เครื่องอ่านแอลเอฟเอสำหรับใช้กับเซนเซอร์ทางชีวภาพ

(LFA strip reader for biosensor sensing applications)

โดย

นางสาวลลิตา สายศิลป์ รหัสนักศึกษา B5308125

นายภาณุพงศ์ ศรีสกุลเตียว รหัสนักศึกษา B5327294

นายประมวล บุญนำ รหัสนักศึกษา B5328826

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชา 438499 โครงงานศึกษาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์

หลักสูตรวิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต สาขาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์ หลักสูตร พ.ศ.2553

สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประจำภาคการศึกษาที่ 3 ปีการศึกษา 2556

เครื่องอ่านแอลเอฟเอสำหรับใช้กับเซนเซอร์ทางชีวภาพ

คณะกรรมการสอบโครงงาน

(อาจารย์ ดร.บุญส่ง สุตะพันธ์)
กรรมการ/อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ วาณิชอนันต์ชัย)
กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืออากาศเอก ดร. ประโยชน์ คำสวัสดิ์)
กรรมการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับรายงานโครงงานฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาวิศวกรรมโทรคมนาคม รายวิชา 438494 โครงงานวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์ ประจำปีการศึกษา 2556

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

โครงงาน เครื่องอ่านแอลเอฟเอสำหรับใช้กับเซนเซอร์ทางชีวภาพ

ผู้ดำเนินงาน 1. นางสาวลลิตา สายศิลป์ B5308125

2. นายภาณุพงศ์ ศรีสกุลเตียว B5327294

3. นายประมวล บุญนำ B5328826

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. บุญส่ง สุตะพันธ์

สาขา วิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์

บทคัดย่อ

(Abstract)

โครงงานนี้ได้พัฒนาเครื่องมืออ่านค่าแถบสีของ LFA ใช้กล้องเว็บแคมอ่านค่าความเข้มแถบสีทั้งสองของ LFA เพื่อให้สามารถวัดสารที่ต้องการวัดได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าการอ่านค่าแถบสีด้วยตาเปล่าและไม่ขึ้นกับผู้ใช้งาน เพื่อให้ได้ภาพแถบสีบน LFA ชัดเจน จะใช้แหล่งกำเนิดแสงไดโอดเปล่งแสงสีขาวเป็นแหล่งกำเนิดแสงได้ทำการจัดมุมตกกระทบและจัดมุมแบบสะท้อน การประมวลผลภาพ (Image processing) เพื่อหาความเข้มข้นของสารตัวอย่าง จะเปรียบเทียบ 2 เทคนิค คือการใช้เทคนิคการหาความเข้มแสงแบบ Line profile ตามแนว Control line และ Test line ซึ่งค่าการกระเจิงแสงของแถบสีบนเส้น Control line และTest Line จะขึ้นกับความหนาแน่นเชิงผิวของอนุภาคนาโนของทองหรือความเข้มข้นของแอนติเจนในสารตัวอย่าง และเทคนิคการตรวจติดตามการเปลี่ยนความเข้มแสง ณ ตำแหน่งแถบสีทั้งสอง ขณะที่กำลังหยดสารตัวอย่าง เครื่องอ่านแอลเอฟเอดังกล่าวนี้สามารถปรับใช้งานกับเซนเซอร์ทางชีวภาพได้หลายชนิด และสามารถพัฒนาให้มีขนาดเล็ก และราคาประหยัด

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำโครงงานเรื่องเครื่องอ่านแอลเอฟเอสำหรับใช้กับเซนเซอร์ทางชีวภาพ (LFA strip reader for biosensor sensing applications) นี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้เนื่องด้วยความกรุณาของบุคคลหลายด้าน ซึ่งคอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ รวมถึงข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ ในการทำโครงงานครั้งนี้ คณะผู้จัดทำขอแสดงความขอบคุณ

- อาจารย์ ดร.บุญส่ง สุตะพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ผู้ที่มอบความรู้และโอกาสให้คณะผู้จัดทำและยังคอยให้คำปรึกษาต่างๆ
- นาย อาโมทย์ สมบูรณ์แก้วและ นาย รัฐศาสตร์ อัมฤทธิ์ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีโฟโทนิกส์ หน่วยวิจัยระบบและอุปกรณ์อัจฉริยะ ศูนย์เทคโนโลยีและอิเล็กทรอนิกส์แห่งชาติ ผู้ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการทำโครงงาน
- สมาชิกภายในกลุ่มที่คอยช่วยเหลือกันและให้กำลังใจตลอดการทำงาน
- เพื่อนกลุ่มอื่นๆ ที่คอยให้คำแนะนำและช่วยเหลือกัน
- โครงงานนี้ได้รับทุนสนันสนุนปริญญานิพนธ์จาก สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ฝ่ายพัฒนาบัณฑิตและนักวิจัย (สวทช)

นางสาว ลลิตา สายศิลป์
นาย ประมวล บุญนำ
นาย ภาณุพงศ์ ศรัสกุลเตียว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตงาน	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 Lateral flow immunochromatographic assays	3
2.2 ตัวอย่างชุดทดสอบที่พัฒนาใช้งานในประเทศ	4
2.2.1 ชุดทดสอบการเกิดเชื้อหวัด ชนิด Flu-A	5
2.2.2 เชื้อแบคทีเรีย Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)	5
2.2.3 ชุดตรวจสอบวันตกไข่ iBabi	6
2.2.4 ชุดตรวจโรคผลเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ Acidovorax avenae subsp. Citrulli	7
2.3 การพัฒนาเครื่องมือสำหรับอ่านแถบสี	8
บทที่ 3 การออกแบบชุดทดลองและเทคนิคที่ใช้ในการประมวลผลภาพ	9
3.1 การออกแบบชุดการทดลอง	9
3.1.1 การจัดอุปกรณ์แบบทะลุผ่าน (Transmission)	9
3.1.2 การจัดอุปกรณ์แบบสะท้อน (Reflection)	10

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

3.2 เทคนิคที่ใช้ในการประมวลผลภาพ 11

3.2.1 เทคนิคการประมวลผลภาพแบบ Line Profile 11

3.2.2 เทคนิคการประมวลผลภาพแบบ Real-time intensity plot 12

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล 14

4.1 การทดลองกับชุดทดสอบเชื้อไข้หวัดใหญ่ ชนิด Flu-A 14

4.1.1 การทดลองแบบทะลุผ่าน 14

4.1.2 การชดเชยความเข้มแสงโดยใช้ภาพอ้างอิง 16

4.1.3 การทดลองแบบสะท้อน 18

4.2 การทดสอบกับชุดตรวจสอบวันตกไข่ iBabi 19

4.2.1 เทคนิคการประมวลผลภาพแบบ Line Profile 20

4.2.2 เทคนิคการประมวลผลภาพแบบ Real-time intensity plot 25

4.3 การทดลองกับชุดทดสอบโรคผลเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ Acidovorax avenae subsp. Citrulli 26

4.3.1 การทดลองแบบทะลุผ่าน 27

4.3.2 การทดลองแบบสะท้อน 39

บทที่ 5 สรุป 31

เอกสารอ้างอิง 33

ภาคผนวก 34

ประวัติผู้เขียน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

เรื่อง **หน้า**

รูปที่ 1. โครงสร้างของ Lateral flow immunochromatographic assays (LFA) 4

รูปที่ 2. การแปรผลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการทดสอบ 4

รูปที่ 3. ภาพถ่ายของ LFA ที่แสดงผลของการเกิดเชื้อหวัด ชนิด Flu A 5

รูปที่ 4. ภาพถ่ายของ LFA ที่แสดงผลของการเกิดเชื้อแบคทีเรีย Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) 6

รูปที่ 5. (ก) ภาพถ่ายชุดตรวจสอบวันตกไข่ และ (ข) ภาพแสดงผลการเกิดฮอร์โมน LH 7

รูปที่ 6. จะแสดงตัวอย่างชุดตรวจสอบโรคผลเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ Acidovorax avenae subsp. Citrulli (*Aac*) 8

รูปที่ 7. การจัดอุปกรณ์ทดลองแบบทะลุผ่าน 9

รูปที่ 8. การจัดอุปกรณ์ทดลองแบบสะท้อน 10

รูปที่ 9. การจัดอุปกรณ์ทดลองสำหรับบันทึกภาพแถบสีจาก LFA 11

รูปที่ 10. ตัวอย่างหน้าจอโปรแกรมประมวลผลภาพเทคนิค Line Profile 12

รูปที่ 11. (ก) แสดงการกำหนดตำแหน่ง ROIs และ (ข) ตัวอย่างหน้าจอโปรแกรมประมวลผลภาพเทคนิค Real-time intensity plot 13

รูปที่ 12 การเกิดสีที่แถบควบคุมและแถบทดสอบ สำหรับชุดทดสอบไข้หวัดใหญ่เมื่อใช้สารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 14

รูปที่ 13. (ก) ภาพถ่ายขณะทำ Line profiles ที่ตัวอย่างความเข้มข้น 1:200 และ (ข) ค่าความเข้มแสงของ Line Profile ถูกปรับค่าเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 100 15

รูปที่ 14. ผลต่างความเข้มแสงที่แถบควบคุม (ΔI_C) และผลต่างความเข้มแสงที่แถบทดสอบ (ΔI_T) สำหรับชุดทดสอบไข้ใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ 16

รูปที่ 15. ภาพการเกิดแถบสีหารด้วยภาพอ้างอิงแบบทะลุผ่าน แล้วทำภาพเฉลี่ยเมื่อใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1:200 16

รูปที่ 16. ชุดทดสอบไข้หวัดใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ แบบทะลุผ่าน Line profiles ค่าความเข้มแสงถูกปรับค่าเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 7000 17

รูปที่ 17. ผลต่างความเข้มแสงที่แถบควบคุม (ΔI_C) และผลต่างความเข้มแสงที่แถบทดสอบ (ΔI_T) สำหรับชุดทดสอบไข้ใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ 17

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

รูปที่ 18. (ก) ภาพถ่ายขณะทำ Line Profile และ (ข) ภาพการเกิดแถบสีหาร ด้วยภาพอ้างอิงแบบสะท้อน เมื่อใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1:200 18

รูปที่ 19. ชุดทดสอบไข้หวัดใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ แบบสะท้อน Line profiles ค่าความเข้มแสงถูกปรับค่าเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 8000 19

รูปที่ 20. ผลต่างความเข้มแสงที่แถบควบคุม (ΔI_C) และผลต่างความเข้มแสงที่แถบทดสอบ (ΔI_T) สำหรับชุดทดสอบไข้ใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ 19

รูปที่ 21. (ก) ภาพถ่ายชุดทดสอบ และ (ข) ภาพการเกิดแถบสีหารด้วยภาพ อ้างอิงแบบทะลุผ่าน 20

รูปที่ 22. ชุดทดสอบวันตกไข่ในตัวอย่างผู้หญิงแบบทะลุผ่าน Line profiles ค่าความเข้มแสงถูกปรับค่าเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 11800 21

รูปที่ 23. (ก) ภาพถ่ายชุดทดสอบ และ (ข) ภาพการเกิดแถบสีหารด้วยภาพ อ้างอิงแบบสะท้อน 21

รูปที่ 24. ชุดทดสอบวันตกไข่ในตัวอย่างผู้หญิงแบบสะท้อน Line profiles ค่าความเข้มแสงถูกปรับค่าเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 7800 22

รูปที่ 25. (ก) ภาพถ่ายชุดทดสอบ และ (ข) ภาพการเกิดแถบสีหารด้วยภาพ อ้างอิงแบบทะลุผ่าน 22

รูปที่ 26. ชุดทดสอบวันตกไข่ในตัวอย่างผู้ชายแบบทะลุผ่าน Line profiles ค่าความเข้มแสงถูกปรับค่าเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 12600 23

รูปที่ 27. (ก) ภาพถ่ายชุดทดสอบ และ (ข) ภาพการเกิดแถบสีหารด้วยภาพ อ้างอิงแบบสะท้อน 23

รูปที่ 28. ชุดทดสอบวันตกไข่ในตัวอย่างผู้ชายแบบสะท้อน Line profiles ค่าความเข้มแสงถูกปรับค่าเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 7000 24

รูปที่ 29. ตำแหน่ง Regions of interest (ROIs) 3 ตำแหน่ง และตัวอย่างการพล็อตกราฟ ความเข้มแสงตามเวลาที่ ROI0 และ ROI1 25

รูปที่ 30. ค่าเข้มแสงตามเวลาเมื่อพิจารณาที่ช่วงกลางข้อมูล เมื่อปรับค่าพิกเซลที่ 1 เป็น 100 (Positive) 25

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

รูปที่ 31. ค่าเข้มแสงตามเวลาเมื่อพิจารณาที่ช่วงกลางข้อมูล เมื่อปรับค่าพิกเซลที่ 1 เป็น 100 (Negative) 26

รูปที่ 32. แสดงตัวอย่างชุดตรวจสอบโรคผลเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ Acidovorax avenae subsp. *citrulli* ที่ความเข้มข้นต่างๆ 27

รูปที่ 33. ชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Aac* ตัวอย่างกราฟความเข้มแสง Line Profile แบบทะลุผ่าน 28

รูปที่ 34. ชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Aac* ตัวอย่างกราฟความเข้มแสง Line Profile แบบสะท้อน 29

รูปที่ 35. ชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Aac* ที่ความเข้มข้น 5×10^5 CFU/ml 30

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา

ชุดทดสอบอย่างง่ายแบบแอลเอฟเอ (Lateral flow immunochromatographic assays, LFA) ได้รับความสนใจพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำหรับสารชีวภาพหลากหลายชนิด ในประเทศไทยเอง ได้มีการวิจัยและพัฒนาชุดทดสอบแอลเอฟเอ สำหรับเป็นชุดทดสอบในทางการแพทย์ การตรวจสอบอาหาร และการเกษตร เป็นจำนวนมาก การแปรผลชุดทดสอบจะใช้การอ่านสีด้วยตาเปล่า ซึ่งมักจะขึ้นกับแต่ละบุคคล การแปรผลการอ่านแถบสีด้วยตาเปล่าจะมีปัญหามากขึ้น ถ้าตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมีความเข้มข้นต่ำ ทำให้แถบสีจางจนบางครั้งไม่สามารถบอกความแตกต่างสีได้ นอกจากนี้ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบบางตัวอย่างจะมีสีอื่นปน เช่น ตัวอย่างที่สกัดจากใบพืชมักจะมีสีเขียว เป็นต้น ทำให้ชุดทดสอบมีพื้นสีเขียวตามไปด้วย ส่งผลให้การอ่านแถบสีทำได้ลำบากขึ้น

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีทดสอบ (Lateral flow immunoassays readers) แทนการอ่านแถบสีด้วยตาเปล่า [1-3] เพื่อให้สามารถวัดความเข้มข้นได้ต่ำลง การแปรผลไม่ขึ้นกับผู้ใช้ และเพิ่มความมั่นใจให้กับผู้ใช้ เทคนิคที่ใช้ในเครื่องอ่านแถบสีทดสอบ แยกได้ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกใช้การวัดความเข้มแสงจากแถบตรวจวัด ด้วยโฟโตดีเท็กเตอร์ โดยสแกนหรือตำแหน่งการไปตามแนวยาวของชุดทดสอบ การวัดโดยวิธีนี้จะได้ความละเอียดสูง แต่ต้องมีการเลื่อนตำแหน่งของอุปกรณ์ กลุ่มที่สองใช้กล้องซีซีดี (CCD) หรือซีมอส (CMOS) อ่านภาพแถบทดสอบและคำนวณหาความเข้มแสงจากแต่ละแถบ เนื่องจากกล้องสามารถถ่ายภาพแถบทดสอบได้โดยไม่ต้องเลื่อนตำแหน่ง วิธีการนี้จึงได้รับความนิยมมากขึ้น นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีชุดทดสอบ โดยใช้กล้องบนโทรศัพท์มือถือ [2] ทำให้ผู้ใช้งานไม่จำเป็นต้องซื้อเครื่องอ่านแถบสีเพิ่มเติม

การนำเครื่องอ่านแถบสีไปใช้กับชุดทดสอบแต่ละชุด จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์ต่างๆ ให้สอดคล้องกับลักษณะเฉพาะของชุดทดสอบนั้นๆ เช่น การปรับความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสง การปรับค่าในสมการต่างๆ รวมทั้งการปรับเปลี่ยนรูปร่างให้สอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพของชุดทดสอบ จึงจำเป็นต้องพัฒนาเครื่องอ่านแถบสีขึ้นใช้งานเอง ซึ่งจะทำให้การปรับเปลี่ยนเครื่องมือดังที่กล่าวมาแล้ว ทำได้ง่ายและสะดวกกว่าการนำเครื่องมือที่มีอยู่แล้วมาปรับเปลี่ยน

โครงงานนี้ได้ศึกษาแนวทางเบื้องต้น การออกแบบเครื่องอ่านแถบสีทดสอบ โดยเลือกใช้กล้องในการบันทึกภาพแถบสี เช่นเดียวกับผลงานที่มาก่อนหน้านี้ แต่เลือกใช้กล้องเว็บแคม (Web camera) เป็นอุปกรณ์ถ่ายภาพ เพื่อหาแนวทางประมวลภาพที่เหมาะสม นอกจากนี้กล้องเว็บแคมมีราคาไม่แพง (ราคาประมาณ 500-1,000 บาท) จึงน่าทำให้อุปกรณ์โดยรวมมีราคาถูก สามารถถอดปรับเปลี่ยนเลนส์ได้ง่ายใน เมื่อได้แนวทางการออกแบบการจัดแสงและเทคนิคประมวลผลภาพที่เหมาะสม ก็สามารถประยุกต์ใช้กับกล้องชนิดอื่นๆ ได้

1.2 วัตถุประสงค์

1. ออกแบบและสร้างต้นแบบภาคสนามเครื่องอ่านแถบสี (LFA strip reader) โดยใช้กล้อง Webcam ของสารตัวอย่าง

2. พัฒนาเทคนิคประมวลผลภาพแบบใหม่สำหรับใช้ในการอ่านแถบสี LFA และการหาความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพื่อให้สามารถอ่านค่าความเข้มข้นได้ต่ำกว่าการอ่านแถบสีด้วยตาเปล่า

1.3 ขอบเขตงาน

- ศึกษาการทำงานของ Lateral flow immunochromatographic assays
- ออกแบบชุทดลองและพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการประมวลผลภาพ
- การทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล
- สร้างต้นแบบและทดสอบเพื่อให้ได้ตามวัตถุประสงค์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

เครื่องมือตรวจสอบสารตัวอย่าง (Sample) ที่อ่านจาก LFA นี้สามารถตรวจสอบได้ว่าเกิดสารที่ทำการทดสอบหรือไม่ สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยในขั้นต้นได้ รวมทั้งการศึกษาวิจัยและบันทึกผลซึ่งจะประมวลผลโดยใช้ซอฟท์แวร์ที่แสดงผลอย่างแม่นยำ และรวดเร็ว

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Lateral flow immunochromatographic assays

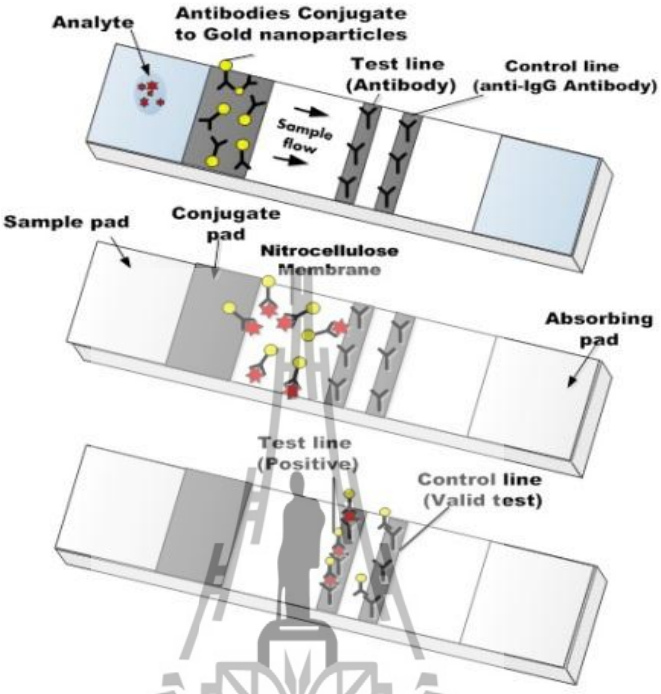
LFA (Lateral flow immunochromatographic assays) ได้รับความนิยมและแพร่หลายในทางการแพทย์เพื่อใช้ทดสอบสารชีวภาพหลายชนิด เช่น ชุดทดสอบการตั้งครรภ์ และชุดทดสอบสารเสพติดเป็นต้น ในประเทศไทยได้มีการวิจัยและพัฒนา LFA เพื่อทดสอบการตรวจสอบอาหารและการเกษตร เป็นจำนวนมากซึ่งปัจจุบันมีราคาถูกและใช้งานสะดวก

ในรูปที่ 1 ได้แสดงตัวอย่างของ LFA ในการใช้งานจะหยดสารตัวอย่าง (Sample) ที่ต้องการทดสอบนั้นลงไปใน Sample pad ของ LFA ใช้เวลาประมาณ 2 นาที จากนั้นสารตัวอย่างจะทำการแพร่จากซ้ายไปขวา ที่ไหลจากซ้ายไปขวานั้นเพราะปลายขวามือมี Absorbing pad ทำหน้าที่ดูดสารตัวอย่างให้แพร่เข้ามา ส่วน Conjugate pad ซึ่งอยู่ติดกับ Sample pad จะมีอนุภาคนาโนของทอง (Gold nanoparticles) ที่ติดผิวไว้ด้วยแอนติบอดี (Antibody) อยู่แล้ว เมื่อทำการหยดสารตัวอย่างที่มีแอนติเจน (Antigen) หรือสารที่เราต้องการทดสอบ เฉพาะแอนติเจนเท่านั้นที่จะจับกับแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทอง สารตัวอย่างรวมทั้งแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีที่ติดบนผิวของอนุภาคนาโนของทอง จะแพร่ซึมเข้าไปทางขวามือผ่าน Test line ซึ่ง Test line นี้จะตึงแอนติบอดีอีกชนิดหนึ่งที่จับอย่างจำเพาะกับแอนติเจน ถ้ามีแอนติเจนอยู่มาก จะทำให้อนุภาคนาโนของทองถูกจับไว้ที่ Test line เป็นจำนวนมาก อนุภาคนาโนของทองนี้จะมีคุณสมบัติการกระเจิงแสงแตกต่างจากพื้นสีขาวของ LFA ทำให้เราสามารถมองเห็นเป็นเส้นสีทึบ ส่วน Control line นั้นจะตึงแอนติบอดีอีกตัวหนึ่งที่ไม่จับกับแอนติเจน แต่จะจับกับแอนติบอดีที่ติดอยู่บนผิวอนุภาคนาโนของทอง ทำให้เส้น Control line มีสีทึบเสมอแม้ไม่มีแอนติเจน

วิธีการแปรผลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการทดสอบนั้นจะแสดงดังรูปที่ 2 ถ้าที่ Test line และ Control line แสดงแถบทึบทั้ง 2 แถบ แสดงว่ามีแอนติเจนที่เราทำการตรวจสอบ ถ้าแถบสีของ Control line แสดงผล ส่วน Test line ไม่แสดงผล เป็นไปได้ว่าอาจจะไม่มีแอนติเจนหรืออาจจะมีแต่มีความเข้มข้นต่ำเกินกว่าที่ตาจะมองเห็น ถ้าไม่เกิดแถบสีทั้งที่ Control line และ Test line แสดงว่าแผ่น LFA นั้นอาจจะชำรุด ต้องให้ทำการตรวจสอบสารดังกล่าวใหม่ด้วยแผ่น LFA แผ่นใหม่

เมื่อสารตัวอย่างมีสารที่เราต้องการวัดอยู่น้อย แถบสี Test line จะมีสีค่อนข้างจาง ทำให้การอ่านค่าแถบสีของ LFA ด้วยตาเปล่านั้น ทำได้ลำบาก และอาจจะขึ้นกับลักษณะสายตาของผู้ใช้งาน ส่งผลให้ไม่สามารถวัดที่ความเข้มข้นต่ำๆ ได้ การพัฒนาเครื่องมือช่วยในการอ่านค่าแถบสี

ของ LFA ที่สามารถตรวจสอบได้แม่นยำและอัตโนมัตินั้น น่าจะทำให้สามารถวัดสารที่ต้องการวัดได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าการอ่านค่าแถบสีด้วยตาเปล่า และไม่ขึ้นกับผู้ใช้งาน



รูปที่ 1. โครงสร้างของ Lateral flow immunochromatographic assays (LFA) [5]

รูปที่ 2. การแปรผลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการทดสอบ

2.2 ตัวอย่างชุดทดสอบที่พัฒนาใช้งานในประเทศ

2.2.1 ชุดทดสอบการเกิดเชื้อหวัด ชนิด Flu A

ชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อหวัดชนิด Flu A เป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปเพื่อตรวจหาแอนติเจนที่มีจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ กลุ่มเอ ซึ่งทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ โดยใช้หลักการไบโอเซ็นเซอร์เป็นหนึ่งในผลงานของศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (นาโนเทค) อ่านผลได้ภายใน 15 นาที มีความแม่นยำสูง

ไข้หวัดใหญ่ (Influenza หรือ Flu) เป็นโรคเกิดจากติดเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา (influenza viruses) เป็นโรคติดต่อทางเดินหายใจเช่นเดียวกับโรคหวัด (ไข้หวัดธรรมดา หรือ ไข้หวัด) แต่จากไวรัสคนละชนิด และมีความรุนแรงสูงกว่าโรคหวัดธรรมดามากไวรัสไข้หวัดใหญ่มีหลายสายพันธุ์ย่อย ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ย่อยมีความรุนแรงของโรคต่างกัน ผลของการทดสอบว่ามีแอนติเจนต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่นั้นแสดงดังรูปที่ 3

(ก) (ข)

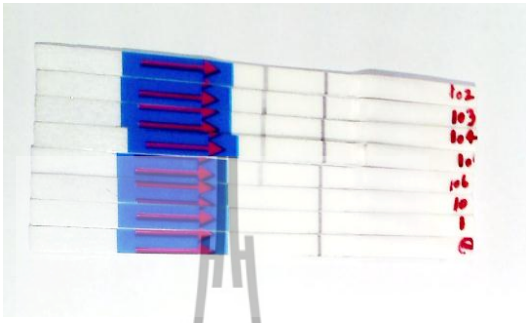
รูปที่ 3. (ก) LFA ที่แสดงผลของการเกิดเชื้อหวัด ชนิด Flu A เมื่อสารตัวอย่างมีความเข้มข้นต่างๆ และ (ข) เมื่อใช้ความเข้มข้น 1:600 และ 1:800 แถบสีที่ test line จะจำแนกด้วยตาเปล่าได้ยาก [LFA ได้รับความอนุเคราะห์จากนักวิจัยของนาโนเทค, ดร.เจษฎา แม่นยำ]

2.2.2 เชื้อแบคทีเรีย Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญมากในทางการแพทย์และสาธารณสุข โดยจัดเป็นเชื้ออันดับสามที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคฝี หนองและสามารถเข้าสู่กระแสเลือดของมนุษย์ได้ และในปัจจุบันมีแนวโน้มของการดื้อยาของแบคทีเรียกลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น หลังจากนั้นเชื้อได้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็วโดยเกิดการดื้อยา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Methicillin และยาในกลุ่มเบต้าแลคแตม จึงเรียกเชื้อนี้ว่า Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ชุดทดสอบเบื้องต้นพัฒนาโดยนักวิจัยไบโอเทคร่วมกับมหาวิทยาลัยมหิดล ไว้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย MRSA เป็นชุดทดสอบอย่างง่ายใช้เวลา 10-15 นาทีในการแสดงผลการเกิดปฏิกิริยา (รูปที่ 4)



รูปที่ 4. ภาพถ่ายของ LFA ที่แสดงผลของการเกิดเชื้อแบคทีเรีย Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ [LFA ได้รับความอนุเคราะห์จากนักวิจัยของไบโอเทค,วรรณสิกา เกียรติปฐมชัย]

2.2.3 ชุดตรวจสอบวันตกไข่ iBabi

โดยปกติแล้ว รอบประจำเดือนของคุณจะเกิดขึ้น ทุกๆ 23 ถึง 35 วัน และมีโอกาสสูงที่ไข่จะตกในช่วงประมาณ 2 สัปดาห์ก่อนที่ประจำเดือนของคุณจะมา แต่ก็อาจแตกต่างกันไปในผู้หญิงแต่ละคน โดยส่วนใหญ่แล้ว ผู้หญิงมักมีประจำเดือนทุกๆ 28 วัน และไข่จะตกในราววันที่ 14 ของรอบเดือน

ในช่วงการตกไข่ จะรู้สึกว่ามีของเหลวออกมาทางช่องคลอดมี ลักษณะเป็นเมือก ใส ลื่น คล้ายไข่ขาว สัญญาณที่แสดงระยะตกไข่ยังรวมถึงความเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในร่างกายด้วย จึงสามารถคาดการณ์ช่วงเวลาการตกไข่ได้จากอุณหภูมิของร่างกาย โดยอุณหภูมิจะลดลงก่อนไข่ตกและเพิ่มขึ้นหลังจากไข่ตกแล้ว แต่จำเป็นต้องบันทึกอุณหภูมิในเวลาเดียวกันทุกเช้า ก่อนดื่มน้ำและรับประทานอาหาร หรือก่อนลุกจากเตียง การหาซื้อชุดทดสอบระยะตกไข่จากร้านขายยา หรือตามซูเปอร์มาร์เก็ตชั้นนำทั่วไป โดยในชุดทดสอบนี้จะมีแผ่นจุ่มทดสอบปัสสาวะ ซึ่งคล้ายกับการทดสอบการตั้งครรภ์

ชุดทดสอบนี้จะตรวจฮอร์โมน LH (Luteinizing Hormone) คือฮอร์โมนที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้ไข่ตกจากรังไข่ในวันปกติร่ายกายจะหลั่งฮอร์โมนนี้ในปริมาณน้อย แต่จะหลั่งเพิ่มขึ้นสูงสุดอย่าง

รวดเร็วก่อนไข่ตกประมาณ 24-48 ชม. ซึ่งชุดตรวจสอบวันตกไข่นี้จะช่วยให้ทราบวันที่ฮอร์โมนLH สูงสุด (LH surge) เพื่อช่วยเพิ่มโอกาสการตั้งครรภ์ อีกทั้งยังประยุกต์ใช้ช่วยเพิ่มโอกาสการเลือกเพศบุตรได้อีกด้วย

(ก) (ข)

รูปที่ 5. (ก) ถ่ายชุดตรวจสอบวันตกไข่ และ (ข) ภาพแสดงผลการเกิดฮอร์โมน LH

2.2.4 ชุดตรวจโรคผลเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ Acidovorax avenae subsp. *Citrulli*

ชุดตรวจโรคผลเน่าแบคทีเรียของพืชตระกูลแตง เป็น ชุดตรวจแบบง่ายในรูปแบบ Immunochromatographic Strip Test ใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp.*citrulli (Aac)* ที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าแบคทีเรียของพืชตระกูลแตงซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตและส่งออกเมล็ดพันธุ์ของพืชในกลุ่มนี้ ชุดตรวจนี้มีความจำเพาะสูง แม่นยำ ใช้เวลารวดเร็วภายใน 5-10 นาที ชุดตรวจสอบดังกล่าวพัฒนาโดย ดร. อรประไพ คชนันท์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุได้จากตัวอย่างใบ ต้นกล้า และเปลือกของผล ใช้ตรวจคัดกรองโรคผลเน่าแบคทีเรียในพืชตระกูลแตงเช่น แตงโม เมลอน สควอ๊ซ แคนตาลูป แตงกวา และฟักทอง

การตรวจโรคมีประโยชน์ในด้านการศึกษาด้านระบาดวิทยา การจัดการควบคุมโรค และการตรวจคัดกรองโรคผลเน่าแบคทีเรียเพื่อรับรองความปลอดเชื้อเมื่อมีการส่งออกเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตง ชุดตรวจสอบนี้พัฒนาโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร และมหาวิทยาลัยขอนแก่น ผลการทดสอบการเกิดเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp.*citrulli (Aac)* แสดงดังรูปที่ 6

รูปที่ 6. ชุดตรวจสอบโรคผลเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ Acidovorax avenae subsp. *Citrulli* (*Aac*) [LFA ได้รับความอนุเคราะห์จากนักวิจัยของไบโอเทค]

2.3 การพัฒนาเครื่องมือสำหรับอ่านแถบสี

การพัฒนาเครื่องมืออ่านแถบสี (LFA strip reader) ได้วิจัยและพัฒนามาพอสมควร เช่น Kuang และคณะ [3] ใช้กล้องในการถ่ายภาพแถบสี LFA และคำนวณหาความเข้มแสง Line profile เปรียบเทียบค่าระหว่าง Test line และ Control line พบว่าสามารถอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวัดได้ดีกว่าการอ่านค่าด้วยตาประมาณ 10 เท่า กลุ่มวิจัยของ Yoon [4] พัฒนาเครื่องอ่าน LFA โดยใช้โทรศัพท์พกพาในการถ่ายภาพและประมวลผล กล้องที่อยู่บนโทรศัพท์ทำหน้าที่รับภาพมาประมวลผล แหล่งกำเนิดแสงใช้แฟลชที่ติดมากับโทรศัพท์ เพื่อให้กล้องอ่านค่าความเข้มแสงได้ดีนั้น ต้องอาศัยการจัดวางมุมที่แม่นยำ อุปกรณ์โดยรวมแม้จะมีประสิทธิภาพสูง แต่การผลิตน่าจะทำได้ยาก นอกจากนี้กลุ่มวิจัยของ Ozcan [5] ได้พัฒนาเครื่องอ่าน LFA โดยใช้โทรศัพท์พกพาขึ้นเช่นกัน โดยใช้แหล่งกำเนิดแสง LEDs และจัดแสงให้เครื่องมือสามารถอ่านค่าการสะท้อนแสงและค่าการทะลุผ่านได้ ทั้งนี้เพื่อให้เครื่องอ่านดังกล่าว สามารถปรับใช้งานกับ LFA ชนิดใดก็ได้ ผลงานของกลุ่มวิจัยดังกล่าวได้พัฒนาเป็นต้นแบบเชิงพาณิชย์แล้ว

นอกจากนี้ยังได้มีเครื่องอ่าน LFA จำหน่ายในเชิงพาณิชย์แล้ว เช่น ของบริษัท Detekt Biomedical (www.idetekt.com) บริษัท Qiagen (www.qiagen.com) บริษัท Optricon (www.optricon.de) และ บริษัท Forsitediagnostics (www.forsitediagnostics.com) เป็นต้น เครื่องมือเหล่านี้ใช้การถ่ายภาพแถบสีด้วยกล้อง และมักจะประมวลผลโดยการอ่านค่า Line profile

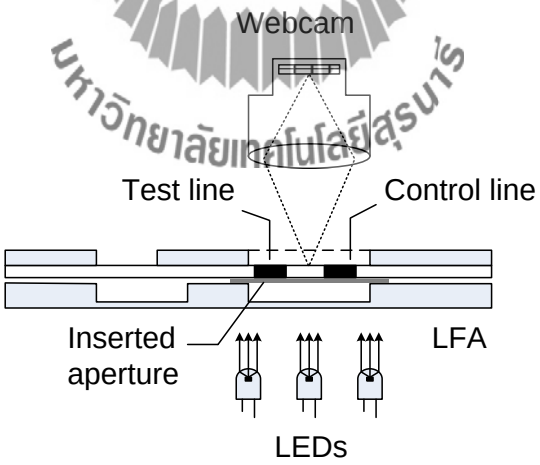
บทที่ 3

การออกแบบชุดทดลองและเทคนิคการประมวลผลภาพ

3.1 การออกแบบชุดการทดลอง

3.1.1 การจัดอุปกรณ์แบบทะลุผ่าน (Transmission)

การจัดชุดทดลองเพื่อศึกษาเทคนิคการจัดแสง และการประมวลผลภาพ แสดงในรูปที่ 7 แหล่งกำเนิดแสงที่ใช้คือไดโอดเปล่งแสงสีขาว (White-light LEDs) วางไว้ด้านล่างของกล่องบรรจุชุดทดสอบ เนื่องจากพลาสติกที่ใช้ทำกล่องบรรจุมีสีขาวขุ่น สามารถทำหน้าที่เป็นดิฟฟิวเซอร์ (Diffuser) ได้ ซึ่งจะทำให้ความเข้มแสงตกกระทบแผ่นชุดทดสอบ มีการกระจายของความเข้มแสงสม่ำเสมอมากขึ้น การวางแหล่งกำเนิดแสงไว้ด้านล่าง จะทำให้ถ่ายภาพแถบสีทดสอบใช้หลักการทะลุผ่าน ซึ่งต่างจากชุดทดสอบอื่นที่ใช้หลักการสะท้อน การจัดแสงในรูปที่ 7 นั้น ทำให้ขนาดของเครื่องอ่านมีขนาดเล็กลง แต่ความเข้มแสงจะถูกลดทอนลงไปมาก จึงต้องใช้ LEDs หลายตัว การอ่านภาพจะใช้กล้องเว็บแคม (Logitech) ซึ่งต่อกับคอมพิวเตอร์ผ่านพอร์ท USB การประมวลภาพจากกล้องจะใช้โปรแกรม LabVIEW

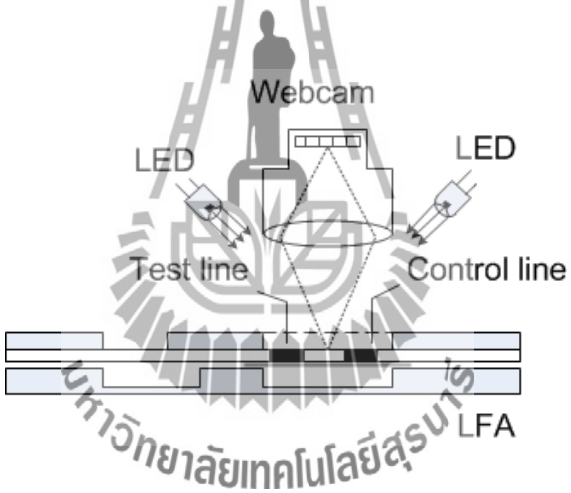


รูปที่ 7. การจัดอุปกรณ์ทดลองแบบทะลุผ่าน

การจัดแหล่งกำเนิดแสงไว้ด้านล่าง ทำให้แสงบางส่วนสามารถทะลุผ่านขอบหรือช่องว่างระหว่างอุปกรณ์ของชุดทดสอบได้มากกว่าส่วนอื่น เพื่อกำหนดให้แสงทะลุผ่านเฉพาะบริเวณตรงกลางของแถบสี งานวิจัยนี้ได้ใช้แผ่นเทปสีดำตัดเปิดช่องตรงกลางขนาดประมาณ 2 mm x 20 mm วางไว้ใต้แถบชุดทดสอบและอยู่ภายในกล่องบรรจุ ดังรูปที่ 7

3.1.2 การจัดอุปกรณ์แบบสะท้อน (Reflection)

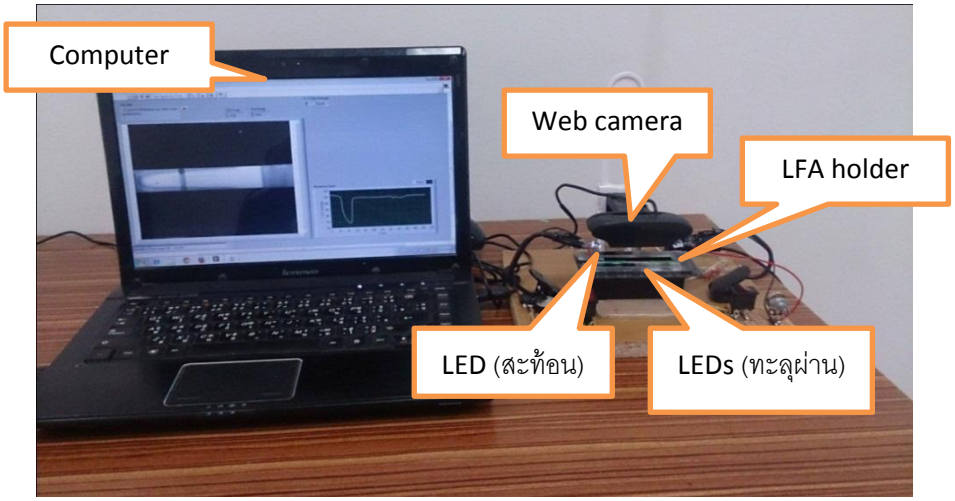
การจัดชุดทดลองเพื่อศึกษาเทคนิคการจัดแสงแบบสะท้อนนั้นแสดงดังรูปที่ 8 โดยจะวางแหล่งกำเนิดแสงไว้ด้านบน ปรับมุมตกกระทบ เพื่อให้เห็นความเข้มข้นแถบสีชัดเจนที่สุด วิธีนี้จะทำให้เห็นภาพแถบสีบน LFA ได้ชัดเจนขึ้น ใช้ LEDs สองตัวเพื่อทำให้ความเข้มแสงมีความสม่ำเสมอ การอ่านภาพจะใช้กล้องเว็บแคม (Logitech) ซึ่งต่อกับคอมพิวเตอร์ผ่านพอร์ท USB การประมวลภาพจากกล้องจะใช้โปรแกรม LabVIEW เหมือนกับการจัดอุปกรณ์แบบทะลุผ่าน



รูปที่ 8. การจัดอุปกรณ์ทดลองแบบสะท้อน

โดยทั่วไปแล้ว แม้จะใช้ดิฟฟิวเซอร์ในการกระจายความเข้มแสงแต่ความเข้มแสงมักจะไม่เท่ากันในแต่ละตำแหน่ง จึงต้องชดเชยผลเนื่องจากความเข้มแสงที่ไม่เท่ากัน ซึ่งทำได้โดยการใช้ชุดทดสอบที่ยังไม่ได้หยดสารตัวอย่างใส่เข้าไปในเครื่องก่อนและวัดความเข้มแสงอ้างอิง จากนั้นใช้ความเข้มแสงอ้างอิงดังกล่าว ในการชดเชยความไม่เท่ากันของความเข้มแสง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 9. ภาพถ่ายชุดทดลองสำหรับบันทึกภาพแถบสีจาก LFA ชุดทดลองดังกล่าวมีแหล่งกำเนิดแสงแบบ ไดโอดเปล่งแสงวางไว้ด้านล่างและด้านบน LFA สำหรับถ่ายภาพแบบทะลุผ่านและแบบสะท้อนตามลำดับ

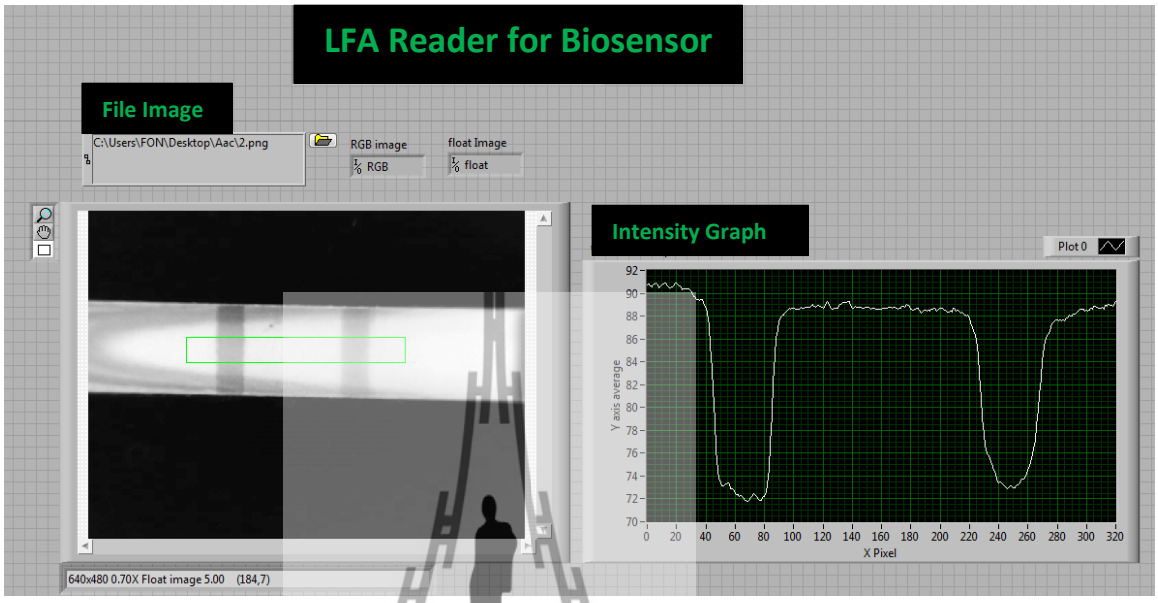
3.2 เทคนิคที่ใช้ในการประมวลผลภาพ

เทคนิคการประมวลผลภาพที่พัฒนาขึ้นมี 2 เทคนิค คือ การอ่านความเข้มแสงแบบ Line profile และ การอ่านค่าความเข้มแสงจากแถบทดสอบและแถบควบคุมขณะเกิดปฏิกิริยา (Real-time intensity plot) ชุดทดสอบที่ใช้เป็นชุดทดสอบไข้หวัดใหญ่และชุดตรวจโรคตรวจสอบโรคผลเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ Acidovorax avenae subsp. *Citrulli* (*Aac*) โดยชุดทดสอบที่ใช้ผ่านการหยดสารตัวอย่างมานานหลายวัน ความเข้มของแถบสีจึงอาจจะไม่เท่ากับความเข้มหลังจากการหยดสารทันที ดังนั้นข้อมูลที่ได้จึงเหมาะสำหรับใช้ในการพัฒนาโปรแกรมประมวลผลภาพในเบื้องต้นเท่านั้น

3.2.1 เทคนิคการประมวลผลภาพแบบ Line Profile

เทคนิคนี้อ่านค่าความเข้มแสง ตามแนวเส้นที่ลากผ่านแถบควบคุม และแถบทดสอบ ซอฟต์แวร์จะทำการประมวลผลความเข้มแสงและพล็อตกราฟความเข้มแสงเทียบกับตำแหน่ง การลากเส้นจะลากบริเวณตรงกลางแถบกระดาษ (รูปที่ 10) ค่าความเข้มแสงที่แถบควบคุมและแถบทดสอบจะลดลงต่ำกว่าบริเวณที่ไม่มีแถบสี สำหรับแต่ละความเข้มข้นของสารตัวอย่าง บันทึกค่าผลต่างความเข้มแสงที่ลดลง ΔI_C สำหรับแถบควบคุม และ ΔI_T สำหรับแถบทดสอบ โดยอ้างอิงจากความเข้มแสงบริเวณขอบทั้งสอง ซึ่งมีความเข้มแสงค่อนข้างสม่ำเสมอในการใช้เทคนิค Line profile ผู้ใช้ควรจะ

ใส่ชุดทดสอบเข้าในเครื่องอ่านแถบสีก่อนหยดสารตัวอย่าง เพื่อบันทึกความเข้มแสงอ้างอิง จากนั้นสามารถหยดสารตัวอย่าง รอจนเกิดสี และนำไปวัดด้วยเครื่องอ่านอีกครั้งหนึ่ง



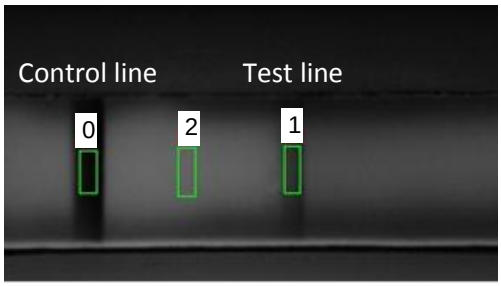
รูปที่ 10. ตัวอย่างหน้าจอโปรแกรมประมวลผลภาพเทคนิค Line Profile

3.2.2 เทคนิคการประมวลผลภาพแบบ Real-time intensity plot

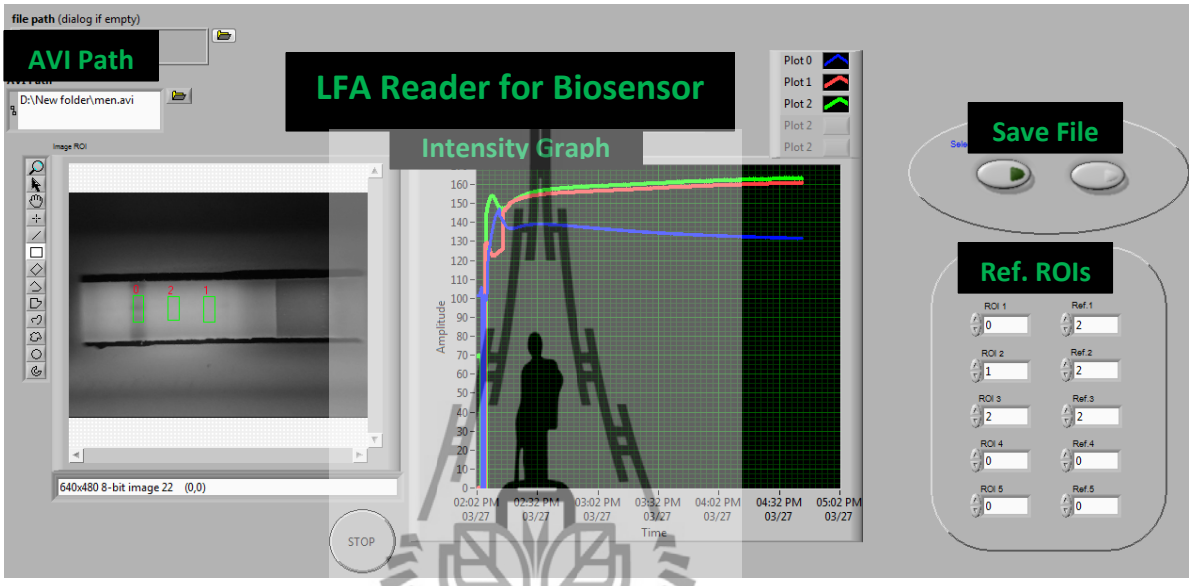
เทคนิค Real-time intensity plot เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงภายในบริเวณแถบควบคุมและแถบทดสอบตามเวลา เริ่มตั้งแต่การเกิดปฏิกิริยา (เริ่มหยดสารตัวอย่าง) จนกระทั่งเกิดสีบนแถบหรือจนเสร็จสิ้นการวัด ซึ่งคาดว่าจะทำให้สามารถดูการเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงที่มีค่าต่ำมากได้

เทคนิคดังกล่าวนี้จำเป็นต้องรู้ตำแหน่งแถบทั้งสอง เพื่อกำหนด Regions of interest (ROI) (รูปที่ 11) ลงบนแถบสีดังกล่าว แต่เนื่องจากขณะเริ่มการทดลองหรือเริ่มหยดสารตัวอย่าง จะไม่มีแถบสีเกิดขึ้น ในการใช้งาน ผู้ใช้จึงต้องบันทึกการวัดชุดทดสอบเป็นวิดีโอไว้ตลอดการวัด จากนั้นใช้ภาพเฟรมสุดท้ายในการกำหนดตำแหน่ง ROIs ลงบนแถบสี โปรแกรมจะย้อนคำนวณความเข้มแสงของแต่ละ ROIs ที่ตำแหน่งดังกล่าว ตั้งแต่เฟรมแรกที่บันทึกไว้

รูปที่ 11 (ก) แสดงการกำหนด ROIs ลงบนแถบควบคุม (ROI0) แถบทดสอบ (ROI1) และตำแหน่งตรงกลางระหว่างแถบสีทั้งสอง (ROI2) โดยที่ตำแหน่ง ROI2 จะทำหน้าที่วัดความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสงเพื่อนำมาชดเชยผลการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความเข้มแสง



(ก)



(ข)

รูปที่ 11. ก) ตำแหน่ง Regions of Interest (ROIs) 3 ตำแหน่ง บนแถบควบคุม แถบทดสอบ และตำแหน่งตรงกลางระหว่างแถบทั้งสอง เพื่อวัดค่าความเข้มแสงตามเวลา ตั้งแต่ก่อนหยดสารตัวอย่างจนเสร็จสิ้นกระบวนการวัด และ (ข) ตัวอย่างการพล็อตกราฟความเข้มแสงตามเวลาที่ ROI0 และ ROI1 ในรูปความเข้มแสงจะไม่เปลี่ยนตามเวลา เนื่องจากอ่านค่าจากแถบทดสอบที่เกิดสีเสร็จแล้ว

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การทดลองกับชุดทดสอบเชื้อไข้หวัดใหญ่ ชนิด Flu-A

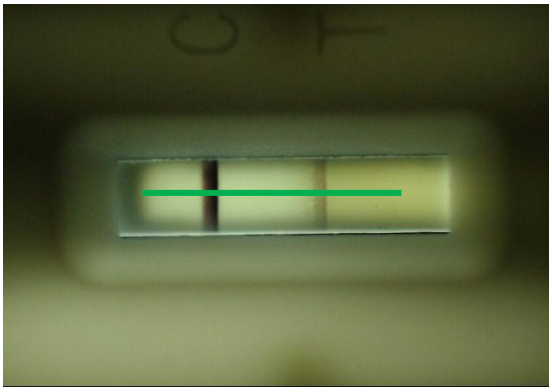
4.1.1 การทดลองแบบทะลุผ่าน

ในรูปที่ 12 แสดงตัวอย่างสีที่เกิดขึ้นที่แถบควบคุมและแถบทดสอบ สำหรับชุดทดสอบไข้หวัดใหญ่ เมื่อใช้สารตัวอย่างความเข้มข้น 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 และ 1:800 โดยการเจือจางสารตัวอย่างตั้งต้นด้วยบัฟเฟอร์ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า พบว่าทุกตัวอย่าง แถบควบคุมจะเกิดสีชัดเจน ส่วนความเข้มสีที่แถบทดสอบจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง โดยแถบทดสอบที่ความเข้มข้น 1:800 จะสังเกตสีได้ค่อนข้างยาก

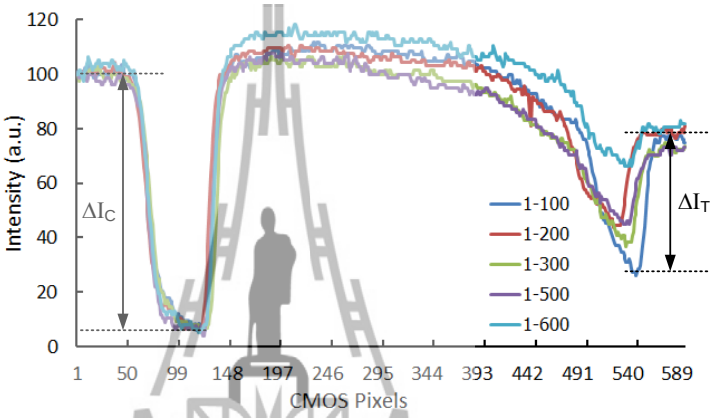
เมื่อนำชุดทดสอบในรูปที่ 12 ไปอ่านค่าความเข้มสีโดยใช้ชุดทดลองในรูป 9 และใช้การอ่านค่า Line profile (รูปที่ 13) พบว่า ความเข้มแสงที่แถบควบคุมจะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับความเข้มแสงนอกแถบ และให้ค่าความเข้มแสงใกล้เคียงกันสำหรับทุกตัวอย่างที่ทดสอบ ส่วนแถบทดสอบ ค่าความเข้มแสงที่ลดลงจะแปรตามความเข้มข้น

รูปที่ 12. การเกิดสีที่แถบควบคุมและแถบทดสอบ สำหรับชุดทดสอบไข้หวัดใหญ่ เมื่อใช้สารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



(ก)

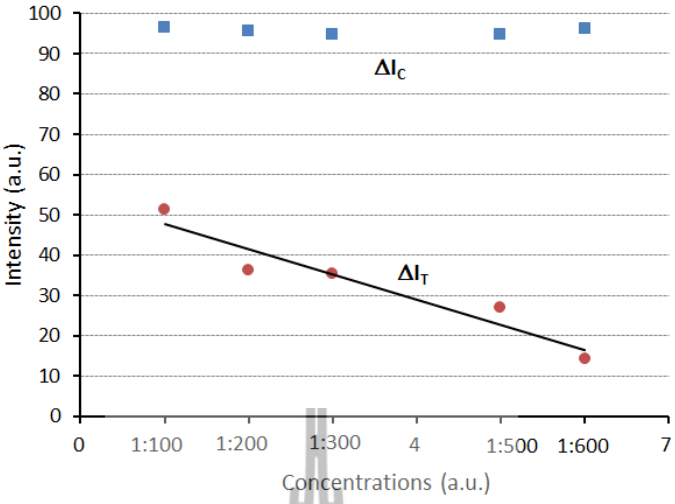


(ข)

รูปที่ 13 (ก) การเกิดแถบสีของชุดทดสอบ Flu-A ที่ตัวอย่างความเข้มข้น 1:200 และ (ข) Line Profile (ปรับค่าความเข้มแสงเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 100)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 13. จะเห็นว่าค่าเข้มแสงทะลุผ่านชุดทดสอบมีค่าไม่สม่ำเสมอจากตำแหน่ง Control line จนถึง Test line ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะชุดทดสอบไข่หวัดใหญ่ บรรจุภัณฑ์มีความหนาของพลาสติกไม่สม่ำเสมอทำให้แสงที่ทะลุผ่านในแต่ล่ะตำแหน่งมีค่าไม่สม่ำเสมอ การอ่านค่าความเข้มแสง ΔI_C และ ΔI_T ที่ถูกต้องจำเป็นต้องให้ความเข้มแสงทะลุผ่าน (เมื่อยังไม่เกิดแถบสี) มีค่าใกล้เคียงกันซึ่งจะอธิบายต่อไป



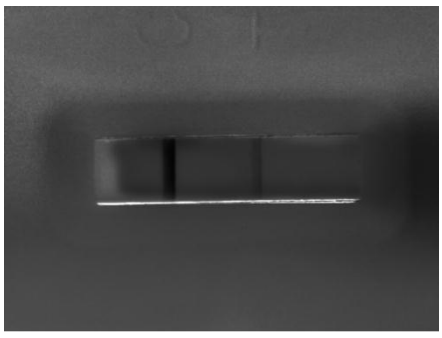
รูปที่ 14. ผลต่างความเข้มแสงที่แถบควบคุม (ΔI_C) และผลต่างความเข้มแสงที่แถบทดสอบ (ΔI_T) สำหรับชุดทดสอบไข้ใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.1.2 การชดเชยความเข้มแสงโดยใช้ภาพอ้างอิง

จากหัวข้อที่ผ่านมาพบว่าการจัดแสงมีความเข้มข้นเท่ากันในทุกตำแหน่งนั้นทำได้ยาก งานวิจัยนี้จึงใช้ภาพอ้างอิงซึ่งเป็นภาพของ LFA ก่อนการทดสอบซึ่งจะไม่มีแถบสีเกิดขึ้นบนภาพอ้างอิง อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ไม่ผ่านการหยดสารตัวอย่าง จึงจะลองใช้กระดาษขาวทำหน้าที่เป็น LFA ที่ยังไม่เกิดแถบสีแทน

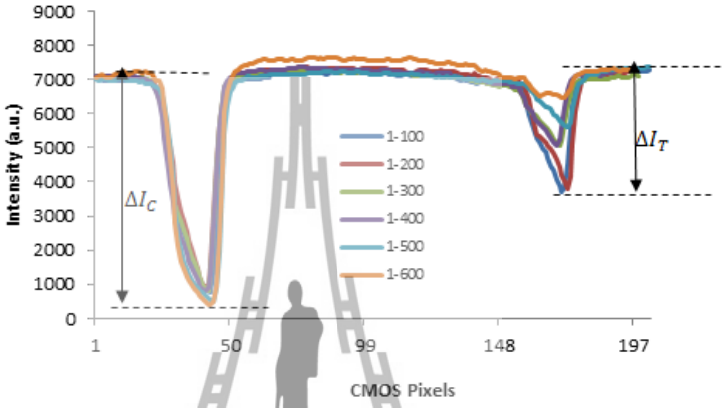
$$Image_{Out} = \frac{Image_n}{Image_{ref.}} \quad \text{สมการที่ (4.1)}$$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

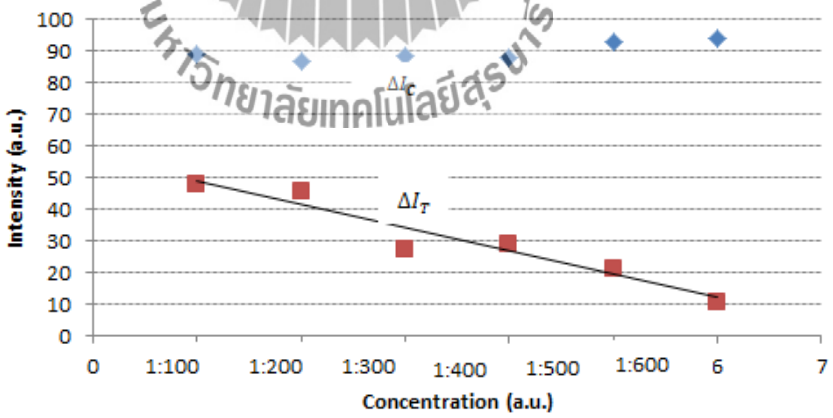


รูปที่ 15. ภาพ LFA เมื่อชดเชยความเข้มแสงด้วยภาพอ้างอิง เมื่อใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1:200

เมื่อนำภาพที่ได้หลังจากการชดเชยความเข้มแสง (รูปที่ 15) และอ่านค่า Line profile (รูปที่ 16) พบว่า ค่าความเข้มแสงที่ได้จะเรียบขึ้นกว่าก่อนทำภาพอ้างอิง แต่ในการใช้จริงผู้ใช้ควรจะใส่ชุดทดสอบเข้าในเครื่องอ่านแถบสีก่อนหยดสารตัวอย่าง เพื่อบันทึกความเข้มแสงอ้างอิง จากนั้นสามารถหยดสารตัวอย่าง รอจนเกิดสี และนำไปวัดด้วยเครื่องอ่านอีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี Line Profile ค่าที่ได้จะแม่นยำมากขึ้น รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มแสงที่ลดลงที่แถบควบคุมและแถบทดสอบด้วยวามเข้มข้นของสารตัวอย่าง



รูปที่ 16. สำหรับชุดทดสอบไข้หวัดใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ แบบทะลุผ่าน Line profiles ค่าความเข้ม (แสงถูกปรับค่าเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 7000)

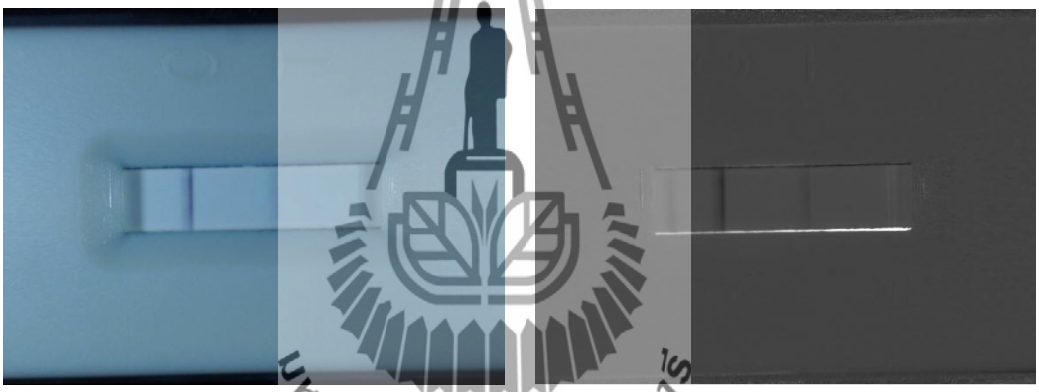


รูปที่ 17. ผลต่างความเข้มแสงที่แถบควบคุม (ΔI_C) และผลต่างความเข้มแสงที่แถบทดสอบ (ΔI_T) สำหรับชุดทดสอบไข้ใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.1.3 การทดลองแบบสะท้อน

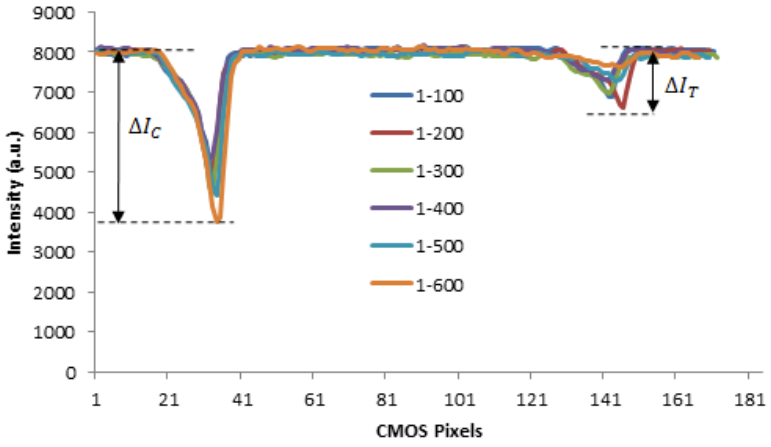
จะใช้ชุดทดสอบไข้หวัดใหญ่ เมื่อใช้สารตัวอย่างความเข้มข้น 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 และ 1:600 ชุดเดียวกับการจัดอุปกรณ์แบบทะลุผ่าน ทำการทดลองกับเครื่องอ่านแบบเดียวกับหลักการทะลุผ่าน โดยใช้ภาพความเข้มแสงอ้างอิง คือภาพกระดาษขาวก่อนเกิดแถบสีบนแผ่น LFA จากนั้นให้ใส่ภาพการเกิดแถบสีของชุดทดสอบเชื้อหวัด Flu-A เพื่อทำการบันทึกภาพ นำภาพการเกิดแถบสีเป็นตัวตั้งหารด้วยภาพอ้างอิง แสดงดังรูปที่ 18 จากนั้นใช้การอ่านค่า Line profile (รูปที่ 19) พบว่า ความเข้มแสงที่แถบควบคุมจะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับความเข้มแสงนอกแถบ และให้ค่าความเข้มแสงใกล้เคียงกันสำหรับทุกตัวอย่างที่ทดสอบ ส่วนแถบทดสอบ ค่าความเข้มแสงที่ลดลงจะแปรตามความเข้มข้น (รูปที่ 20) โดยที่ความเข้มข้น 1:600 ของสารวัดค่าความเข้มแสงที่ลดลงได้ 4.68%



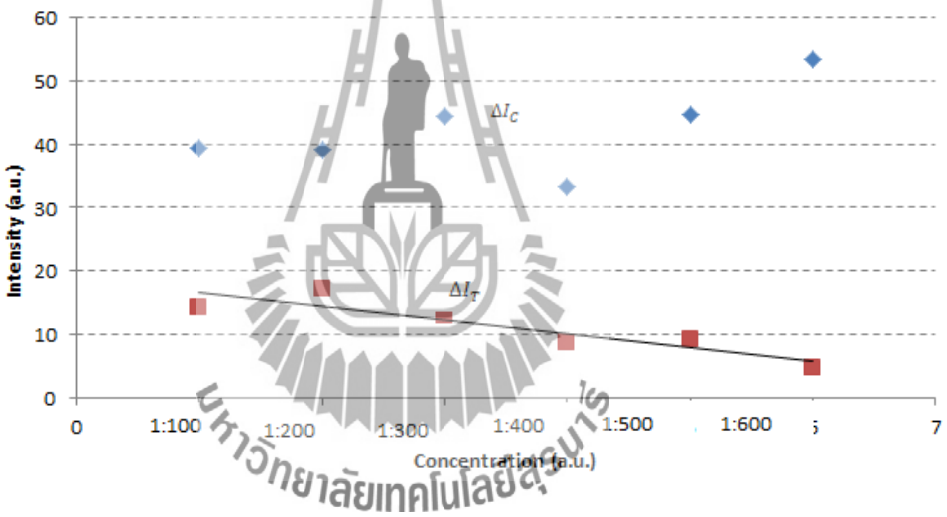
(ก) (ข)

รูปที่ 18. (ก) ภาพถ่ายขณะทำ Line Profile และ (ข) ภาพการเกิดแถบสีหารด้วยภาพอ้างอิงแบบสะท้อน เมื่อใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1:200

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 19. Line profile ชุดทดสอบไข้หวัดใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อวัดแสงแบบสะท้อน



รูปที่ 20. ผลต่างความเข้มแสงที่แถบควบคุม (ΔI_C) และผลต่างความเข้มแสงที่แถบทดสอบ (ΔI_T) สำหรับชุดทดสอบไข้ใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 การทดสอบกับชุดตรวจสอบวันตกไข่ iBabi

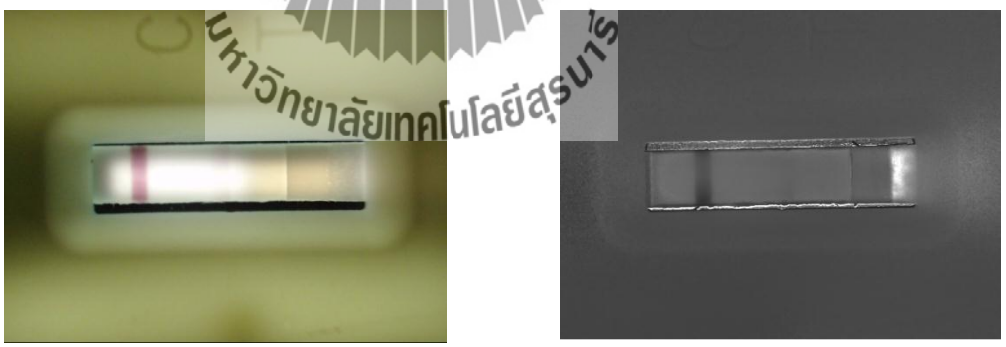
ชุดตรวจสอบวันตกไข่ จะตรวจสอบฮอร์โมน LH (Luteinzing hormone) ชุดตรวจสอบนี้จะช่วยให้ทราบวันที่ฮอร์โมน LH สูงสุด เพื่อเพิ่มโอกาสในการตั้งครรภ์ วิธีทดสอบจะทำการนำ LH Surge test strip นำมาใส่บรรจุภัณฑ์สวมใส่เหมือนกับชุดทดสอบเชื้อไข้หวัดใหญ่ ทำการใส่ในเครื่องอ่านแถบสีชุดทดลอง แล้วเก็บภาพก่อนการเกิดปฏิกิริยา จากนั้นให้หยดสารตัวอย่าง (ปัสสาวะ) ลงในบริเวณที่หยดสาร ทำการบันทึกภาพผ่านซอฟต์แวร์ที่ใช้ในการประมวลผลตั้งแต่ก่อนเกิดปฏิกิริยา จนสิ้นสุดการเกิดแถบสี

ชุดทดสอบวันตกไข่นี้ในการทดลองสามารถบันทึกได้ตั้งแต่ก่อนการเกิดปฏิกิริยา จนสิ้นสุดการเกิดปฏิกิริยา สามารถทำการทดลองได้ทั้งเทคนิค Line Profile และ เทคนิค Real-time intensity plot ซึ่งได้ทำการทดลองการจัดแสงทั้งแบบตกกระทบและแบบสะท้อน โดยจะใช้ตัวอย่างผู้หญิงเป็น Positive และตัวอย่างผู้ชายเป็น Negative ในการทดสอบ

4.2.1 เทคนิคการประมวลผลภาพแบบ Line Profile

เทคนิคนี้เมื่อนำชุดทดสอบใส่เครื่องอ่านแถบสี จะทำการบันทึกภาพอ้างอิงก่อนทำการหยดสารตัวอย่าง ใช้เวลาประมาณ 10-15 นาที รอจนกระทั่งสิ้นสุดการเกิดปฏิกิริยา ภาพที่เกิดแถบนำไปหารด้วยภาพอ้างอิง จะได้ภาพใหม่ซึ่งจะเป็นการทำให้ได้ค่าความเข้มแสงที่เรียบขึ้น จะเกิดการเฉลี่ย จากนั้นนำภาพที่ได้ไปอ่านค่าความแสงด้วยเทคนิค Line Profile

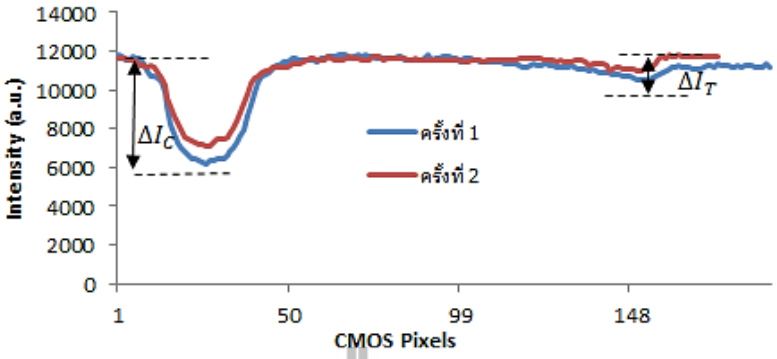
รูปที่ 21 แสดงการเกิดปฏิกิริยาจากการทดสอบผลตัวอย่างของผู้หญิง (Positive) แบบทะลุผ่าน จากนั้นนำมาทำ Normalization คือการหารด้วยภาพอ้างอิง แล้วนำภาพที่ได้มาทำภาพเฉลี่ยเพื่อให้ได้ภาพที่เรียบขึ้น เมื่อทำ Line Profile พบว่าค่าความเข้มแสงที่ได้แสดงดังรูปที่ 22 ความเข้มแสงที่แถบควบคุมจะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับความเข้มแสงนอกแถบ และให้ค่าความเข้มแสงใกล้เคียงกันสำหรับทุกตัวอย่างที่ทดสอบ ส่วนแถบทดสอบ ค่าความเข้มแสงที่ลดลงเพียงเล็กน้อย อาจเป็นเพราะว่ามีสารตัวอย่างในปริมาณไม่มาก ครั้งที่ 1 ลดลงเพียง 9.55% และครั้งที่ 2 ลดลง 7.77%



(ก) (ข)

รูปที่ 21. (ก) ภาพการเกิดแถบสีของชุดทดสอบ และ (ข) ภาพของชุดทดสอบที่ชดเชยความเข้มแสงโดยใช้ภาพอ้างอิงผ่าน

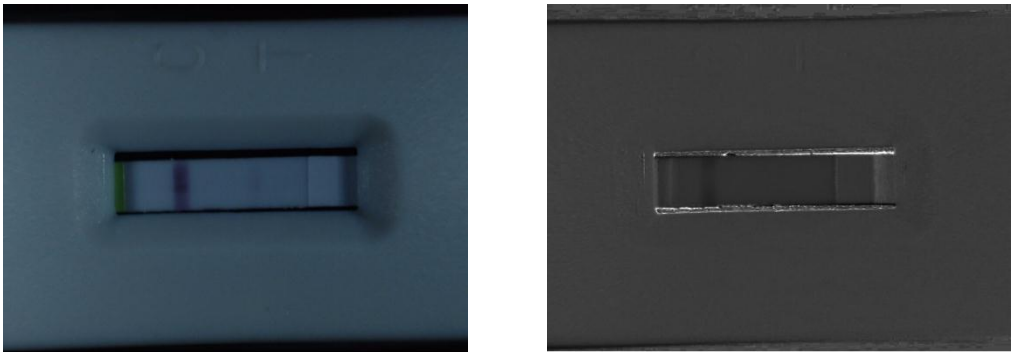
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 22. Line profile ของชุดทดสอบวันตกไข่ในตัวอย่างผู้หญิงเมื่อใช้การจัดแสงแบบทะลุผ่าน Line profiles (ค่าความเข้มแสงถูกปรับค่าเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 11800)

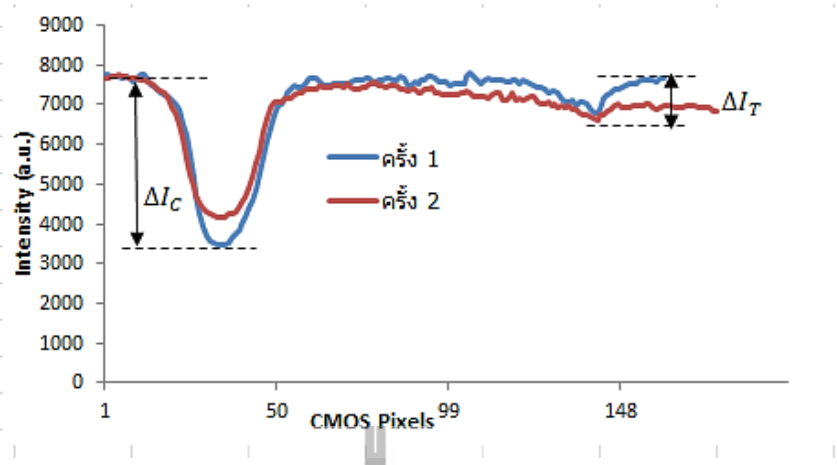
รูปที่ 23 แสดงภาพการเกิดปฏิกิริยาจากการทดสอบสารตัวอย่างของผู้หญิง (Positive) เมื่อจัดแสงแบบสะท้อน เมื่อทำ Line Profile (รูปที่ 24) ความเข้มแสงที่แถบควบคุมจะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับความเข้มแสงนอกแถบ และให้ค่าความเข้มแสงใกล้เคียงกันสำหรับทุกตัวอย่างที่ทดสอบ ส่วนแถบทดสอบค่าความเข้มแสงที่ลดลงเพียงเล็กน้อยอาจเป็นเพราะว่ามีสารตัวอย่างในปริมาณไม่มาก ครั้งที่ 1 ลดลงไป 8.26% และครั้งที่ 2 ลดลงไป 3.33% จะเห็นว่าภาพถ่ายการเกิดปฏิกิริยาแบบสะท้อนจะชัดกว่าแบบทะลุผ่านแต่ค่าความเข้มแสงที่ได้จากการทำ Line Profile มีอัตราส่วนน้อยกว่าแบบทะลุผ่าน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



(ก) (ข)

รูปที่ 23. (ก) ภาพถ่ายชุดทดสอบเมื่อใช้การจัดแสงแบบสะท้อน และ (ข) ภาพชุดทดสอบเมื่อชดเชยความเข้มแสงโดยใช้ภาพอ้างอิงแบบสะท้อน

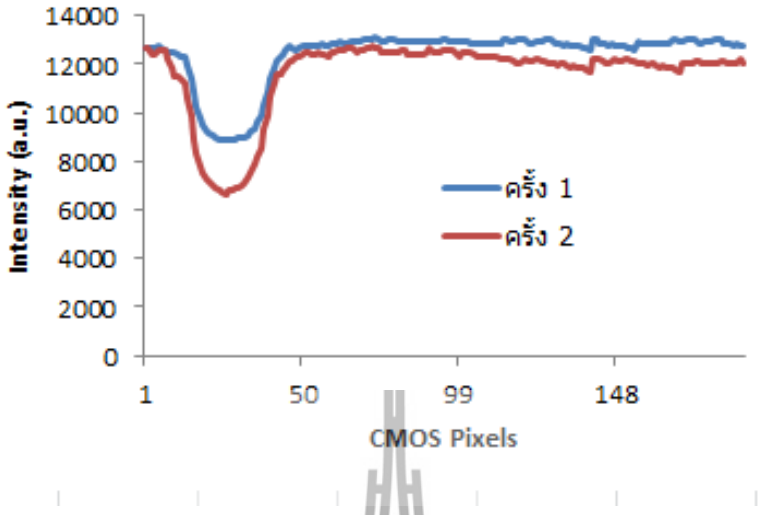


รูปที่ 24. สำหรับชุดทดสอบวันตกไข่ในตัวอย่างผู้หญิงแบบสะท้อน Line profiles (ค่าความเข้มแสงถูกปรับค่าเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 7800)

เมื่อทำการทดสอบในกลุ่มตัวอย่างผู้ชาย (Negative) ตามหลักการแล้วจะต้องไม่เกิดแถบสีบริเวณแถบทดสอบ เมื่อนำชุดทดสอบที่เตรียมไว้เข้าเครื่องอ่านแถบสีแล้วทำการบันทึกภาพอ้างอิง จากนั้นทำการทดสอบเหมือนกับตัวอย่างข้างต้นที่ผ่านมา พบว่าภาพถ่ายหลังการเกิดปฏิกิริยา (รูปที่ 25) เมื่อนำมาทำ Line Profile ความเข้มแสงที่แถบควบคุมจะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับความเข้มแสงนอกแถบ ส่วนแถบทดสอบไม่เกิดแถบสี (รูปที่ 26)

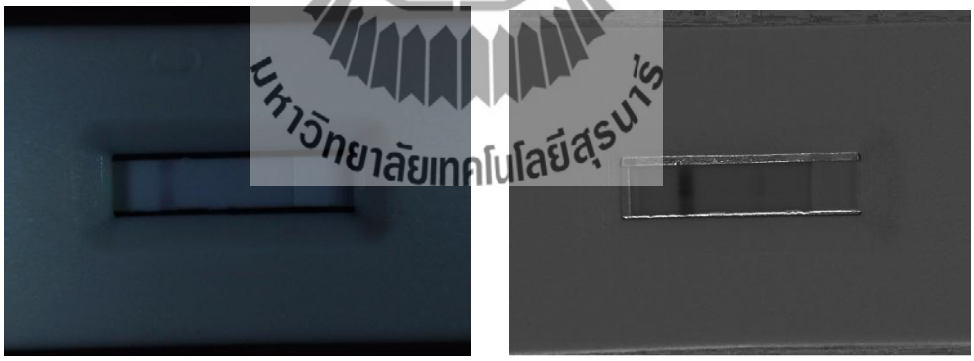
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 25. (ก) ภาพถ่ายชุดทดสอบเมื่อใช้การจัดแสงแบบทะลุผ่าน และ (ข) ภาพชุดทดสอบเมื่อชดเชยความเข้มแสงโดยใช้ภาพอ้างอิงแบบทะลุผ่าน



รูปที่ 26. สำหรับชุดทดสอบวันตกไข่ในตัวอย่างผู้ชายแบบทะลุผ่าน Line profiles (ค่าความเข้มแสงถูกปรับค่าเพื่อให้ค่าที่ตำแหน่งพิกเซลที่ 1 เท่ากับ 12600)

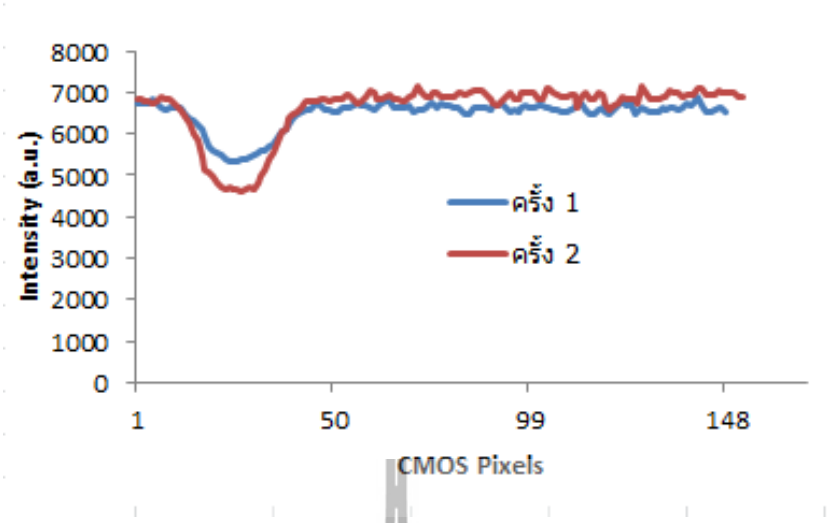
ผลการทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างผู้ชายโดยใช้การจัดแสงแบบสะท้อนให้ผลเช่นเดียวกับกรณีการจัดแสงแบบทะลุผ่าน (รูปที่ 27-28) ความเข้มแสงที่ Test line ไม่ลดลง



(ก) (ข)

รูปที่ 27. (ก) ภาพถ่ายชุดทดสอบเมื่อใช้การจัดแสงแบบสะท้อน และ (ข) ภาพชุดทดสอบเมื่อชดเชยความเข้มแสงโดยใช้ภาพอ้างอิงแบบสะท้อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

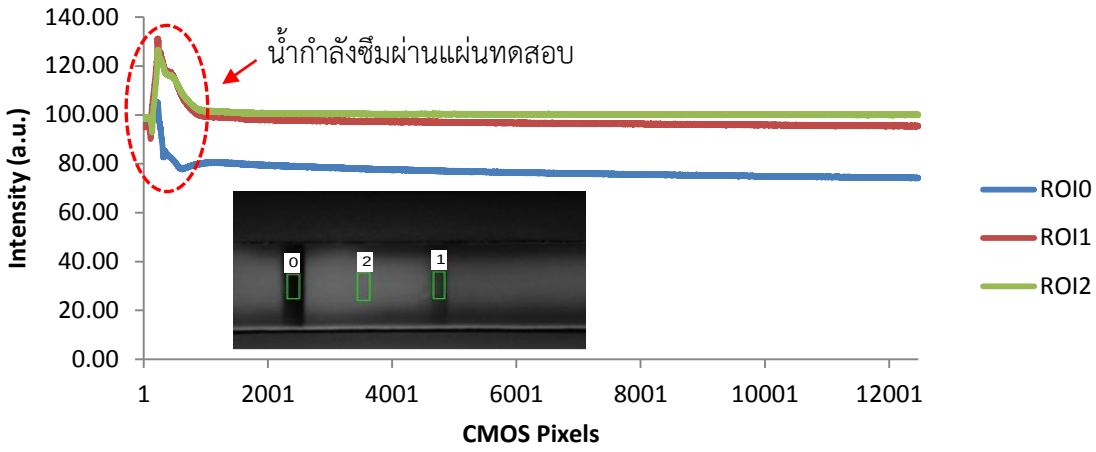


รูปที่ 28. Line profiles สำหรับชุดทดสอบวันตกไข่ในตัวอย่างผู้ชายแบบสะท้อน

4.2.2 เทคนิคการประมวลผลภาพแบบ Real-time intensity plot

วิธีนี้จะทำการบันทึกวีดิโอตั้งแต่ยังไม่ทำการหยดสาร รอประมาณ 10-15 นาที จนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา เทคนิคดังกล่าวนี้จำเป็นต้องรู้ตำแหน่งแถบทั้งสอง เพื่อกำหนด Regions of interest (ROI) ลงบนแถบสีดังกล่าว แต่เนื่องจากขณะเริ่มการทดลองหรือเริ่มหยดสารตัวอย่าง จะไม่มีแถบสีเกิดขึ้น ในการใช้งาน ผู้ใช้จึงต้องบันทึกการวัดชุดทดสอบเป็นวิดีโอไว้ตลอดการวัด จากนั้นใช้ภาพเฟรมสุดท้ายในการกำหนดตำแหน่ง ROIs ลงบนแถบสี โปรแกรมจะย้อนคำนวณความเข้มแสงของแต่ละ ROIs ที่ตำแหน่งดังกล่าว ตั้งแต่เฟรมแรกที่บันทึกไว้ ค่าความเข้มแสง

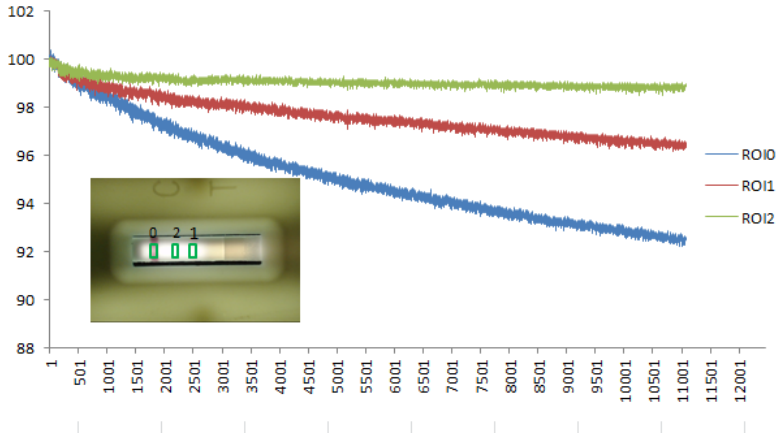
รูปที่ 29 แสดงการกำหนด ROIs ลงบนแถบควบคุม (ROI0) แถบทดสอบ (ROI1) และตำแหน่งตรงกลางระหว่างแถบสีทั้งสอง (ROI2) โดยที่ตำแหน่ง ROI2 จะทำหน้าที่วัดความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสง (=$I_2(t)$) เพื่อนำมาชดเชยผลการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความเข้มแสง ขณะทำการทดลอง โดยที่ $I_{0n}(t) = [I_0(t)/I_2(t)]x100$ และ $I_{1n}(t) = [I_1(t)/I_2(t)]x100$ ตัวอย่างกราฟความเข้มแสงที่เปลี่ยนตามเวลา ซึ่งเป็นการพล็อตค่า $I_{0n}(t)$ และ $I_{1n}(t)$ จากแถบควบคุมและแถบทดสอบตามลำดับ



รูปที่ 29. กราฟความเข้มแสงตามเวลาที่ ROI0 และ ROI1 และตำแหน่ง Regions of interest (ROIs) 3 ตำแหน่ง บนแถบควบคุม แถบทดสอบ และตำแหน่งตรงกลางระหว่างแถบทั้งสอง เพื่อวัดค่าความเข้มแสงตามเวลา ตั้งแต่ก่อนหยดสารตัวอย่างจนเสร็จสิ้นกระบวนการวัด

จะทำการพิจารณาตรงช่วงกลางถึงช่วงสุดท้ายของกราฟความเข้มแสงตามเวลา เนื่องจากช่วงแรก ค่าความแสงที่ได้ไม่คงที่เพราะเกิดจากการไหลของสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงจะนำค่าความเข้มแสงที่ช่วงกลาง จนไปถึงการสิ้นสุดปฏิกิริยามาพิจารณา

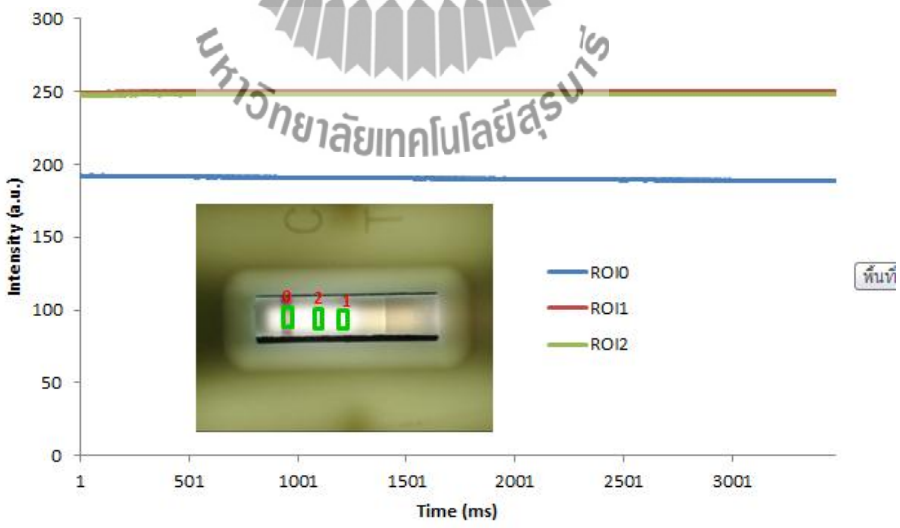
จากรูปที่ 30 พบว่าค่าที่ทำการพิจารณา ROI2 คือแถบสีขาวไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลา เนื่องจากไม่เกิดแถบสี ส่วนตำแหน่ง ROI2 และ ROI1 เป็นตำแหน่งบนแถบควบคุม และแถบทดสอบ ตามลำดับ ลดลงโดยที่แถบควบคุมจากตำแหน่งแรกค่าความเข้มข้นที่ 100 หน่วย ที่ตำแหน่งสุดท้ายค่าความเข้มข้นอยู่ที่ 92.48 หน่วย แถบควบคุมลดลงไปถึง 7.52 หน่วย ส่วนที่แถบทดสอบค่าความเข้มข้นแรกอยู่ที่ 100 หน่วย และตำแหน่งสุดท้ายอยู่ที่ 96.33 หน่วย แถบทดสอบลดลงไป 3.67 หน่วย แสดงว่ามีฮอร์โมน LH อยู่ในตัวอย่างที่ทำการทดสอบกับตัวอย่างผู้หญิงแต่มีปริมาณน้อยมาก



รูปที่ 30. ค่าเข้มแสงตามเวลาเมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลา 2001 มิลลิวินาทีถึงช่วงเวลา 12300 มิลลิวินาที

รูปที่ 31 ในกลุ่มตัวอย่างผู้ชาย พบว่าค่าที่ทำการพิจารณา ROI2 คือแถบสีขาวไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลาเนื่องจากไม่เกิดแถบสี ส่วนตำแหน่ง ROI2 และ ROI1 เป็นตำแหน่งบนแถบควบคุม และแถบทดสอบ ตามลำดับ ลดลงโดยที่แถบควบคุมจากตำแหน่งแรกค่าความเข้มข้นที่ 192.21 หน่วย ที่ตำแหน่งสุดท้ายค่าความเข้มข้นอยู่ที่ 188.32 หน่วย แถบควบคุมลดลงไปถึง 3.90 หน่วย ส่วนที่แถบทดสอบค่าความเข้มข้นแรกอยู่ที่ 250.254 หน่วย และตำแหน่งสุดท้ายอยู่ที่ 247.986 หน่วย แถบทดสอบลดลงไป 0.87 หน่วย

วิธี Real-time Intensity plot จะยุ่งยากกว่าวิธี Line Profile แต่ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถอ่านค่าความเข้มข้นแถบสีที่ความเข้มข้นต่ำๆ ได้ดี แต่วิธีใช้อาจจะซับซ้อนกว่า



รูปที่ 31. ค่าเข้มแสงตามเวลาเมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลา 2500 มิลลิวินาทีถึงช่วงเวลา 7813 มิลลิวินาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3 การทดลองกับชุดทดสอบโรคผลเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ Acidovorax avenae subsp. *Citrulli*

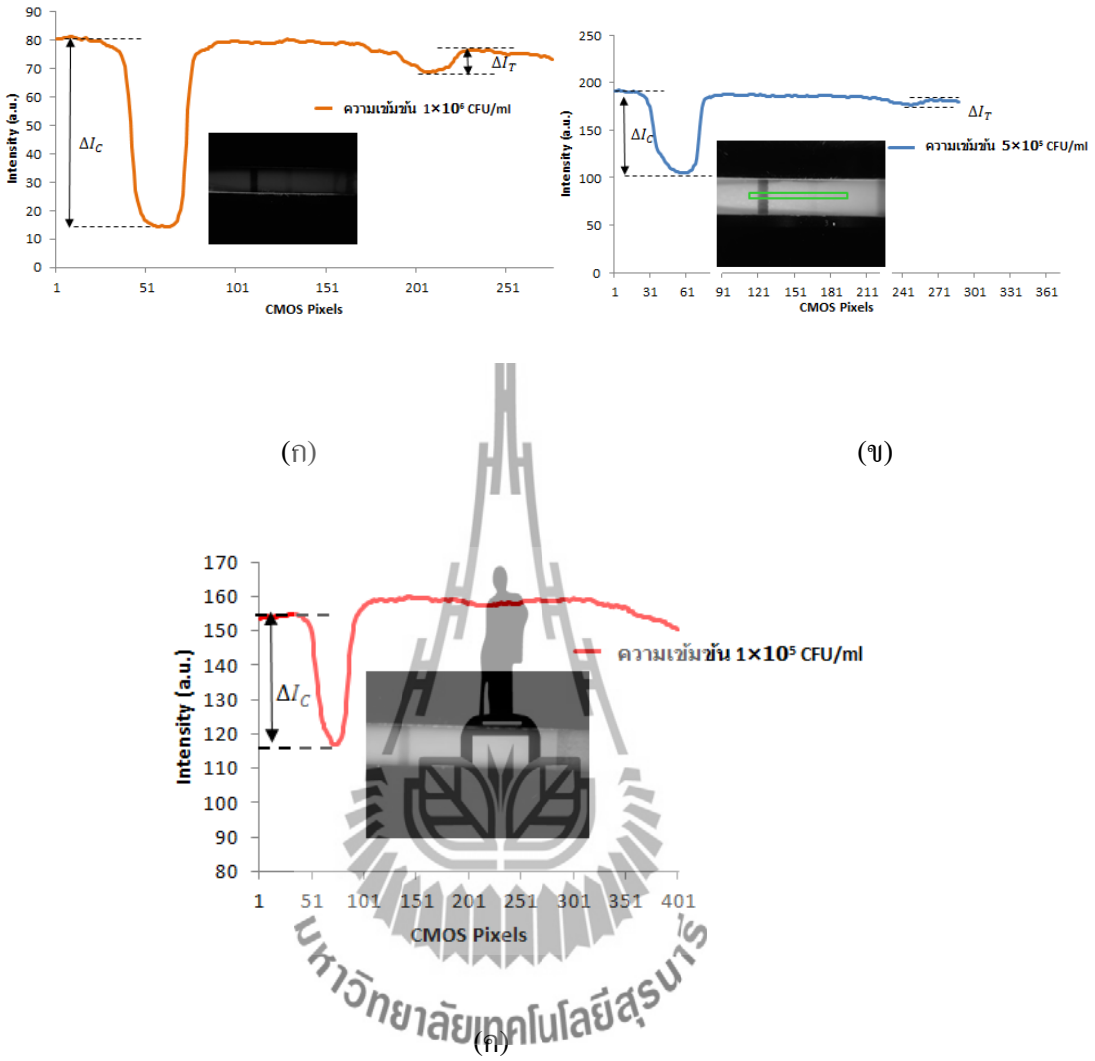
ชุดตรวจโรคผลเน่าแบคทีเรียของพืชตระกูลแตงเป็นชุดตรวจแบบง่ายในรูปแบบ Immunochromatographic Strip Test ใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli (Aac)* ที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าแบคทีเรียของพืชตระกูลแตงซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตและส่งออกเมล็ดพันธุ์ของพืชในกลุ่มนี้ ชุดตรวจนี้มีความจำเพาะสูง แม่นยำ ใช้เวลารวดเร็วภายใน 5-10 นาที พัฒนาโดยนักวิจัยไบโอเทค มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์แล้ว

4.3.1 การทดลองแบบทะลุผ่าน

แผ่น Strip สำหรับตรวจโรคแบคทีเรีย *Aac* เป็นแบบจุ่ม วิธีใช้จะทำการจุ่มแผ่นทดสอบ Strip ลงในหลอดทดลองที่บรรจุตัวอย่าง (Sample) แล้ว จากนั้นแช่ไว้ในหลอดทดลองเป็นเวลา 5-10 นาที รอจนเกิดแถบสี ทำการเตรียม Strip ที่ความเข้มข้นต่างๆ (รูปที่ 32) แล้วนำมาเข้าเครื่องอ่านแถบสีบันทึกภาพหลังการเกิดปฏิกิริยา ไม่สามารถบันทึกภาพก่อนการเกิดปฏิกิริยาได้เนื่องจากเครื่องอ่านที่ทำขึ้นออกแบบมาเพื่อใช้แบบหยด จึงทำได้เพียงนำภาพสุดท้ายหลังการเกิดปฏิกิริยาแล้วทำภาพเฉลี่ย เมื่อทำ Line Profile (รูปที่ 33) ความเข้มแสงที่แถบควบคุมจะลดลงอย่างชัดเจนและให้ค่าความเข้มแสงใกล้เคียงกันสำหรับทุกตัวอย่างที่ทดสอบ ส่วนแถบทดสอบค่าความเข้มแสงที่ลดลงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เราทำการทดสอบ ในที่นี้จะแสดงตัวอย่างเฉพาะที่ความเข้มข้นต่ำๆ ส่วนความเข้มข้นอื่นๆ ดูได้ที่ภาคผนวก

รูปที่ 32. แสดงตัวอย่างชุดตรวจสอบโรคผลเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ Acidovorax avenae subsp.*citrulli* ที่ความเข้มข้นต่างๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

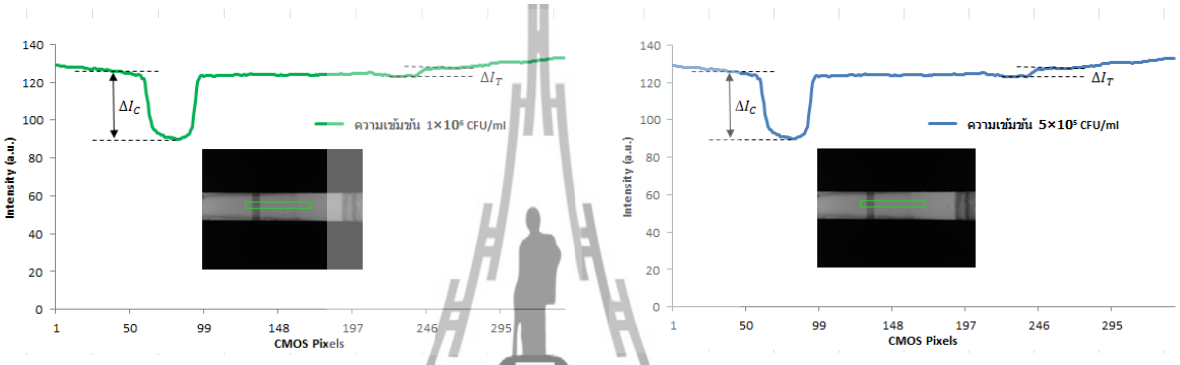


รูปที่ 33. สำหรับชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Aac* ตัวอย่างกราฟความเข้มแสง Line Profile ที่ความเข้มข้น (ก) 1x10^6 CFU/ml (ข) 5x10^5 CFU/ml และ (ค) 1x10^5 CFU/ml

จากข้อมูลดังกล่าวเครื่องอ่านแถบสีสามารถอ่านได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 5x10^5 CFU/ml ซึ่งวัดค่าความเข้มแสงต่ำสุดที่แถบควบคุมลดลงไป 64.25% ส่วนที่แถบทดสอบลดลงไป 5.01% ที่ความเข้มข้น1x10^5 CFU/ml ยังไม่สามารถเห็นค่าความเข้มแสงลดลงได้ที่เป็นเช่นนี้ อาจเป็นเพราะว่ายังไม่ได้ทำภาพอ้างอิง ถ้าได้ทดลองทำภาพอ้างอิงอาจจะสามารถเห็นที่ความเข้มข้นต่ำๆ ได้

4.3.2 การทดลองแบบสะท้อน

วิธีนี้ได้ทำทุกอย่างเหมือนขั้นตอนการทะลุผ่าน แต่เปลี่ยนวิธีการจัดแสงจากเดิมที่จัดแสงแบบทะลุผ่านก็ทำการจัดแสงแบบสะท้อนเพื่อทำการเปรียบเทียบว่าการจัดแสงแบบใด สามารถอ่านค่าความเข้มแสงที่ความเข้มข้นต่ำๆ ได้ดีกว่าเมื่อทำ Line Profile (รูปที่ 34) พบว่าค่าความเข้มแสงที่แถบควบคุมจะลดลงอย่างชัดเจน ส่วนแถบทดสอบจะลดลงตามความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ได้ทำการทดสอบ เช่นเดียวกับการทำแบบทะลุ



(ก) (ข)

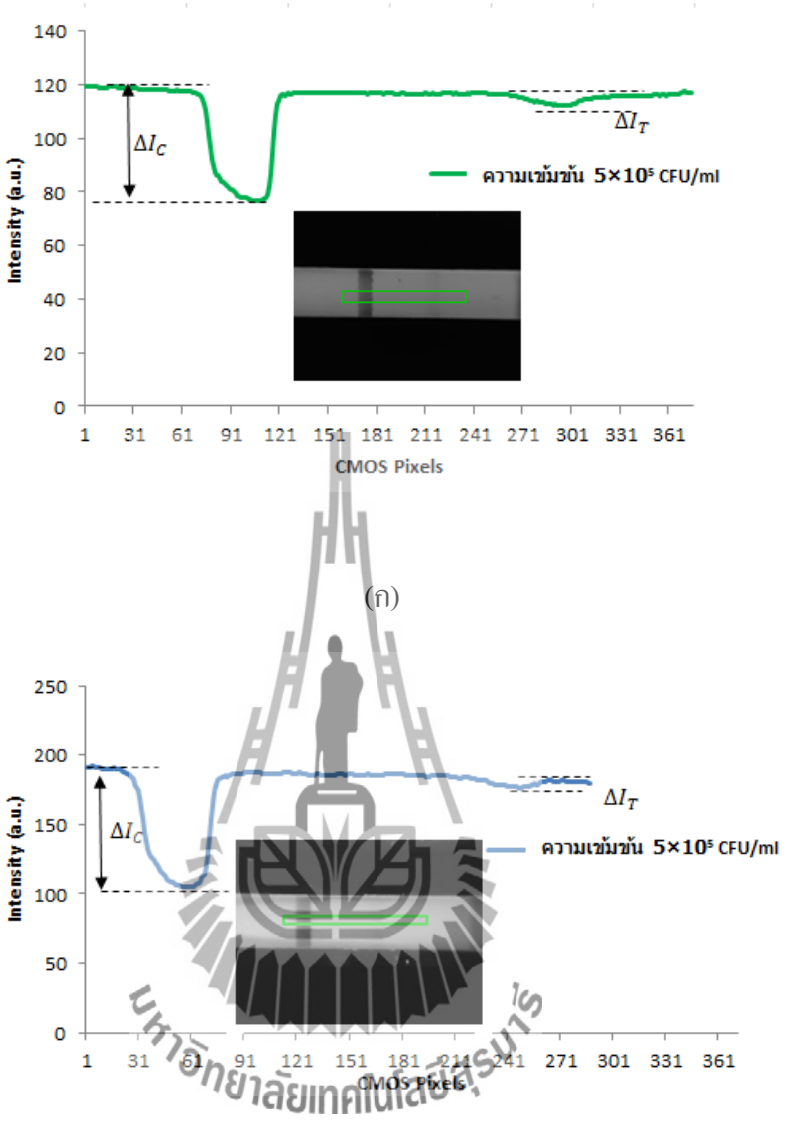
รูปที่ 34 สำ Line Profile หรับชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Aac* ตัวอย่างกราฟความเข้มแสง แบบสะท้อน (ก) ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ CFU/ml และ (ข) $5x10^5$ CFU/ml

จะเห็นว่าการจัดแสงแบบสะท้อนนั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดอยู่ที่ $5x10^5$ CFU/ml ซึ่งวัดค่าความเข้มแสงต่ำสุดที่แถบควบคุมลดลงไป 37.17% ส่วนที่แถบทดสอบลดลงไป 1.50% และอัตราส่วนการลดลงของแถบสีลดลงได้น้อยกว่าการจัดแสงแบบทะลุผ่าน อาจสรุปได้ว่าการจัดแสงแบบทะลุผ่านนั้นดีกว่าการจัดแสงแบบสะท้อน

เมื่อผ่านไป 1-2 วันได้มีการนำแผ่นทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Aac* มาทำการอ่านด้วยเครื่องอ่านอีกครั้ง เมื่อทำ Line Profile (รูปที่ 35) พบว่าที่ความเข้มข้น $5x10^5$ CFU/ml ที่แถบควบคุมสามารถลดลงได้อย่างชัดเจนถึง 86.05% ส่วนที่แถบทดสอบก็ยังสามารถเห็นว่าลดลงไป 6.55%

การจัดแสงแบบสะท้อน ทำให้แถบทดสอบเห็นชัดเจนขึ้นเนื่องมาจากแผ่นทดสอบแห้งลดลงไปถึง 42.84% ส่วนที่แถบควบคุมลดลงไปเพียง 3.24% ในการทดลองข้างต้นเมื่อเตรียมแผ่นทดสอบเสร็จ รอเกิดปฏิกิริยาก็ทำการเข้าเครื่องอ่านแถบสีไม่ได้รอจนแห้ง นี่อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่สามารถเห็นแถบสีได้ชัดเจน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 35. Line Profile สำหรับชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Aac* ที่ความเข้มข้น 5x10^5 CFU/ml เมื่อปล่อยให้ตัวอย่างชุดทดสอบแห้ง เมื่อจัดแสง (ก) แบบสะท้อน และ (ข) แบบทะลุผ่าน

บทที่ 5
สรุป

เครื่องมืออ่านแถบสีชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจสอบสารทางชีวภาพแบบอัตโนมัติ ใช้กล้องเว็บแคมในการถ่ายภาพแถบสีของชุดทดสอบเชื่อมต่อกับโปรแกรม LabVIEW บนคอมพิวเตอร์ใช้เทคนิคการประมวลผลภาพ (Image Processing) โดยออกแบบชุดการทดลองใช้การจัดแสงแบบสะท้อน และจัดแสงแบบทะลุผ่าน ใช้เทคนิคการประมวลผลภาพสองเทคนิคที่ใช้คือ Line profile และ Real-time intensity plot

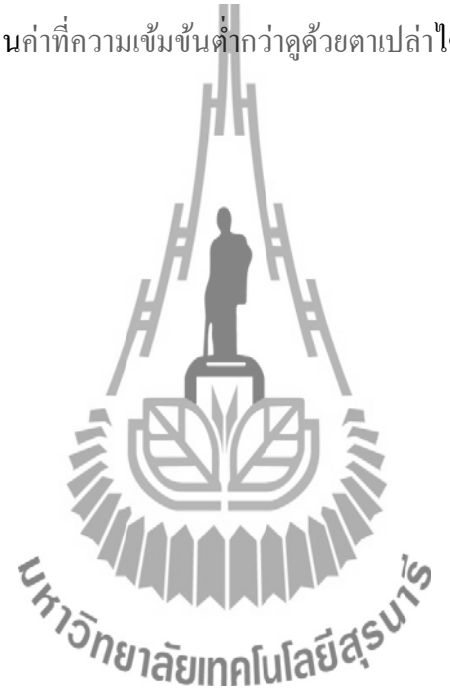
หลักการการจัดแสงแบบสะท้อนพบ จะใช้ไดโอดเปล่งแสงวางไว้ด้านบนชุดทดสอบทำมุมตกกระทบที่ทำเมื่อกล้องเว็บแคมรับภาพมาจะทำให้สามารถเห็นภาพชุดทดสอบชัดเจน แต่วิธีนี้พบว่าการจัดชุดทดลองทำได้ง่าย แต่อัตราส่วนการลดลงการเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงทั้งแถบควบคุม (ΔI_C) และแถบทดสอบ (ΔI_T) นั้นเปลี่ยนแปลงได้น้อยกว่าการจัดแสงแบบทะลุผ่าน

หลักการการจัดแบบทะลุผ่านนั้น จะทำการวางตำแหน่งไดโอดเปล่งแสงไว้ด้านล่างจัดอุปกรณ์ทุกอย่างแบบหลักการจัดแสงสะท้อน การภาพถ่ายจากชุดทดสอบนั้นจะให้ไม่ชัดเนื่องจากบรรจุภัณฑ์ที่ส่วมใส่ชุดทดสอบนั้นทำมาจากพลาสติก มีขนาดไม่เรียบเสมอกันทำให้ค่าความเข้มแสงที่ได้ ไม่เท่ากันในทุกตำแหน่ง และความเข้มแสงได้ถูกลดทอนไปจากดิฟฟิวเซอร์ที่เป็นพลาสติก เราจึงใช้ไดโอดเปล่งแสง 3 ตัววางในตำแหน่งด้านล่างที่เกิดแถบสีกับชุดทดสอบ การจัดแหล่งกำเนิดแสงไว้ด้านล่าง ทำให้แสงบางส่วนสามารถทะลุผ่านขอบหรือช่องว่างระหว่างอุปกรณ์ของชุดทดสอบ ได้มากกว่าส่วนอื่น เพื่อกำหนดให้แสงทะลุผ่านเฉพาะบริเวณตรงกลางของแถบสี ได้ใช้แผ่นเทปสีดำตัดเปิดช่องตรงกลางขนาดประมาณ 2 mm x 20 mm วางไว้ใต้แถบชุดทดสอบและอยู่ภายในกล่องบรรจุ พบว่าการจัดแสงแบบทะลุผ่านนั้นให้ค่าอันตราการลดลงของความเข้มแสงได้ดีว่า สามารถมองเห็นแถบสีได้ดีดว่าการจัดแสงแบบสะท้อน

เทคนิคที่ใช้ในการประมวลผลภาพนั้นเทคนิคแรกจะใช้เทคนิค Line Profile ทำการดูความเข้มแสงตามแนวเส้น ซึ่งเทคนิคนี้จะสามารถอ่านค่าความเข้มแสงได้ที่ลดลงได้ชัดเจน ในทุกตัวอย่างที่ตามองเห็น และมีแนวโน้มที่จะสามารถอ่านค่าชุดทดสอบกรณีความเข้มข้นต่ำ เกินกว่าจะอ่านค่าด้วยตาเปล่าได้ สำหรับเทคนิคนี้จะใช้งานงานเพียงแค่ลากเส้นผ่านแถบควบคุม และแถบทดสอบ โปรแกรมจะสามารถคำนวณค่าความแสงแสดงในกราฟ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ส่วนเทคนิค Real-time Intensity plot นั้นมีการใช้งานที่ซับซ้อนกว่า เมื่อทำการวิเคราะห์ผลค่าความเข้มแสงที่ได้ ช่วงแรกของค่าความเข้มแสงจะกระเพื่อมเกิดจากการไหลของสารตัวอย่าง จะทำการพิจารณาเมื่อความเข้มแสงค่อนข้างนิ่งจนกระทั่งละลงและคงที่ในที่สุด วิธีนี้จะทำการเลือกตำแหน่งที่สนใจ (ROIs) ตั้งแต่แรกไม่ได้เพราะยังไม่รู้ตำแหน่งที่เกิดแถบสี จะทำการใช้เฟรมสุดท้ายในการกำหนดตำแหน่งที่สนใจดูความเข้มแสงเทียบกับเวลา สำหรับเทคนิค Real-time intensity plot พบว่าให้สัญญาณที่มีความเสถียรสูง รวมทั้งมีความละเอียดในการวัดที่ดี ซึ่งเมื่อนำไปใช้กับตัวอย่างจริงยังไม่สามารถอ่านค่าความเข้มข้นต่ำๆได้ จะต้องทำการพัฒนาโปรแกรมเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถอ่านค่าที่ความเข้มข้นต่ำกว่าดูด้วยตาเปล่าได้

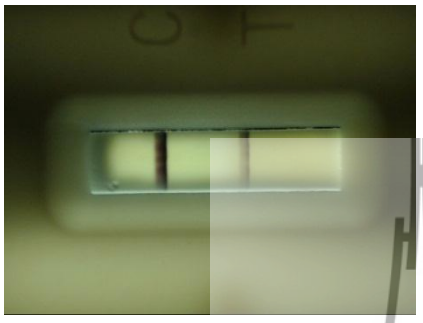


ภาคผนวก

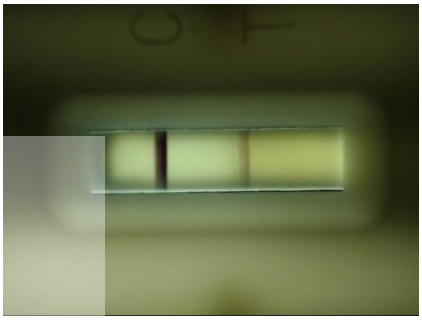
ภาพถ่ายชุดทดสอบเชื้อหวัด Flu-A ที่ความเข้มข้นต่างๆ

<u>แบบทะลุผ่าน</u>

1:100

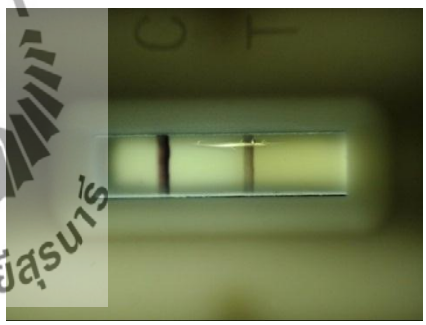


1:200

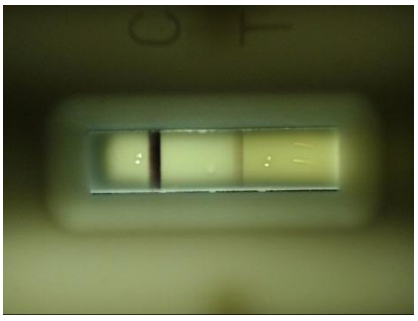


1:300

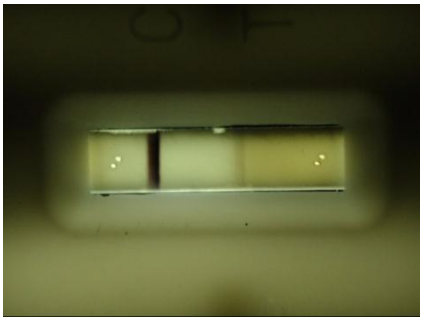
1:400



1:500



1:600

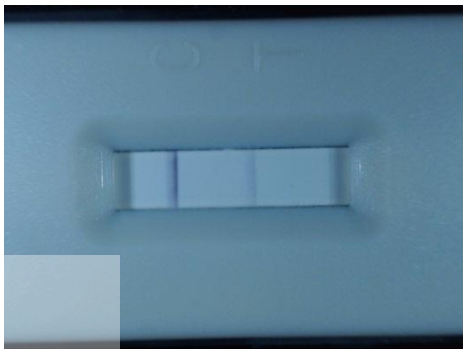


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

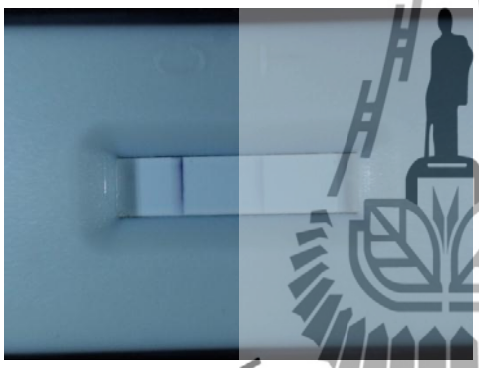
<u>แบบสะท้อน</u>

1:100

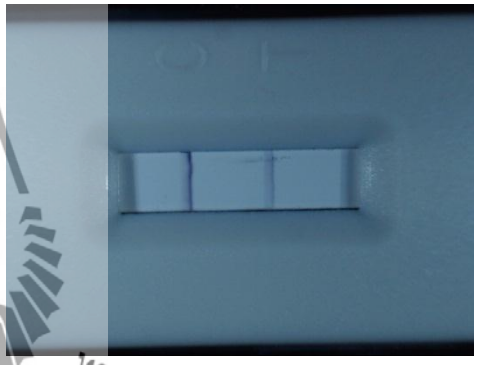
1:200



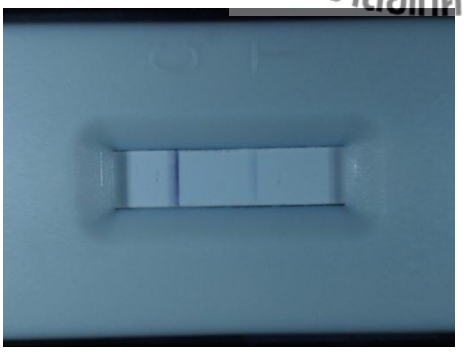
1:300



1:400



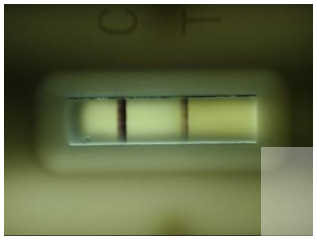
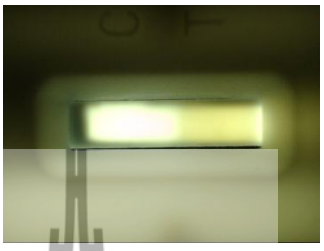
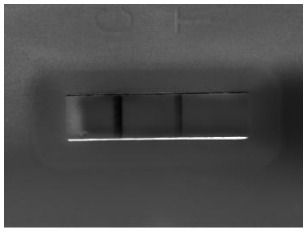
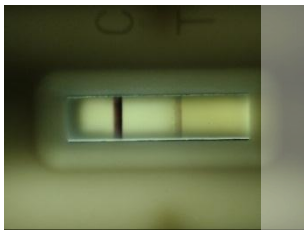
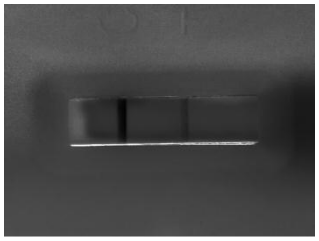
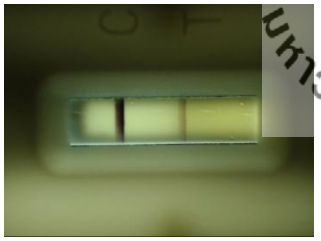
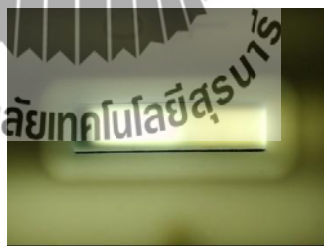
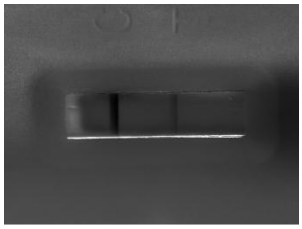
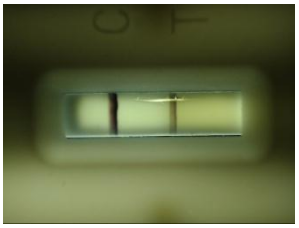
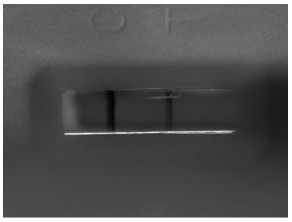
1:500



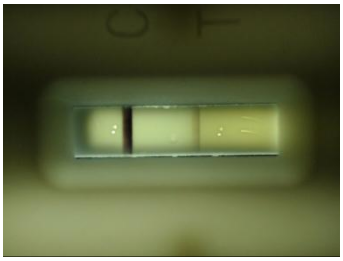
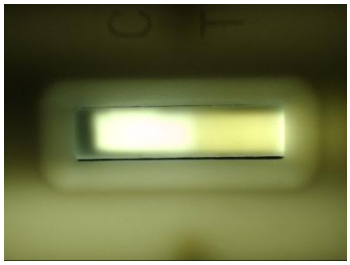
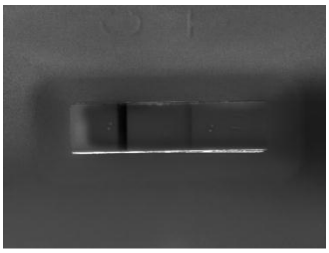
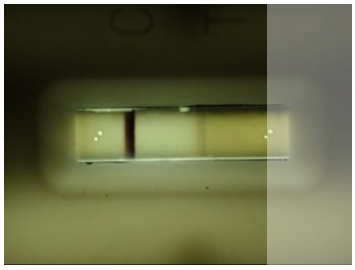
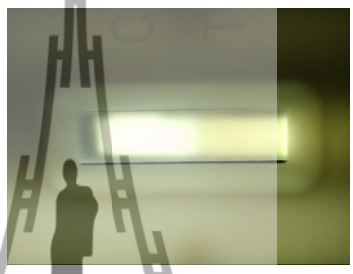
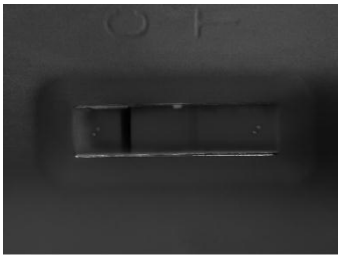
1:600

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การหารภาพแบบทะลุผ่าน

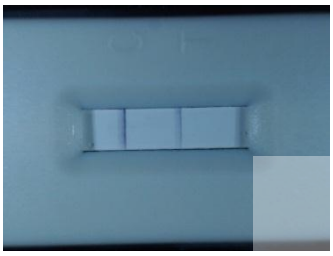
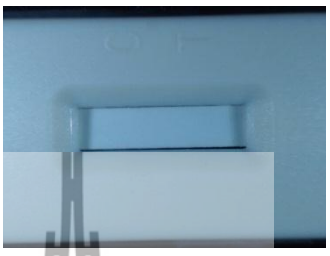
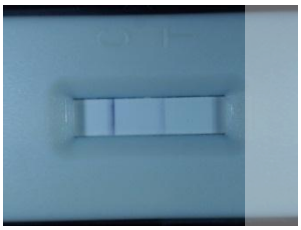
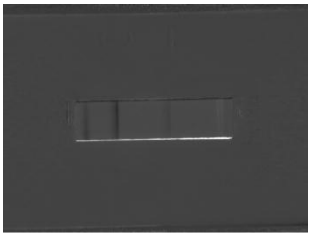
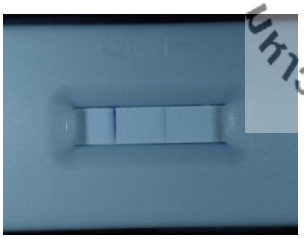
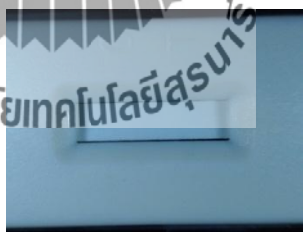
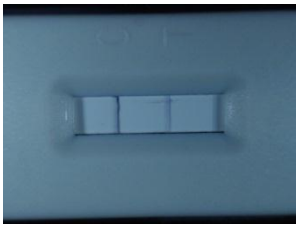
ความเข้มข้น	ภาพตั้งต้น	ภาพหาร	ภาพใหม่
1:100			
1:200			
1:300			
1:400			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

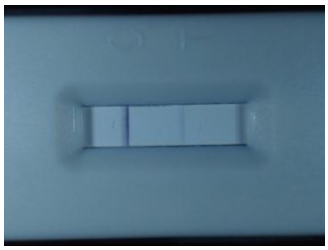
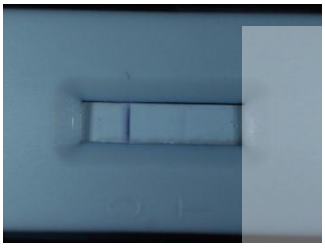
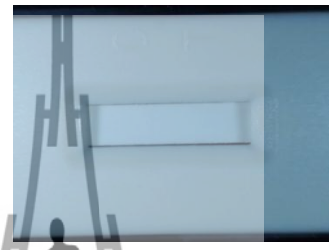
1:500			
1:600			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

<u>การหารภาพแบบสะท้อน</u>

ความเข้มข้น	ภาพตั้งต้น	ภาพหาร	ภาพใหม่
1:100			
1:200			
1:300			
1:400			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

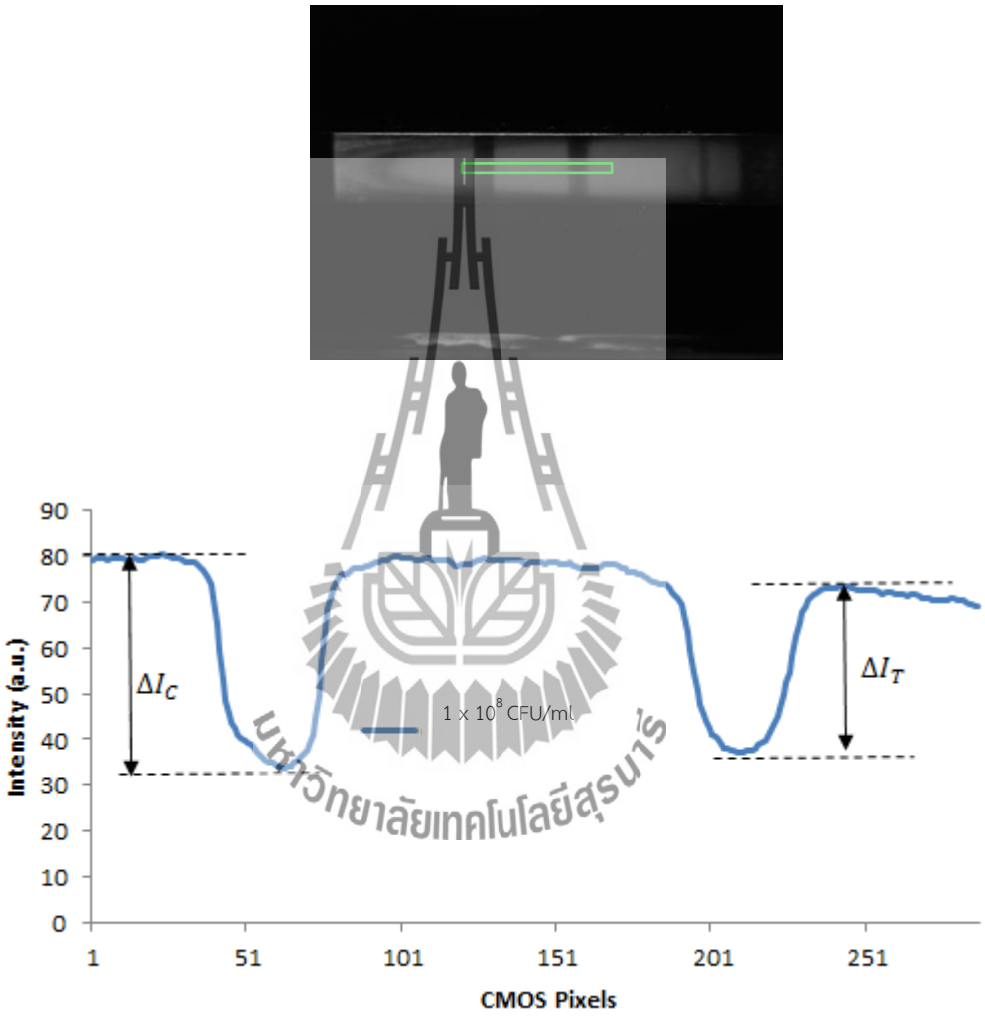
1:500			
1:600			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพถ่ายชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย Aac ที่ความเข้มข้นต่างๆ

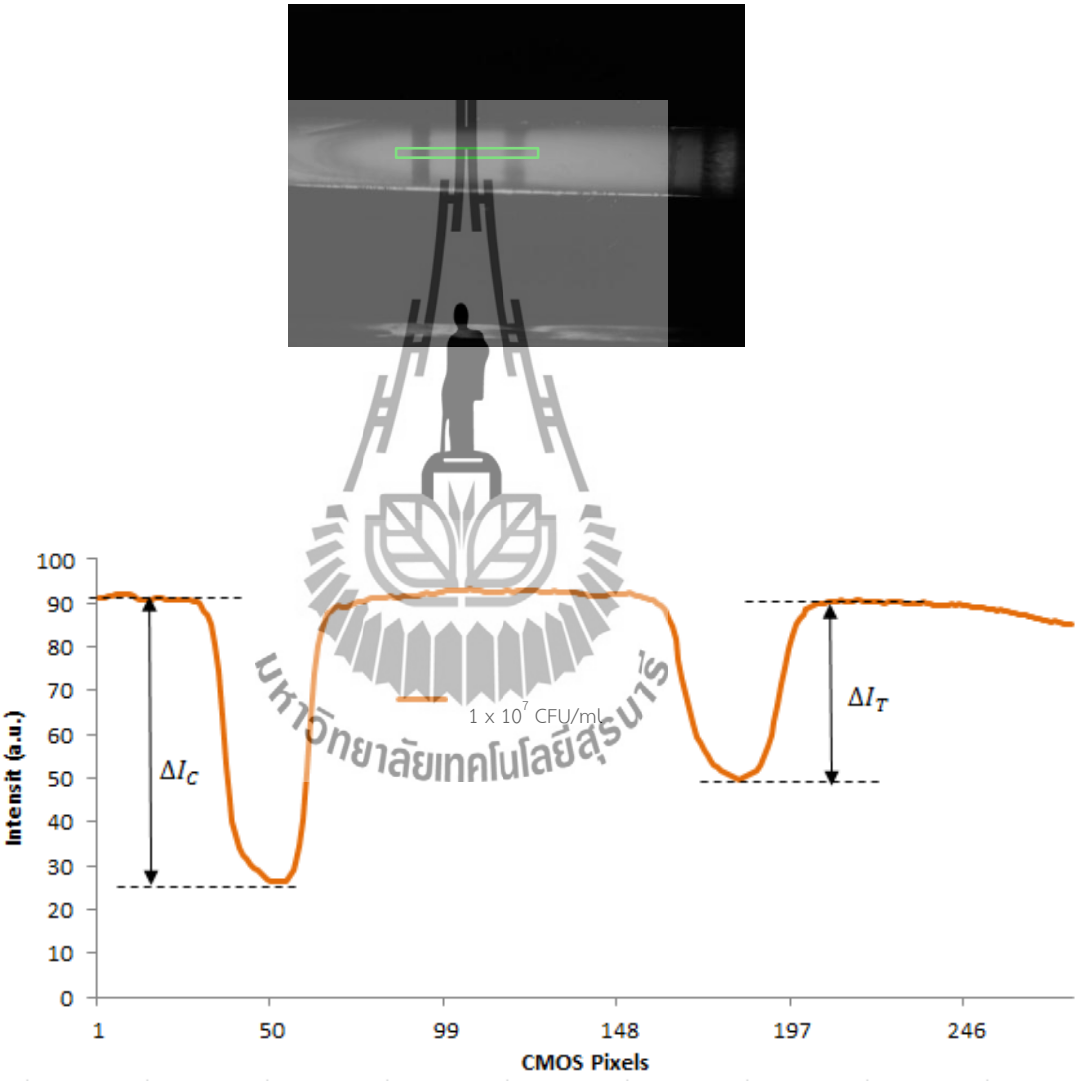
<u>แบบทะลุผ่านโดยเทคนิค Line Profile แสดงกราฟความเข้มแสง</u>

ที่ความเข้มข้น 1 x 10^8 CFU/ml



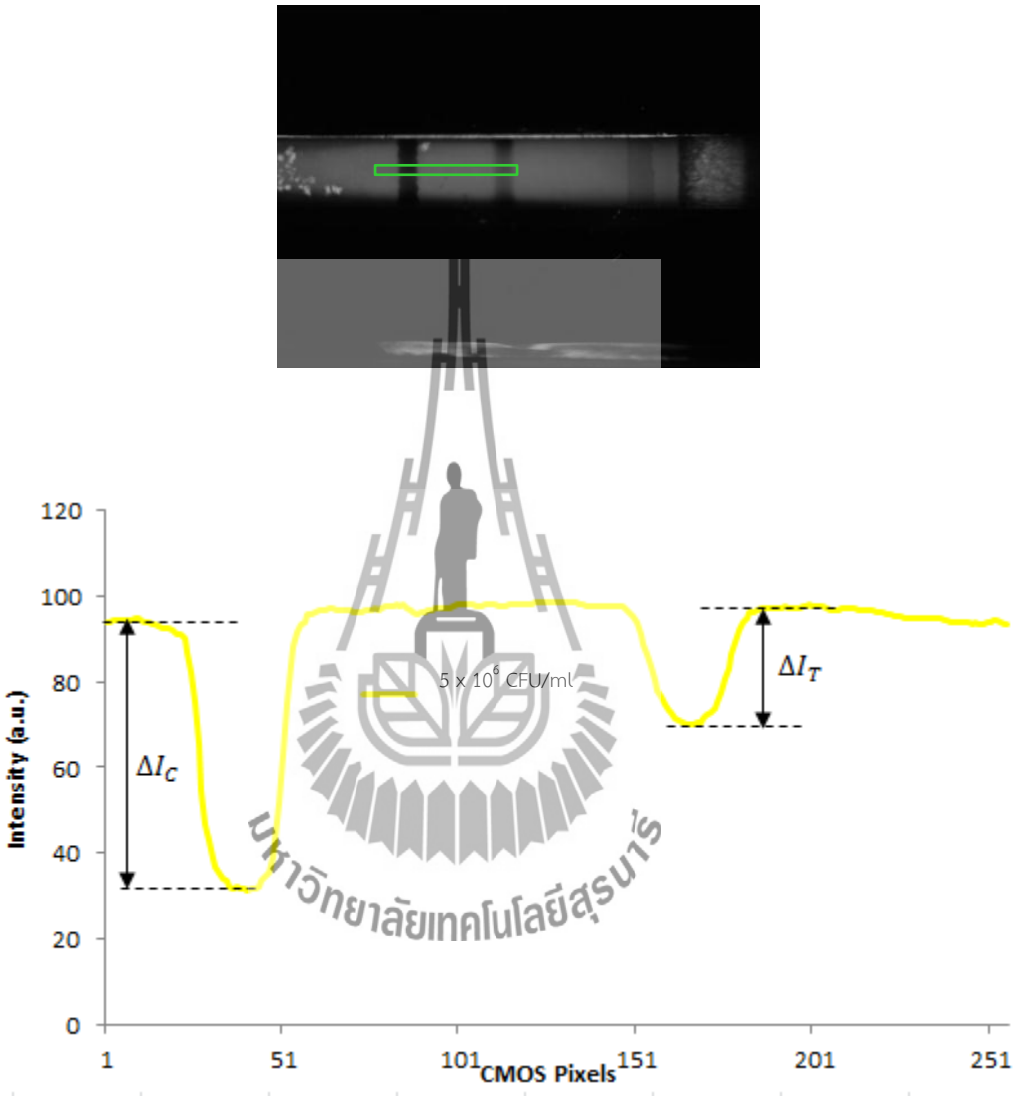
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่ความเข้มข้น 1 x 10^7 CFU/ml



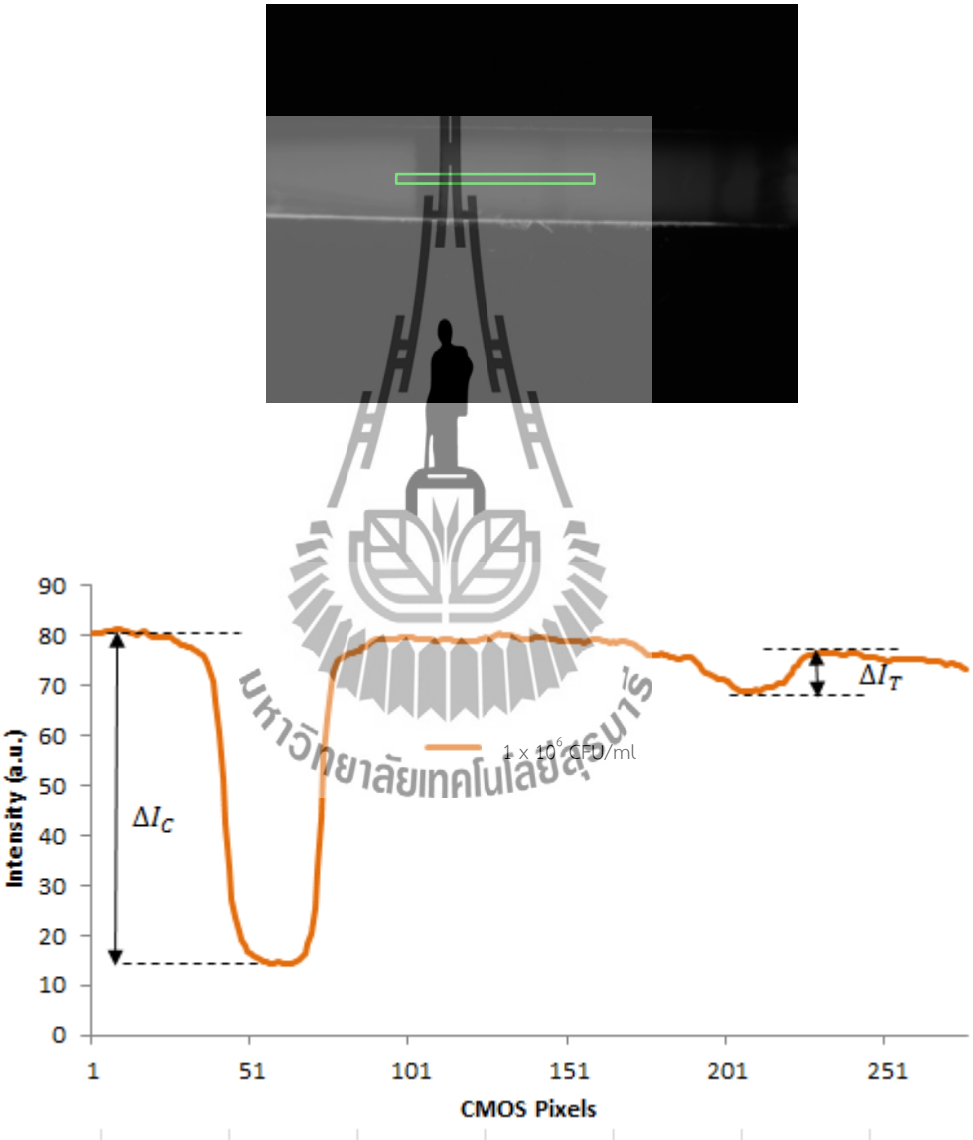
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่ความเข้มข้น 5 x 10^6 CFU/ml



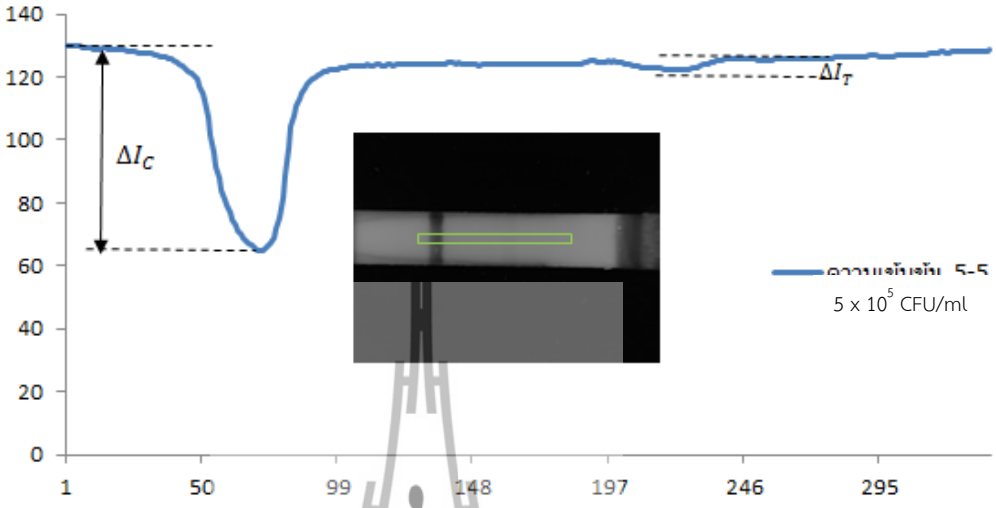
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่ความเข้มข้น 1 x 10^6 CFU/ml

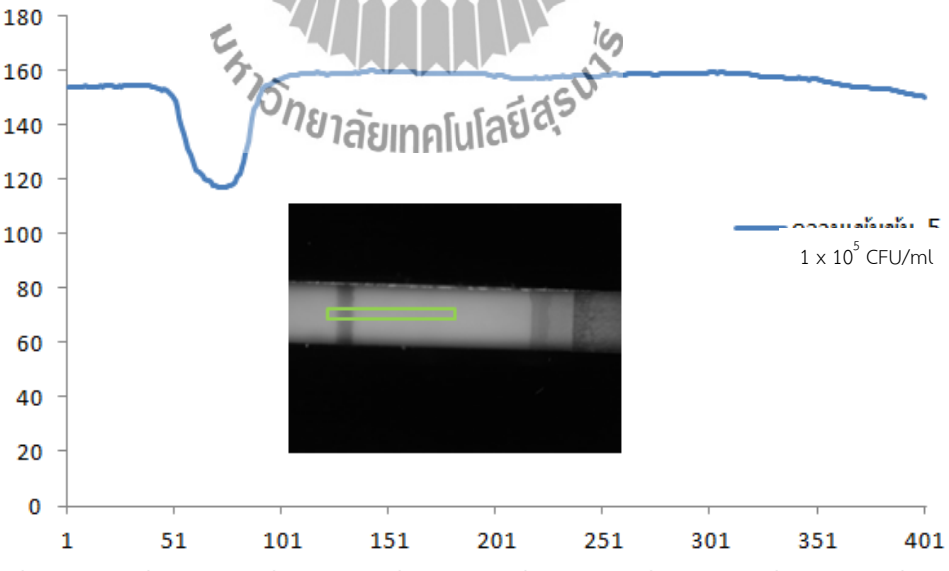


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่ความเข้มข้น 5 x 10^5 CFU/ml



ที่ความเข้มข้น 1 x 10^5 CFU/ml

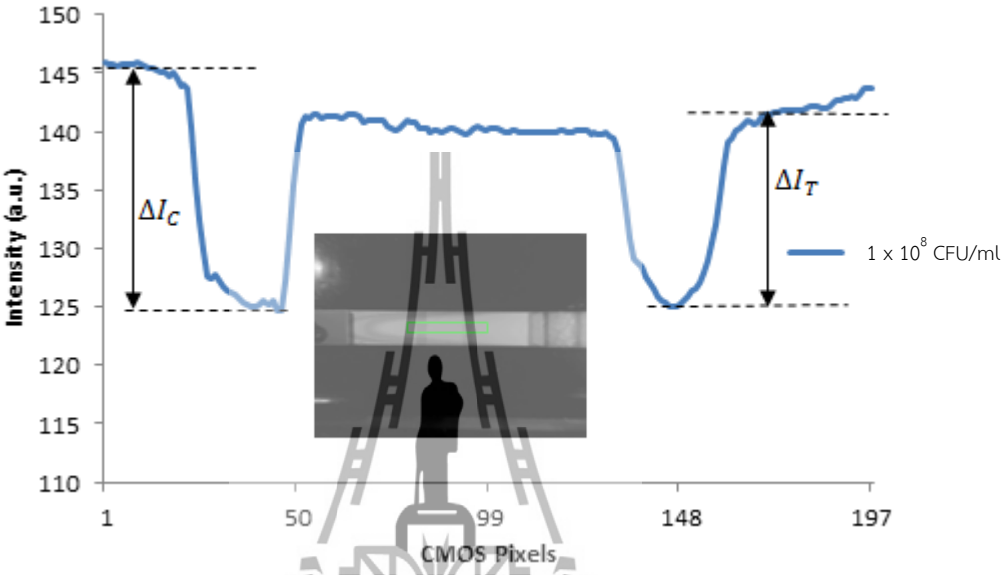


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

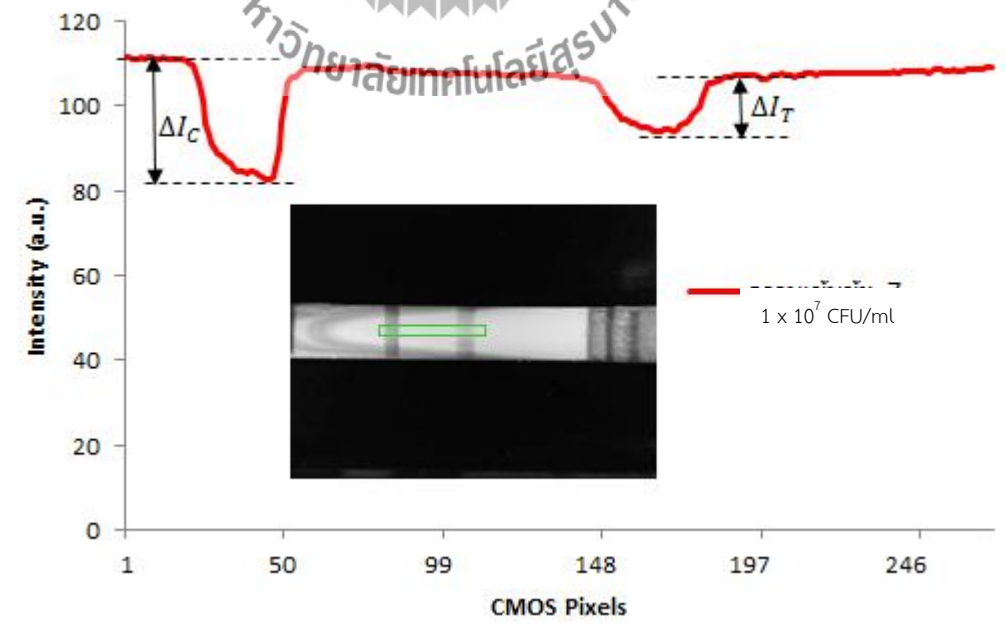
ภาพถ่ายชุดทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Aac* ที่ความเข้มข้นต่างๆ

<u>แบบสะท้อนโดยเทคนิค Line Profile แสดงกราฟความเข้มแสง</u>

ที่ความเข้มข้น 1 x 10^8 CFU/ml

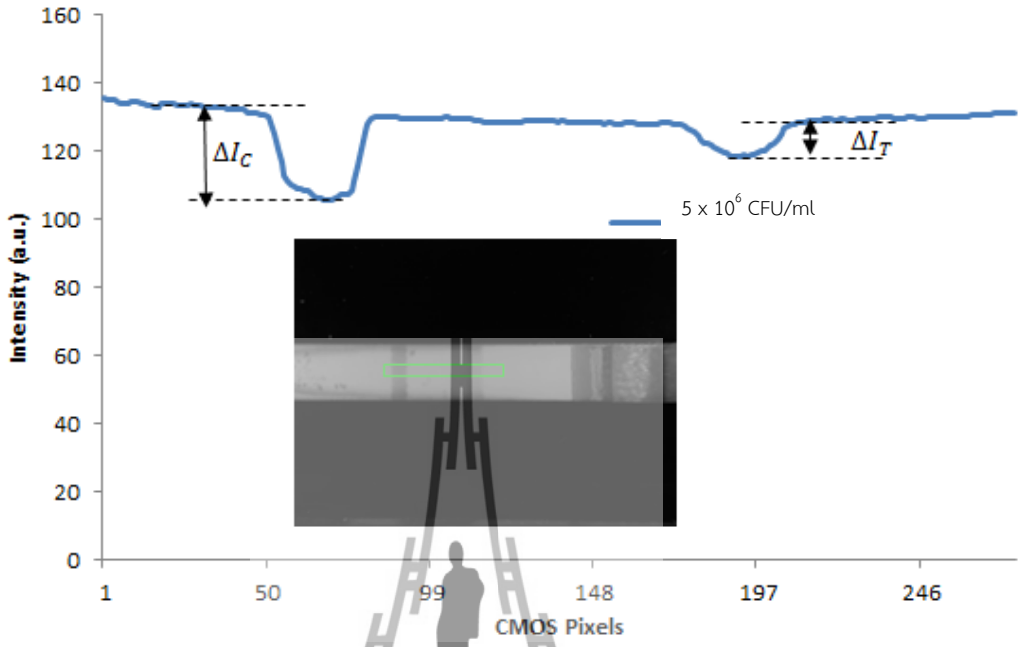


ที่ความเข้มข้น 1 x 10^7 CFU/ml

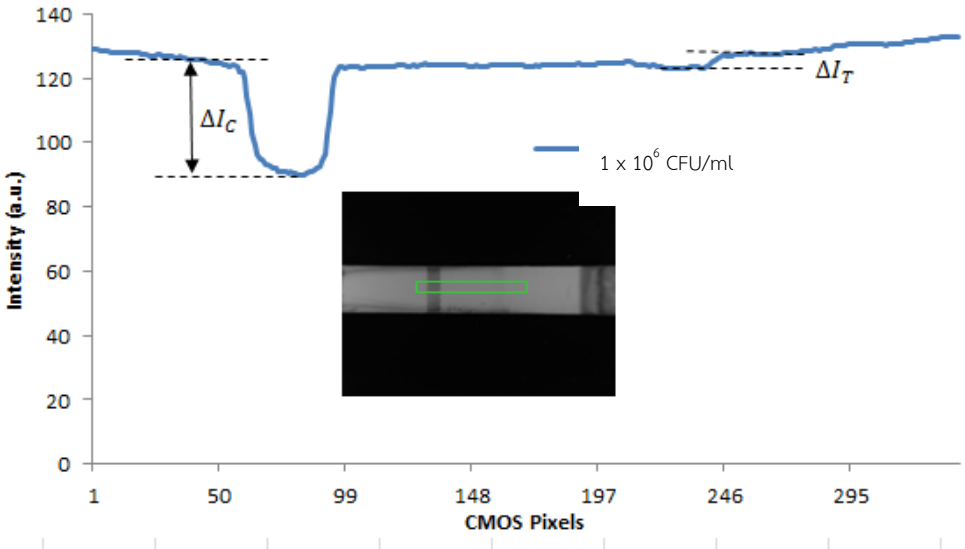


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่ความเข้มข้น 5 x 10^6 CFU/ml

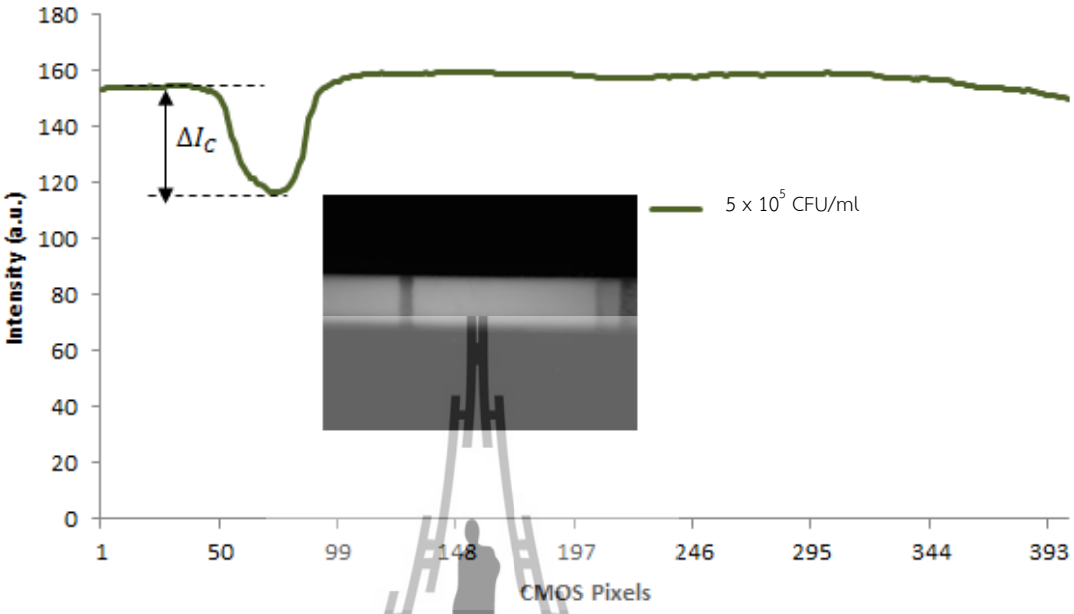


ที่ความเข้มข้น 1 x 10^6 CFU/ml

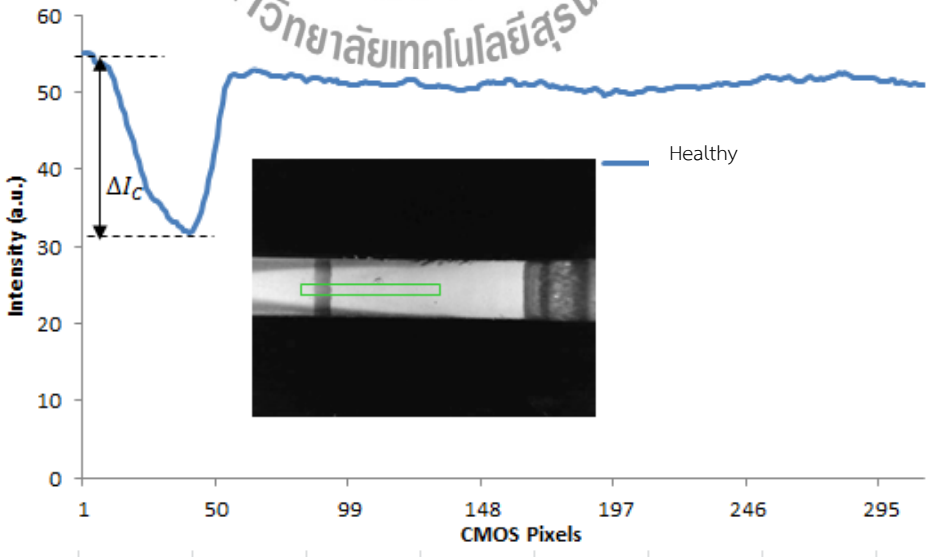


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่ความเข้มข้น 5 x 10^5 CFU/ml

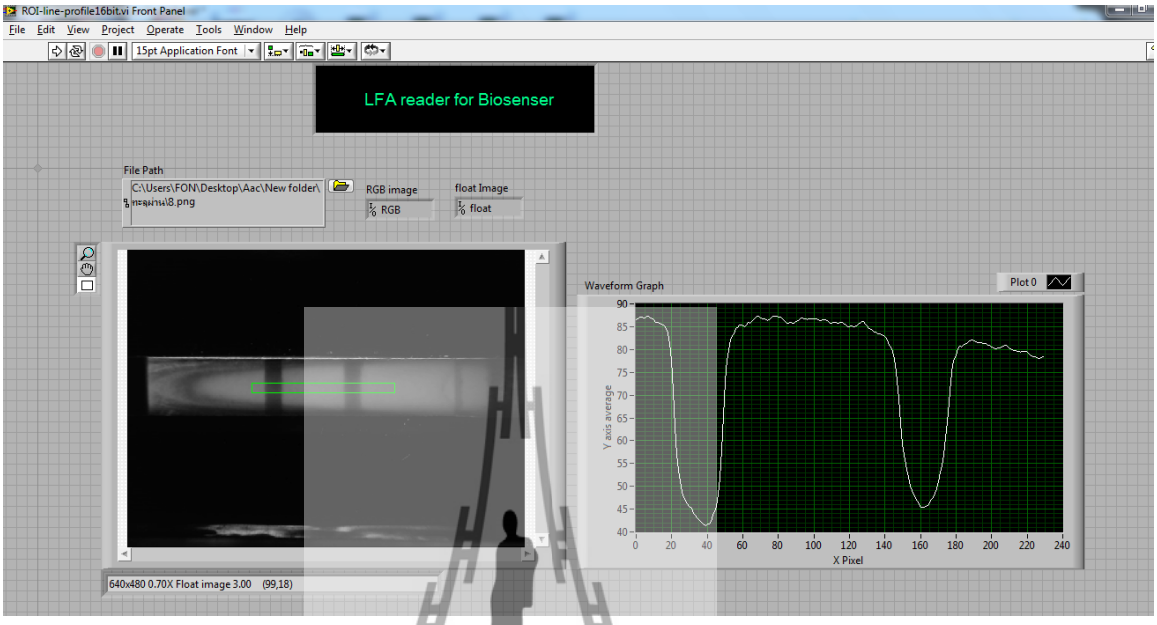


ไม่มีสิ่งที่เราต้องการทดสอบ (Healthy)

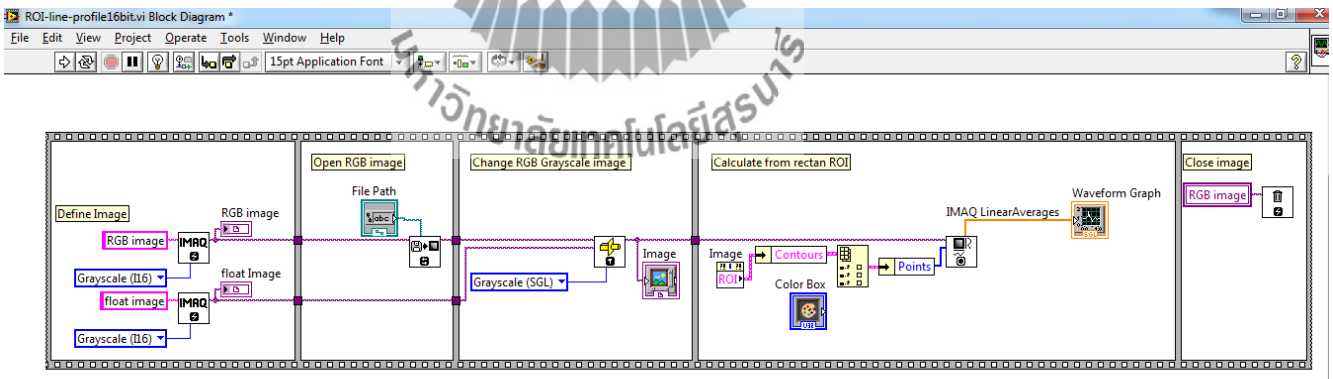


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

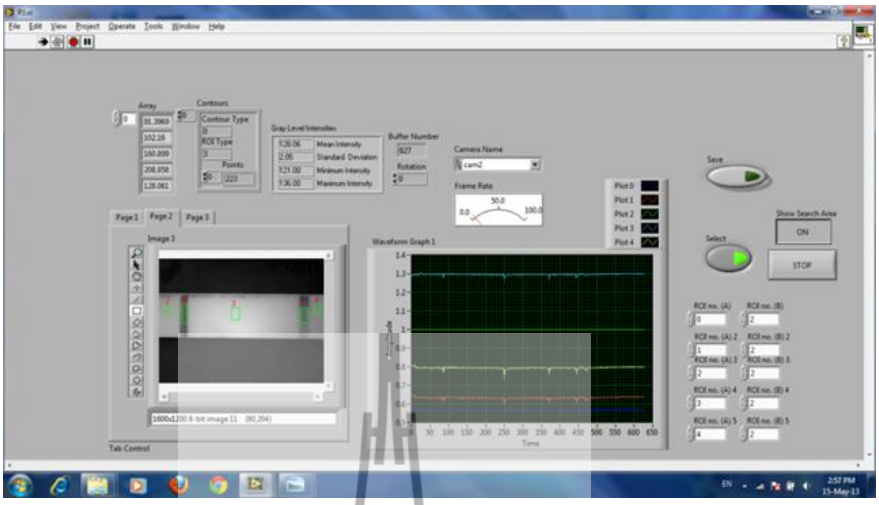
ภาพตัวอย่างการใช้งานโปรแกรม Line Profile บน LabVIEW



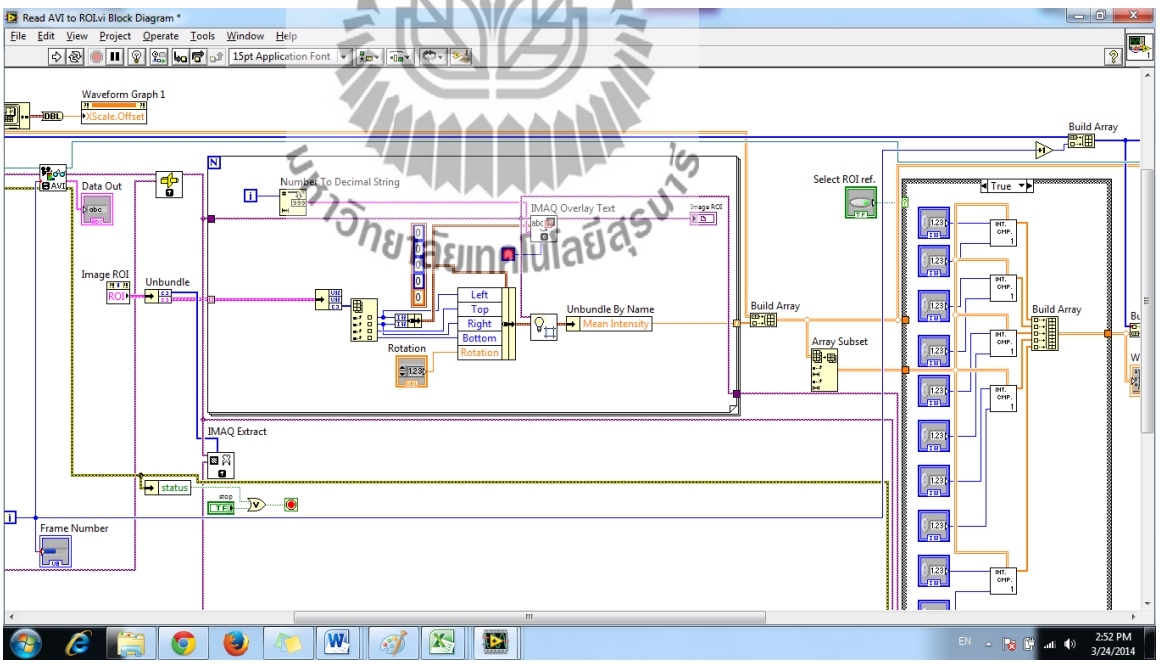
Code การเขียนโปรแกรม LabVIEW ในการหา Line Profile



ภาพตัวอย่างการใช้งานโปรแกรม ROI บน LabVIEW



Code การเขียนโปรแกรม LabVIEW ในการหา Line Profile



เอกสารอ้างอิง

[1] R. C. Wong, *Lateral Flow Immunoassays*, New York, Humana Press, 2009.

[2] O. Mudanyali, S. Dimitrov, U. Sikora, S. Padmanabhan, I. Navruz and A. Ozcan, "Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone", *Lab Chip*, vol. 12, no. 15, pp. 2678-2686, 2012

[3] H. Kuang, C. Xing, C. Hao, L. Liu, L. Wang and C. Xu "Rapid and Highly Sensitive Detection of Lead Ions in Drinking Water Based on a Strip Immunosensor," Sensors 13 (2013) 4214-4224.[4] D.J.You,T.S. Park and J.-Y. Yoon "Cell-phone-based measurement of TSH using Mie scatter optimized lateral flow assays," Biosensors and Bioelectronics 40 (2013) 180–185.

[5] O.Mudanyalia, S. Dimitrova, U. Sikoraa, S.Padmanabhana, I. Navruza and A. Ozcana "Integrated Rapid-Diagnostic-Test Reader Platform on a Cellphone," Lab Chip. 12 (2012) 2678–2686.

[6] Cytodiagnostics, http://www.cytodiagnostics.com/lateral-flow-immunoassays.php, [สืบค้นเมื่อ กุมภาพันธ์ 2557]

[7] The Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, People's Republic of China.

[8] Tsuda, S., et al. Plant Disease 76, 466-469 (1992).

[9] Fan, E., et al. Immunochromatographic Assay and Method of Using Same , International Patent: WO 91/12336, August 22,1991.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้เขียน

นางสาวลลิตา สายศิลป์ เกิดเมื่อวันที่ 6 ตุลาคม พ.ศ. 2534 ภูมิลำเนาเดิมอยู่บ้านเลขที่ 32/4 ถนนกุดั่น ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000 จบระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสุรนารีวิทยา12 จังหวัดนครราชสีมา ปีการศึกษา 2553 ปัจจุบันกำลังศึกษาอยู่ชั้นปีที่ 4 สาขาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ได้รับทุนโครงการวิทย์ผลิตนักเทคโน จากสวทช.

นายภาณุพงศ์ ศรีสกุลเตียว เกิดเมื่อวันที่ 15 สิงหาคม พ.ศ. 2534 ภูมิลำเนาเดิมอยู่บ้านเลขที่ 5-7 ถนนโพธิ์กลาง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000 จบระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนราชสีมาวิทยาลัย จังหวัดนครราชสีมา ปีการศึกษา 2553 ปัจจุบันกำลังศึกษาอยู่ชั้นปีที่ 4 สาขาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

นายประมวล บุญนำ เกิดเมื่อวันที่ 26 มีนาคม พ.ศ. 2535 ภูมิลำเนาเดิมอยู่ที่บ้านเลขที่ 63 หมู่ 1 ตำบลศาลาลี่ไทย อำเภอเสาไห้ จังหวัดสระบุรี 18160 จบระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเสาไห้วิมลวิทยานุกูล ปัจจุบันกำลังศึกษาอยู่ชั้นปีที่ 4 สาขาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา