาพชุดทดสอบ แถบสี CCD หรือ กล้อง CMOS ทำให้ผู้อ่านไม่ต้องซื้อเครื่องอ่านแถบสีเพิ่มเติม

### 2.3.1 เทคนิคการวัดความเข้มแสงจากชุดทดสอบด้วยโฟโตดีเทกเตอร์

เทคนิคการวัดความเข้มแสงจากชุดทดสอบด้วยโฟโตดีเทกเตอร์ (Kaylor et al. 2013; Kim et al. 2004; Shao et al. 2017; Yang et al. 2015) โดยสแกนไปตามแนวยาวของชุดทดสอบ จะใช้สเต็ปมอเตอร์ในการเลื่อนตำแหน่งของอุปกรณ์และไดโอดเปล่งแสงเป็นแหล่งกำเนิดแสง จากนั้นทำการวัดค่าการสะท้อนแสงแต่ละตำแหน่งบนชุดทดสอบ แล้วนำไปประมวลผลและบันทึกผลด้วยซอฟต์แวร์ การวัดด้วยเทคนิคนี้จะได้ความละเอียดสูง

ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Kim และคณะ (2004) พัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบโดยใช้เทคนิคการวัดความเข้มแสงจากชุดทดสอบด้วยโฟโตดีเทกเตอร์ แสดงดังรูปที่ 2.5 (ก) ประกอบไปด้วย แหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสงสีเขียว จากนั้นใช้โฟโตดีเทกเตอร์วัดค่าการสะท้อนแสงบนชุดทดสอบอย่างง่าย ออกแบบอะลูมิเนียมที่พอดีกับขนาดของแหล่งกำเนิดแสง พร้อมทั้งกำหนดมุมโฟโตดีเทกเตอร์ เพื่อหลีกเลี่ยงการรับค่าสะท้อนแสงโดยตรงจากพื้นขาวบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน สำหรับงานวิจัยนี้ประยุกต์ใช้กลไกการเคลื่อนที่ของสเต็ปมอเตอร์จากเครื่องเล่น CD-ROM เลื่อนชุดทดสอบเพื่อให้โฟโตดีเทกเตอร์สามารถอ่านค่าการสะท้อนแต่ละตำแหน่งได้ โดยใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์ควบคุมการเลื่อนตำแหน่งดังกล่าว และส่งข้อมูลค่าการสะท้อนแสงแต่ละตำแหน่งหรือ Line profile ที่ได้มาประมวลผลที่คอมพิวเตอร์

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทดลองกับชุดทดสอบอย่างง่ายสำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B Virus, HBV) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 1000 ng/mL เมื่อใช้หลักการที่กล่าวมาข้างต้นอ่านค่าการสะท้อนแสงบนชุดทดสอบจะได้กราฟ Line profile แสดงในรูปที่ 2.5 (ข) พบว่าที่ความเข้มข้นแอนติเจนของสารตัวอย่างเพิ่มขึ้น ค่าการสะท้อนที่ลดลงที่ตำแหน่งแถบควบคุมเพิ่มขึ้นเช่นกัน จาก Line profile ทำการคำนวณหาค่าการสะท้อนแสงที่ต่ำที่สุดของทั้งแถบควบคุมและแถบทดสอบ นำมาหาอัตราส่วนของค่าการสะท้อนแสงดังกล่าว (Ratio = Control line/Test line) เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นกับความเข้มข้นของแอนติเจนในช่วง 0 – 1000 ng/mL การหาอัตราส่วนดังกล่าวจะมีความเป็นเชิงเส้นดีกว่า เนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของแถบควบคุมไม่เท่ากันในทุกความเข้มข้น จากผลการทดลองพบว่า Detection limit ของเครื่องอ่านแถบสีอยู่ที่ความเข้มข้น 1.25 ng/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดสำหรับการทดลองดังกล่าว



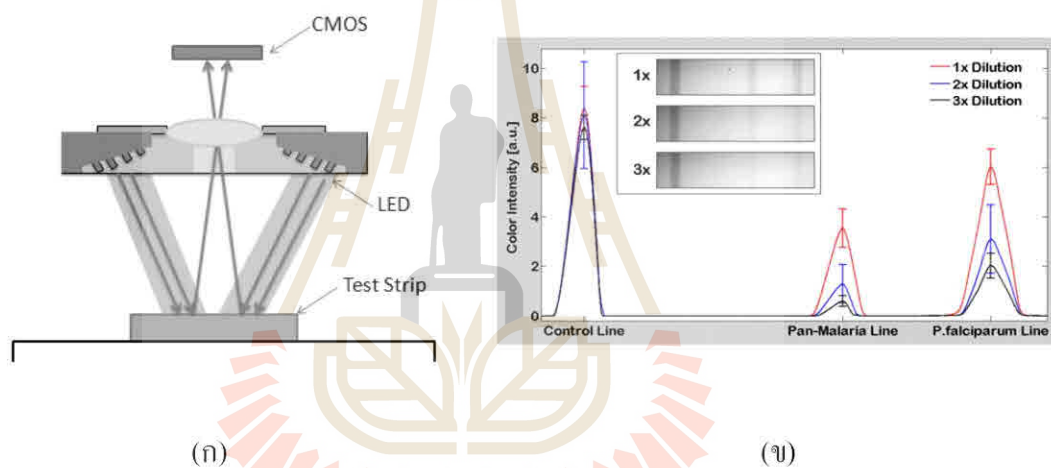
**รูปที่ 2.5** (ก) เทคนิคการวัดความเข้มแสงจากชุดทดสอบด้วยโฟโตดีเท็กเตอร์ ประกอบไปด้วย แหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสง โฟโตดีเท็กเตอร์วัดค่าการสะท้อนแสงแต่ละตำแหน่งบนชุดทดสอบอย่างง่าย และ (ข) ค่าการสะท้อนแสงหรือ Line profile ที่อ่านได้จากโฟโตดีเท็กเตอร์ สำหรับชุดทดสอบอย่างง่ายตรวจเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 1000 ng/mL (Kim et al. 2004)

### 2.3.2 เทคนิคการถ่ายภาพชุดทดสอบและคำนวณหาความเข้มแสงด้วยกล้อง CCD หรือ กล้อง CMOS

กลุ่มที่สองใช้กล้องซีซีดีหรือซีโมส (Carrio et al. 2015; Gui et al. 2014; Mudanyali et al. 2012; Yang et al. 2015; Yeh et al. 2014) อ่านภาพแถบทดสอบและคำนวณหาความเข้มแสงจากแต่ละแถบสี เนื่องจากกล้องสามารถถ่ายภาพแถบทดสอบได้โดยไม่ต้องเลื่อนตำแหน่ง วิธีการนี้จึงได้รับความนิยมมากขึ้น แต่ไม่เหมาะกับการใช้งานที่มีความไว (Sensitivity) สูง เพราะฉะนั้นวิธีนี้จำเป็นต้องมีอุปกรณ์เพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงความไวของเครื่องอ่าน โดยใช้แหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสง หรือมีเทคนิคประมวลผลภาพชุดทดสอบอย่างง่าย

ตัวอย่างงานวิจัยของ Mudanyali และคณะ (2012) พัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบโดยใช้กล้อง CMOS เป็นอุปกรณ์ถ่ายภาพชุดทดสอบพร้อมติดตั้งอุปกรณ์เพิ่มเติมในการเพิ่มความไวของเครื่องอ่าน แสดงดังรูปที่ 2.6 (ก) ซึ่งประกอบไปด้วย แหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสงสีเขียว จัดแสงให้กระจายตัวสม่ำเสมอครอบคลุมบริเวณแถบควบคุมและแถบทดสอบ จากนั้นถ่ายภาพชุดทดสอบสำหรับตรวจเชื้อมาลาเรีย ส่งภาพมาประมวลผลที่คอมพิวเตอร์

ด้วยซอฟต์แวร์ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้น ขั้นแรกทำการเลือกขอบเขตการพิจารณา (Region of interest, ROI) ให้ครอบคลุมบริเวณพื้นขาวของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนทั้งหมด ไม่รวมตำแหน่งที่เกิดแถบสี ทำการลบค่าการสะท้อนแสงที่บริเวณดังกล่าว ทำให้ค่าการสะท้อนแสงบนพื้นขาวบริเวณที่ไม่เกิดแถบสีมีค่าเป็นศูนย์ เพื่อหาค่าความเข้มแสงที่ไม่สม่ำเสมอของแหล่งกำเนิดแสง จากนั้นซอฟต์แวร์จะทำการคำนวณหาค่าการสะท้อนแสงแต่ละตำแหน่งที่ได้บนชุดทดสอบแบบ Line profile แสดงดังรูปที่ 2.6 (ข) จากกราฟ Line profile ทำการหาค่าการสะท้อนสูงสุดของแถบทดสอบ พบว่า Detection limit ของเครื่องอ่านอยู่ที่ 156 parasites/ $\mu\text{L}$  (3 x Dilution) ใกล้เคียงกับการแปลผลด้วยตาเปล่า ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ เครื่องอ่านไม่สามารถแยกแยะแถบสีได้



**รูปที่ 2.6** (ก) เทคนิคการถ่ายภาพชุดทดสอบอย่างง่ายด้วยกล้อง CMOS ซึ่งประกอบไปด้วยแหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสงสีเขียว จัดแสงให้กระจายตัวสม่ำเสมอครอบคลุมบริเวณแถบควบคุมและแถบทดสอบ (Yang et al. 2015) และ (ข) กราฟค่าการสะท้อนหรือ Line profile สำหรับชุดทดสอบอย่างง่ายที่ความเข้มข้น 468 parasites/ $\mu\text{L}$  (1X), 312 parasites/ $\mu\text{L}$  (2X), 156 parasites/ $\mu\text{L}$  (3X) (Mudanyali et al. 2012)

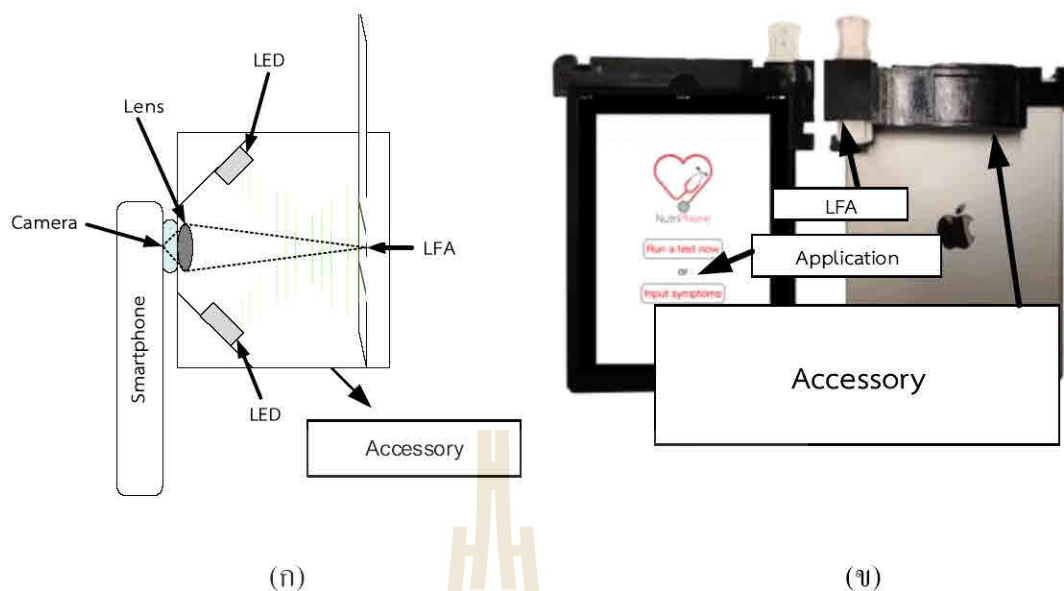


### 2.3.3 เทคนิคการถ่ายภาพชุดทดสอบและคำนวณหาความเข้มแสงของแต่ละแถบสีด้วยกล้องโทรศัพท์แบบพกพา

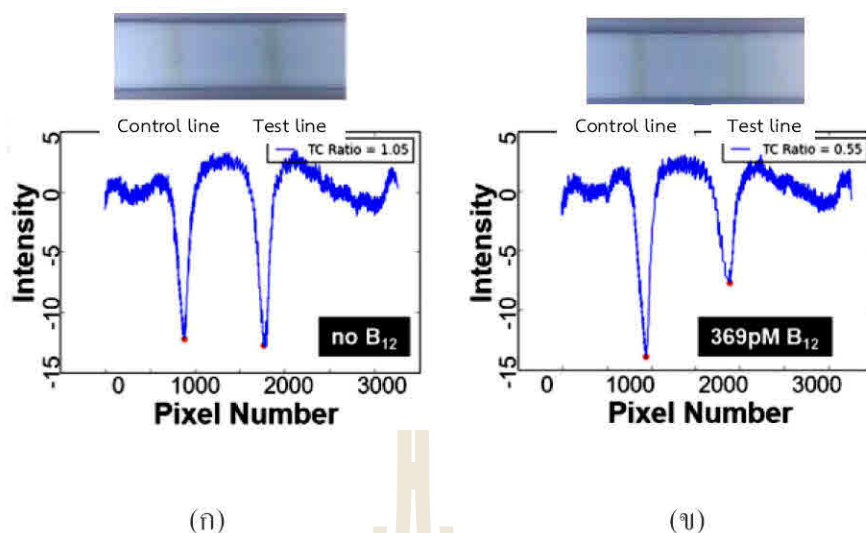
กลุ่มที่สามใช้กล้องโทรศัพท์แบบพกพาพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ (Jung et al. 2015; Kim et al. 2017; Lee et al. 2016; Scherr et al. 2016; Zangheri et al. 2015) ทำให้เครื่องอ่านมีขนาดเล็กกะทัดรัดสามารถพกพาได้ ซึ่งเทคนิคนี้ใช้กล้องโทรศัพท์เป็นอุปกรณ์ถ่ายภาพแถบสีชุดทดสอบ พร้อมทั้งติดตั้งอุปกรณ์เสริมเข้ากับกล้องโทรศัพท์ เช่น แหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสง เลนส์ เป็นต้น

ตัวอย่างงานวิจัยของ Lee และคณะ (2016) ออกแบบโทรศัพท์พกพาสำหรับถ่ายภาพชุดทดสอบ พร้อมทั้งติดตั้งอุปกรณ์เพิ่มเติมเข้าไปกับโทรศัพท์ แสดงในรูปที่ 2.7 ประกอบไปด้วยเลนส์ ( $f = 12 \text{ mm}$ ) เพื่อขยายภาพชุดทดสอบและทำให้ขนาดของอุปกรณ์เล็กลง โดยตำแหน่งของเลนส์ดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเดียวกันกับเลนส์ของกล้องโทรศัพท์ ขณะเดียวกันผู้วิจัยจำเป็นต้องกำหนดตำแหน่งที่ใส่ชุดทดสอบอย่างง่ายตรงบริเวณเกิดแถบสี ให้ตรงกับตำแหน่งของกล้อง จากนั้นวางแหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสงไว้ด้านข้างของเลนส์ และจัดความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสงให้สม่ำเสมอเท่ากันทั้งชุดทดสอบ อุปกรณ์ดังกล่าวออกแบบมาสำหรับสวมเข้ากับโทรศัพท์แบบพกพา

การทดลองสำหรับงานวิจัยนี้ใช้ชุดทดสอบอย่างง่ายแบบ Competitive assays สำหรับตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่  $0 - 1107 \text{ pmol/L}$  จากนั้นนำชุดทดสอบดังกล่าวที่ต้องการวิเคราะห์ใส่เข้าเครื่องอ่านแถบสี เปิดแอปพลิเคชันที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นบนระบบปฏิบัติการ iOS สำหรับอ่านค่าแถบสี ซึ่งซอฟต์แวร์ดังกล่าวจะถ่ายภาพชุดทดสอบ และคำนวณค่าการสะท้อนแสงแต่ละตำแหน่งบนชุดทดสอบแบบ Line profile แสดงในรูปที่ 2.8 การประมวลผลใช้ตำแหน่งค่าการสะท้อนแสงสูงสุดของแถบทดสอบและแถบควบคุม นำค่าดังกล่าวมาหาอัตราส่วนระหว่างแถบทดสอบต่อแถบควบคุม (T/C ratio) เพื่อใช้หาความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณวิตามินบี 12 เนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของแถบควบคุมไม่เท่ากันในทุกความเข้มข้น การคำนวณหาอัตราส่วนของ T/C ratio ทำให้มีความเป็นเชิงเส้นดีกว่า ผลการทดสอบพบว่า Detection limit ของเครื่องอ่านอยู่ที่ความเข้มข้น  $221 \text{ pmol/L}$  ดีกว่า Detection limit ของการแปลผลด้วยตาเปล่าถึง 1.7 เท่า



รูปที่ 2.7 (ก) หลักการออกแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบด้วยกล้องโทรศัพท์แบบพกพา ประกอบไปด้วย เลนส์นูนซึ่งวางอยู่ที่หน้ากล้องของโทรศัพท์ มีแหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสงอยู่ด้านหลังของเลนส์ ควรให้ตำแหน่งชุดทดสอบตรงบริเวณเกิดแถบสีตรงกับตำแหน่งของกล้อง และ (ข) ต้นแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบด้วยกล้องโทรศัพท์แบบพกพา พร้อมหน้าจอหลักของแอปพลิเคชันที่ใช้ประมวลผลที่กลุ่มวิจัยของ Lee พัฒนาขึ้น (Lee et al. 2016)



**รูปที่ 2.8** ค่าการสะท้อนแสงหรือ Line profile ที่อ่านได้แต่ละตำแหน่งบนชุดทดสอบสำหรับหาปริมาณวิตามินบี 12 (ก) ชุดทดสอบสำหรับตัวอย่างที่ไม่มีวิตามินบี 12 ค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบและแถบควบคุมมีค่าใกล้เคียงกัน และค่า T/C ratio = 1.05 และ (ข) ชุดทดสอบสำหรับตัวอย่างที่ความเข้มข้น 369 pmol/L ค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบมีค่าน้อยกว่าแถบควบคุม และค่า T/C ratio = 0.55 (Lee et al. 2016)

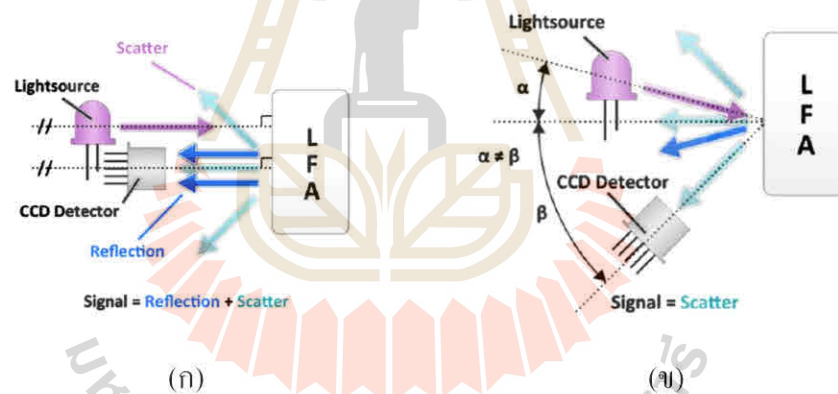
นอกจากที่กล่าวมาข้างต้นยังมีการศึกษาและพัฒนาเทคนิค อื่น ๆ เพื่อให้เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบสามารถวัดความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต่ำลงได้ หรือมี Detection limit ดีกว่าการแปลผลชุดทดสอบด้วยตาเปล่า

## 2.4 เทคนิคการเพิ่มความไว (Sensitivity) สำหรับเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่าย

### 2.4.1 เทคนิคกำหนดมุมตกกระทบของแสงเพื่อลดแสงสะท้อนโดยตรงจากไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนบนชุดทดสอบ

งานวิจัยของ You และคณะ (2013) ได้ศึกษาเทคนิคกำหนดมุมตกกระทบของแสงเพื่อลดการสะท้อนแสงโดยตรงจากไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนบนชุดทดสอบ หลักการออกแบบประกอบไปด้วย แหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสง โฟโตดีเทกเตอร์ และชุดทดสอบอย่างง่าย

ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการทดลองจัดตำแหน่งของแหล่งกำเนิดแสงและโฟโตดีเท็กเตอร์ทำมุมตั้งฉาก  $90^\circ$  กับชุดทดสอบ แสดงในรูป 2.9 (ก) เปรียบเทียบกับการจัดตำแหน่งมุมของแหล่งกำเนิดแสงและโฟโตดีเท็กเตอร์ ซึ่งทำมุม ( $\alpha$ ) และทำมุม ( $\beta$ ) กับชุดทดสอบตามลำดับ แสดงในรูป 2.9 (ข) ถ้าจัดตำแหน่งอุปกรณ์ตามรูปที่ 2.9 (ก) ผู้วิจัยคาดว่าค่าที่ได้จากโฟโตดีเท็กเตอร์จะเป็นค่าการกระเจิงแสงของอนุภาคนาโนของทองบนบริเวณที่เกิดแถบสี รวมถึงรับค่าการสะท้อนแสงจากแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนโดยตรง ซึ่งค่าการสะท้อนจากแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนดังกล่าวเป็นสัญญาณรบกวนที่อยากหลีกเลี่ยง เมื่อเทียบกับการจัดอุปกรณ์ในรูปที่ 2.9 (ข) ผู้วิจัยคาดว่าค่าที่โฟโตดีเท็กเตอร์อ่านได้ จะเป็นค่าการกระเจิงแสงของอนุภาคนาโนของทองบนแถบสีชุดทดสอบเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวเป็นการเพิ่มอัตราส่วนของสัญญาณระหว่างสัญญาณที่ต้องการต่อสัญญาณรบกวน (Signal to noise ratio) จากผลการทดลองพบว่ามุมที่เหมาะสมที่สุดในการจัดตำแหน่งอุปกรณ์ตามรูป 2.9 (ข) คือ  $\alpha$  เท่ากับ  $65^\circ$  และ  $\beta$  เท่ากับ  $110^\circ$



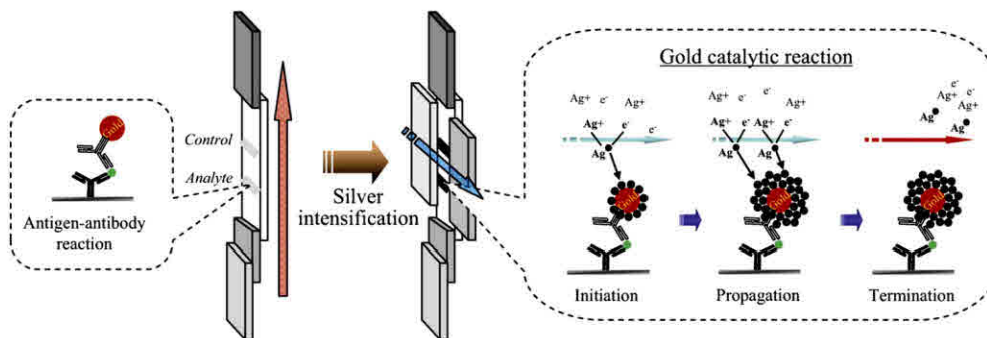
**รูปที่ 2.9** (ก) จัดตำแหน่งของแหล่งกำเนิดแสงและโฟโตดีเท็กเตอร์ทำมุมตั้งฉาก  $90^\circ$  กับชุดทดสอบ ค่าที่ได้จากโฟโตดีเท็กเตอร์จะเป็นค่าการกระเจิงแสงของอนุภาคนาโนของทองบนบริเวณที่เกิดแถบสี รวมถึงรับค่าการสะท้อนแสงจากแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนโดยตรง และ (ข) จัดตำแหน่งของแหล่งกำเนิดแสงทำมุม ( $\alpha$ ) และตำแหน่งโฟโตดีเท็กเตอร์ทำมุม ( $\beta$ ) กับชุดทดสอบเพื่อลดการรับค่าสะท้อนแสงโดยตรงจากไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนบนชุดทดสอบ (You et al. 2013)

เมื่อได้พารามิเตอร์ดังกล่าว ผู้วิจัยได้ออกแบบเครื่องอ่านแถบสีด้วยโทรศัพท์แบบพกพา ทำการทดลองกับชุดทดสอบอย่างง่ายสำหรับตรวจหาระดับฮอร์โมนไทรอยด์ในร่างกาย (Thyroid stimulating hormone, TSH) ผลการวิจัยพบว่า Detection limit ของเครื่องอ่านแถบสีอยู่ที่ความเข้มข้น 5 mIU/L ดีกว่าการแปลผลแถบสีชุดทดสอบด้วยตาเปล่า อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดลองที่ความเข้มข้นสารตัวอย่างต่ำกว่า 5 mIU/L ไม่สามารถแยกแยะความเข้มข้นได้

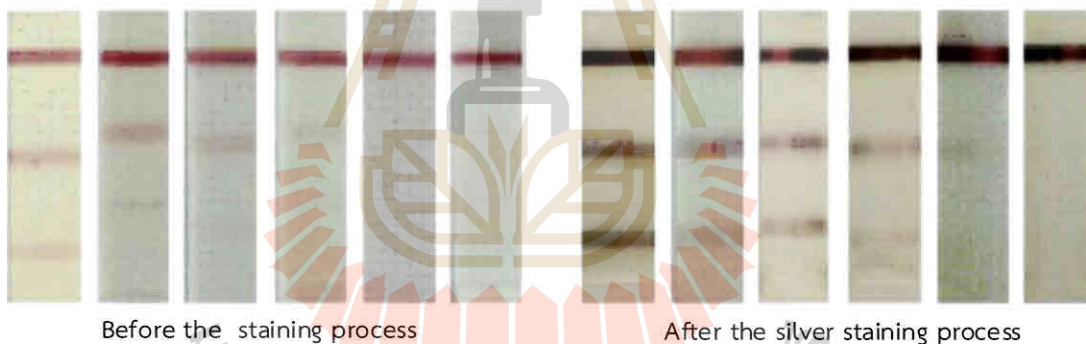
#### 2.4.2 เทคนิค Silver staining enhancement

งานวิจัยของ Yu และคณะ (2015) ใช้การย้อมสีด้วยเทคนิค Silver staining ของชุดทดสอบอย่างง่ายหลังเกิดแถบสีแล้ว หลักการของเทคนิค Silver staining แสดงดังรูปที่ 2.10 โดยหยดสารละลาย Silver enhancer ลงบนชุดทดสอบอย่างง่ายบนบริเวณแถบสี อนุภาคนาโนของทองที่แถบสีจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของการถ่ายโอนอิเล็กตรอน จากสารละลาย Silver enhancer มีการเสียอิเล็กตรอน ทำให้ไอออนเงิน ( $Ag^+$ ) ไปจับที่ผิวอนุภาคนาโนของทอง เมื่อเวลาผ่านไปไอออนดังกล่าวที่สะสมอยู่บนผิวของอนุภาคนาโนของทองกลายเป็นโลหะเงินที่มีขนาดใหญ่ขึ้น แถบสีบนชุดทดสอบจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มทำให้เห็นแถบสีชัดเจนขึ้นเมื่อเทียบกับพื้นหลังสีขาวบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

ใช้เทคนิคที่กล่าวมาข้างต้นกับชุดทดสอบอย่างง่าย สำหรับตรวจหาเชื้อราฟูโมนิซิน บี1 (Fumonisin B1) ตั้งแต่ความเข้มข้น 0 – 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  แสดงในรูปที่ 2.11 เมื่อแปลผลแถบสีชุดทดสอบด้วยตาเปล่า พบว่า Detection limit ของเทคนิค Silver staining อยู่ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ดีกว่าการแปลผลแถบสีชุดทดสอบจากอนุภาคนาโนของทองด้วยตาเปล่าถึง 2.5 เท่า อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ยังไม่สามารถแยกออกได้ว่าเกิดแถบสีที่ตำแหน่งแถบทดสอบหรือไม่ เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ผลที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ ต้องพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบโดยใช้เทคนิคที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ใช้คู่กับเทคนิค Silver staining



รูปที่ 2.10 (ก) หลักการของ Silver staining enhancement สำหรับวิเคราะห์ชุดทดสอบอย่างง่าย เมื่อสารละลาย Silver enhancer ทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนของทอง ส่งผลให้อิออนของเงินยึดติดกันที่ผิวอนุภาคนาโนของทองสะสมจนกลายเป็นโลหะเงิน ทำให้เห็นแถบสีชัดเจน (Cho et al. 2010)



รูปที่ 2.11 ผลการทดสอบของชุดทดสอบสำหรับตรวจหาเชื้อราฟูโมนิซิน บี1 ภาพทางซ้ายมือแสดงผลก่อนการทำ Silver staining ส่วนภาพทางขวามือแสดงผลหลังทำ Silver staining ที่ชุดทดสอบความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ng/mL ตามลำดับ (Yu et al. 2015)

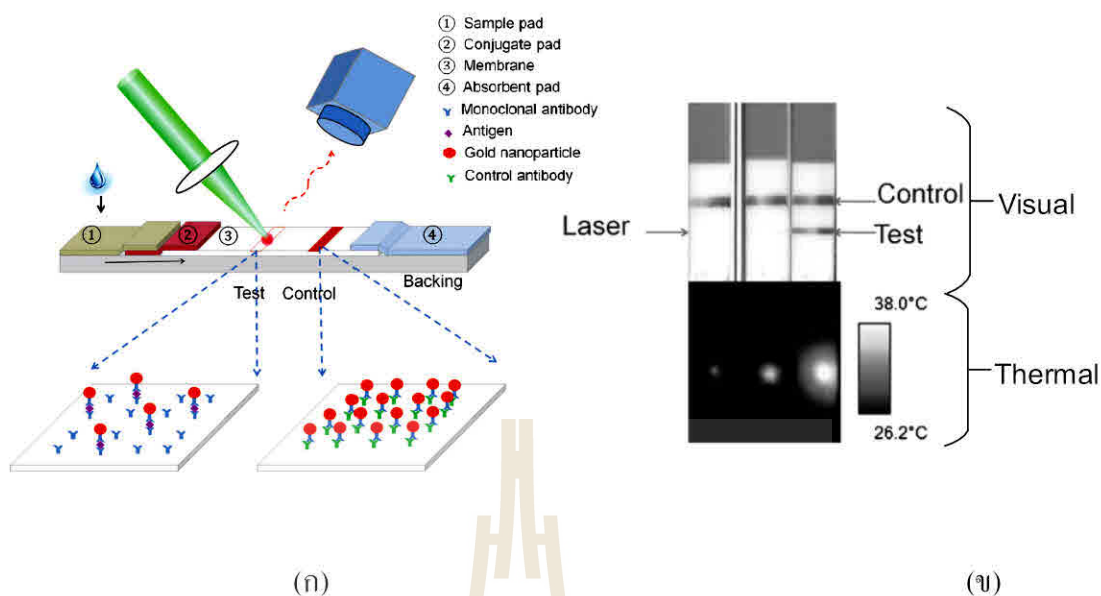
2.4.3 เทคนิคโฟโตเทอร์มัลแบบไม่สัมผัส

Qin และคณะ (2012) ได้ศึกษาเทคนิคโฟโตเทอร์มัลแบบไม่สัมผัสสำหรับวิเคราะห์แถบสีชุดทดสอบ หลักการของเทคนิคแสดงดังรูปที่ 2.12 (ก) ใช้เลเซอร์ไดโอดสีเขียว (0.5 W, ความยาวคลื่น 532 nm) กำลังงานสูงฉายไปบนบริเวณตำแหน่งแถบสีที่ชุดทดสอบ เมื่อแสงตก

กระทบที่อนุภาคนาโนของทอง อนุภาคนาโนจะดูดกลืนแสงและเกิดเป็นความร้อนขึ้น อุณหภูมิจากความร้อนที่เพิ่มนั้น ขึ้นอยู่กับจำนวนอนุภาคนาโนของทองบนแถบสีชุดทดสอบ ถ้าอนุภาคนาโนของทองมีจำนวนมาก ส่งผลให้อุณหภูมิที่เกิดขึ้นบนตำแหน่งแถบสีที่มากขึ้นตามไปด้วย การเปลี่ยนแปลงของความร้อนที่เกิดขึ้นบนชุดทดสอบถูกวัดด้วยกล้องโฟโตเทอร์มัลแบบอินฟราเรด

จากการศึกษาเบื้องต้นผู้วิจัยลองเปรียบเทียบการแปลผลด้วยเทคนิคโฟโตเทอร์มัลกับการแปลผลด้วยตาเปล่า โดยการหยดตัวอย่างสารละลายอนุภาคนาโนของทองปริมาตร 10  $\mu\text{L}$  ลงบนสไลด์ ถ่ายภาพดังกล่าวด้วยกล้องดิจิทัลใช้ในการแปลผลด้วยตาเปล่า และใช้เทคนิคโฟโตเทอร์มัล เริ่มจากยิงแสงเลเซอร์ไดโอดลงไปบริเวณสารละลาย การเปลี่ยนแปลงความร้อนด้วยกล้องโฟโตเทอร์มัลแบบอินฟราเรด พบว่าที่ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่  $2.5 \times 10^9$  GNP/mL เทคนิคโฟโตเทอร์มัลยังสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีอนุภาคนาโนของทอง แต่การแปลผลด้วยตาเปล่า Detection limit อยู่ที่  $2.5 \times 10^{11}$  GNP/mL แสดงให้เห็นว่าเทคนิคดังกล่าวมี Detection limit ดีกว่าการแปลผลด้วยตาถึง 100 เท่า ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้ผู้วิจัยนำเทคนิคโฟโตเทอร์มัลมาใช้งานกับชุดทดสอบอย่างง่าย ที่ต้องการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ

เมื่อทดลองใช้เทคนิคโฟโตเทอร์มัลแบบไม่สัมผัสกับชุดทดสอบอย่างง่ายสำหรับวิเคราะห์โรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อรา Cryptococcal (CrAg) โดยการฉายแสงเลเซอร์ไดโอด (0.01 W, ความยาวคลื่น 532 nm) ลงบนตำแหน่งแถบทดสอบ ใช้กล้องโฟโตเทอร์มัลแบบอินฟราเรด การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ตำแหน่งดังกล่าว แสดงดังรูป 2.12 (ข) จากผลการทดลองพบว่า Detection limit ของเทคนิคโฟโตเทอร์มัลอยู่ที่ความเข้มข้น 1:1024 CrAg titer ดีกว่าการแปลผลด้วยตาเปล่าถึง 32 เท่า อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวใช้อุปกรณ์ที่มีราคาสูง



รูปที่ 2.12 (ก) หลักการของเทคนิคโฟโตเทอร์มัลแบบไม่สัมผัสสำหรับใช้งานกับชุดทดสอบอย่างง่าย ประกอบไปด้วย เลเซอร์ไดโอดยิงแสงลงบนแถบสี ทำให้อุณหภูมิที่แถบดังกล่าวร้อนขึ้น และเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิด้วยกล้องโฟโตเทอร์มัล และ (ข) ตัวอย่างภาพถ่ายชุดทดสอบเชื้อรา CrAg ภาพบนจากกล้องดิจิทัล และภาพล่างจากกล้องโฟโตเทอร์มัลแบบอินฟราเรดที่ความเข้มข้น 0, 1:1024, 1:2048 CrAg titer (Qin et al. 2012)

#### 2.4.4 เทคนิคประมวลผลภาพชุดทดสอบอย่างง่าย

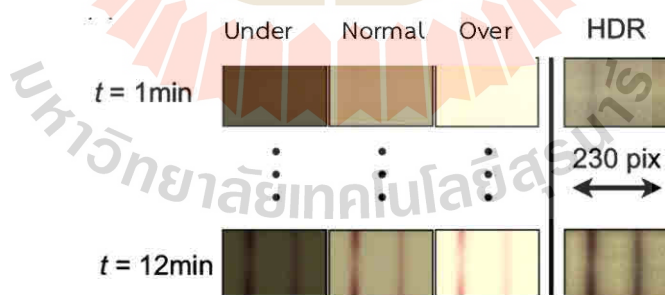
การพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบด้วยการใช้กล้อง CCD หรือ กล้อง CMOS เป็นอุปกรณ์ถ่ายภาพชุดทดสอบ ให้สามารถวิเคราะห์แถบสีที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้นั้น มีงานวิจัยที่ศึกษาและพัฒนาเทคนิคประมวลผลภาพชุดทดสอบอย่างง่าย (Gui et al. 2014; Jakoby et al. 2010; Lee et al. 2016; Scherr et al. 2016) โดยออกแบบซอฟต์แวร์ให้มีความรวดเร็วในการตรวจสอบสามารถทำงานผ่านแอปพลิเคชัน Android และ iOS

ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Jakoby และคณะ (2010) พัฒนาซอฟต์แวร์ประมวลผลภาพชุดทดสอบด้วยเทคนิค High Dynamic Range (HDR) คือการขยายช่วงไดนามิกของภาพระหว่างภาพที่มีแสงสว่างมากที่สุดกับภาพที่มืดที่สุด ให้อยู่ในภาพเดียวกันเพื่อให้ได้ภาพที่มีรายละเอียดครบถ้วน เช่น ถ้าเราจะถ่ายภาพให้มองเห็นในจุดสว่างคมชัด ภาพในส่วนที่มืดก็จะมืด

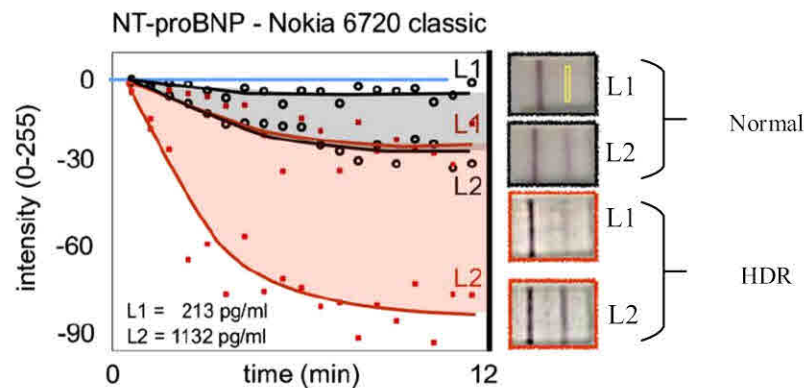


สนิท แต่ถ้าเราต้องการถ่ายให้ส่วนที่มีดคมชัด ภาพในส่วนสว่างก็จะสว่างจนเกินไป ทำให้ไม่เห็นรายละเอียดเลย ปัญหาดังกล่าวแก้ไขได้ด้วยเทคนิค HDR

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการถ่ายภาพชุดทดสอบสำหรับตรวจหาโปรตีน NT-proBNP ของผู้ป่วยที่มีภาวะเสี่ยงเป็นโรคหัวใจขาดเลือด ด้วยเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น โดยใช้กล้องโทรศัพท์แบบพกพา (Nokia 6720) เป็นอุปกรณ์ถ่ายภาพ ประยุกต์ใช้หน้าจอแสดงผลของโทรศัพท์ที่เป็นแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งพัฒนาซอฟต์แวร์บนมือถือให้สามารถควบคุมความสว่างหน้าจอเปรียบเสมือนกับตั้งค่าเวลาในการรับแสง (Exposure time) ของกล้อง เพื่อถ่ายภาพทั้ง 3 ช่วงความสว่าง แสดงดังรูปที่ 2.13 ประกอบไปด้วยภาพของค่า Exposure time น้อย (Under exposure) ภาพของค่า Exposure time ที่เหมาะสม (Normal exposure) และภาพของค่า Exposure time สูง (Over exposure) ส่งภาพที่ถ่ายทั้งหมดมาประมวลผลที่คอมพิวเตอร์ จากนั้นทำการรวมภาพของ Exposure time ทั้ง 3 ภาพเข้าด้วยกันด้วยเทคนิคประมวลผลภาพที่เรียกว่า HDR และจะเริ่มถ่ายภาพตั้งแต่ชุดทดสอบยังไม่เกิดแถบสีจนกระทั่งเกิดแถบสีขึ้นบนชุดทดสอบเป็นเวลา 12 นาที จากผลการทดลองพบว่าภาพ HDR ของชุดทดสอบอย่างง่ายทำให้แถบสีชัดเจนเมื่อดูด้วยตาเปล่า จากภาพดังกล่าวทำการคำนวณหาค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงตามเวลาของแถบทดสอบ แสดงดังรูปที่ 2.14 พบว่า Detection limit ของเทคนิคดังกล่าวอยู่ที่ความเข้มข้น 213 pg/mL ดีกว่าการแปรผลชุดทดสอบด้วยตาเปล่า 2 เท่า



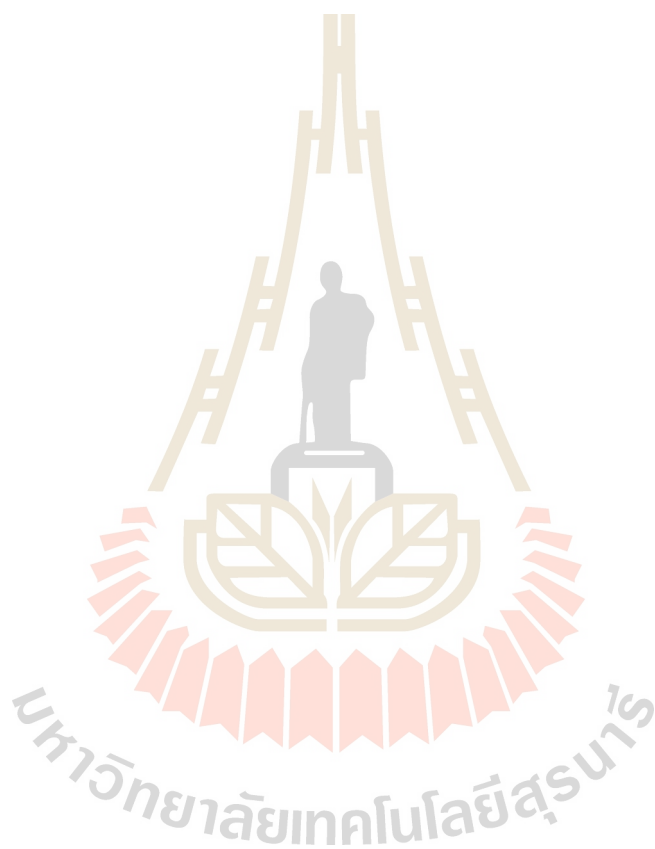
**รูปที่ 2.13** ภาพถ่ายแถบสีชุดทดสอบสำหรับตรวจหาโปรตีน NT-proBNP ทั้ง 3 ช่วงความสว่าง ได้แก่ ค่า Exposure time น้อย (Under exposure) ค่า Exposure time ที่เหมาะสม (Normal exposure) และค่า Exposure time สูง (Over exposure) จากนั้นทำการรวมภาพทั้ง 3 ช่วงด้วยเทคนิคการรวมภาพที่เรียกว่า HDR จะได้ภาพแถบสีชุดทดสอบที่ชัดเจนขึ้น ดังรูป ขวามือ (Jakoby et al. 2010)



**รูปที่ 2.14** กราฟค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงตามเวลา ตั้งแต่ภาพชุดทดสอบยังไม่ปรากฏแถบสี จนกระทั่งเกิดแถบสีบนชุดทดสอบตรวจหาโปรตีน NT-proBNP เส้นสีดำในกราฟเป็นค่าการสะท้อนแสงของภาพปกติ ส่วนเส้นสีแดงในกราฟเป็นค่าการสะท้อนแสงของภาพ HDR ที่ความเข้มข้น L1 เท่ากับ 213 pg/mL และ L2 เท่ากับ 1132 pg/mL (Jakoby et al. 2010)

ผลจากการศึกษาเทคนิคการเพิ่มความไวของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่าย ดังที่กล่าวมาแล้ว จากผลการทดสอบพบว่าเครื่องอ่านแถบสีที่พัฒนาขึ้นมี Detection limit ดีกว่าการแปลผลด้วยตาเปล่า ยกตัวอย่างเช่น เทคนิคโฟโตเทอร์มัลแบบไม่สัมผัสเหมาะสำหรับใช้งานกับชุดทดสอบที่ต้องการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ เนื่องจากเป็นเทคนิคการวัดที่มีความละเอียดสูง อย่างไรก็ตามอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเทคนิคดังกล่าวยังมีราคาสูงที่มาก ส่วนการประมวลผลภาพชุดทดสอบอย่างง่ายด้วยเทคนิค HDR ทำให้ได้ภาพแถบสีชุดทดสอบที่ชัดเจนขึ้น อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวสมควรในการรวมภาพ HDR ที่ยากและซับซ้อน ถ้านำมาพัฒนาเป็นแอปพลิเคชันบนเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบด้วยโทรศัพท์แบบพกพา อาจใช้เวลาในการประมวลผลและแสดงผลภาพเป็นเวลานาน ดังนั้นงานวิจัยจะประยุกต์ใช้เทคนิคการถ่ายภาพชุดทดสอบและคำนวณหาความเข้มแสงของแต่ละแถบสีด้วยกล้อง CMOS กำหนดมุมตกกระทบของแสงเพื่อลดแสงสะท้อนโดยตรงจากไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนบนชุดทดสอบ พัฒนาเครื่องอ่านแถบสีสำหรับชุดทดสอบแบบพกพา ที่ Detection limit ดีกว่าการแปลผลด้วยตาเปล่า และสามารถใช้งานกับชุดทดสอบชนิดต่าง ๆ ที่มีการพัฒนาขึ้นใช้งานเองในประเทศ ราคาไม่แพง ทั้งนี้เครื่องมือวัดดังกล่าวยังสามารถศึกษาผลกระทบจากการปรับค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ บนกล้องได้ เช่น Contrast

Exposure time เป็นต้น เนื่องจากยังไม่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้าถึงการปรับค่าพารามิเตอร์ดังกล่าว  
ว่าส่งผลต่อการวัดค่าการสะท้อนบนชุดทดสอบหรือไม่



### บทที่ 3

## การออกแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่ายแบบแอลเอฟเอ

เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบได้รับความสนใจและได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันมีผู้ผลิตจำหน่ายเครื่องอ่านแถบสีในเชิงพาณิชย์เป็นจำนวนมาก (Baugh and Murphy 2013; Kaylor et al. 2013; Ozcan et al. 2014; Pawlak et al. 1998; Vail et al. 2005) แต่ยังไม่พบข้อมูลระบุชัดเจนจากผู้ผลิตรายใดว่า เครื่องอ่านแถบสีสามารถใช้ตรวจวัดสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำกว่าการระบุแถบสีด้วยตาเปล่า นอกจากการระบุเพียงแต่การใช้เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบสามารถระบุความเข้มข้นของสารที่วัดได้ในเชิงปริมาณ หรืออาจเพียงเพราะการแปลผลความเข้มข้นเป็นตัวเลขเท่านั้นที่ทำให้เครื่องอ่านได้รับความน่าเชื่อถือในการอ่านค่าความเข้มข้นให้กับชุดทดสอบนั้น ๆ งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีที่ให้ค่า Detection limit ต่ำกว่าการดูด้วยตาเปล่า โดยได้ออกแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ 2 รูปแบบ คือ แบบแรกใช้กล้องเว็บแคมในการบันทึกภาพแถบสี และใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็นไดโอดเปล่งแสง การใช้กล้องเว็บแคมทำให้สามารถศึกษาผลกระทบจากการปรับค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของกล้องทำได้ง่าย เช่น Contrast, Exposure time เป็นต้น เมื่อได้พารามิเตอร์ในการตั้งค่ากล้องที่เหมาะสมแล้ว จึงได้พัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบแบบที่สองใช้เทคนิคเดียวกัน โดยใช้กล้องของโทรศัพท์มือถือแบบพกพาในการบันทึกภาพแถบสี

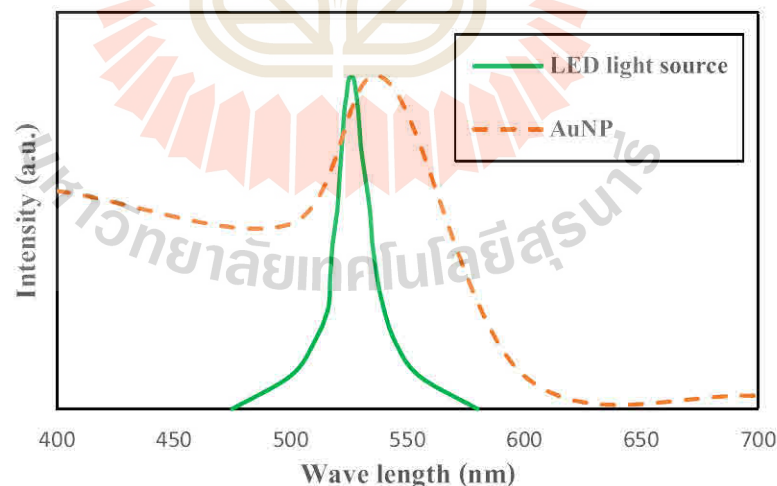
### 3.1 การออกแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบโดยใช้กล้องเว็บแคมเป็นอุปกรณ์รับภาพ

ต้นแบบภาคสนามของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นนี้ ใช้กล้องเว็บแคม (Logitech HD C525, ราคาประมาณ 1,500 บาท) เป็นอุปกรณ์รับภาพ ซึ่งกล้องเว็บแคมรุ่นนี้ผู้ใช้สามารถตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการรับภาพของกล้องได้ เช่น Exposure time, Gain หรือ Contrast เป็นต้น ทำให้สะดวกสำหรับทำการวิจัยและพัฒนาที่ต้องการศึกษาผลกระทบของพารามิเตอร์ข้างต้น ว่าส่งผลต่อการวัดความเข้มแสงของแถบสีชุดทดสอบหรือไม่ กล้องเว็บแคมรุ่นอื่น ๆ

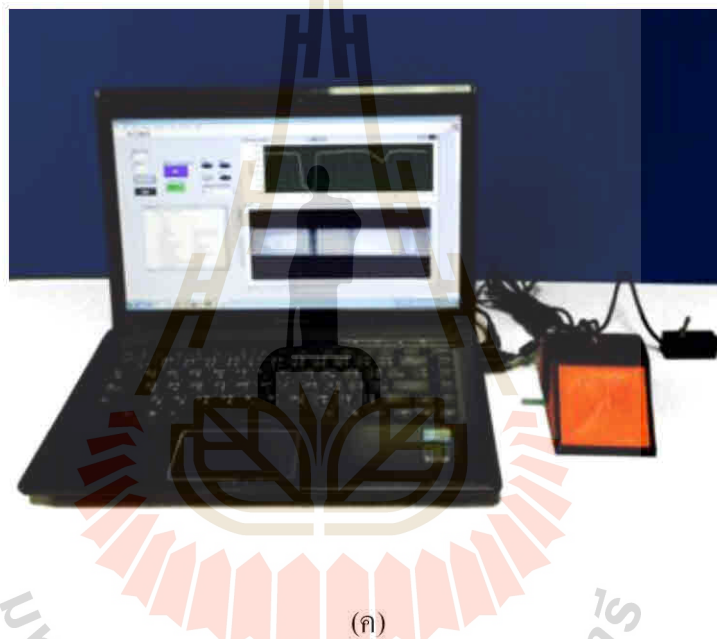
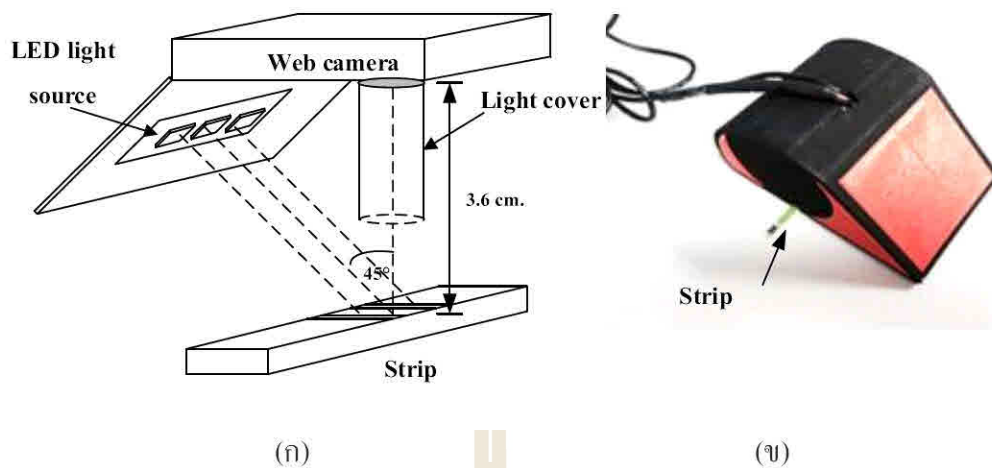
สามารถนำมาใช้งานได้เช่นเดียวกัน แต่ต้องเป็นรุ่นที่ผู้ผลิตอนุญาตให้ผู้ผู้ใช้ปรับค่าพารามิเตอร์ในการถ่ายภาพได้

เครื่องอ่านแถบสีจะประกอบไปด้วยแหล่งกำเนิดแสงเป็นไดโอดเปล่งแสงสีเขียวจำนวน 6 ตัว (0.48 W) จัดแสงในรูปแบบเส้นตรง (Line light) และจัดมุมตกกระทบ  $45^\circ$  เทียบกับระนาบของชุดทดสอบ โดยมีกล้องเว็บแคมอยู่ตรงกลาง การใช้แหล่งกำเนิดแสงสีเขียวสอดคล้องกับสเปกตรัมการกระเจิงแสงและการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนของทอง Huang และคณะ (2010) ดังรูปที่ 3.1 และการจัดมุมตกกระทบ  $45^\circ$  น่าจะลดแสงสะท้อนโดยตรงจากพื้นสีขาวของชุดทดสอบได้ ต้นแบบดังกล่าวจะเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ผ่านพอร์ต USB เพื่อประมวลผลและแสดงผล

สำหรับการออกแบบกล่องเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ ผู้วิจัยใช้ 3D Printer ขึ้นรูป แสดงในรูปที่ 3.2 โดยออกแบบให้กล้องรับภาพอยู่บริเวณตรงกลางกล่องพอดีกับกับตำแหน่งแถบสีของชุดทดสอบอย่างง่าย ระยะของเลนส์กล้องห่างจากชุดทดสอบประมาณ 3.6 cm ซึ่งเป็นระยะที่กล้องโฟกัสภาพแถบสีชุดทดสอบชัดเจน บริเวณด้านข้างของกล่องออกแบบที่ชิดกับแหล่งกำเนิดแสงทำมุม  $45^\circ$  กับชุดทดสอบ วาง Diffuser ไว้ที่หน้าแหล่งกำเนิดแสง เพื่อให้แสงนวลและกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ส่วนบริเวณหน้าเลนส์ของกล้องจะสวมอุปกรณ์ป้องกันแสง เพื่อลดแสงสะท้อนที่เกิดจากการสะท้อนภายในกล่องของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ

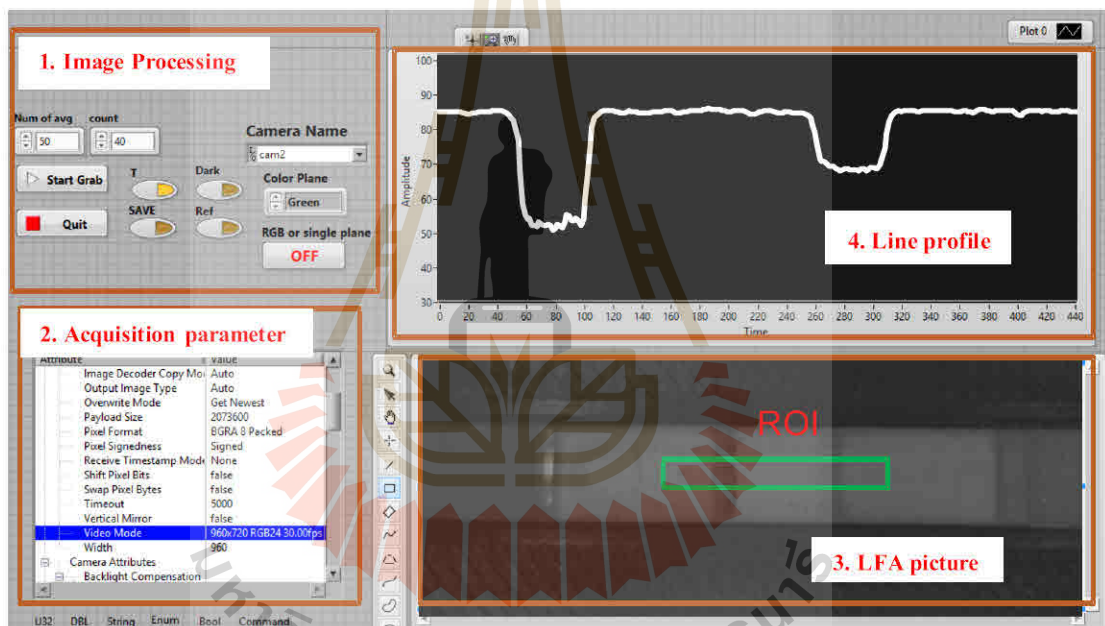


**รูปที่ 3.1** สเปกตรัมการส่องสว่างของแหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสงสีเขียว (เส้นสีเขียว) สอดคล้องกับสเปกตรัมการกระเจิงแสงของอนุภาคนาโนของทองขนาด 40 nm (เส้นสีแดง) (ดัดแปลงจาก Huang et al. 2010)



**รูปที่ 3.2** (ก) การจัดอุปกรณ์ของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบโดยใช้กล้องเว็บแคมเป็นอุปกรณ์รับภาพ ประกอบด้วย กล้องรับภาพ ไดโอดเปล่งแสงสีเขียวแบบแถวยาว (Line lights source) และช่องใส่ชุดทดสอบ (ข) ภาพต้นแบบภาคสนามเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบโดยใช้กล้องเว็บแคม และ (ค) รูปภาพต้นแบบพร้อมด้วยคอมพิวเตอร์ประมวลผล

การประมวลผลภาพ การประมวลผลข้อมูล และการแสดงผลของเครื่องต้นแบบนี้จะเขียนบนโปรแกรม LabVIEW 2013 (National Instrument) หน้าจอประมวลผลสามารถปรับเปลี่ยนค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของกล้องเว็บแคมได้สะดวกและจัดเก็บข้อมูลง่าย หน้าจอประมวลผลประกอบไปด้วย 4 ส่วน ดังรูปที่ 3.3 ส่วนแรกคือชุดคำสั่งประมวลผลเบื้องต้น ส่วนที่สองคือการตั้งค่าพารามิเตอร์ในการรับภาพของกล้องเว็บแคม ซึ่งจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเทคนิคของกล้องรุ่นนั้น ๆ ส่วนที่สามคือส่วนแสดงภาพชุดทดสอบ และส่วนสุดท้ายคือส่วนแสดงกราฟ Line profile ซึ่งจะแสดงค่าความเข้มแสงตามแนวแกนของชุดทดสอบ จากบริเวณ ROI (Region of interest) ที่ผู้ใช้เลือก



รูปที่ 3.3 หน้าจอประมวลผลของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ หน้าจอแสดงผลประกอบไปด้วยส่วนการตั้งค่าพารามิเตอร์ในการประมวลผลภาพ ส่วนการตั้งค่ากล้องรับภาพ ส่วนของหน้าจอแสดงภาพชุดทดสอบ และส่วนหน้าจอแสดงค่า Line profile

### 3.2 กราฟ Line profile

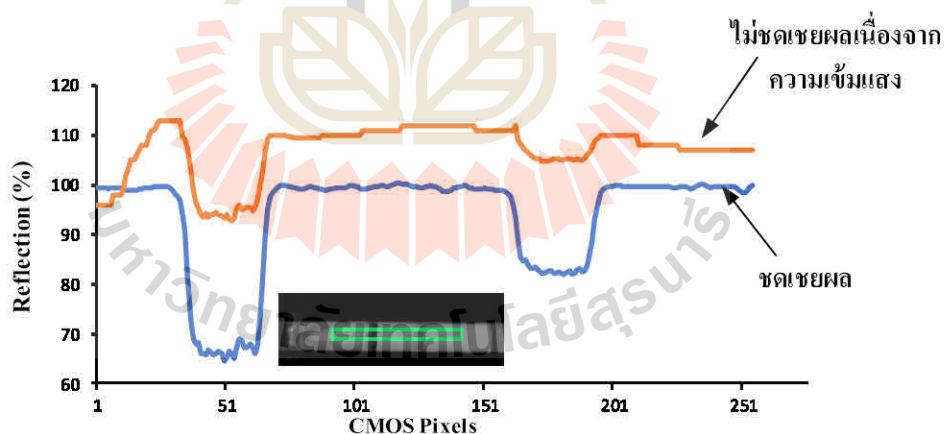
กราฟ Line profile หาได้จากการพล็อตค่าการสะท้อนแสงจากแต่ละตำแหน่งบนชุดทดสอบ ( $I_L(x)$ ) กับระยะตามแนวยาวของชุดทดสอบ แสงจากแหล่งกำเนิดแสงที่ตกกระทบชุด

ทดสอบอาจมีความเข้มแสงไม่เท่ากันทั้งภาพ เพื่อชดเชยผลเนื่องจากความเข้มแสงไม่สม่ำเสมอของความเข้มแสงตกกระทบแต่ละจุดบริเวณชุดทดสอบไม่เท่ากัน จำเป็นต้องใช้ความเข้มแสงจากภาพอ้างอิง ( $I_{Ref}$ ) หาค่าความเข้มแสงที่อ่านค่าได้ ( $I$ ) ภาพอ้างอิงในกรณีนี้คือ ภาพที่ได้จากชุดทดสอบสีขาวที่ยังไม่เกิดสีหรือยังไม่ได้ใช้งาน ค่าความเข้มแสง  $I_R(x)$  ที่ตำแหน่ง  $x$  ใด ๆ บนชุดทดสอบหาได้จาก

$$I_R(x) = \frac{I(x) - I_d(x)}{I_{Ref} - I_d(x)}$$

เมื่อ  $I(x)$  คือความเข้มแสงที่อ่านได้จากกล้องรับภาพที่ตำแหน่ง  $x$  ส่วน  $I_d(x)$  คือความเข้มแสงที่อ่านได้ที่ตำแหน่ง  $x$  เมื่อปิดแหล่งกำเนิดแสง และ  $I_{Ref}(x)$  คือความเข้มแสงที่อ่านได้ที่ตำแหน่ง  $x$  เมื่อใช้ชุดทดสอบที่ยังไม่ได้ใช้งาน โดยเลือกบริเวณสีขาว

รูปที่ 3.4 แสดงกราฟ Line profile จากชุดทดสอบ เมื่อชดเชยผลเนื่องจากความเข้มแสงที่ไม่สม่ำเสมอแล้ว จะพบว่าบริเวณพื้นสีขาวของชุดทดสอบจะมีค่าค่อนข้างคงที่



รูปที่ 3.4 กราฟ Line profile จากชุดทดสอบเปรียบเทียบระหว่างไม่ชดเชยผลเนื่องจากความเข้มแสงกับชดเชยผลเนื่องจากความเข้มแสง



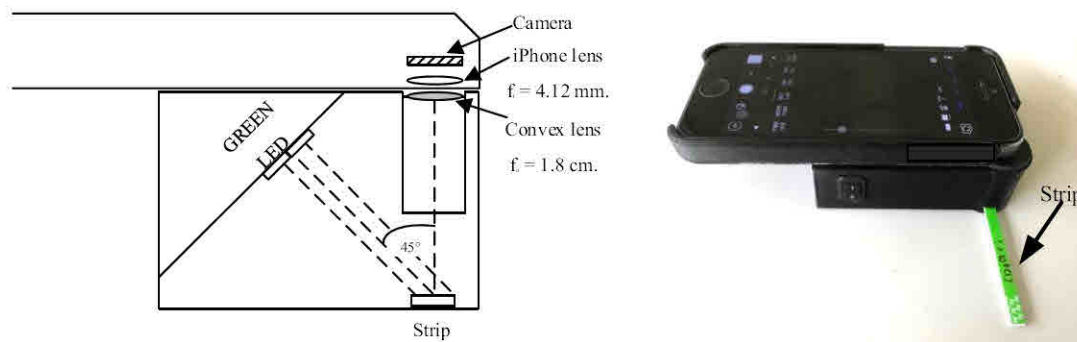
กราฟ Line profile จากชุดทดสอบจะเป็นข้อมูลหลักที่จะนำไปประมวลผล เพื่อหาค่าความเข้มแสงบริเวณแถบทดสอบ (Test line) ซึ่งจะได้อธิบายต่อไปในหัวข้อ 3.4

### 3.3 การออกแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ โดยใช้กล้องโทรศัพท์แบบพกพาเป็นอุปกรณ์รับภาพ

เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบแอลเอฟเอรูปแบบที่สอง จะใช้กล้องโทรศัพท์แบบพกพา (iPhone 5S) ในการอ่านค่าแถบสี ใช้แหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสงสีเขียว 6 ตัว (0.48 W) จัดแสงในรูปแบบเส้นตรง (Line light) แบ่งเป็น 2 แถว และจัดให้มีมุมตกกระทบ  $45^\circ$  เทียบกับระนาบของชุดทดสอบ ออกแบบเชิงแสงโดยใช้เลนส์นูนความยาวโฟกัส ( $f_0$ ) เท่ากับ 1.8 cm. และเลนส์ของกล้อง iPhone 5S ความยาวโฟกัส ( $f$ ) เท่ากับ 4.12 mm. เพื่อขยายภาพแถบสีชุดทดสอบที่อัตราการขยายภาพประมาณ 4.5 เท่า วางเลนส์นูนให้มีระยะห่างจากชุดทดสอบที่ 2 cm. จึงจะได้ภาพแถบสีชุดทดสอบชัด แสดงดังรูปที่ 3.5 (ก)

การออกแบบกล่องเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบขึ้นรูปด้วย 3D Printer ดังรูปที่ 3.5 (ข) โดยมีตำแหน่งยึดเลนส์นูนให้อยู่ในตำแหน่งที่พอดีกับกล้องโทรศัพท์ และสร้างอุปกรณ์ป้องกันแสงสวมเข้าไปที่เลนส์นูนยาวประมาณ 0.7 cm. เพื่อลดทอนแสงรบกวนที่เกิดจากการสะท้อนภายในกล่องเครื่องอ่าน ออกแบบช่องใส่ชุดทดสอบให้บริเวณแถบสีอยู่ตำแหน่งเดียวกับเลนส์นูน ส่วนบริเวณด้านข้างของกล่องออกแบบที่ยึดกับแหล่งกำเนิดแสงทำมุม  $45^\circ$  กับระนาบชุดทดสอบ วาง Diffuser ไว้ที่หน้าแหล่งกำเนิดแสง เพื่อให้แสงนวลและกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

เนื่องจากแอปพลิเคชันถ่ายภาพของกล้องโทรศัพท์บนระบบปฏิบัติการ iOS ไม่สามารถตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการถ่ายภาพได้ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้อุปกรณ์ ProCam3 เป็นแอปพลิเคชันในการถ่ายภาพ ซึ่งแอปพลิเคชันดังกล่าวสามารถตั้งค่าพารามิเตอร์ในการรับภาพของกล้องได้ เช่น Exposure time, Focus, White balance เป็นต้น



(ก)

(ข)



(ค)

**รูปที่ 3.5** (ก) การจัดอุปกรณ์ของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบโดยใช้กล้องโทรศัพท์แบบพกพาเป็นอุปกรณ์รับภาพ อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วย กล้องรับภาพ ไดโอดเปล่งแสงสีเขียวแบบแถวยาว (Line light source) และช่องใส่ชุดทดสอบ (ข) ดันแบบภาคสนามของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ และ (ค) หน้าจอแสดงภาพแถบสีชุดทดสอบ โดยใช้เครื่องอ่านแถบสีจากกล้องโทรศัพท์แบบพกพา

เมื่อต้องการอ่านค่าแถบสี จะใช้ดันแบบที่พัฒนาขึ้นถ่ายภาพอ้างอิง ภาพเมื่อปิดแหล่งกำเนิดแสง และภาพเมื่อเกิดแถบสีชุดทดสอบ ส่งข้อมูลภาพดังกล่าวไปที่คอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผลภาพของเครื่องดันแบบใช้โทรศัพท์แบบพกพาเป็นอุปกรณ์ถ่ายภาพ จะใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่เขียน

ขึ้นโดยใช้ LabVIEW 2013 ในการประมวลผลเช่นเดียวกับต้นแบบในหัวข้อที่ 3.1 ในอนาคตสามารถเขียนแอปพลิเคชันสำหรับประมวลผลภาพได้โดยตรง โดยไม่ต้องนำภาพที่ได้จากโทรศัพท์ไปประมวลผลด้วยคอมพิวเตอร์ และกราฟ Line profile หาได้จากการพล็อตค่าการสะท้อนแสงจากตำแหน่งบนชุดทดสอบแสดงดังสมการที่ 3-1

### 3.4 การคำนวณค่าการสะท้อนแสงแบบ Line profile

กราฟ Line profile เป็นค่าการสะท้อนแสงที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนชุดทดสอบ หาได้จากขั้นตอนต่อไปนี้

ขั้นตอนแรกใส่ชุดทดสอบที่ยังไม่ได้ใช้งานเข้าไปในเครื่องอ่านแถบสี ทำการสร้าง Region of interest (ROI) ขนาด  $33 \times 334$  พิกเซล บนบริเวณกึ่งกลางชุดทดสอบ โดยให้ครอบคลุมบริเวณที่จะเกิดแถบสีทั้งสอง เมื่อใส่ชุดทดสอบที่ยังไม่ได้ใช้งานเข้าไปในเครื่อง บันทึกค่าภาพอ้างอิง (Reference image) และบันทึกภาพเมื่อปิดแหล่งกำเนิดแสง (Dark image)

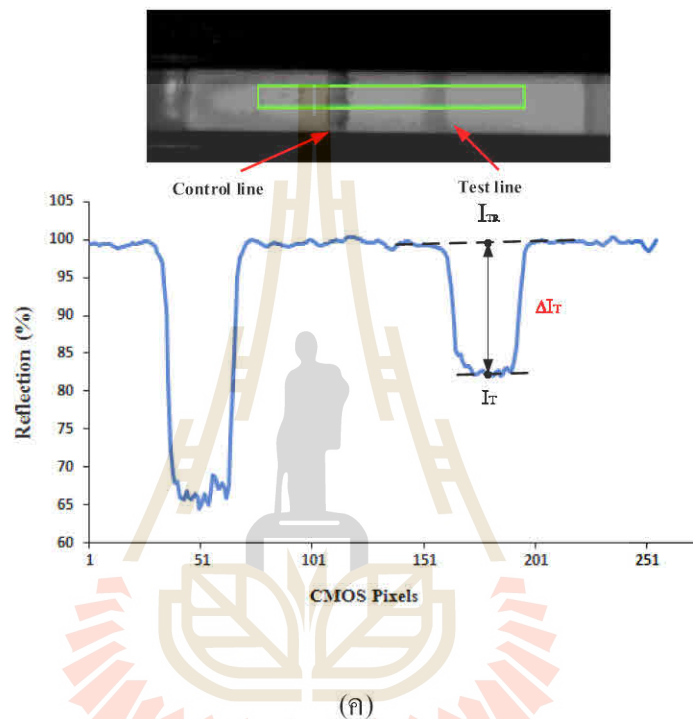
ใส่ชุดทดสอบที่ต้องการวิเคราะห์เข้าไปในช่องเสียบชุดทดสอบ จัดตำแหน่งให้แถบควบคุมและแถบทดสอบอยู่ตรงกลาง และจัดให้ ROI ที่สร้างก่อนหน้านี้ให้ครอบคลุมแถบทั้งสอง กราฟ Line profile จะปรากฏขึ้นที่หน้าจอแสดงผล ซึ่งแสดงค่าการสะท้อนแสงที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนชุดทดสอบที่ได้จากสมการที่ (3-1) จากนั้นบันทึกค่ากราฟ Line profile เพื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ต่อ

เมื่อได้กราฟค่า Line profile แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการคำนวณหาค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) ซึ่งค่าการสะท้อนแสงดังกล่าวจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัดในสาร ค่า  $\Delta I_T$  คำนวณจากผลต่างระหว่างความเข้มแสงอ้างอิงที่ตำแหน่งแถบทดสอบ ( $I_{IR}(x)$ ) กับความเข้มแสงที่ลดลงเมื่อเกิดแถบสี ( $I_T(x)$ ) ดังรูปที่ 3.6 จากผลการทดลองที่ผ่านมาผู้วิจัยพบว่า ลักษณะเส้นกราฟ Line profile บริเวณที่ไม่เกิดแถบสีบางครั้งจะเอียงจากซ้ายไปขวา หรือจากขวาไปซ้าย ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากน้ำตัวอย่างตัวอย่างพิชชีเยียวติดค้างอยู่ในชุดทดสอบ



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 3.6 (ก) ภาพอ้างอิง (ข) ภาพเมื่อเปิดแหล่งกำเนิดแสง และ (ค) กราฟ Line profile ค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่ตำแหน่งแถบทดสอบ ( $\Delta I_r$ ) โดยวัดเทียบกับเส้นอ้างอิงคือ ค่าการสะท้อนแสงที่ตำแหน่งเมื่อไม่เกิดแถบสี สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ต้องการวัด

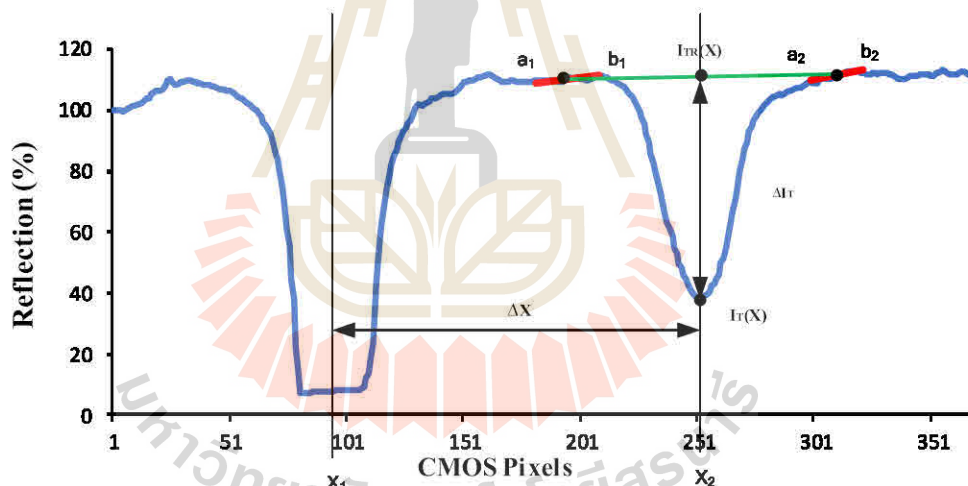
### 3.5 โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับคำนวณหาตำแหน่งแถบทดสอบและค่า $\Delta I_r$

การประมวลผลภาพจากภาพถ่ายชุดทดสอบแบบแอลเอฟเอ เพื่อหาตำแหน่งแถบทดสอบและค่า  $\Delta I_r$  ได้เขียน โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อให้การคำนวณค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบทำได้อัตโนมัติ

รูปที่ 3.7 เป็นการคำนวณหาค่า  $\Delta I_T$  ที่แถบทดสอบจากกราฟ Line profile เนื่องจาก  $\Delta I_T = I_{TR}(x) - I_T(x)$  การหาค่าดังกล่าวโปรแกรมต้องทราบตำแหน่งของแถบทดสอบ ( $X_1$ ) สำหรับชุดทดสอบแต่ละชุดระยะห่างระหว่างตำแหน่งของแถบควบคุม ( $X_1$ ) กับตำแหน่งแถบทดสอบจะมีค่าเท่าเดิม ( $\Delta X$ ) ซึ่งค่าระยะห่างระหว่างแถบสามารถหาได้จาก การวัดระยะห่างระหว่างแถบควบคุมและแถบทดสอบจากชุดทดสอบที่ปรากฏแถบสีชัดเจนหลายๆ ชุด นำมาหาค่าเฉลี่ย (กรณีชุดทดสอบเชิงแบคทีเรีย *Aac* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้  $\Delta X = 0.6 \pm 0.2$  cm. หรือเทียบเท่ากับ  $\Delta X = 155 \pm 1.5$  พิกเซล)

การหาตำแหน่งแถบทดสอบ เริ่มจากการหาตำแหน่งแถบควบคุมก่อน เนื่องจากแถบควบคุมจะเกิดขึ้นทุกครั้งและมีแถบสีชัดเจน ถ้าชุดทดสอบยังใช้งานได้ปกติ เมื่อทราบตำแหน่งแถบควบคุมแล้ว สามารถหาตำแหน่งแถบทดสอบได้จาก  $X_2 = X_1 + \Delta X$

ขั้นตอนการคำนวณหาตำแหน่งแถบทดสอบ และ  $\Delta I_T$  แสดงดังรูปที่ 3.8

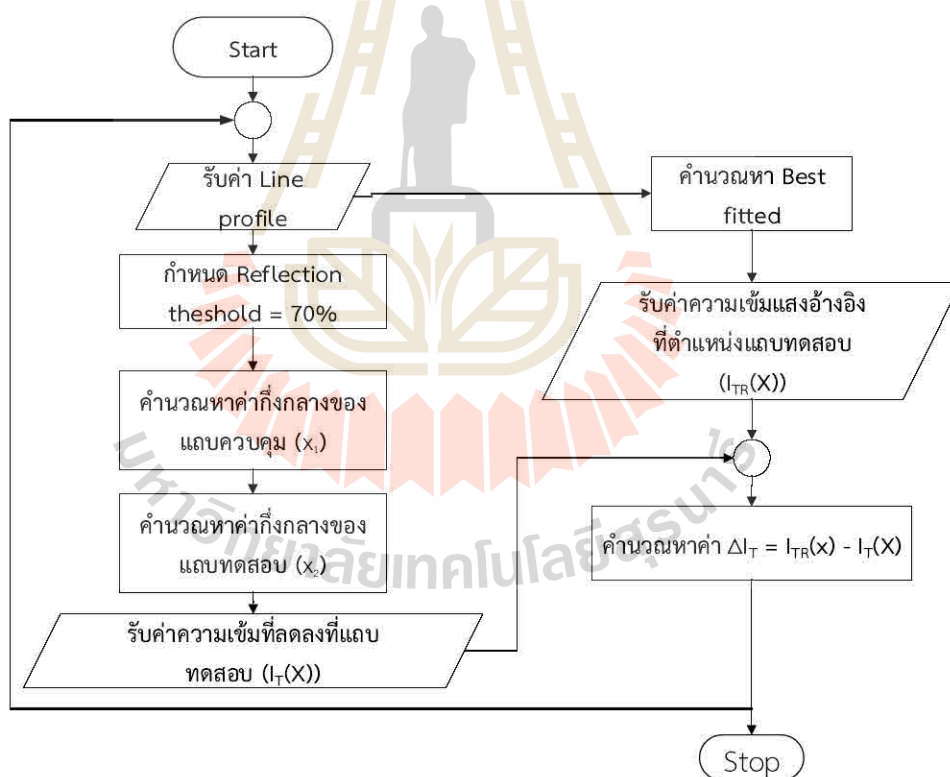


รูปที่ 3.7 การหาตำแหน่งของแถบทดสอบ และค่า  $\Delta I_T$  ที่แถบทดสอบอัตโนมัติ

กำหนด Reflection threshold = 70 % ในการหาตำแหน่งแถบควบคุม คำนวณหาตำแหน่งกึ่งกลางของแถบควบคุม ( $X_1$ ) โดยคำนวณค่ากึ่งกลางระหว่าง Threshold ที่เลือกไว้ ต่อมาคำนวณหาตำแหน่งกึ่งกลางแถบทดสอบ ( $X_2$ ) กำหนดเป็น  $X_2 = X_1 + \Delta X$  ซึ่งค่า  $\Delta X$  คือระยะห่างระหว่างแถบที่ได้ทำการวัดมาก่อนหน้า กำหนดช่วงบริเวณรอบ ๆ แถบทดสอบ ช่วงบริเวณ  $a_1$  ถึง  $b_1$

และช่วง  $a_2$  ถึง  $b_2$  (รูปที่ 3.7) ซึ่งแต่ละช่วงกว้างประมาณ 30 pixels โดยเลือกจากบริเวณที่ไม่เกิดแถบสี เมื่อได้ระยะต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาแล้วคำนวณหาเส้นตรงที่ดีที่สุด (Best fitted) โดยใช้ข้อมูลในช่วง  $a_1$  ถึง  $b_1$  และ  $a_2$  ถึง  $b_2$  เส้น Best fitted ดังกล่าวหมายถึงค่าการสะท้อนแสงเมื่อไม่เกิดสีที่แถบทดสอบ จากเส้นตรงดังกล่าวคำนวณหาค่าการสะท้อนแสงเมื่อไม่เกิดแถบสีที่แถบทดสอบ ( $I_{TR}(x)$ ) ที่บริเวณกึ่งกลางของแถบทดสอบ ( $X = X_2$ ) แล้วคำนวณหาค่าการสะท้อนแสงที่วัดได้ที่แถบทดสอบ ( $I_T(x)$ ) ที่ตำแหน่ง  $X = X_2$  คำนวณค่า  $\Delta I_T$  ที่แถบทดสอบจากสมการ  $\Delta I_T = I_{TR}(X) - I_T(X)$

เมื่อได้ค่าระยะต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว ก็สามารถนำไปวิเคราะห์กับชุดทดสอบที่ต้องการวิเคราะห์ เทคนิคการประมวลผลข้อมูลที่พัฒนาขึ้นนี้ดังรูปที่ 3.8 สามารถลดความไม่แน่นอนในการหาค่า  $\Delta I_T$  ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากน้ำตัวอย่างพืชสีเขียวติดค้างอยู่ในชุดทดสอบ ทำให้ลักษณะเส้นกราฟบริเวณที่ไม่เกิดแถบสีบางครั้งจะเอียงจากซ้ายไปขวา หรือเอียงจากขวาไปซ้ายได้



รูปที่ 3.8 Flow chart การทำงานของโปรแกรมหาตำแหน่งของแถบทดสอบ และค่า  $\Delta I_T$  ที่แถบทดสอบอัตโนมัติ

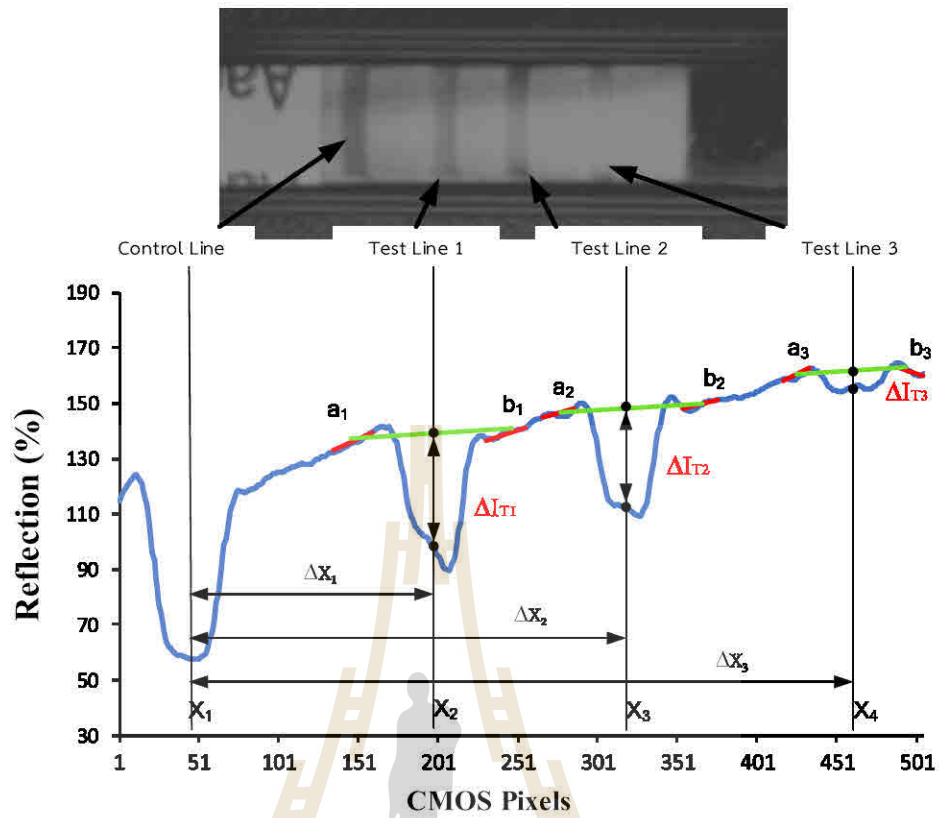
### 3.6 การพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีแบบ Multiplex

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่ายแบบหลายแถบ (Multiplex lateral flow immunochromatographic assays) เพื่อให้สามารถตรวจวัดได้หลายสารพร้อมกัน (Chen et al. 2016; Sajid et al. 2015) รวมทั้งชุดตรวจสอบโรคพิษที่พัฒนาโดย ดร. อรประไพ คชนันท์ และคณะ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ สามารถตรวจเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคพิษหลายเชื้อได้พร้อมกัน (Charlarmroj et al. 2013) ซึ่งทำให้แถบสีที่เกิดขึ้นมีมากกว่า 2 แถบสี จากการทดสอบพบว่าเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบที่พัฒนามาก่อนหน้านี้ สามารถใช้กับชุดทดสอบแบบ Multiplex ได้ แต่ต้องพัฒนาโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณหาตำแหน่งแถบทดสอบและค่า  $\Delta I_T$  แบบหลายแถบขึ้น เพื่อให้การคำนวณค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบทำอัตโนมัติ และเพื่อสะดวกในการใช้งาน

กราฟ Line profile ที่อ่านได้จากชุดทดสอบแบบ Multiplex ซึ่งชุดทดสอบดังกล่าวจะมี 4 แถบ ประกอบด้วย แถบควบคุม 1 แถบ และแถบทดสอบอีก 3 แถบ

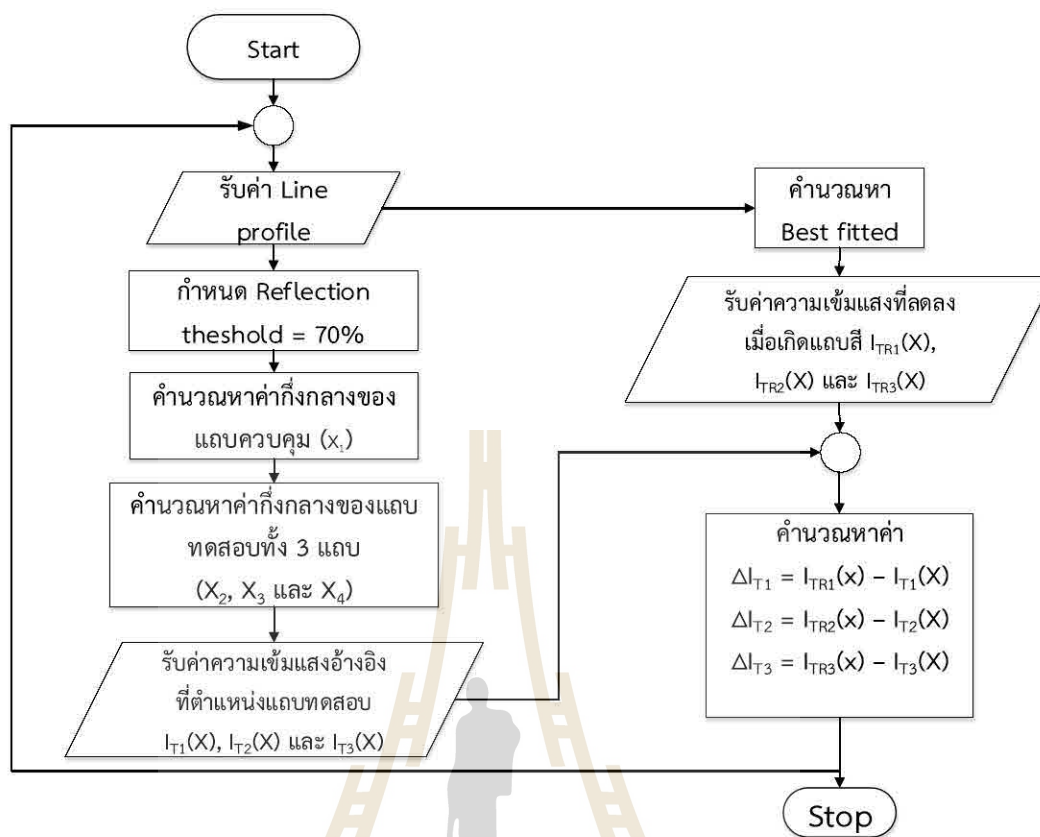
การหาตำแหน่งแถบทดสอบทั้ง 3 แถบ ( $X_2, X_3, X_3$ ) รวมทั้งตำแหน่งของแถบควบคุม ( $X_1$ ) จะใช้หลักการเดียวกันกับกรณีของชุดทดสอบที่มี 2 แถบ ทั้งนี้ต้องวัดระยะห่างแถบควบคุมกับแถบทดสอบแถบที่ 1 ( $\Delta X_1$ ) ระยะห่างแถบควบคุมกับแถบทดสอบแถบที่ 2 ( $\Delta X_2$ ) และระยะห่างแถบควบคุมกับแถบทดสอบแถบที่ 3 ( $\Delta X_3$ ) กรณีชุดทดสอบที่ใช้ในงานวิจัยนี้พบว่า  $\Delta X_1 = 3.3$  mm. หรือเทียบเท่ากับ  $\Delta X_1 = 155$  พิกเซล,  $\Delta X_2 = 6.3$  mm. หรือเทียบเท่ากับ  $\Delta X_2 = 275$  พิกเซล และ  $\Delta X_3 = 9.5$  หรือเทียบเท่ากับ  $\Delta X_3 = 420$  พิกเซล ดังรูปที่ 3.9

เมื่อได้ค่าระยะต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว นำไปวิเคราะห์กับชุดทดสอบที่แบบ Multiplex ซึ่งเทคนิคการประมวลผลข้อมูลที่พัฒนาขึ้นนี้ ขั้นตอนการคำนวณหาตำแหน่งแถบทดสอบ และ  $\Delta I_T$  แสดงดังรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.9 การหาตำแหน่งของแถบทดสอบ และค่า  $\Delta I_T$  ที่แถบทดสอบอัตโนมัติ สำหรับชุดทดสอบ Multiplex





รูปที่ 3.10 Flow chart การทำงานของโปรแกรมหาดำแหน่งของแถบทดสอบ และค่า  $\Delta I_T$  ที่แถบทดสอบอัตโนมัติ

## บทที่ 4

### การทดลองและผลการทดลอง

การทดลองของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมาในบทที่ 3 จะใช้งานกับชุดทดสอบอย่างง่ายตรวจเชื้อก่อโรคพืชในกลุ่มแตง ชุดตรวจสอบดังกล่าวพัฒนาโดย ดร. อรประไพ คชนันท์ และคณะ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ผลการทดสอบพบว่าเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพดีกว่าตาเปล่าและสามารถนำไปใช้งานจริงได้ นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ถึงผลกระทบพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของกล้อง เช่น Contrast, Exposure time หรือ Gain เป็นต้น เนื่องจากยังไม่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้าถึงการปรับค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวว่าส่งผลต่อการวัดความเข้มแสงหรือไม่ ดังนั้นในบทนี้จะทำการทดสอบเพื่อเป็นการยืนยันผลความยาวคลื่นและมุมตกกระทบของแหล่งกำเนิดแสง และผลกระทบจากการปรับค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของกล้อง

#### 4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

##### 4.1.1 ชุดตรวจโรคผลไม้แบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

การพัฒนาเครื่องมืออ่านแถบสี สำหรับงานวิจัยนี้ จะออกแบบสำหรับใช้งานกับชุดตรวจโรคผลไม้แบคทีเรียของพืชตระกูลแตงเป็นชุดตรวจแบบง่ายในรูปแบบ Immunochromatographic strip test ให้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (*Aac*) ที่เป็นสาเหตุของโรคผลไม้แบคทีเรียของพืชตระกูลแตง ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตและส่งออกเมล็ดพันธุ์ของพืชในกลุ่มนี้ ชุดตรวจนี้มีความจำเพาะสูง แม่นยำ ใช้เวลารวดเร็วภายใน 5-10 นาที

ชุดตรวจสอบดังกล่าวพัฒนาโดย ดร. อรประไพ คชนันท์ และคณะ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุได้จากตัวอย่างใบ ต้นกล้า และเปลือกของผล ใช้ตรวจคัดกรองโรคผลไม้แบคทีเรียในพืชตระกูลแตงเช่น แตงโม เมลอน สควอช แคนตาลูป แตงกวา และฟักทอง เป็นต้น

การตรวจโรคมีประโยชน์ในด้านการศึกษาด้านระบาดวิทยา การจัดการควบคุมโรค และการตรวจคัดกรองโรคผลไม้แช่เพื่อรับรองความปลอดภัยเมื่อมีการส่งออกเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตง ชุดตรวจสอบนี้พัฒนาโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร และมหาวิทยาลัยขอนแก่น ผลการทดสอบเมื่อสารตัวอย่างมีเชื้อแบคทีเรีย *Aac* แสดงดังรูปที่ 4.1 (ค) ซึ่งจะพบว่าเกิดแถบสี 2 แถบ การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบได้รับความอนุเคราะห์ จาก ดร. อรวรรณ หิมานัน โด ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ



(ก)



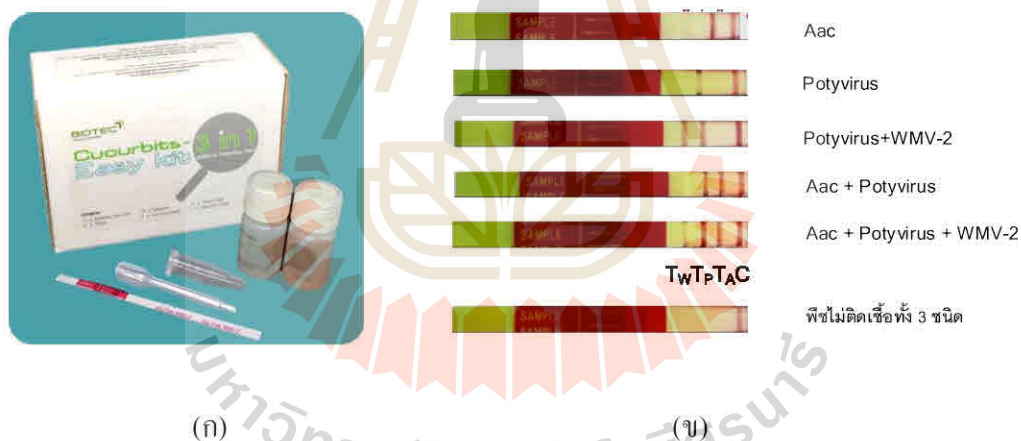
(ข)

(ค)

รูปที่ 4.1 (ก) ชุดตรวจสอบโรคผลไม้แช่ที่เรียที่เกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (*Aac*) (ข) ชุดทดสอบยังไม่ได้ใช้งาน และ (ค) ชุดทดสอบที่มีการใช้งานแล้ว (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

#### 4.1.2 ชุดตรวจโรคผลไม้แบบที่เรียกแบบตรวจวัดพร้อมกัน (Multiplex detection)

การพัฒนาต้นแบบชุดตรวจแบบรวดเร็วในรูปแบบ Immunochromatographic strip test เพื่อตรวจเชื้อก่อโรคพืชในกลุ่มแดง 3 ชนิดให้ได้ในคราวเดียวกัน (Multiplex detection) ได้แก่ เชื้อ Watermelon mosaic virus-2 (WMV-2) เชื้อ Potyvirus และเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) ชุดตรวจนี้วินิจฉัยเชื้อก่อโรคพืชที่มีความแม่นยำสูง และสามารถตรวจโรคหลายๆ ชนิดในคราวเดียวกัน โดยชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ Potyvirus, WMV-2 และ Aac ซึ่งจะไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกัน และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียก่อโรคพืชชนิดอื่น ๆ มีความไวเพียงพอในการตรวจเชื้อในตัวอย่างพืชเป็นโรค (ข้อมูลจาก ดร.อรวรรณ หิমানันโต) รู้ผลภายใน 10 นาที ชุดตรวจดังกล่าวพัฒนาโดย ดร. อรประไพ คชนันท์ และคณะ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ผลการทดสอบเมื่อสารตัวอย่างเชื้อก่อโรคพืชในกลุ่มแดง แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 (ก) ชุดตรวจแบบรวดเร็วสำหรับตรวจเชื้อก่อโรคในพืชตระกูลแดง 3 ชนิดได้ในคราวเดียวกัน และ (ข) ตัวอย่างชุดทดสอบที่มีการใช้งานแล้ว แถบ  $T_A$  หมายถึงเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*, แถบ  $T_p$  หมายถึงเชื้อ Potyvirus, แถบ  $T_W$  หมายถึง Watermelon mosaic virus-2 และ แถบ Control line (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

## 4.2 วิธีการทดลอง

เมื่อผู้ใช้ได้ทำการทดสอบชุดทดสอบแบบแอลเอฟเอที่ต้องวิเคราะห์ผลเรียบร้อยแล้ว หลังจากรอให้เกิดแถบสีประมาณ 15 นาทีที่แถบควบคุมและแถบทดสอบ ทั้งชุดทดสอบไว้ประมาณ 2-5 นาที จากนั้นใช้เครื่องอ่านแถบสีวิเคราะห์ผล ซึ่งวิธีนี้สามารถทำตามได้จากขั้นตอนต่อไป

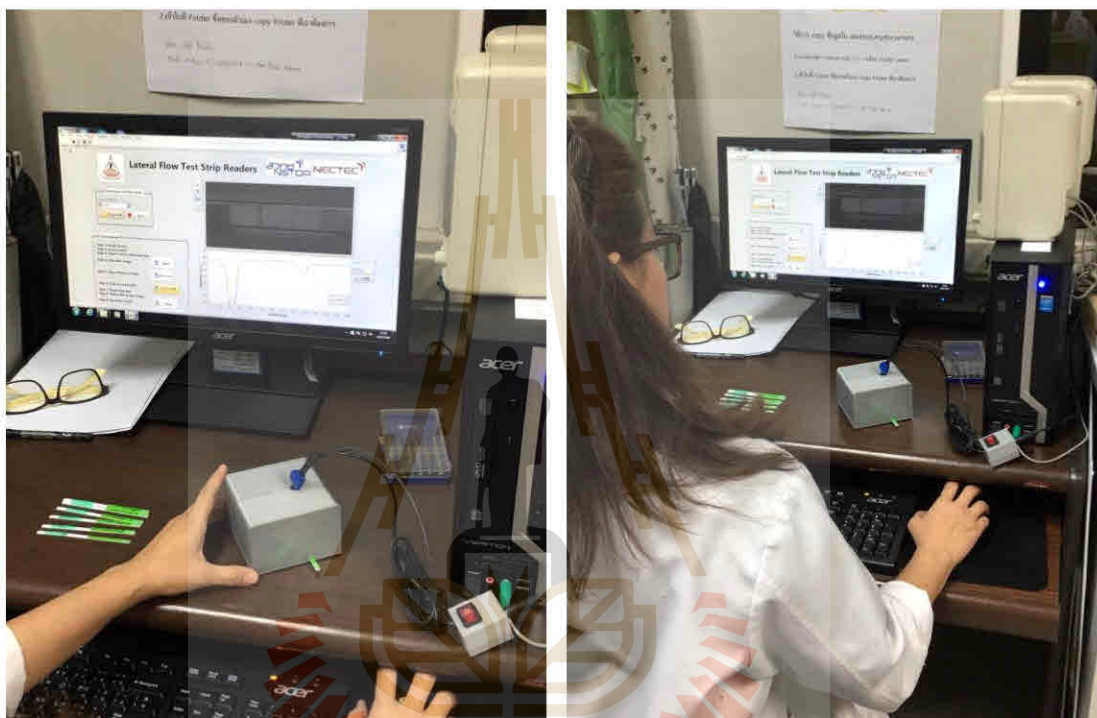
- |              |   |
|--------------|---|
| ขั้นตอนที่ 1 | ใส่ชุดทดสอบที่ยังไม่ได้ใช้งานเข้าไปในเครื่องอ่านแถบสี สร้าง ROI วางไว้กึ่งกลางชุดทดสอบ  |
| ขั้นตอนที่ 2 | บันทึกค่าภาพอ้างอิง (Reference image) ทำการปิดแหล่งกำเนิดแสง และบันทึกค่าภาพเมื่อปิดแหล่งกำเนิดแสง (Dark image)   |
| ขั้นตอนที่ 3 | ใส่ชุดทดสอบที่ต้องการวิเคราะห์เข้าไปในช่องเสียบชุดทดสอบ จัดตำแหน่งให้แถบควบคุมและแถบทดสอบอยู่กึ่งกลาง ROI ที่สร้างขึ้นมาก่อนหน้า  |
| ขั้นตอนที่ 4 | กราฟ Line profile ซึ่งแสดงค่าการสะท้อนแสงที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนชุดทดสอบค่าการสะท้อนแสงที่อ่านได้ในขั้นตอนนี้เป็นค่าที่คำนวณจากสมการที่ (3-1) และการคำนวณค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่ตำแหน่งแถบทดสอบ ( $\Delta I_r$ ) จะปรากฏขึ้นที่หน้าจอ |
| ขั้นตอนที่ 5 | บันทึกค่ากราฟ Line profile เพื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์   |

การทดลองสำหรับเครื่องอ่านโดยใช้โทรศัพท์แบบพกพาเป็นอุปกรณ์รับภาพ มีขั้นตอนการทดลองเหมือนกับการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น ต่างกันเล็กน้อยตรงที่ เมื่อใช้เครื่องอ่านบันทึกภาพแถบสีชุดทดสอบแล้ว ต้องส่งข้อมูลภาพไปประมวลผลต่อที่คอมพิวเตอร์

## 4.3 การคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ (Detection limit)

ในงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างชุดทดสอบโรคพิษจำนวน 6 ความเข้มข้น ที่มีความเข้มข้น เท่ากับ  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  และตัวอย่างพืชที่ไม่เป็นโรค (Healthy) ขั้นตอนการใช้ชุดทดสอบ ขั้นแรกเตรียมใบพืชใส่ลงในถุง และดูดบัพเฟอร์ให้เต็มหลอดดูดที่เตรียมให้ ใส่ลงในถุง 2 ครั้ง (ประมาณ 2.5 ml) บดใบพืชจนละเอียดและใช้หลอดดูดเฉพาะส่วนน้ำใส ควรระวังไม่ให้กาก

ใบพีชปนมาด้วย จากนั้นนำน้ำคั้นใบพีชใส่ลงในหลอดที่เตรียมไว้ให้ (ประมาณ 0.25 ml) อย่าให้เกินขีดขาวของหลอดทดลอง แล้วนำชุดตรวจจุ่มลงในน้ำคั้นใบพีชแช่ทิ้งไว้ 5 – 10 นาที และอ่านผลทดสอบโดยใส่ชุดทดสอบลงในเครื่องอ่านแถบสีที่พัฒนาขึ้นเพื่ออ่านค่าแถบสี ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง ดังรูป 4.3



**รูปที่ 4.3** การใช้งานเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้น สำหรับชุดตรวจโรคผลเน่าแบคทีเรียของพืชตระกูลแตง ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติในการอ่านค่าแถบสีที่เกิดบนชุดทดสอบ ผู้ใช้ต้องกำหนด ROI ให้ครอบคลุมแถบควบคุมและแถบทดสอบ

เมื่อพล็อตกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มแสงภายใน ROI กับระยะทางตามแนวของชุดทดสอบจะได้กราฟ Line profile วัดค่าความเข้มแสงที่ลดลงที่บริเวณกึ่งกลางแถบทดสอบ ( $\Delta I_r$ ) สำหรับแต่ละความเข้มข้น คำนวณหาค่าเฉลี่ยของความเข้มแสงที่ลดลงละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 5 ครั้ง หาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างน้อยที่สุดที่สามารถวัดได้ด้วยเครื่องมือนี้

(Detection limit) โดยใช้นิยามเท่ากับค่าการสะท้อนแสงที่วัดได้จากตัวอย่างพืชที่ไม่เป็นโรคบวกกับ 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $\sigma$ ) ที่วัดได้จากตัวอย่างพืชที่ไม่เป็นโรค ( $\Delta I_{Tmin} = \Delta I_{THealthy} + 3\sigma$ )

#### 4.4 การปรับเวลาในการรับภาพของกล้อง (Exposure time)

การทดลองศึกษาผลการปรับพารามิเตอร์ของกล้อง ต่อค่าการสะท้อนแสงที่แถบทดสอบ ในช่วงแรกของการศึกษาจะตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ บนซอฟต์แวร์ของกล้องเว็บแคม (Logitech webcam software) และซอฟต์แวร์ของกล้องโทรศัพท์แบบพกพา (ProCam app) ให้คงที่ แต่จะทำการปรับค่า Exposure time ของกล้องตั้งแต่ค่อยไปหามาก เมื่อได้ข้อสรุปที่ชัดเจนแล้ว จึงจะนำผลการศึกษาที่ได้ไปปรับใช้กับเครื่องอ่านแถบสี การกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของกล้องกำหนดดังต่อไปนี้

การตั้งค่าพารามิเตอร์ของกล้องเว็บแคม:

- Gain = 16
- Brightness = 50%
- Contrast = 15%
- Exposure times = 0.015, 0.031, 0.0625, 0.125 และ 0.25 s

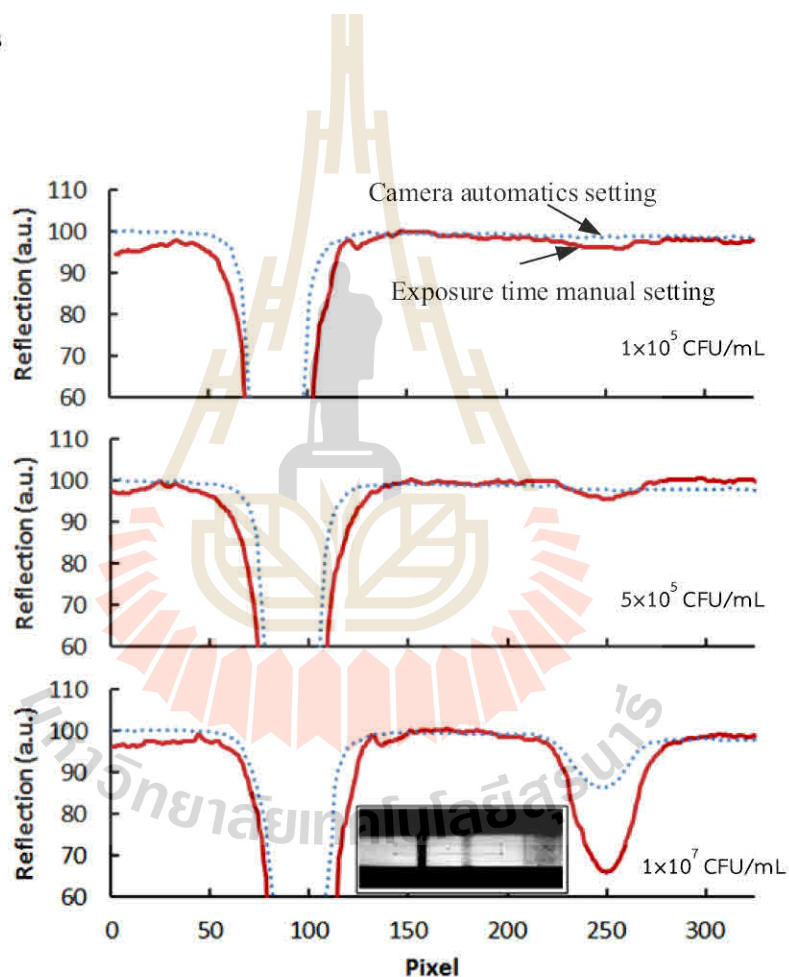
การตั้งค่าพารามิเตอร์ของกล้องโทรศัพท์แบบพกพา:

- ISO = 100
- Focus = 0.96
- White balance = 5200 K
- Exposure time = 0.004, 0.008, 0.0167, 0.022, 0.067 s

กล้องแต่ละตัวจะทำการปรับค่าพารามิเตอร์ได้ไม่เหมือนกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของกล้องที่ใช้

#### 4.5 ผลการทดลองเบื้องต้น

ในช่วงแรกของการพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่าย พบว่าเมื่อตั้งค่า Exposure time หรือเวลาในการรับแสงของกล้องรับภาพ ให้สั้นกว่าค่าที่ซอฟต์แวร์ของกล้องเลือกให้ (Automatic setting) จะทำให้ภาพแถบทดสอบมืดลง แต่ให้ค่าความเข้มแสงที่  $\Delta I_T$  ที่แถบทดสอบ กลับให้ผลดีกว่าค่าที่ซอฟต์แวร์เลือกให้ ดังรูปที่ 4.4 ซึ่งการตั้งค่า Exposure time ของกล้องมีดีกว่าปกติในการถ่ายภาพที่เรียกว่า Under exposure นั้นอาจทำให้ได้ค่า Detection limit ดีกว่า ทั้งนี้ ซอฟต์แวร์ของกล้องรับภาพจะเลือกค่า Exposure time ที่ทำให้ภาพมีความชัดเจน หรือเรียกว่าภาพ แบบ Midtones



รูปที่ 4.4 Line profile ของภาพถ่ายแถบสีชุดทดสอบเปรียบเทียบระหว่างภาพที่ตั้งค่า Exposure time แบบ Under exposure กับภาพ Automatic settings ของชุดทดสอบเชื้อ *Aac* ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^5$  CFU/mL,  $5 \times 10^5$  CFU/mL และ  $1 \times 10^7$  CFU/mL ตามลำดับ



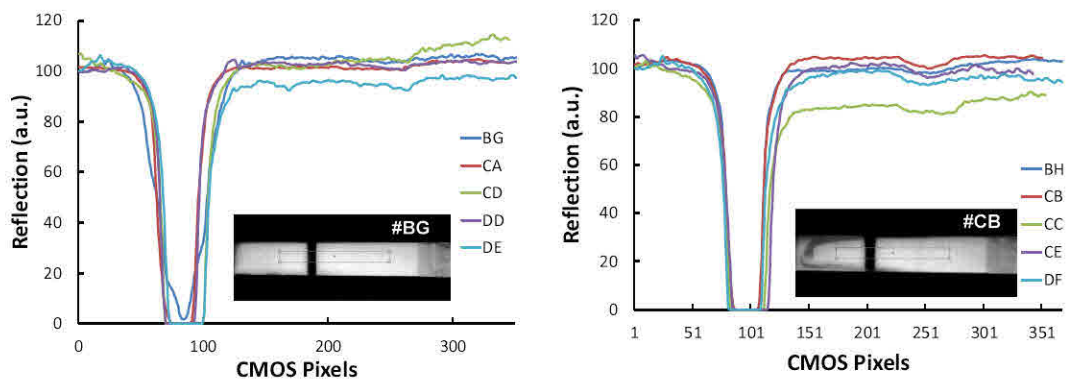
แม้ว่าจะยังไม่ทราบเหตุผลที่ชัดเจนว่าทำไมการตั้งค่า Exposure time แบบ Under exposure ให้ผลการวัดค่าความเข้มแสงจากแถบทดสอบดีกว่า ผู้วิจัยจะใช้การตั้งค่ากล้องรับภาพดังกล่าวในการหาค่า Detection limit ของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเมื่อใช้กับชุดทดสอบ เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลการวัดด้วยตาเปล่า

#### 4.6 Detection limit เมื่อใช้การอ่านค่าแบบ Under exposure

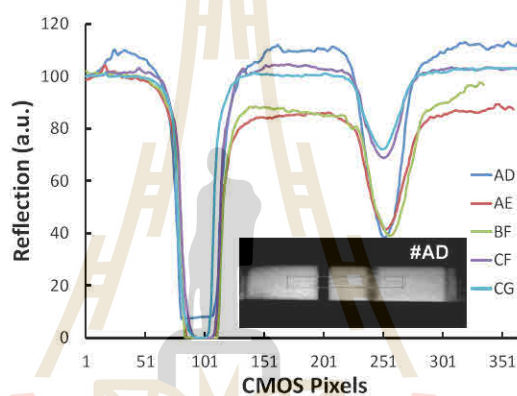
รูปที่ 4.5 แสดง Line profile สำหรับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Aac* เท่ากับ 0 (Healthy),  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^7$  CFU/mL และรูปที่ 4.6 แสดงผลการทดลองวัดค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) พล็อตเทียบกับความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Aac* ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า เมื่อความเข้มข้นในสารตัวอย่างสูงขึ้น ค่า  $\Delta I_T$  บริเวณแถบทดสอบจะสูงขึ้น

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลในรูปที่ 4.6 พบว่า Detection limit ของชุดทดสอบนี้ เมื่อใช้เครื่องอ่านแถบสีที่พัฒนาขึ้น คือ  $5 \times 10^5$  CFU/mL

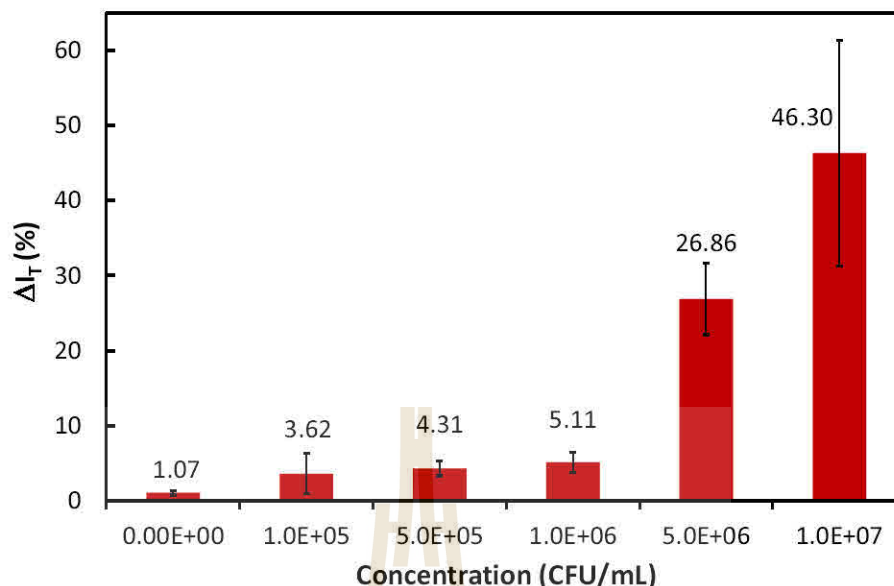




(ก) Healthy samples

(ข)  $5 \times 10^5$  CFU/mL(ค)  $1 \times 10^7$  CFU/mL

รูปที่ 4.5 Line profiles จากชุดทดสอบที่สารตัวอย่างมีความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Aac* ต่างกัน (ก) ตัวอย่างจากพืชที่ไม่เป็นโรค (Healthy samples) (ข) ตัวอย่างความเข้มข้น  $5 \times 10^5$  CFU/mL และ (ค) ตัวอย่างความเข้มข้น  $1 \times 10^7$  CFU/mL



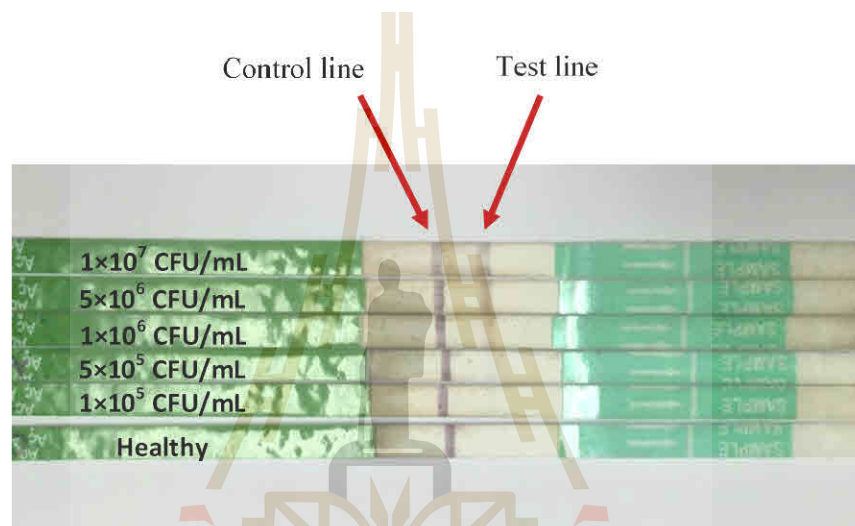
**รูปที่ 4.6** ค่าการสะท้อนแสงลดลงเฉลี่ยที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_7$ ) สำหรับสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Aac* ต่าง ๆ เมื่อใช้แหล่งกำเนิดแสงไดโอดเปล่งแสงสีเขียว ความเข้มข้น 0 CFU/mL ในรูป หมายถึงตัวอย่างจากพืชที่ไม่เป็นโรค (Healthy samples) ข้อมูลแต่ละความเข้มข้นได้จากการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง

#### 4.7 Detection limit ของชุดทดสอบกรณีระบุแถบสีด้วยตาเปล่า

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการอ่านแถบสีชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Aac* ใช้ผู้ทดสอบทั้งหมด 9 คน เป็นพนักงานของศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ 7 คน และนักศึกษาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 2 คน ผู้ทดสอบทุกคนไม่ทราบข้อมูลความเข้มข้นของแต่ละชุดทดสอบ จำนวนชุดทดสอบทั้งหมด 30 ชุด โดยใช้สารตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย 6 ความเข้มข้น (รูปที่ 4.7) คือ Healthy,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^7$  CFU/ml อย่างละ 5 ชุดทดสอบ ซึ่งแต่ละชุดทดสอบจะมีรหัสกำกับ เช่น AA, AB, CF, DE เป็นต้น โดยที่การเรียงรหัสจะไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ผู้ทดสอบจะทำการอ่านแถบสีชุดทดสอบทั้งหมด 30 แถบ ในคราวเดียวกัน ชุดทดสอบจะมีทั้งที่เกิดแถบสีและไม่เกิดแถบสีปะปนกัน

ผู้วิจัยได้ทำแบบสอบถามให้สำหรับผู้ทดสอบ ว่ามองเห็นแถบสีที่บริเวณแถบทดสอบหรือไม่ โดยให้ระบุเครื่องหมาย “+” ในแบบสอบถามถ้าบริเวณแถบทดสอบเกิดสีเข้มหรือสีจาง ในกรณีที่มองไม่เห็นแถบสีที่เกิดขึ้นบริเวณดังกล่าว ให้ระบุเครื่องหมาย “-” และกรณีที่ไม่แน่ใจว่าเกิด

แถบสีหรือไม่เกิดแถบสีให้ระบุเครื่องหมาย “+/-” ลงในแบบสอบถาม สำหรับชุดทดสอบที่มีความเข้มข้น  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^7$  CFU/ml ถ้าผู้ทดสอบระบุเครื่องหมาย “+” ลงในแบบทดสอบจะแปลผลว่า ผู้ทดสอบอ่านแถบสีได้ถูกต้อง แต่ถ้าผู้ทดสอบระบุเครื่องหมาย “-” จะแปลผลว่า ผู้ทดสอบอ่านแถบสีไม่ถูกต้อง ส่วนในกรณีชุดทดสอบที่ทดลองกับ Healthy ถ้าผู้ทดสอบระบุเครื่องหมาย “-” จะแปลผลว่า ผู้ทดสอบอ่านแถบสีได้ถูกต้อง แต่ถ้าผู้ทดสอบระบุเครื่องหมาย “+” จะแปลผลว่า ผู้ทดสอบอ่านแถบสีไม่ถูกต้อง



รูปที่ 4.7 การเกิดแถบสีชุดทดสอบของเชื้อแบคทีเรีย *Aac* ที่ความเข้มข้น Healthy,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^7$  CFU/ml

ตารางที่ 4.1 ผลการอ่านค่าแถบสีชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Aac* ที่ความเข้มข้น Healthy,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^7$  CFU/ml (N=5) โดยใช้การระบุการเกิดแถบสีด้วยตาเปล่าจากผู้ทดสอบทั้งหมด 9 คน

รหัสแถบ ทดสอบ	ความเข้มข้น (CFU/ml)	ผลการทดสอบ		
		จำนวนคนที่ทาย ถูก	จำนวนคนที่ผิด	จำนวนคนที่ไม่ แน่ใจ
BG	Healthy	7	0	2
CA		9	0	0
CD		8	0	1
DD		9	0	0
DE		9	0	0
<i>Average</i>		<i>8.4</i>	<i>0.0</i>	<i>0.6</i>
DB	$1 \times 10^5$	0	9	0
AH		0	9	0
AF		0	8	1
AG		0	9	0
AA		1	7	1
<i>Average</i>		<i>0.2</i>	<i>8.4</i>	<i>0.4</i>
BH	$5 \times 10^5$	0	9	0
CB		0	9	0
CC		0	9	0
DF		0	9	0
CE		0	9	0
<i>Average</i>		<i>0.0</i>	<i>9.0</i>	<i>0.0</i>
BD	$1 \times 10^6$	0	8	1
DC		0	9	0
CH		0	8	1
DA		0	8	1
BB		6	2	1
<i>Average</i>		<i>1.2</i>	<i>7.0</i>	<i>0.8</i>

ตารางที่ 4.1 ผลการอ่านค่าแถบสีชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย Aac ที่ความเข้มข้น Healthy,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^7$  CFU/ml (N=5) โดยใช้การระบุการเกิดแถบสีด้วยตาเปล่า จากผู้ทดสอบทั้งหมด 9 คน (ต่อ)

BC	$5 \times 10^6$	9	0	0
BA		9	0	0
BE		9	0	0
AB		9	0	0
AC		9	0	0
<i>Average</i>		<i>9.0</i>	<i>0.0</i>	<i>0.0</i>
BF	$1 \times 10^7$	9	0	0
AD		9	0	0
AE		9	0	0
CF		9	0	0
CG		9	0	0
<i>Average</i>		<i>9.0</i>	<i>0.0</i>	<i>0.0</i>

ในแต่ละความเข้มข้นของสารตัวอย่างจะมีข้อมูลการระบุแถบสีทั้งหมดจากผู้ทดสอบ 30 ข้อมูล โดยแต่ละชุดทดสอบจะมีข้อมูลการอ่านค่าแถบสีจากผู้ทดสอบ 9 คน จากตารางที่ 4.1 แสดงผลการอ่านแถบสีชุดทดสอบด้วยตาเปล่า สำหรับความเข้มข้น Healthy พบว่า ผู้ทดสอบระบุการอ่านค่าแถบสีได้ถูกต้อง 93% จากชุดทดสอบทั้งหมด มี 7% ที่ระบุว่าไม่แน่ใจว่ามีแถบสีเกิดขึ้นหรือไม่ และไม่มีผู้ทดสอบคนใดระบุผิดว่ามีแถบสีเกิดขึ้น ที่สารตัวอย่างมีความเข้มข้น  $5 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^7$  CFU/ml ความเข้มข้นนี้จะเกิดแถบสีบริเวณที่แถบทดสอบอย่างชัดเจน ผู้ทดสอบอ่านค่าแถบสีได้ถูกต้อง 100% ไม่มีผู้ทดสอบคนไหนระบุการเกิดแถบสีได้ไม่ถูกต้อง ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  CFU/ml ผู้ทดสอบจำนวน 78% ระบุว่าไม่มีแถบสีที่แถบทดสอบ เป็นการแปลผลการอ่านค่าที่ผิด ทั้งนี้มี 1 ชุดทดสอบ (#BB) ที่ผู้ทดสอบ 67% ระบุว่าเกิดแถบสีที่ชุดทดสอบ ส่วนชุดทดสอบที่เหลืออีก 4 ชุด ที่ความเข้มข้นนี้ ผู้ทดสอบเกือบทั้งหมดระบุว่าไม่มีแถบสีเกิดขึ้น

Detection limit กรณีการอ่านค่าแถบสีด้วยตาเปล่าจะนิยามเท่ากับ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ผู้ทดสอบทุกคนที่มีความผิดปกติทางสายตา ระบุแถบสีได้ถูกต้อง 100% จากข้อมูลในตารางที่ 4.1 สรุปได้ว่า Detection limit ของชุดทดสอบกรณีการอ่านค่าแถบสีด้วยตาเปล่าเท่ากับ  $5 \times 10^6$  CFU/ml เมื่อเทียบกับค่า Detection limit เมื่อใช้เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบในหัวข้อที่แล้ว พบว่าการอ่านแถบสีด้วยเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นดีกว่าการอ่านแถบสีด้วยตาเปล่า 10 เท่า

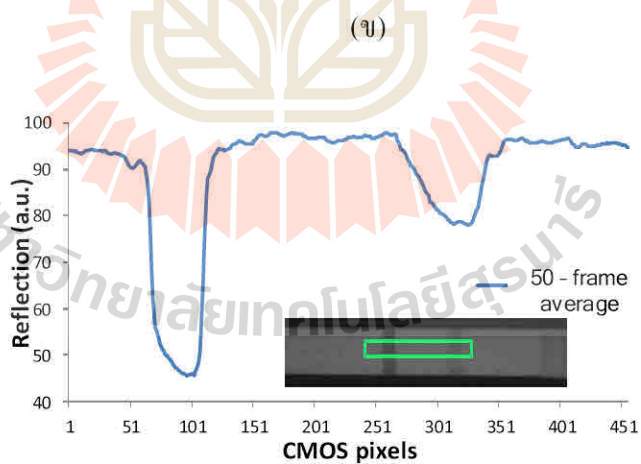
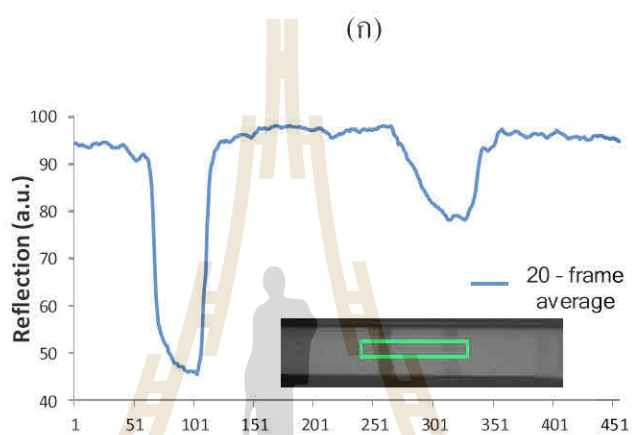
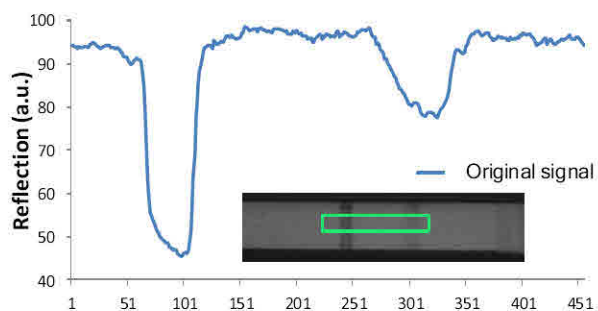
#### 4.8 ผลการวัดค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน เมื่อใช้จำนวนเฟรมภาพเฉลี่ยต่างกัน

สัญญาณรบกวนที่เกิดขึ้นในภาพจากกล้องดิจิทัลนั้นเป็นสัญญาณรบกวนแบบสุ่ม (Random noise) สัญญาณรบกวนนี้สามารถเกิดขึ้นได้ทุกช่วงการบันทึกภาพ รูปแบบการเกิดสัญญาณรบกวนแบบ Random Noise จะเปลี่ยนไปกับภาพที่บันทึกในแต่ละครั้ง และมีค่ามากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

ค่าเฉลี่ยจากภาพหลายภาพเป็นวิธีที่นิยมใช้สำหรับลดสัญญาณรบกวน เนื่องจากการหาค่าเฉลี่ยไม่กระทบต่อรายละเอียดของภาพ และยังเพิ่มอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal to noise ratio) ของภาพ รูปที่ 4.8 แสดง Line profile ของตัวอย่างชุดทดสอบที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Aac* เท่ากับ  $1 \times 10^7$  CFU/mL ในจำนวนเฟรมภาพเฉลี่ยที่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าภาพที่ไม่ทำเฟรมเฉลี่ย ค่าการสะท้อนแสงที่ได้บนชุดทดสอบไม่เรียบ แต่เมื่อใช้เฟรมเฉลี่ยที่ 20 ภาพ Line profile ที่ได้เรียบขึ้น สังเกตที่บริเวณพื้นขาวของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนดูเรียบสม่ำเสมอกว่าภาพที่ไม่ได้ทำเฟรมเฉลี่ย และเมื่อใช้เฟรมเฉลี่ยของภาพเพิ่มขึ้นสัญญาณที่ได้จะยิ่งเรียบ เป็นการเพิ่ม Signal to noise ratio ของสัญญาณ สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการใช้เฟรมเฉลี่ยที่ 50 เฟรม เพื่อไม่ให้เวลาในการประมวลผลภาพของโปรแกรมใช้เวลานานเกินไป

จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าภาพที่ไม่ทำเฟรมเฉลี่ย ค่าการสะท้อนแสงที่ได้บนชุดทดสอบไม่เรียบ แต่เมื่อใช้เฟรมเฉลี่ยที่ 20 ภาพ Line profile ที่ได้เรียบขึ้น สังเกตที่บริเวณพื้นขาวของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนดูเรียบสม่ำเสมอกว่าภาพที่ไม่ได้ทำเฟรมเฉลี่ย และเมื่อใช้เฟรมเฉลี่ยของภาพเพิ่มขึ้นสัญญาณที่ได้จะยิ่งเรียบ เป็นการเพิ่ม Signal to noise ratio ของสัญญาณ สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการใช้เฟรมเฉลี่ยที่ 50 เฟรม เพื่อไม่ให้เวลาในการประมวลผลภาพของโปรแกรมใช้เวลานานเกินไป



(ค)

รูปที่ 4.8 Line profile จากชุดทดสอบที่สารตัวอย่างมีความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Aac* เท่ากับ  $1 \times 10^7$  CFU/mL (ก) 1 เฟรม (ข) 20 เฟรม และ (ค) 50 เฟรม



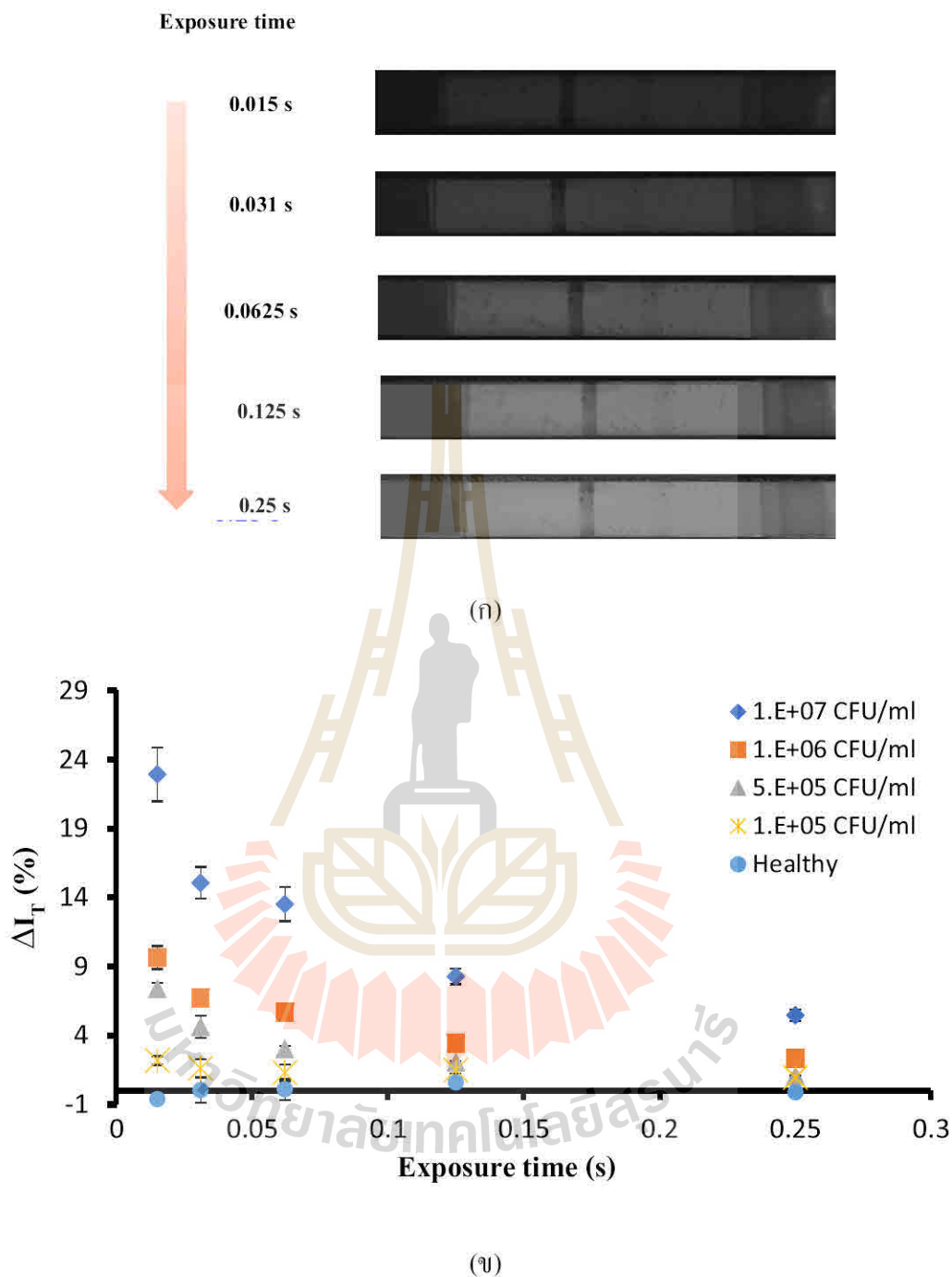
#### 4.9 ผลการปรับค่า Exposure time ของกล้องเว็บแคม

จากผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่า Exposure time ของกล้องรับภาพ มีผลต่อการอ่านค่าความเข้มแสง  $\Delta I_T$  และ Detection limit ของกล้องรับภาพ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาว่าควรตั้งค่า Exposure time อย่างไรจึงจะให้ผลการวัดที่ดีที่สุด

รูปที่ 4.9 แสดงผลการทดลองวัดค่า  $\Delta I_T$  สำหรับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Aac* เท่ากับ Healthy,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^7$  CFU/mL ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง เมื่อใช้ Exposure time อยู่ในช่วง 0.015 s – 0.25 s โดยใช้ซอฟต์แวร์ของกล้อง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ Exposure time ต่ำ ค่า  $\Delta I_T$  ที่ได้จะสูงขึ้น ในกรณีนี้การปรับค่า Exposure time ต่ำสุดที่กล้องสามารถปรับได้ขึ้นอยู่กับค่า Gain ที่ตั้งไว้ จากการทดลองตั้งค่า Gain ไว้ที่ 16 จึงทำให้ค่า Exposure time ต่ำสุดที่ปรับได้อยู่ที่ 0.015 s และค่าสูงสุดที่สามารถอ่านค่าการสะท้อนแสงแต่ละตำแหน่งบนชุดทดสอบอยู่ที่ 0.25 s เนื่องจากถ้าปรับค่า Exposure time สูงเกินไปทำให้ค่าการสะท้อนแสงที่วัดได้อ้อมตัวเป็นค่าความเข้มแสงเดียว

จากกราฟจะเห็นว่าค่า Exposure time มีผลต่อค่า  $\Delta I_T$  ดังนั้นการตั้งค่า Exposure time ต่างกันทำให้ได้ค่า  $\Delta I_T$  และ Detection limit ต่างกัน

ข้อมูลจากกราฟที่ 4.9 ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) เปรียบเทียบผลจากการปรับค่า Exposure time พบว่าที่ Exposure time ต่ำ ค่า  $\Delta I_T$  ที่ได้จะสูงขึ้น เมื่อ Exposure time เท่ากับ 0.015 s มี Detection limit ของชุดทดสอบ *Aac* เท่ากับ  $1 \times 10^5$  CFU/mL เป็นความเข้มข้นต่ำสุด ในกรณีที่ปรับค่า Exposure time ต่ำกว่าค่า 0.015 s ไม่สามารถเห็นตำแหน่งของแถบสีบนภาพชุดทดสอบได้ เนื่องจากเปิดเวลารับแสงน้อยเกินไปทำให้ภาพชุดทดสอบมืด

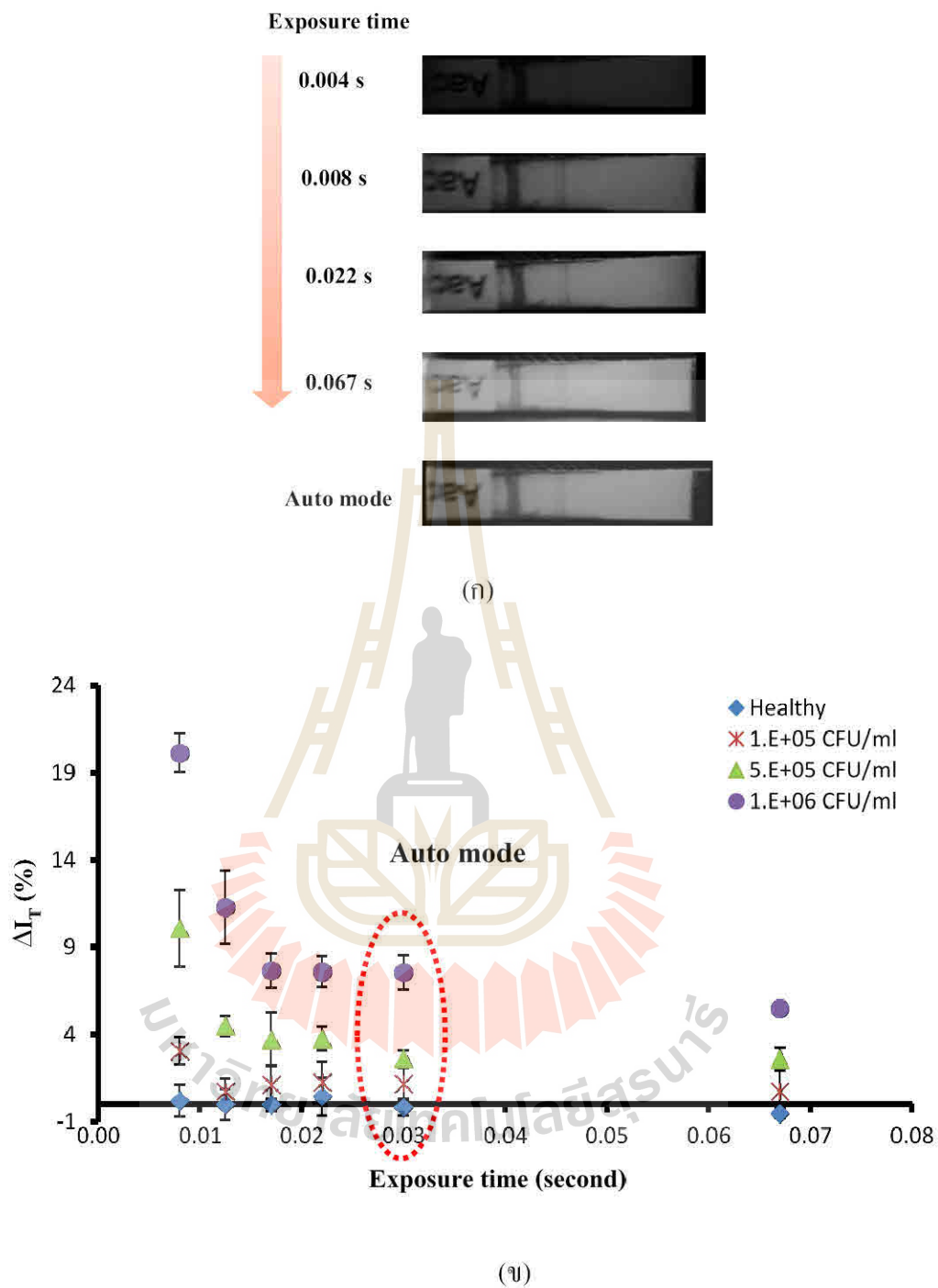


รูปที่ 4.9 (ก) ภาพชุดทดสอบแบคทีเรีย *Aac* ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  CFU/mL แต่ละ Exposure time ค่า และ (ข) ค่าการสะท้อนแสงเฉลี่ยที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) แต่ละ Exposure time และที่ความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Aac* ต่าง ๆ

#### 4.10 ผลการปรับค่า Exposure time ของกล้องโทรศัพท์แบบพกพา

รูปที่ 4.10 แสดงผลการทดลองวัดค่า  $\Delta I_T$  สำหรับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Aac* เท่ากับ Healthy,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^7$  CFU/mL ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง เมื่อใช้ Exposure time อยู่ในช่วง 0.008-0.067 s โดยใช้ซอฟต์แวร์ ProCam และทำการเปรียบเทียบกับค่าที่ซอฟต์แวร์เลือกให้ ซึ่งมี Exposure time เท่ากับ 0.03 s จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ Exposure time ต่ำ ค่า  $\Delta I_T$  ที่ได้จะสูงขึ้น

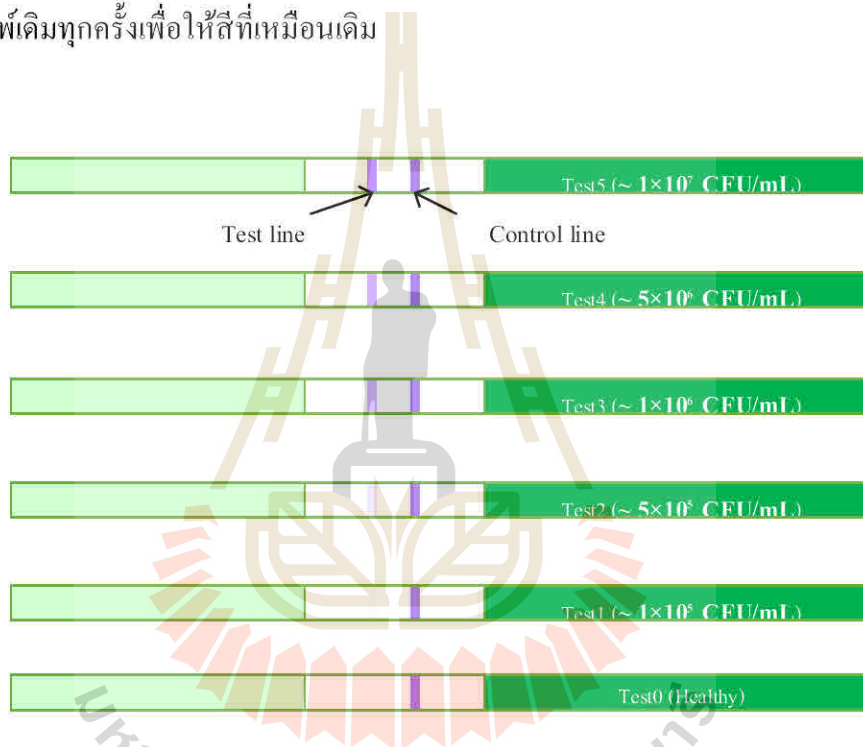
ข้อมูลจากกราฟที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่า Exposure time มีผลต่อค่า  $\Delta I_T$  ดังนั้นการตั้งค่า Exposure time ของกล้องต่างกันทำให้ได้ค่า  $\Delta I_T$  และ Detection limit ต่างกัน คล้ายกับกรณีของกล้องเว็บแคม เมื่อ Exposure time เท่ากับ 0.008 s มี Detection limit ของชุดทดสอบ *Aac* เท่ากับ  $1 \times 10^5$  CFU/mL เป็นความเข้มข้นต่ำสุด ซึ่งจะเห็นว่าค่า Exposure time ของกล้องแต่ละรุ่นนั้นปรับได้ไม่เท่ากัน ดังนั้นไม่ว่าจะใช้กล้องรุ่นไหน ควรเลือก Exposure time ที่ให้ค่า Detection limit ของเครื่องอ่านแถบสีต่ำสุด



รูปที่ 4.10 (ก) ภาพชุดทดสอบแบคทีเรีย *Aac* ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  CFU/mL แต่ละ Exposure time และ (ข) ค่าการสะท้อนแสงเฉลี่ยที่ลดลงที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) ที่ความเข้มของแบคทีเรียต่าง ๆ แต่ละ Exposure time เมื่อใช้กล้องโทรศัพท์กรณีถ่ายภาพแบบ Auto mode ค่า Exposure time จะเท่ากับ 0.03 s

#### 4.11 ผลการปรับค่าพารามิเตอร์อื่น ๆ ของกล้อง

การทดลองศึกษาผลการปรับพารามิเตอร์ของกล้องต่อค่าการสะท้อนแสงที่แถบทดสอบ จำเป็นต้องใช้ชุดทดสอบจำนวนมาก เนื่องจากชุดทดสอบโรคผลเน่าแบคทีเรีย *Aac* เพื่อนำมาตรวจสอบนั้น (ไบโอเทค) ต้องใช้เวลาในการเตรียมเชื้อตัวอย่างแบคทีเรียและยุ่งยาก และด้วยงบวิจัยที่มีจำกัด ในการศึกษาต่อไปจะใช้วิธีพิมพ์แถบสีชุดทดสอบด้วยเครื่องพิมพ์ (Fuji Xerox DocuPrint CP405d) โดยจะพิมพ์ให้แถบสีมีค่าใกล้เคียงกับแถบสีชุดทดสอบของ *Aac* ดังรูปที่ 4.11 เมื่อพิมพ์แถบสีจนได้ใกล้เคียงกับชุดทดสอบแล้ว ก็จะบันทึกค่า RGB ของแต่ละแถบสีไว้ ในการพิมพ์จะใช้เครื่องพิมพ์เดิมทุกครั้งเพื่อให้สีที่เหมือนเดิม



รูปที่ 4.11 ภาพชุดทดสอบที่พิมพ์ขึ้นทำการเทียบเคียงสีให้ใกล้เคียงกับแถบสีของชุดทดสอบ *Aac*

ตารางที่ 4.2 ค่า RGB ของแถบสีที่พิมพ์ขึ้นที่มีแถบสีใกล้เคียงกับแถบสีชุดทดสอบ *Aac* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Sample Name	RGB Value					
	Test line			Control line		
	R	G	B	R	G	B
Test1 ( $\sim 1 \times 10^7$ CFU/mL)	184	132	255	180	65	139
Test2 ( $\sim 5 \times 10^6$ CFU/mL)	204	166	255	180	65	139
Test3 ( $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL)	214	183	255	180	65	139
Test4 ( $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL)	239	227	255	180	65	139
Test5 ( $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL)	249	244	255	180	65	139
Test0 ( $\sim$ Healthy)	255	255	255	180	65	139

#### 4.11.1 ผลการปรับค่า Contrast ของกล้อง

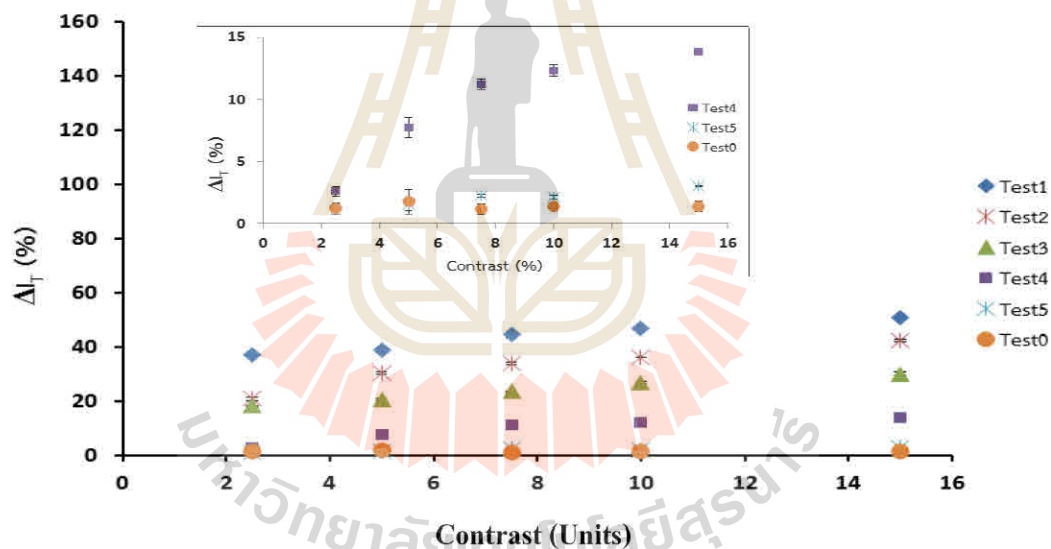
ในการทดลอง จะใช้ต้นแบบกล้องเว็บแคมในการถ่ายภาพ การปรับค่า Contrast จะใช้ซอฟต์แวร์ของผู้ผลิตที่ให้มาพร้อมกับกล้อง ซึ่งกล้องรุ่นนี้สามารถปรับค่า Contrast ได้ในช่วง 0 – 15 หน่วย ตั้งค่า Exposure time = 0.031 s และ Gain = 16 หน่วย

เมื่อปรับค่า Contrast ที่ 0 หน่วย ส่งผลให้ภาพสว่างเท่ากันหมดทั้งภาพ ไม่สามารถหาความเข้มแสงแต่ละตำแหน่งบนชุดทดสอบได้ เพราะค่าความเข้มแสงที่ได้แต่ละตำแหน่งบนชุดทดสอบเป็นค่าเดียวกันหมด ดังนั้นจึงเริ่มใช้ค่า Contrast ที่ 2.5 - 15 หน่วย ส่วนกรณีที่ปรับค่า Contrast เกิน 15 หน่วยขึ้นไป ภาพที่ได้จะมีค่าความเข้มแสงอยู่ที่ 0 หน่วยทำให้เกิดภาพมืด จึงไม่ใช้ค่า Contrast นี้

รูปที่ 4.12 แสดงผลการทดลองวัดค่า  $\Delta I_T$  สำหรับชุดทดสอบที่พิมพ์ขึ้นมา ตั้งแต่ Test0, Test1, Test2, Test3, Test4 และ Test5 เมื่อใช้ค่า Contrast ต่างกันทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 5

ครั้ง พบว่า Contrast ที่ 15% มีค่า  $\Delta I_T$  สูงสุด และมี Detection limit ดีที่สุดอยู่ Test4 แต่เนื่องจากชุดทดสอบที่พิมพ์ขึ้นมาเป็นกระดาษเรียบ มีสีขาวล้วนเท่ากันสม่ำเสมอ ทำให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำ (Error bar ในรูป) การแยกแยะแถบสีจึงทำได้ง่าย ทั้งนี้เมื่อใช้ค่า Contrast สูงขึ้นค่าความเข้มแสงที่อ่านได้จะมีค่าต่ำลงหรือภาพที่ถ่ายได้จะมีดีขึ้น หรือมีค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนต่ำ เมื่อใช้กับตัวอย่างที่เป็นชุดทดสอบ Aac แผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนจะมีลักษณะขรุขระ ซึ่งอาจทำให้เกิดค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงได้ ดังนั้นการเพิ่มค่า Contrast อาจไม่ทำให้ค่า Limit of detection ดีขึ้นก็ได้

จากกราฟพบว่า การเปลี่ยนค่า Contrast ของกล้องจะทำให้ค่า  $\Delta I_T$  และ Detection limit ไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงไม่ควรใช้การตั้งค่าแบบ Auto mode แต่ควรทำการทดลองเพื่อหาค่า Contrast ที่ให้ค่า Detection limit ดีที่สุด



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบค่าการสะท้อนแสงเฉลี่ยที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) แต่ละ Contrast จากการทดลองซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง กับชุดทดสอบที่พิมพ์ขึ้นมา Test0, Test1, Test2, Test3, Test4 และ Test5

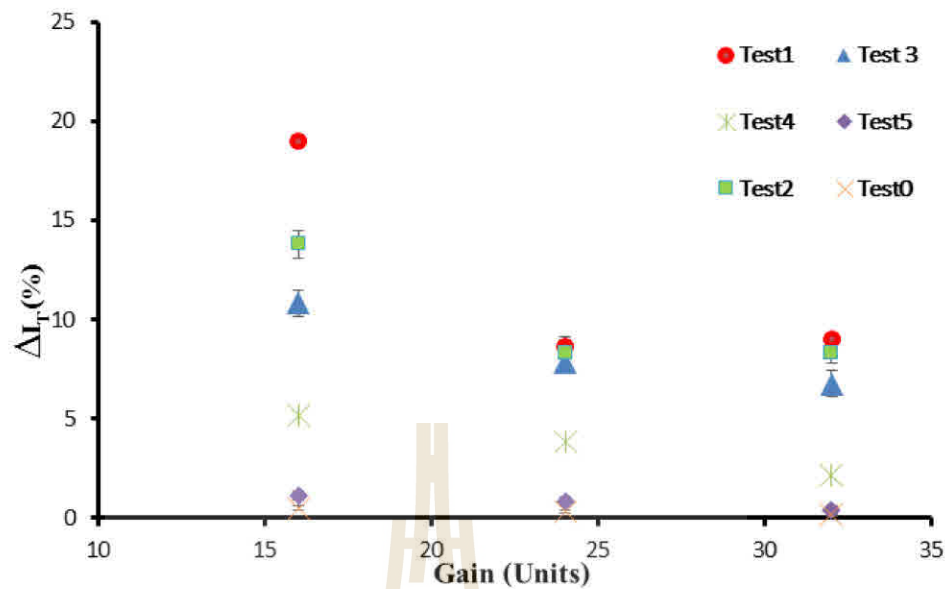
#### 4.11.2 ผลของการปรับค่า Gain ของกล้อง

ในการทดลอง จะใช้ต้นแบบกล้องเว็บแคมในการอ่านภาพ การปรับค่า Gain จะใช้ซอฟต์แวร์ของผู้ผลิตที่ให้มาพร้อมกับกล้อง ซึ่งกล้องรุ่นนี้สามารถปรับค่า Gain ได้ในช่วง 16 – 32 หน่วย ตั้งค่า Exposure time = 0.013 s และ Contrast = 15 หน่วย

จากรูปที่ 4.13 เมื่อปรับค่า Gain แสดงผลการทดลองวัดค่า  $\Delta I_T$  สำหรับชุดทดสอบที่เพิ่มพื้ขึ้นมา ตั้งแต่ Test0, Test1, Test2, Test3, Test4 และ Test5 เปรียบเทียบผลจากการปรับค่า Gain ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง พบว่า Gain เท่ากับ 16 หน่วย ทำให้มีค่า  $\Delta I_T$  สูงขึ้น และมี Detection limit ดีที่สุดอยู่ Test4 แต่เนื่องจากชุดทดสอบที่เพิ่มพื้ขึ้นมาเป็นกระดาษเรียบ มีสีขาวส่วนเท่ากันสม่ำเสมอ ทำให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำ (Error bar ในรูป) การแยกแยะแถบสีจึงทำได้ง่าย ทั้งนี้เมื่อใช้ค่า Gain ต่ำลงค่าความเข้มแสงที่อ่านได้จะมีค่าต่ำลงหรือภาพที่ถ่ายได้จะมีคี่ขึ้นหรือมีค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนต่ำ เมื่อใช้กับตัวอย่างที่เป็นชุดทดสอบ Aac แผ่นกระดาษในโตรเซลล์โลสมเมเบรอนจะมีลักษณะขรุขระ ซึ่งอาจทำให้เกิดค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงได้ ดังนั้นการลดค่า Gain อาจไม่ทำให้ค่า Detection limit ดีขึ้นก็ได้

จากกราฟที่ 4.13 พบว่าการเปลี่ยนค่า Gain เท่ากับ 16 หน่วยของกล้องจะทำให้ค่า  $\Delta I_T$  และ Detection limit ไม่เท่ากัน ที่ Gain เท่ากับ 24 และ เท่ากับ 32 หน่วยนั้น ค่า  $\Delta I_T$  ที่ได้ไม่ต่างกัน ดังนั้นจึงไม่ควรใช้การตั้งค่าแบบ Auto mode แต่ควรทำการทดลองเพื่อหาค่า Gain ของกล้องให้ได้ค่า Detection limit ดีที่สุด





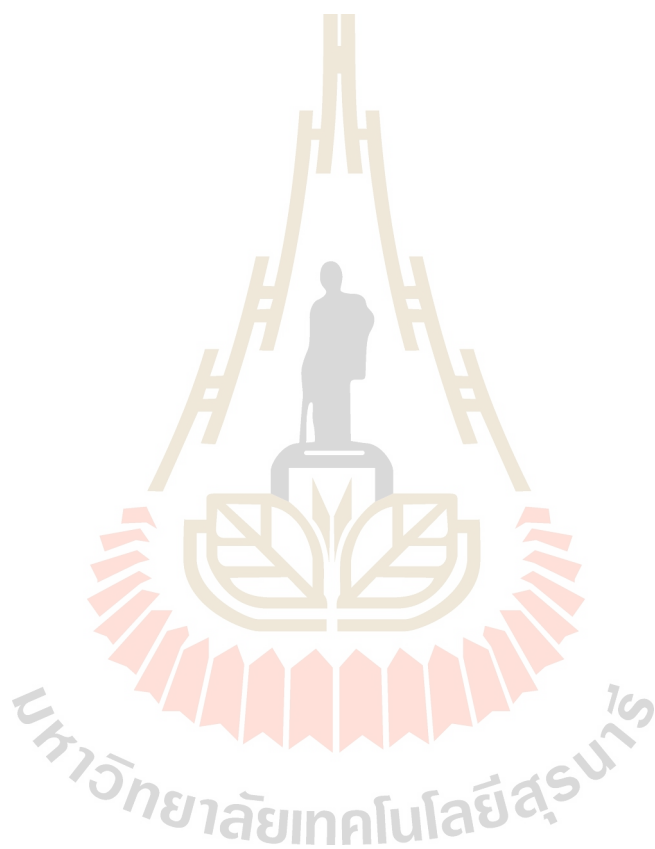
รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบค่าการสะท้อนแสงเฉลี่ยที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) แต่ละ Gain จากการทดลองซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง กับชุดทดสอบที่พิมพ์ขึ้นมา Test0, Test1, Test2, Test3, Test4 และ Test5

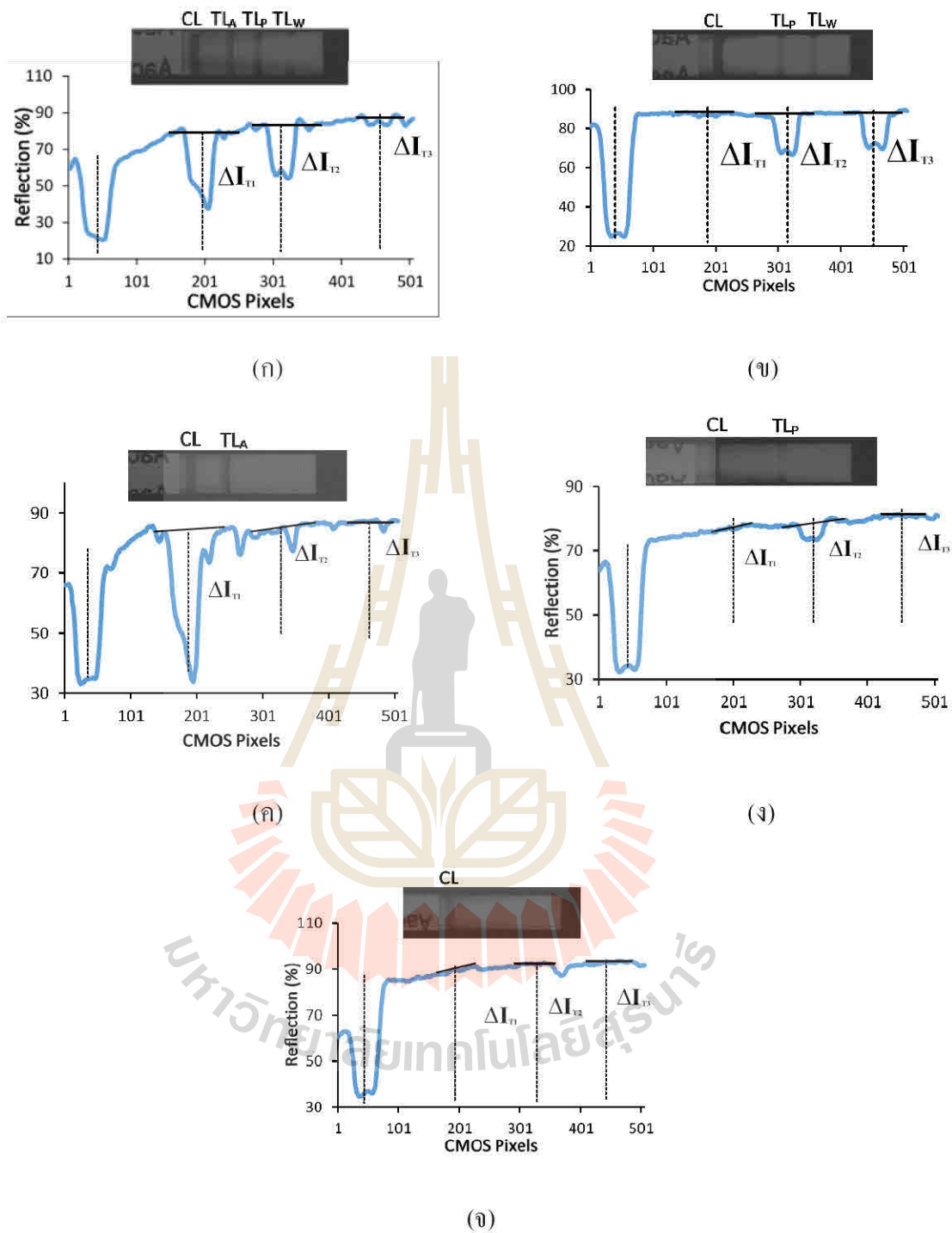
#### 4.12 ผลการทดลองกับชุดทดสอบแบบ Multiplex

เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมาก่อนหน้า สามารถนำมาใช้กับชุดทดสอบแบบ Multiplex สำหรับวัดค่าการสะท้อนแสงบนชุดทดสอบ เพื่อตรวจเชื้อก่อโรคพืชในกลุ่มแดง 3 ชนิดได้ในคราวเดียวกัน ได้แก่ เชื้อ Watermelon mosaic virus-2 (WMV-2) เชื้อ Potyvirus และเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) ดังรูปที่ 4.14 แสดงกราฟ Line profile ของชุดทดสอบแบบ Multiplex และตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดลองวัดค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) ของแถบดังกล่าว จากผลการทดลองไม่สามารถหา Detection limit ของเครื่องอ่านได้ เนื่องจากผู้วิจัยทดลองเพียง 1 ครั้ง เพื่อให้สามารถหาค่า Detection limit ของเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบแบบ Multiplex ต้องทำการทดลองเก็บผลเพิ่มเติม

ผลการทดสอบหาค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบทั้ง 3 แถบ เมื่อใช้ตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อทั้ง 3 ปน พบว่าค่าความเข้มแสง  $\Delta I_T$  เท่ากับ 0.58, 1.12 และ 0.17 % ตามลำดับ เมื่อพิจารณาตัวอย่างที่มีเชื้อ เช่น ตัวอย่าง A ซึ่งมีเชื้อทั้ง 3 ชนิด ค่าการสะท้อนแสง  $\Delta I_T$  ทั้ง 3 แถบมีค่าชัดเจนสำหรับตัวอย่าง D ซึ่งมีเชื้อ Potyvirus ค่าความเข้มแสง  $\Delta I_T$  จากแถบที่ 2 เท่ากับ 3.5% ซึ่งสูงกว่ากรณีไม่มีเชื้อ 3 เท่า ระบุได้จากผลการทดลองว่าเชื้อดังกล่าวอาจจะมียูจริงแต่มีความเข้มขั้นต่ำ ส่วน

แถบที่ 1 นั้นให้ค่าความเข้มแสงสูงกว่ากรณีไม่มีเชื้อ 2.3 เท่า ซึ่งระบุได้ว่าอาจจะมีเชื้อความเข้มข้นต่ำหรือไม่มีเชื้อก็ได้ และข้อมูลจากแถบที่ 3 ค่าความเข้มแสงที่อ่านได้ไม่ต่างจากกรณีไม่มีเชื้อ จึงระบุได้ว่าตัวอย่างไม่มีเชื้อ





รูปที่ 4.14 Line profile ของชุดทดสอบแบบ Multiplex สำหรับตัวอย่างที่มีเชื้อ (ก) เชื้อ Aac, Potyvirus และ WMV-2 (ข) เชื้อ Potyvirus และ WMV-2 (ค) เชื้อ Potyvirus (ง) เชื้อ Aac และ (จ) ตัวอย่างของพืชที่ไม่เป็นโรค

ตารางที่ 4.3 ค่าการสะท้อนแสงที่ลดลงที่แถบทดสอบของชุดทดสอบแบบ Multiplex

ชื่อตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง	แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3
		(TL <sub>A</sub> )	(TL <sub>w</sub> )	(TL <sub>p</sub> )
		$\Delta I_{T1}$ (%)	$\Delta I_{T2}$ (%)	$\Delta I_{T3}$ (%)
Test A	มีเชื้อ Aac, WMV-2, Potyvirus	28.8	24.6	7.8
Test B	มีเชื้อ WMV-2 และ Potyvirus	0.3	21.3	18.7
Test C	มีเชื้อ Aac	44.4	1.7	0.1
Test D	มีเชื้อ Potyvirus	1.4	3.5	0.2
Test E	พืชไม่เป็นโรค	0.58	1.12	0.17

#### 4.13 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

จากข้อมูลการทดลองในหัวข้อที่ผ่านมาพบว่า การประจบพารามิเตอร์ของกล้องรับภาพ ทำให้ค่าความเข้มแสง  $\Delta I_T$  ของแถบทดสอบมีค่าไม่เท่ากัน ส่งผลให้ค่า Detection limit ไม่เท่ากันด้วย ถ้าใช้กล้องรับภาพต่างกันหรือเมื่อเปลี่ยนชนิดของชุดทดสอบ จึงควรทำการทดลองเพื่อหาค่าพารามิเตอร์ของกล้องที่ให้ผลดีที่สุด

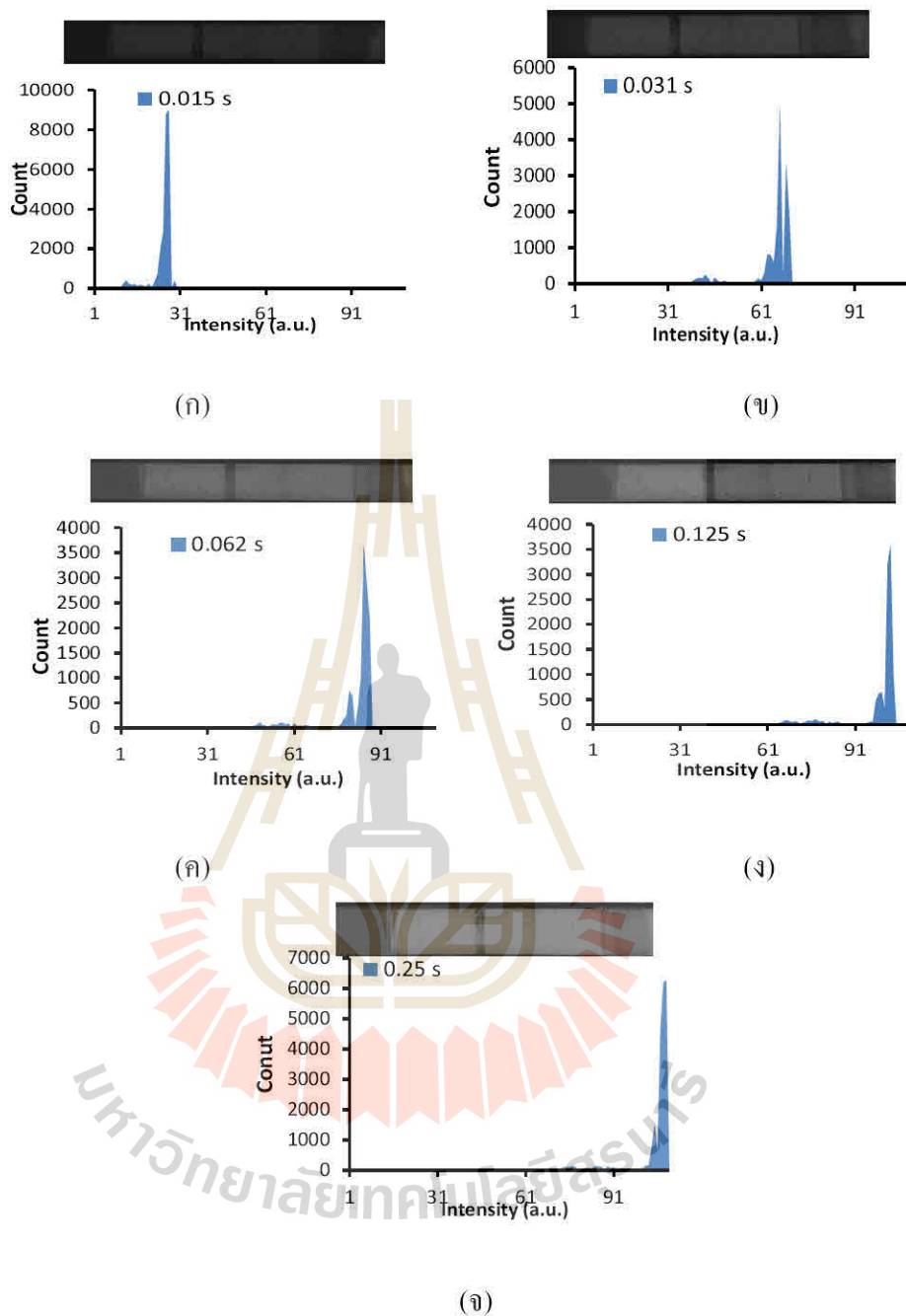
พารามิเตอร์ของกล้องรับภาพที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย Exposure time, Contrast และ Gain กรณีกล้องรับภาพแบบ CMOS โดยทั่วไป ในทั้งสามพารามิเตอร์มีการปรับ Exposure time เท่านั้นที่เป็นการปรับค่าของวงจรอิเล็กทรอนิกส์ที่อยู่ภายในกล้อง เมื่อเพิ่ม Exposure time หรือเวลารับแสงมากขึ้น ภาพจะสว่างมากขึ้น ถ้าลด Exposure time ภาพจะมีมืดมากขึ้นเพราะค่าความเข้มแสงที่กล้องอ่านได้ลดลง ส่วนการปรับค่า Contrast จะเป็นการปรับจากข้อมูลความเข้มแสงสูงสุด ( $I_{max}$ ) หรือความเข้มแสงต่ำสุด ( $I_{min}$ ) จากภาพ [ $Contrast = (I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min})$ ] เมื่อต้องการ Contrast สูงขึ้น ซอฟต์แวร์จะปรับให้  $I_{max}$  มีค่าเข้าใกล้ค่าสูงสุด (255) มากขึ้น และปรับ  $I_{min}$  ให้มีค่าเข้าใกล้ค่าต่ำสุด (0) มากขึ้น ส่วนการปรับ Gain จะเท่ากับการใช้ค่าคงที่คูณกับค่าความเข้มแสงของภาพ ซึ่งจะทำให้ภาพสว่างหรือมืดมากขึ้น ขึ้นอยู่กับ Gain ที่ใช้ การปรับ Gain สำหรับกล้อง

CMOS โดยทั่วไปจะเป็นการปรับจากภาพเช่นกัน ยกเว้นกล้อง CMOS บางรุ่นที่มีราคาแพง จะสามารถปรับ Gain ของวงจรภายในกล้องได้ ดังนั้นการปรับ Exposure time ต้องทำก่อนการถ่ายภาพ เนื่องจากเป็นการปรับภาพด้วยซอฟต์แวร์

ในการออกแบบเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ การหา Exposure time ที่เหมาะสมต้องทำการทดลองกับชุดทดสอบแต่ละชนิด เมื่อได้ค่า Exposure time ที่ต้องการแล้วสามารถนำข้อมูลภาพที่บันทึกไว้มาวิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อหาค่า Contrast หรือ Gain ที่เหมาะสมภายหลังได้ ดังนั้นการปรับค่า Exposure time จึงมีความสำคัญเป็นอันดับแรก

จากข้อมูลการทดลองพบว่า Exposure time มีผลต่อค่า  $\Delta I_T$  และค่า Detection limit ซึ่งผู้วิจัยจะใช้ Histogram ของแต่ละ Exposure time เป็นตัวกำหนดว่าควรตั้ง Exposure time ของกล้องเท่าไรจึงจะเหมาะสม

Histogram คือกราฟแสดงความถี่หรือจำนวนพิกเซล (Pixel) ที่กระจายตัวอยู่ในช่วงความเข้มแสงต่าง ๆ ตั้งแต่ค่า 0 (มืดที่สุดของภาพ) จนกระทั่งถึงค่า 255 (สว่างที่สุดของภาพ) ดังนั้นการกำหนดเวลาในการรับแสงของเซนเซอร์รับภาพ (Exposure time) จะได้ Histogram ที่ต่างกัน รูปที่ 4.15 แสดงค่า Histogram เมื่อตั้งค่า Exposure time ของกล้องเว็บแคมตั้งแต่เวลารับแสงเท่ากับ 0.015 s ไปจนถึงเวลารับแสง 0.25 s



รูปที่ 4.15 เปรียบเทียบ Histogram จากภาพชุดทดสอบของชุดทดสอบ *Aac* ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  CFU/mL (ก) Exposure time เท่ากับ 0.015 s (ข) Exposure time เท่ากับ 0.031 s (ค) Exposure time เท่ากับ 0.062 s (ง) Exposure time เท่ากับ 0.125 s และ (จ) Exposure time เท่ากับ 0.25 s

รูปที่ 4.15 พบว่า Histogram ของภาพ Exposure time ที่ 0.015 s ค่าความเข้มแสงเลื่อนไปทางด้านซ้ายมือเข้าใกล้ค่า 0 ของกราฟ โทนาภาพอยู่ในช่วง Under exposure ที่ Exposure time เท่ากับ 0.062-0.25 s มีค่า Histogram ของภาพอยู่ในช่วง Over exposure และเมื่อ Exposure time ที่ 0.031 s ค่า Histogram ของภาพจะกระจายตัวอยู่ในช่วงบริเวณกลางกราฟ หรือเรียกว่า Midtones

กรณีการตั้งค่า Exposure time สูงหรือนาน ค่าความเข้มแสงที่มีค่าสูงอยู่แล้วจะถูกปรับให้มีค่าเท่ากับค่าสูงสุด ซึ่งจะแสดงผลเป็นสีขาวในจอภาพ ภาพจึงสว่างขึ้นมากกว่าปกติ หรือ Over exposure สำหรับความเข้มขั้นต่ำ แลบทดสอบจะมีสีขาวใกล้เคียงกับพื้นขาว เมื่อตั้งค่า Exposure time สูง จะทำให้แลบทดสอบมีสีขาวใกล้เคียงกับพื้นขาวมากขึ้น จนแถบแยกไม่ออก เนื่องจากค่าความเข้มแสง  $\Delta I_T$  เป็นค่าความแตกต่างระหว่างแลบทดสอบกับพื้นขาว ค่า  $\Delta I_T$  กรณีตั้งค่า Exposure time สูงจึงมีค่าต่ำลง (รูปที่ 4.9)

นอกจากนี้เมื่อค่า Exposure time มีค่าสูงขึ้น ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) มีแนวโน้มลดลงด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า Histogram และข้อมูลในรูปที่ 4.9 ก็ให้ข้อมูลที่สรุปสอดคล้องกัน กล่าวคือ ค่าความเข้มแสงที่แลบทดสอบจะถูกปรับให้ใกล้เคียงค่าสูงสุดค่าหนึ่ง ทำให้การวัดจากชุดทดสอบแต่ละชุดให้ผลที่เกือบจะเท่ากัน นอกจากนี้เมื่อความเข้มแสงสูงขึ้น ค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N ratio) จะสูงขึ้นด้วย

เมื่อตั้งค่า Exposure time ให้ต่ำลง จนภาพมืดลงหรือ Under exposure ความเข้มแสงต่ำในภาพจะถูกปรับเข้าหาค่าต่ำสุด (0) จะทำให้แถบควบคุมมืดมากขึ้น ความเข้มแสงที่แลบทดสอบและพื้นขาวจะมีค่าต่ำลง ภาพทั้งหมดจึงดูทึบมากขึ้น รวมทั้งความเข้มแสงที่แลบทดสอบจะต่างกับพื้นขาวมากขึ้น ส่งผลให้ค่า  $\Delta I_T$  มีค่าต่างกันมากขึ้น แต่เมื่อความเข้มแสงโดยรวมทั้งภาพมีค่าลดลง ค่า S/N ratio จะลดลงตามไปด้วย ส่งผลให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าสูงขึ้น ตำแหน่งค่า Exposure time ที่เหมาะสมจะทำให้ค่า Detection limit ดีที่สุด จึงต้องมีค่า  $\Delta I_T$  สูง แต่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำ ซึ่งจำเป็นต้องทำการทดลองเพื่อหาค่า Exposure time ที่เหมาะสมดังกล่าว

รูปที่ 4.10 แสดงผลการทดลองวัดค่า  $\Delta I_T$  สำหรับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Aac* เท่ากับ Healthy,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  และ  $1 \times 10^6$  CFU/mL ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ในกรณีการปรับค่า Exposure time ของกล้องโทรศัพท์อยู่ระหว่าง 0.008 – 0.0067 s ถ้าเลือก Automatic mode ของกล้องในการถ่ายภาพชุดทดสอบ กล้องจะเลือกค่า Exposure time เท่ากับ 0.03 s จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อค่า Exposure time ต่ำลง ค่า  $\Delta I_T$  ที่แลบทดสอบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกความเข้มข้น ค่า Detection limit ในรูปที่ 4.10 มีค่าเท่ากับ  $1 \times 10^5$  CFU/mL เมื่อ Exposure time เท่ากับ 0.008 s เมื่อเทียบกับ Exposure time ค่าอื่น ๆ ข้อมูลที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือ ค่า

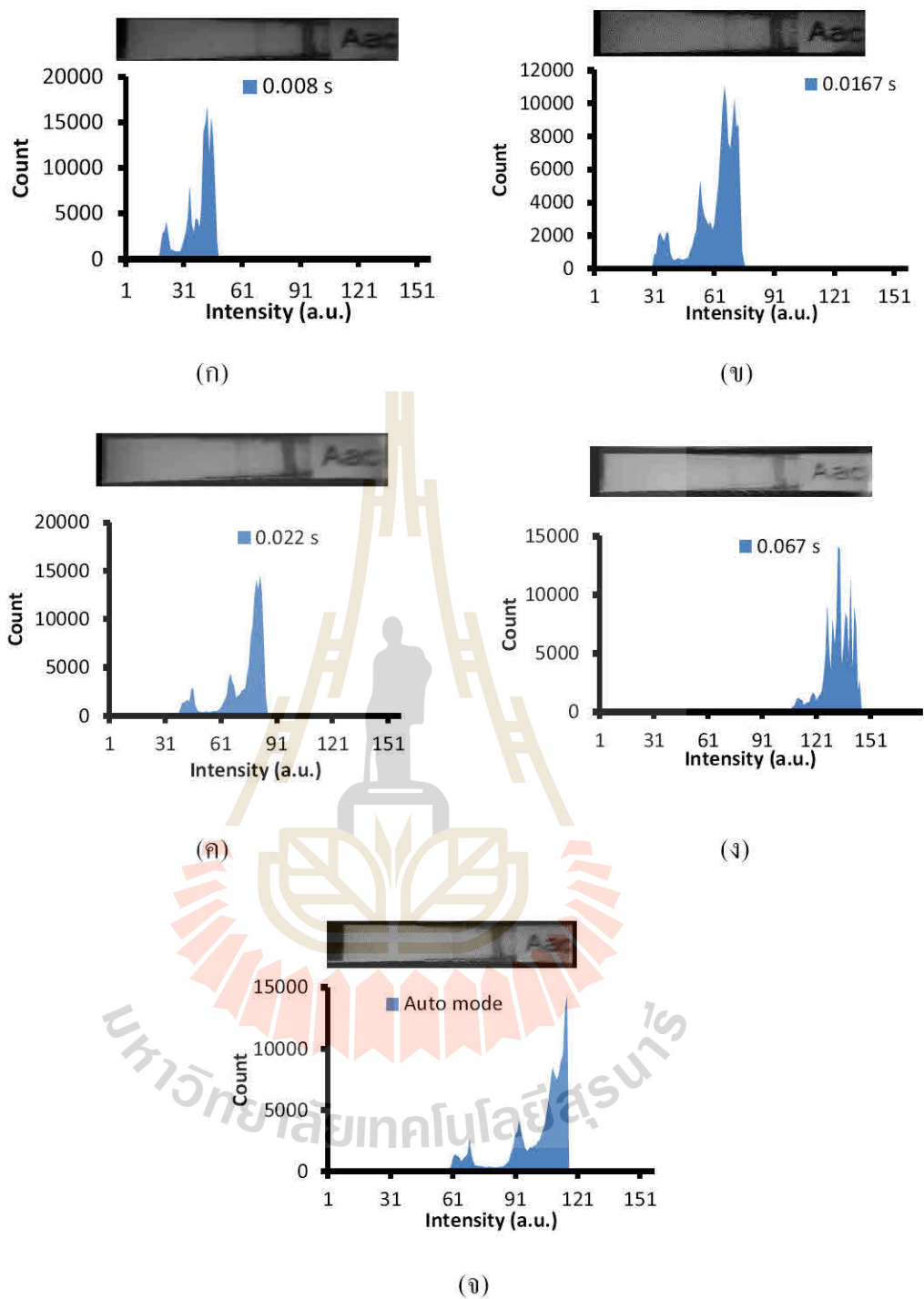
เบี่ยงเบนมาตรฐาน (Error bar ในรูปที่ 4.10) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อลดค่า Exposure time ดังนั้นการลดค่า Exposure time ลงต่ำกว่านี้ Detection limit อาจจะแย่งกว่านี้ก็ได้

รูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่า Exposure time ต่างกัน มีผลต่อค่า  $\Delta I_T$  ดังนั้นการตั้งค่า Exposure time ของกล้องต่างกัน  $\Delta I_T$  และ Detection limit ที่ได้ต่างกัน คล้ายกับกรณีของกล้องเว็บแคม โดยทั่วไป Exposure time ของกล้องแต่ละรุ่นนั้นปรับได้ไม่เท่ากัน ดังนั้นไม่ว่าจะใช้กล้องรุ่นไหน ถ่ายภาพ ควรทดลองเพื่อหาค่า Exposure time ที่เหมาะสม

จากการทดลองปรับ Exposure time ของกล้องเว็บแคมตั้งแต่เวลารับแสงสั้น 0.008 s ไปจนถึงเวลารับแสง 0.067 วินาที และใช้งานกล้องในโหมดอัตโนมัติ (Exposure time เท่ากับ 0.03 s) จากนั้นทำการบันทึก Histogram ข้อมูล Histogram เมื่อใช้กล้องโทรศัพท์ถ่ายภาพชุดทดสอบ สามารถอธิบายการลดลงของความเข้มแสง  $\Delta I_T$  ที่แถบทดสอบและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการวัดของข้อมูลรูปที่ 4.16 ได้โดยใช้เหตุผลดังที่ได้อธิบายไว้ในกรณีของกล้องเว็บแคม ดังนั้นการใช้ Exposure time ต่ำ จึงจะให้ค่า Detection limit ในการวัดของเครื่องมือดีขึ้น ทั้งนี้ค่า Exposure time ที่เหมาะสมต้องทำการทดลองสำหรับชุดทดสอบแต่ละชนิด

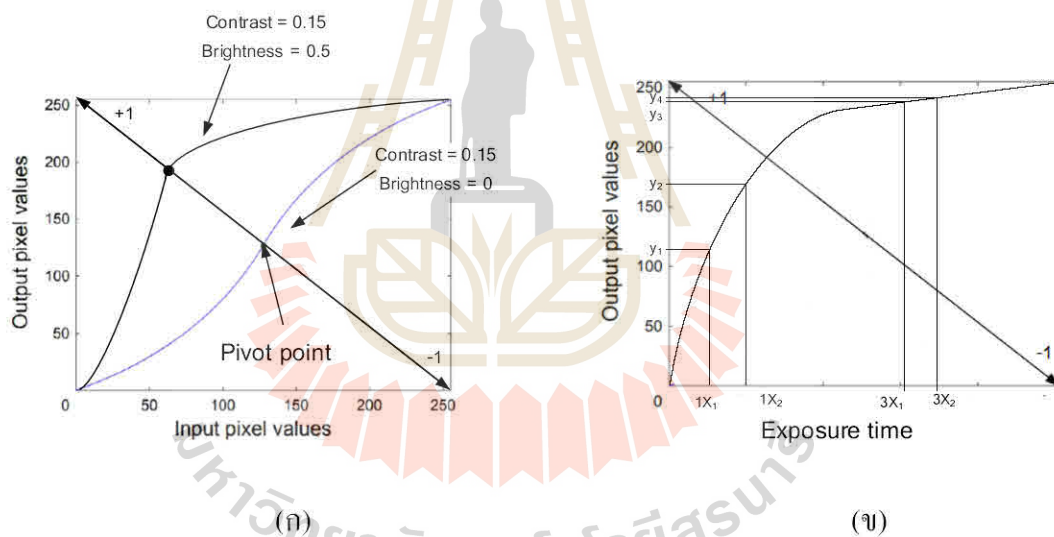
การปรับค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของกล้องมีเพียงการปรับ Exposure time หรือเวลาเปิดรับแสงของกล้องเท่านั้น ที่เป็นการปรับค่าอิเล็กทรอนิกส์ของวงจรที่อยู่ภายในกล้อง ส่วนการปรับ Contrast กับ Gain เป็นการปรับภาพที่ซอฟต์แวร์ ดังนั้นการปรับ Exposure time จึงมีความสำคัญอันดับแรก จากรูปที่ 4.16 เมื่อปรับ Exposure time จาก 0.015 s เป็น 0.031 s เพิ่มขึ้นจากเดิม 2 เท่า พบว่าค่าความเข้มแสงแต่ละตำแหน่งบนภาพชุดทดสอบเพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์แบบไม่เชิงเส้น เมื่อพิจารณาจากการเพิ่มเวลารับแสงของกล้องรับภาพกรณีแบบไม่เชิงเส้นเป็นเรื่องที่ยาก เนื่องจากค่า Exposure time เป็นเวลาในการรับโฟตอนที่ดีเทกเตอร์ของกล้อง CMOS ดังนั้นผู้วิจัยคิดว่าค่าความเข้มแสงแบบไม่เชิงเส้นที่เพิ่มขึ้นจากการปรับค่า Exposure time นั้น มาจากการตั้งค่า Contrast และ Brightness ของกล้องที่ผู้วิจัยตั้งอยู่ก่อนแล้ว





รูปที่ 4.16 เปรียบเทียบ Histogram จากภาพชุดทดสอบของชุดทดสอบ Aac ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  CFU/mL แต่ละ Exposure time (ก) 0.008 s (ข) 0.0167 s (ค) 0.022 s (ง) 0.097 s และ (จ) 0.03 s (Auto mode)

การปรับค่า Contrast และ Brightness ของกล้องทั่วไปแล้ว จะใช้โหมดการปรับแบบ S-Curve (<https://www.baslerweb.com>) ดังรูป 4.17 (ก) การปรับ brightness ทำการปรับแนวโน้มของกราฟที่จุด Pivot point ส่งผลให้ความเข้มแสงอินพุตที่ค่าต่ำ ๆ ขยายสัญญาณได้มากขึ้น เนื่องจากความชันของกราฟความเข้มแสงอินพุตดังกล่าวมีค่าสูง จากเหตุผลดังกล่าวเมื่อปรับค่า Exposure time ของกล้องเป็นค่าต่ำ ๆ กล่าวคือมีความเข้มแสงอินพุตต่ำ ๆ ความเข้มแสงเอาต์พุตที่ได้จากกราฟ S-Curve ระหว่างความเข้มแสงที่ตำแหน่งแถบทดสอบกับความเข้มแสงที่ตำแหน่งอ้างอิง บริเวณพื้นขาวต่างกันมากขึ้นส่งผลให้ค่า  $\Delta I_T$  สูงขึ้น ในทางกลับกันถ้าตั้งค่า Exposure time ค่าสูง ๆ ความเข้มแสงเอาต์พุตที่ได้จากกราฟ S-Curve ระหว่างความเข้มแสงที่ตำแหน่งแถบทดสอบกับความเข้มแสงที่ตำแหน่งอ้างอิงบริเวณพื้นขาวไม่ต่างกันเหมือนเป็นความเข้มแสงเดียวกัน ส่งผลให้ค่า  $\Delta I_T$  ที่ได้มีค่าน้อย ดังรูป 4.17 (ข)



**รูปที่ 4.17** (ก) การปรับค่า Contrast และ Brightness ของกล้องแบบ S-Curve และ (ข) ความเข้มแสงเอาต์พุตที่ได้จากกราฟ S-Curve ในกรณีที่ Exposure time ต่ำ ความชันบริเวณดังกล่าวมีค่าสูง ส่งผลให้การขยายสัญญาณในช่วงนี้สูง ส่วนที่ Exposure time สูง ความชันบริเวณนั้นมีค่าน้อยทำให้การขยายสัญญาณต่ำ (<https://www.baslerweb.com>)

## บทที่ 5

### สรุป

ในประเทศไทยมีการวิจัยและพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่ายแบบแอลเอฟเอ (Lateral flow immunochromatographic assays, LFA) สำหรับเป็นชุดทดสอบทางการแพทย์ การเกษตร และการตรวจสอบอาหารเป็นจำนวนมาก ชุดทดสอบบางชุดได้รับการพัฒนาต่อยอดจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ อย่างไรก็ตามพบว่า ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในประเทศส่วนใหญ่จะใช้การอ่านแถบสีด้วยตาเปล่า ซึ่งการแปลผลด้วยตาเปล่านั้นขึ้นอยู่กับผู้ใช้งานแต่ละคน การแปลผลด้วยตาเปล่าจะมีปัญหามากขึ้นถ้าต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความเป็นไปได้ทางเทคนิคที่จะพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ สำหรับใช้ในการแปลผลแทนการแปลผลด้วยตาเปล่า และได้ศึกษาพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของกล้องที่ใช้ถ่ายภาพชุด เพื่อให้ได้ Detection limit ที่วัดได้ของเครื่องอ่านแถบสีดีกว่าค่าดังกล่าวเมื่อแปลผลด้วยตาเปล่า ซึ่งออกแบบให้สามารถใช้งานกับชุดทดสอบที่หลากหลายที่พัฒนาขึ้นภายในประเทศ ทั้งนี้ราคาต้นทุนวัสดุอุปกรณ์เครื่องมือวัดดังกล่าวต้องไม่แพงสามารถใช้งานได้จริง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ 2 แนวทาง แนวทางแรกคือ การพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีโดยใช้กล้องเว็บแคมต่อกับคอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผล ทั้งนี้ต้องติดตั้งโปรแกรมประมวลผลไว้ที่คอมพิวเตอร์ ปัจจุบันกล้องเว็บแคมมีราคาค่อนข้างถูก การพัฒนาซอฟต์แวร์จะไม่ยุ่งยากง่ายต่อการพัฒนาและไม่จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนบ่อย ๆ เนื่องจากคอมพิวเตอร์ส่วนใหญ่ใช้ Window อย่างไรก็ตาม แนวทางนี้ทำให้การใช้งานภาคสนามค่อนข้างยุ่งยากสำหรับผู้ใช้งานจึงเหมาะใช้งานในห้องปฏิบัติการ

แนวทางที่สองคือ การใช้กล้องโทรศัพท์แบบพกพาเป็นอุปกรณ์รับภาพ (แทนกล้องเว็บแคม) วิธีการนี้มีอุปกรณ์ที่ใช้สร้างเครื่องอ่านเพียงแหล่งกำเนิดแสง เลนส์ปรับขนาดของภาพชุดทดสอบ โครงสร้างเชิงกล ซึ่งทำให้ต้นทุนต่ำกว่ากรณีแรก ทั้งนี้ต้องพัฒนาซอฟต์แวร์ (Mobile application) ในการประมวลผลภาพและข้อมูล อย่างไรก็ตามโทรศัพท์แต่ละรุ่นมีลักษณะที่แตกต่างกันมาก หรือมีการเปลี่ยนแปลงรุ่นอยู่ตลอดเวลา การออกแบบเครื่องมือวัดให้สามารถรองรับการใช้งานกับโทรศัพท์รุ่นต่าง ๆ ได้ จึงค่อนข้างยากในการออกแบบ อาจมีการวางแผนหรือเตรียมรองรับการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอยู่เสมอ

แนวทางนี้งานวิจัยนี้ได้ออกแบบและสร้างต้นแบบภาคสนามเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ สำหรับใช้งานกับชุดทดสอบอย่างง่ายที่จำเพาะต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) และ เชื้อ Watermelon mosaic virus-2 (WMV-2) เชื้อ Potyvirus รวมทั้งเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) ของชุดทดสอบอย่างง่ายแบบตรวจวัดพร้อมกัน (Multiplex detection) โดยใช้กล้องเว็บแคมหรือโทรศัพท์เป็นอุปกรณ์รับภาพ และใช้แหล่งกำเนิดแสงไดโอดเปล่งแสงสีเขียว จัดแสง ตกกระทบให้มีมุมเอียง  $45^\circ$  รวมทั้งได้พัฒนาเทคนิคประมวลผลภาพและข้อมูลแบบอัตโนมัติ ผลการทดสอบพบว่า Detection limit เมื่อการใช้เครื่องอ่านแถบสีในการแปลผลเท่ากับ  $1 \times 10^5$  CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับแปลผลด้วยตาเปล่ามี Detection limit เท่ากับ  $5 \times 10^6$  CFU/mL จากผลการทดลองพบว่า Detection limit กรณีการใช้เครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบอย่างง่ายในการแปลผลดีกว่า การใช้ตาเปล่าแปลผลถึง 50 เท่า เครื่องอ่านแถบสีสำหรับชุดทดสอบนี้มีราคาไม่แพง วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างต้นแบบสามารถจัดหาได้โดยทั่วไป การปรับค่า Exposure time, Contrast และ Gain ของกล้องส่งผลทำให้ได้ค่าการสะท้อนที่ลดลงที่ตำแหน่งแถบทดสอบ ( $\Delta I_T$ ) และ Detection limit ที่ได้จากเครื่องมือวัดแตกต่างกัน ในกรณีของ Exposure time ควรตั้งให้มีค่าต่ำ หรือเปิดรับแสงในเวลาสั้นๆ ส่งผลให้  $\Delta I_T$  ที่ได้สูงขึ้น การปรับค่า Contrast ที่สูงขึ้น และ Gain ที่ต่ำลงนั้น ส่งผลให้ค่า  $\Delta I_T$  สูงขึ้นด้วย ดังนั้นจึงไม่ควรใช้การตั้งค่าแบบ Auto mode แต่ควรตั้งพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของกล้อง ให้ได้ค่า Detection limit ดีที่สุด

ในอนาคตผู้พัฒนาชุดทดสอบในต่างประเทศ จะนำเครื่องอ่านมาใช้กับชุดทดสอบทุกชุด แทนการแปลผลด้วยตาเปล่า เนื่องจากเครื่องมือได้รับการพัฒนาไปมากแล้ว และการผลิตในปริมาณมากจะทำให้เครื่องอ่านถูกลงมาก แนวโน้มดังกล่าวจะทำให้การพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีสำหรับชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นในประเทศจำเป็นต้องมีเครื่องอ่านแถบสีเสนอให้กับผู้ใช้งาน ผลจากการวิจัยนี้พบว่า สามารถสร้างเครื่องอ่านแถบสีสำหรับชุดทดสอบที่มีความไวสูง สามารถผลิตใช้งานจริงได้ สามารถนำไปปรับใช้กับชุดทดสอบทางชีวภาพที่พัฒนาขึ้นเองในประเทศได้ ซึ่งจะช่วยให้อ่านค่าได้แม่นยำขึ้น และเพิ่มความน่าเชื่อถือให้กับชุดทดสอบ อย่างไรก็ตาม เพื่อให้เครื่องมือที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือ จำเป็นต้องมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการทดสอบให้หลากหลายมากขึ้น

## รายการอ้างอิง

- Abe, Kaoru, et al. (2009), 'Simplified method for determining cadmium concentrations in rice foliage and soil by using a biosensor kit with immunochromatography', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89 (6), 1097-100.
- Bahadır, Elif Burcu and Sezgintürk, Mustafa Kemal (2016), 'Lateral flow assays: Principles, designs and labels', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 286-306.
- Carrio, Adrian, et al. (2015), 'Automated Low-Cost Smartphone-Based Lateral Flow Saliva Test Reader for Drugs-of-Abuse Detection', *Sensors*, 15 (11), 29569-93.
- Chen, Yiping, et al. (2016), 'A dual-readout chemiluminescent-gold lateral flow test for multiplex and ultrasensitive detection of disease biomarkers in real samples', *Nanoscale*, 8 (33), 15205-12.
- Cho, Il-Hoon, et al. (2010), 'Immunogold-silver staining-on-a-chip biosensor based on cross-flow chromatography', *Journal of Chromatography B*, 878 (2), 271-77.
- Coleman, Russell E, et al. (2002), 'Field evaluation of the ICT Malaria Pf/Pv immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a Plasmodium falciparum/vivax endemic area in Thailand', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66 (4), 379-83.
- Geginat, G., Kaiser, D., and Schrempf, S. (2012), 'Evaluation of third-generation ELISA and a rapid immunochromatographic assay for the detection of norovirus infection in fecal samples from inpatients of a German tertiary care hospital', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31 (5), 733-37.
- Gollier, J., Piech, G.A., and Webb, M.B. (2009), 'Optical reader system and method for monitoring and correcting lateral and angular misalignments of label independent biosensors', (Google Patents).
- Gui, Chen, et al. (2014), 'A CCD-based reader combined with CdS quantum dot-labeled lateral flow strips for ultrasensitive quantitative detection of CagA', *Nanoscale Research Letters*, 9 (1), 57.

- Himananto, Orawan, et al. (2011), 'Novel and Highly Specific Monoclonal Antibody to Acidovorax citrulli and Development of ELISA-Based Detection in Cucurbit Leaves and Seed', *Plant Disease*, 95 (9), 1172-78.
- Hua, Xiude, et al. (2010), 'Development of an immunochromatographic assay for the rapid detection of chlorpyrifos-methyl in water samples', *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (1), 189-94.
- Huang, Xiaohua and El-Sayed, Mostafa A. (2010), 'Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy', *Journal of Advanced Research*, 1 (1), 13-28.
- Jakoby, B., et al. (2010), 'Eurosensor XXIV Conference Mobile phone analysis of NT-proBNP using high dynamic range (HDR) imaging', *Procedia Engineering*, 5, 584-87.
- Jung, Youngkee, et al. (2015), 'Smartphone-based colorimetric analysis for detection of saliva alcohol concentration', *Applied Optics*, 54 (31), 9183-89.
- Kaylor, R., Yang, D., and Knotts, M. (2013), 'Reading device, method, and system for conducting lateral flow assays', (Google Patents).
- Khamta, Yaowapa, et al. (2009), 'Development of Immunochromatographic Assay for the On-site Detection of Salbutamol', *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 30 (4), 441-56.
- Kim, S. and Park, J. K. (2004), 'Development of a test strip reader for a lateral flow membrane-based immunochromatographic assay', *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9 (2), 127-31.
- Koczula, Katarzyna M and Gallotta, Andrea (2016), 'Lateral flow assays', *Essays in Biochemistry*, 60 (1), 111-20.
- Lee, Seoho, et al. (2016), 'NutriPhone: a mobile platform for low-cost point-of-care quantification of vitamin B12 concentrations', *Scientific Reports*, 6, 28237.
- Mansfield, MA, Wong, RC, and Tse, HY (2009), 'Lateral Flow Immunoassay', (Humana Press, New York).
- Mei, Jianchun, et al. (2011), 'Development and study of lateral flow test strip reader based on embedded system', *IEEE 2011 10th International Conference on Electronic Measurement & Instruments* (1), 201-04.

- Mudanyali, O., et al. (2012), 'Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone', *Lab Chip*, 12 (15), 2678-86.
- Ozcan, A., et al. (2014), 'Portable rapid diagnostic test reader', (Google Patents).
- Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., and van Amerongen, A. (2009), 'Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey', *Anal Bioanal Chem*, 393 (2), 569-82.
- Qin, Zhenpeng, et al. (2012), 'Significantly Improved Analytical Sensitivity of Lateral Flow Immunoassays by Using Thermal Contrast', *Angewandte Chemie International Edition*, 51 (18), 4358-61.
- Sajid, Muhammad, Kawde, Abdel-Nasser, and Daud, Muhammad (2015), 'Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review', *Journal of Saudi Chemical Society*, 19 (6), 689-705.
- Scherr, Thomas F., et al. (2016), 'Mobile phone imaging and cloud-based analysis for standardized malaria detection and reporting', *Scientific Reports*, 6, 28645.
- Shao, Xiang-Yang, et al. (2017), 'Rapid and Sensitive Lateral Flow Immunoassay Method for Procalcitonin (PCT) Based on Time-Resolved Immunoassay', *Sensors*, 17 (3), 480.
- Sithigorngul, Paisarn, et al. (2007), 'A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of pathogenic isolates of *Vibrio harveyi*', *Journal of Microbiological Methods*, 71 (3), 256-64.
- Vail, T., Hatfield, J., and Propper, C. (2005), 'Lateral flow diagnostic assay reader with radial cassette', (Google Patents).
- Venkataramana, M., et al. (2014), 'Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid detection of fumonisin B1 from cereal samples', *Journal of Food Science and Technology*, 51 (9), 1920-28.
- Wathanaworawit, Wanitda, et al. (2011), 'A prospective evaluation of diagnostic methodologies for the acute diagnosis of dengue virus infection on the Thailand-Myanmar border', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105 (1), 32-37.
- Xiulan, Sun, et al. (2006), 'Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B1 in foods', *Food Control*, 17 (4), 256-62.

- Yang, Y., et al. (2015), 'Development of a quantifiable optical reader for lateral flow immunoassay', 2015 8th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics (BMEI), 344-49.
- Yeh, Chia-Hsien, et al. (2014), 'Optimization of an Optical Inspection System Based on the Taguchi Method for Quantitative Analysis of Point-of-Care Testing', *Sensors*, 14 (9), 16148.
- Yetisen, Ali K., et al. (2014), 'A smartphone algorithm with inter-phone repeatability for the analysis of colorimetric tests', *Sensors and Actuators B: Chemical*, 196, 156-60.
- You, D. J., Park, T. S., and Yoon, J. Y. (2013), 'Cell-phone-based measurement of TSH using Mie scatter optimized lateral flow assays', *Biosens Bioelectron*, 40 (1), 180-5.
- Zangheri, Martina, et al. (2015), 'A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescence-based lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection', *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 63-68





## รายชื่อบทความวิชาการที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในระหว่างการศึกษา

Boonsong Sutapun, Lalita Saisin; Ratthasart Amarit, Armote Somboonkaew, Orapapai Gajanandana, Orawan Himananto. (2016) . **Detection limit improvement for a mobile lateral flow assay reader.** Photonics Asia 2016 Conference being held at Beijing International Convention Centre from 11th to 14 th October 2016.



## ประวัติผู้เขียน

นางสาวลลิตา สายศิลป์ เกิดเมื่อวันที่ 6 ตุลาคม พ.ศ. 2534 ภูมิลำเนาเดิมอยู่บ้านเลขที่ 32/4 ถนนกุดั่น ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000 จบระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสุรนารีวิทยา 2 จังหวัดนครราชสีมา ปีการศึกษา 2553 และสำเร็จการศึกษาปริญญาวิศวกรรมศาสตร์ (วิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2557 ได้รับทุนสนับสนุนปริญญาโทของโครงการวิจัยผลิตนักเทคโนโลยี จากสวทช.

เมื่อ พ.ศ. 2557 ในปีเดียวกันได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สัญญาเลขที่ TGIST 01-57-025 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี