

การพัฒนาแถบตรวจโรคแบบแลทเทอรัลโฟลว์จากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
เพื่อตรวจคัดกรองโรคสครับทัยฟัส

นางสาวนารีธร อุดมทองสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์สงวนลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

DEVELOPMENT OF GOLD NANOPARTICLE-BASED LATERAL FLOW STRIP TEST
FOR SCRUB TYPHUS SCREENING

Miss Nareethorn Udomthongsuk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biomedical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาแถบตรวจโรคแบบแลทเทอรัลโฟลว์จากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพื่อตรวจคัดกรองโรคสครับทัยฟัส
โดย	นางสาวนารีธร อุดมทองสุข
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.พิชญ์ ศุภผล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ นายแพทย์ ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ พันเอกหญิง ดร.จริยาณา ภูเก็ว

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับเป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดี คณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศธีรวัฒน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.พิชญ์ ศุภผล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ นายแพทย์ ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(พันเอกหญิง ดร.จริยาณา ภูเก็ว)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(พันตรี ดร.ตุลย์ เรืองอารีรัชต์)

นารีธร อุดมทองสุข : การพัฒนาแถบตรวจโรคแบบแลทเทอรัลโฟลว์จากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพื่อตรวจคัดกรองโรคสครับทัยฟัส. (Development of gold nanoparticle-based lateral flow strip test for scrub typhus screening.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.ดร. พิชญ์ ศุภผล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.นพ.ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์, พ.อ.หญิง ดร. จริยาณญา เกวี, 134 หน้า.

โรคสครับทัยฟัสหรือโรคใช้รากสาตใหญ่จัดเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทยซึ่งจัดอยู่ในพื้นที่ระบาดของโรค ผู้ป่วยมักไม่ได้รับการวินิจฉัยเนื่องจากไม่มีอาการทางคลินิกที่เด่นชัดและการตรวจวินิจฉัยที่ใช้ในปัจจุบันยังมีข้อด้อย ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรร่วมกับวิธีทางอณูชีววิทยามาใช้ในการพัฒนาแถบตรวจคัดกรองโรคที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ทำให้ตรวจได้ง่าย รวดเร็ว แม่นยำ และไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญหรือเครื่องมืออื่นๆ มาช่วยในการแปลผล

การพัฒนาแถบตรวจคัดกรองโรคแบบแลทเทอรัลโฟลว์จากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ถูกตรึงด้วยสายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีน 47 kDa, 56 kDa และ 60 kDa antigen ซึ่งถูกนำมาใช้ร่วมกันในการตรวจจับเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* อันเป็นเชื้อก่อโรค สามารถใช้ตรวจจับเป้าหมายสังเคราะห์ได้ปริมาณต่ำสุด 0.125 fmol และตรวจหาผลาสมิติที่สอดคล้องด้วยยีน 56 kDa antigen ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี Multiplex PCR ได้ต่ำสุด 1.72 copies และจากการทดสอบกับตัวอย่างเลือดทางคลินิกจำนวน 55 ตัวอย่าง พบว่ามีความไวร้อยละ 92 และความจำเพาะร้อยละ 93 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Duplex nested PCR นอกจากนี้ยังไม่พบการเกิด Cross-hybridization กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และหนูซึ่งเป็น Host ชนิดหนึ่งของโรคอีกด้วย จากผลการทดลองพบว่า Stringency ของ Hybridization buffer และ Sodium dodecyl sulfate มีผลต่อความไวและความจำเพาะของชุดตรวจ จึงสรุปได้ว่าแถบตรวจคัดกรองโรคแบบแลทเทอรัลโฟลว์ที่ถูกพัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้ตรวจคัดกรองโรคสครับทัยฟัสในทางคลินิกได้ และยังสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจคัดกรองอื่นๆ ต่อไป

สาขาวิชา.....วิศวกรรมชีวเวช.....

ปีการศึกษา.....2554.....

ลายมือชื่อ.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5187188221 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORDS : Gold nanoparticles / Nucleic acid lateral flow strip test / Scrub typhus / *Orientia tsutsugamushi*

NAREETHORN UDOMTHONGSUK : Development of gold nanoparticle-based lateral flow strip test for scrub typhus screening. Advisor : Prof. Pitt Supaphol, Ph.D., Co-adviser : Amornpun Sereemasapun, M.D. Ph.D., Col. Jariyanart Gaywee, Ph.D., 134 pp.

In Thailand, there has been high incidence of patients suffering from scrub typhus. The decisive diagnosis is difficult because clinical symptoms are very broad and common. Traditional diagnosis methods have many disadvantages. Hence, the applications of gold nanoparticles (AuNPs) and molecular biology principles were used to develop AuNP-based nucleic acid lateral flow (NALF) strip test as a promising tool to provide a sensitive, specific, cheap and simple screening method.

AuNPs immobilized with thiolated-probes were used for multiplex detection NALF strip test development. Three types of the thiolated-probes were designed to be specific with 47 kDa, 56 kDa and 60 kDa antigen gene regions of pathogenic *Orientia tsutsugamushi* and were combined for signal amplification. Our platform could, by naked eye, detect mixed synthetic targets as low as 0.125 fmol and 1.72 copies for plasmid with 56 kDa antigen gene insertion after amplification with multiplex PCR. Fifty-five clinical samples were also used for evaluation of NALF efficiency. The sensitivity and specificity were 92% and 93% respectively, compared with duplex nested PCR. No cross hybridization with other types of bacteria as well as rat which is a possible host of the disease was observed. Our developed NALF provided satisfactory efficiency for clinical scrub typhus screening. The obtained knowledge can also be applied for strip test development of other diseases.

Field of Study : Biomedical Engineering..... Student's Signature

Academic Year : 2011..... Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิทยานิพนธ์นี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศ.ดร. พิชญ์ ศุภผล ดร.นพ. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ และ พ.อ.หญิง ดร. จริยาณาฏ เกวี ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่างๆ และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในการทำงานวิจัยนี้ ทั้งยังเอื้อเฟื้อเครื่องมือ สารเคมีต่างๆ ตลอดจนสถานที่ในการทำงานวิจัย

ผศ.ดร.พญ. กนิษฐา ภัทรกุล อาจารย์ประจำภาควิชาภาคจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ดร.สัตย์ พยุภร อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์และ นาย จีรวัดณ์ นาคนุนทด นิสิตปริญญาเอกประจำภาควิชาภาคจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาช่วยให้คำแนะนำและคำปรึกษาในด้านการออกแบบลำดับเบสของ Probe และ Primer ที่ใช้ในการงานวิจัย

พ.อ.หญิง ดร. จริยาณาฏ เกวี พ.ท. ดร. วุฒิกกรณ์ รอดความทุกข์ น.ส. พิมพ์มาดา เจียมวัฒนาเลิศ และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร กรมการแพทย์ทหารบกทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและสละเวลาในการให้ความรู้ คำแนะนำ สอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ การ Inoculation เชื้อ *O. tsutsugamushi* เข้า Vero cells การทำ Duplex nested PCR เพื่อตรวจสอบหาเชื้อ *O. tsutsugamushi* ในตัวอย่าง การหาตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่นำมาใช้ทำงานวิจัย ตลอดจนการให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ สารเคมีต่างๆ รวมถึงสถานที่ในการทำงานวิจัยที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร กรมการแพทย์ทหารบก

นพ. กนก พฤตวิทย์ ญ อาจารย์ประจำภาควิชาภาคปริสิต คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สละเวลาช่วยเหลือและสอนการทำ Plasmid cloning ของ เชื้อ *O. tsutsugamushi*

นาย วีรวัดณ์ ก่อเกียรติสกุล นาย มงคล พงษ์สุชาติ นางสาว ชุติพราง แदनลาดแก้ว และ นาย ธีระเดช ชมหวาน นิสิตปริญญาโท หลักสูตรวิชาวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ สาขาวิชาอณูพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนิสิตปริญญาโทและเอก หลักสูตรสหสาขาวิศวกรรมชีวเวช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยให้คำปรึกษาและแบ่งปันกำลังใจกันในช่วงการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้กำลังใจ สนับสนุน และให้ทุนทรัพย์ในการศึกษาต่อในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ด
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
3 วิธีดำเนินการ.....	23
3.1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	23
3.2. สารเคมี.....	25
3.3. การสังเคราะห์หรือขนาดของค่าระดับนาโนเมตร.....	27
3.4. การออกแบบ Probe.....	28
3.5. การตรึง Detection probe บนผิวอนุภาคของค่าระดับนาโนเมตร	31
3.6. การตรึง Capture probe บน Nitrocellulose membrane เพื่อทำ Test line และ Control line.....	33
3.7. การเตรียมและประกอบชุด Nucleic acid lateral flow strip test	34
3.8. การทดสอบหา Hybridization buffer ที่เหมาะสม	36
3.9. การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe	37
3.9.1. การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่าง Detection probe กับ Capture probe ที่ต่างชุดกัน	37
3.9.2. การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน.....	38

บทที่	หน้า
3.10. การทดสอบหาความไวของ Nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target	39
3.10.1. การทดสอบหาความไวของ Single detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target	39
3.10.2. การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection Nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target	39
3.11. การทำ Multiplex PCR ของเชื้อ <i>Orientia tsutsugamushi</i>	40
3.11.1. การออกแบบ Primer	40
3.11.2. การทดลองหาสภาวะของ Multiplex PCR ที่เหมาะสมด้วย Single PCR	41
3.11.3. การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของ Multiple PCR	42
3.12. การทดลองนำ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test มาทดสอบกับของเชื้อ <i>Orientia tsutsugamushi</i> สายพันธุ์ต่างๆ	46
3.13. การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบสของ 56 kDa antigen	48
3.14. การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วยเชื้อ <i>Orientia tsutsugamushi</i>	50
3.15. การทดสอบความจำเพาะของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test กับตัวอย่าง DNA จากตั๊กแตนและเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ....	52
3.16. การนำ Clinical sample มาทดสอบกับ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test	54
3.17. ลำดับขั้นการทำงานวิจัย	58
3.18. การวิเคราะห์ข้อมูล	59
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	60
4.1. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	60
4.2. การตรึง Detection probe บนผิวอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	61
4.3. การทดสอบหา Hybridization buffer ที่เหมาะสม	62
4.4. การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe	65

4.4.1.	การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่าง Detection probe กับ Capture probe ที่ต่างชนิดกัน	65
4.4.2.	การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชนิดกัน	70
4.5.	การทดสอบหาความไวของ Nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target	72
4.5.1.	การทดสอบหาความไวของ Single detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target	72
4.5.2.	การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection Nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target	74
4.6.	การทำ Multiplex PCR ของเชื้อ <i>Orientia tsutsugamushi</i>	75
4.6.1.	การทดลองหาสภาวะของ Multiplex PCR ที่เหมาะสมด้วย Single PCR	75
4.6.2.	การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของ Multiple PCR	76
4.7.	การทดลองนำ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test มาทดสอบกับเชื้อ <i>Orientia tsutsugamushi</i> สายพันธุ์ต่างๆ	80
4.8.	การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบสของ 56 kDa antigen	81
4.9.	การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วยเชื้อ <i>Orientia tsutsugamushi</i>	84
4.10.	การทดสอบความจำเพาะของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test กับตัวอย่าง DNA จากตั๊กแตนและเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ....	88
4.11.	การนำ Clinical sample มาทดสอบกับ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test	91
5	อภิปรายผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย ข้อเสนอแนะ	107
5.1.	อภิปรายผลการวิจัย	107
5.2.	สรุปผลการวิจัย	113
5.3.	ข้อเสนอแนะ	114
	รายการอ้างอิง.....	115

	ญ
บทที่	หน้า
ภาคผนวก.....	126
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	134

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงสาเหตุของไข้ที่ตรวจพบในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุจำนวน 471 ราย (ร้อยละ 38.7)	2
2	แสดงเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> สายพันธุ์ต่างๆ	9
3	แสดงตารางสรุปค่าความไว, ความจำเพาะ และเกณฑ์ตัดสินผลของวิธีตรวจทางเซรัมวิทยาต่างๆ	13
4	แสดงวัสดุนาโน (Nanomaterial) ที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์	14
5	ค่าร้อยละความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของ <i>groEL</i> ใน Scrub typhus group (STG) เมื่อเปรียบเทียบภายในเชื้อกลุ่มเดียวกัน (table 2) และข้ามกลุ่มกับ Typhus group (TG) และ Spotted fever group (SFG) (table 3)	20
6	แสดงรายละเอียดของลำดับเบสของ 47-kDa antigen ที่นำมาใช้ในการออกแบบ P47_DT, P47_CL และ P47_TL	28
7	แสดงรายละเอียดของ Detection probe (P47_DT) และ Capture probe (P47_CL และ P47_TL) ที่จำเพาะกับ 47-kDa antigen ที่ใช้ในการตรึงบนผิว AuNPs และ Nitrocellulose membrane ตามลำดับ (* Poly-(A) ₁₀ spacer)	28
8	แสดงรายละเอียดของลำดับเบสของ 56-kDa antigen ที่นำมาใช้ในการออกแบบ P56_DT, P56_CL และ P56_TL	29
9	แสดงรายละเอียดของ Detection probe (P56_DT) และ Capture probe (P56_CL และ P56_TL) ที่จำเพาะกับ 56-kDa antigen ที่ใช้ในการตรึงบนผิว AuNPs และ Nitrocellulose membrane ตามลำดับ (* Poly-(A) ₁₀ spacer)	29
10	แสดงรายละเอียดของลำดับเบสของ 60-kDa antigen ที่นำมาใช้ในการออกแบบ P60_DT, P60_CL และ P60_TL	30
11	แสดงรายละเอียดของ Detection probe (P60_DT) และ Capture probe (P60_CL และ P60_TL) ที่จำเพาะกับ 60-kDa antigen ที่ใช้ในการตรึงบนผิว AuNPs และ Nitrocellulose membrane ตามลำดับ (* Poly-(A) ₁₀ spacer)	30
12	แสดง Synthetic target ที่ใช้ในการทดสอบกับ NALF	36

ตารางที่	หน้า
13	แสดงการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่าง Detection probe กับ Capture probe ที่ต่างชุดกัน 37
14	แสดงการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่าง ชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน 38
15	แสดงรายละเอียดของ Primer ที่ใช้ใน Multiplex PCR 40
16	แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Single PCR 41
17	แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR เมื่อใช้ Extension time (A) 1 นาที และ (B) 30 วินาที 42
18	แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR ที่ Annealing temperature ต่างๆ 43
19	แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR โดยใช้ปริมาณ MgCl ₂ ต่างๆ 44
20	แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR ของเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> สายพันธุ์ ต่างๆ 46
21	แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR เพื่อหาความไวของ Multiple detection NALF ด้วย Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบสของ 56 kDa antigen 48
22	แสดงปริมาณต่างๆ ของ Plasmid ที่ใช้ทดสอบความไวของ Multiple detection NALF และปริมาณเทียบเท่าเป็น Copies 49
23	แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR ของเพื่อหาความไวของ Multiple detection NALF ด้วยเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) 50
24	แสดงปริมาณต่างๆ ของเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) ที่ใช้ทดสอบ ความไวของ Multiple detection NALF และปริมาณเทียบเท่าเป็น Copies 51
25	แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR ของเพื่อหาความจำเพาะของ Multiple detection NALF ด้วย DNA ของหนูและเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ..... 53
26	แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR ของเพื่อหาใช้ตรวจหาเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> ด้วย Multiple detection NALF จากตัวอย่างเลือด 55
27	แสดงตารางการคำนวณค่า Sensitivity, Specificity, Positive predictive value (PPV), Negative predictive value (NPV), Pre-test likelihood, Post-test likelihood และ Likelihood ratio 56

ตารางที่	หน้า
28	แสดงการเกิด Cross-hybridization ของ NALF ที่ใช้ P60-NALF และกราฟ Signal curve จากโปรแกรม ImageJ เมื่อใช้ 6xSSC และ 8xSSC เป็น Hybridization buffer และใช้ Milli Q water แทน Synthetic target 64
29	แสดงผลการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่าง Detection probe กับ Capture probe ที่ต่างชุดกัน 65
30	แสดงสรุปผลการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่าง Detection probe กับ Capture probe ที่ต่างชุดกัน (ช่องที่แรงเงา คือ ไม่เกิด Cross-hybridization) 69
31	แสดงสรุปผลการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน (ช่องที่แรงเงา คือ ไม่เกิด Cross-hybridization) 70
32	แสดงปริมาณ Synthetic target ที่ใช้ทดสอบความไวของ NALF และปริมาณ เทียบเท่าเป็น Copies 72
33	แสดงสถานะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR 78
34	แสดงปริมาณต่างๆ ของ Plasmid ที่ใช้ทดสอบความไวของ Multiplex detection NALF ด้วย Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบส 56 kDa antigen สอดแทรก และกราฟแสดงระดับสัญญาณจากโปรแกรม ImageJ (CL = Control line, TL = Test line) 82
35	แสดงปริมาณต่างๆ ของเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) ที่ใช้ทดสอบ ความไวของ Multiplex detection NALF และกราฟแสดงระดับสัญญาณจาก โปรแกรม ImageJ (CL = Control line, TL = Test line) 85
36	แสดงรายละเอียดผลการทดสอบตัวอย่างเลือดด้วย Multiplex detection NALF เทียบกับวิธี Duplex nested PCR 91
37	แสดงผล Multiplex detection NALF และกราฟจากโปรแกรม ImageJ ของ ตัวอย่างเลือดจำนวน 55 ตัวอย่าง โดยมีเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> เป็น Positive control และ Healthy human เป็น Negative control 95
38	แสดงการเปลี่ยนแปลงของ Vero cells หลังจากเติมเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> ที่ เวลาต่างๆ (นับวันที่เติมเชื้อ (Inoculation) เป็น day 0) 129

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสรีบทัยฟัส	1
2	แสดงลักษณะแผลเอสคาร์	3
3	แสดงส่วนประกอบต่างๆ ของ Lateral flow strip test และการแปลผลการทดสอบ	5
4	แสดงรูปเชื้อ <i>Orientia tsutsugamushi</i>	8
5	แสดงวงจรชีวิตของตัวไรซึ่งเป็นพาหะของโรคสรีบทัยฟัส	8
6	แสดงการสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย HAuCl ₄ และ Sodium citrate ด้วยปฏิกิริยา Reduction	15
7	แสดงสีของคอลลอยด์ AuNPs ที่เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงินเมื่อ AuNPs เกิดการเกาะกลุ่มกัน (รูป A) และกราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ของ AuNPs ที่เปลี่ยนแปลงไป (รูป B)	16
8	แสดงส่วนประกอบต่างๆ (รูปซ้าย) และหลักการทำงาน (รูปขวา) ของ Nucleic acid lateral flow strip test	17
9	แผนภาพแสดงการตรึงสารชีวโมเลกุลต่างๆ บนพื้นผิวของ AuNPs	18
10	แสดงความแปรผันทางพันธุกรรมในช่วงของยีน 56-kDa type-specific antigen	19
11	แสดงหลักการของ AuNPs ที่ถูกตรึงด้วย Thiolated-probe ในการตรวจจับ DNA เป้าหมาย (รูปซ้าย) และการเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (รูปขวา)	21
12	แสดงการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	27
13	แสดงส่วนประกอบต่างๆ และขนาดของ Nucleic acid lateral flow (NALF) strip test (A) รูปจากด้านบน (B) รูปจากด้านข้าง (SP : Sample pad, CP : Conjugate pad, NM : Nitrocellulose membrane และ AP : Absorption pad)	34
14	แสดง Ladder ที่ใช้ในการทำ Gel electrophoresis ขนาด (A) 100 bp และ (B) 25 bp	45
15	แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติและคุณลักษณะของ AuNPs ด้วย (A) UV-Vis spectrophotometer (B) TEM และ (C) Zetasizer	60

ภาพที่	หน้า
16	แสดงลักษณะของสี AuNPs ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อผ่านกระบวนการ Salting 61
17	แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของ AuNPs ที่ถูกตรึงด้วย Detection probe บนผิว ด้วย Zetasizer 61
18	กราฟแสดง Signal level และค่าตัดสิน (Cut-off) จากโปรแกรม ImageJ ของ Single detection NALF ที่ใช้ P47-NALF, P56-NALF และ P60-NALF ทดสอบกับ 47 kDa, 56kDa และ 60 kDa synthetic target 125 fmol ตามลำดับ เมื่อใช้ Hybridization buffer ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ 63
19	กราฟแสดง Signal level และค่าตัดสิน (Cut-off) จากโปรแกรม ImageJ ของ Single detection NALF ที่ใช้ P47-NALF, P56-NALF และ P60-NALF ทดสอบกับ Milli Q water (Negative control) เมื่อใช้ Hybridization buffer ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ 64
20	แสดงกราฟผลการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบหาการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน (A) P47-NALF, (B) P56-NALF และ (C) P60-NALF 71
21	กราฟแสดงค่า LOD ของ Single detection NALF ของ (A) P47-NALF, (B) P56-NALF และ (C) P60-NALF เมื่อทดสอบด้วย Synthetic target ที่ปริมาณ 0.0125, 0.125, 1.25, 12.5 และ 125 fmol 73
22	กราฟแสดงค่า LOD ของ Multiplex detection NALF เมื่อทดสอบด้วย Synthetic target ที่ปริมาณ 0.0125, 0.125, 1.25, 12.5 และ 125 fmol 74
23	แสดงรูป NALF ชนิดต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบกับ Synthetic target 125 fmol (n=3) 74
24	แสดงผล Gel electrophoresis ของ Single PCR โดยใช้เชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) ได้ PCR product 3 ขนาด ได้แก่ 47 kDa Ag (86 bp), 56 kDa Ag (166 bp) และ 60 kDa Ag (334 bp) และมี Healthy human เป็น Negative control 75
25	แสดงผล Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR เมื่อใช้ Extension time (A) 1 นาที และ (B) 30 วินาที โดยใช้เชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) เป็น Template และมี Healthy human เป็น Negative control 76

ภาพที่	หน้า
26 แสดงผล Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR ที่ Annealing temperature ต่างๆ โดยใช้เชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) เป็น Template	77
27 แสดงผล Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR ที่ใช้ MgCl ₂ ความเข้มข้น ต่างๆ โดยใช้เชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) เป็น Template	78
28 แสดงผล Multiplex detection NALF (แถบขน) และ Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR (แถวล่าง) ของเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Karp, Kato และ Gilliam โดยใช้ Human genomic DNA เป็น Negative control (n= 3)	80
29 แสดงผล Multiplex detection NALF (แถบขน) และ Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR (แถวล่าง) ของ Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบส 56 kDa antigen สอดแทรกในปริมาณต่างๆ เพื่อหาปริมาณต่ำสุด (Limit of detection) ที่สามารถ ตรวจสอบได้ด้วย Multiplex detection NALF โดยมี Human genomic DNA เป็น Negative control	81
30 แสดงผล Multiplex detection NALF (แถบขน) และ Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR (แถวล่าง) ของ เชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) ใน ปริมาณต่างๆ เพื่อหาปริมาณต่ำสุด (Limit of detection) ที่สามารถตรวจสอบได้ ด้วย Multiplex detection NALF โดยมี Healthy human เป็น Negative control	84
31 แสดง Signal level เมื่อทดสอบ Multiplex detection NALF ด้วยเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) ในปริมาณต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม ImageJ (ค่าตัดสินค้านวนจาก Negative control ที่ใช้น้ำจาก Multiplex PCR)	87
32 แสดงผล Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR ของตัวอย่าง DNA จากตับ หนูและเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (Positive control) และ Healthy human (Negative control) (ลูกศร คือ Non-specific band ของ <i>E.coli</i> ที่มีขนาดมากกว่า 400 bp)	89

ภาพที่	หน้า
33	แสดงผลของ Multiplex detection NALF ที่นำมาทดสอบกับ PCR product ของตัวอย่าง DNA จากตับหนู และเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยมีเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> เป็น Positive control และ Human เป็น Negative control (CL = Control line, TL = Test line) 90
34	แสดงผล Gel electrophoresis ของ Duplex nested PCR ของตัวอย่างเลือดจำนวน 55 ตัวอย่าง โดยมีเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (O.T.) และ <i>Rickettsia honei</i> (R.T.) เป็น Positive control และ Healthy human เป็น Negative control 94
35	แสดงผล Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR ของตัวอย่างเลือดจำนวน 55 ตัวอย่าง โดยมีเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> (O.T.) เป็น Positive control และ Healthy human เป็น Negative control 105
36	แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของตัวอย่างเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> สายพันธุ์ต่างๆ กับลำดับเบสของ Primer ที่จำเพาะต่อแอนติเจนยีน 56 kDa ที่ใช้ในการทำ Duplex nested PCR ด้วยโปรแกรม MultAlin (a) Primer RTS8 และ (b) Primer F (invert; กลับลำดับเบสเพื่อให้เปรียบเทียบลำดับเบสได้) 112
37	แสดงผลการทำ Cytospin ในวันที่ 14 จะสังเกตเห็นเชื้อ <i>O. tsutsugamushi</i> อยู่ในไซโตพลาสซึมของ Vero cells (เจือจาง Sample : PBS = 1:1) 132

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AuNPs = Gold nanoparticles

NALF = Nucleic acid lateral flow

DNA = Deoxyribonucleic acid

RNA = Ribonucleic acid

O.T. = *Oriantia tsutsugamushi*

GL = *Oriantia tsutsugamushi* (Gilliam strain)

PCR = Polymerase chain reaction

DT = Detection probe, Thiolated probe

TL = Test line

CL = Control line

SSC = Saline-sodium citrate buffer

SDS = Sodium dodecyl sulphate

MQW = Milli Q water

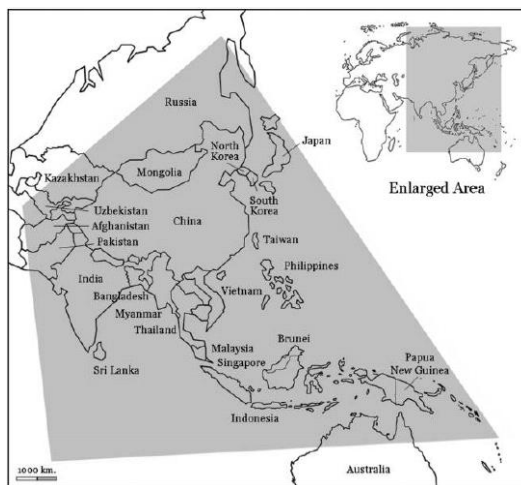
a.u. = Arbitrary unit

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคสครับทัยฟัส (Scrub typhus) หรือ ไข้รากสาดใหญ่จัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ เนื่องจากพบการติดเชื้อของประชากรทั่วโลกหลายล้านคน พบการระบาดในแถบเอเชีย-แปซิฟิก อัฟกานิสถาน จีน เกาหลี หมู่เกาะทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึงประเทศออสเตรเลียทางตอนเหนือ [1] รวมถึงพื้นที่ของประเทศไทย ดังแสดงในภาพที่ 1 และมีอุบัติการณ์ของโรคในพื้นที่ระบาดประมาณ 1 ล้านคนต่อปี [2] โดยจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับรายงานน่าจะมีปริมาณน้อยกว่าที่เป็นจริง เนื่องจากผู้ป่วยมักไม่ได้รับการการวินิจฉัยว่าเป็นโรคสครับทัยฟัสเพราะส่วนใหญ่ไม่มีอาการทางคลินิกที่เด่นชัด และอาการทางคลินิกจะคล้ายคลึงกับโรคต่างๆ ในกลุ่มโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ (Fever of Unknown Origin; FUO) เช่น ฉีหนู (Leptospirosis), มิวรีนทัยฟัส (Murine typhus) และไข้เลือดออก (Dengue hemorrhagic fever) เป็นต้น [3,4,5] สำหรับในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2533 มีการศึกษาหาสาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุในผู้ป่วยจำนวน 1,218 ราย ที่ไม่สามารถวินิจฉัยโรคจากข้อมูลที่ได้จากประวัติและการตรวจร่างกาย โดยในจำนวนนี้สามารถตรวจพบสาเหตุของไข้ได้ 471 ราย (ร้อยละ 38.7) ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 1 พบว่าโรคสครับทัยฟัสเป็นโรคที่พบบ่อยที่สุด คือ 91 ราย (ร้อยละ 7.5) รองลงมาคือไข้หวัดใหญ่ (73 ราย หรือร้อยละ 5.7) และไข้เลือดออก (70 ราย หรือร้อยละ 5.7) [6]



ภาพที่ 1 แสดงพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสครับทัยฟัส [1]

ตารางที่ 1 แสดงสาเหตุของไข้ที่ตรวจพบในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุจำนวน 471 ราย (ร้อยละ 38.7) [6]

โรคที่ตรวจพบ	จำนวน	ร้อยละ
Scrub typhus	91	7.5
Influenza	73	6
Dengue hemorrhagic fever	70	5.7
Murine typhus	65	5.3
Bacteremia	36	3
Typhoid fever	23	1.9
Chikunkunya viral infection	14	1.1
Leptospirosis	14	1.1
Melioidosis	11	0.9
JE viral infection	7	0.6
EB viral infection	2	0.2
ให้ผลบวก 2 โรค	58	4.8
ให้ผลบวก 3 โรค	7	0.6

อาการทางคลินิกที่มักพบ เช่น ไข้เฉียบพลัน, หนาวสั่น, ปวดศีรษะ, ไอแห้งๆ, ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ, เบื่ออาหาร และต่อมน้ำเหลืองโต เป็นต้น ส่วนผื่นแดงบริเวณลำตัวมักพบหลังมีไข้ 5-7 วัน ลักษณะเฉพาะของโรคที่อาจพบ คือ “แผลเอสคาร์ (Eschar)” ซึ่งเกิดในบริเวณที่ถูกไร่ออนกัดทำให้เกิดตุ่มแข็งขึ้นที่ผิวหนัง หลังจากนั้นจะเกิดการอักเสบกลายเป็นรอยแผลบวมเป็นสะเก็ดสีดำ รูปร่างรี ขอบนูนแดง ไม่เจ็บหรือคัน ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร คล้ายแผลถูกบุหรี่จี้ พบได้ประมาณร้อยละ 30-80 มักพบในบริเวณร่มผ้า แขน ท้ายทอย ลำตัว ถุงอัณฑะ สะโพก และต้นขา เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามแผลเอสคาร์อาจพบได้ในโรคกลุ่ม Spotted group rickettsioses ในรายที่เกิดจากเห็บกัด [3] หรือ Rickettsialpox [7] หรืออาจสับสนกับแผลที่เกิดการตกสะเก็ดทั่วไปก็ได้ [8] ผู้ป่วยที่อาการไม่รุนแรงอาจหายได้เองแม้ไม่ได้รับการรักษา ส่วนในรายที่มีอาการรุนแรงจะเกิดจากภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น ปอดอักเสบ, กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ, เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และภาวะช็อก โดยผู้ป่วยมักมีภาวะแทรกซ้อนหลายระบบพร้อมๆ กัน จนอาจเสียชีวิตได้หากไม่ได้รับการรักษา [3]

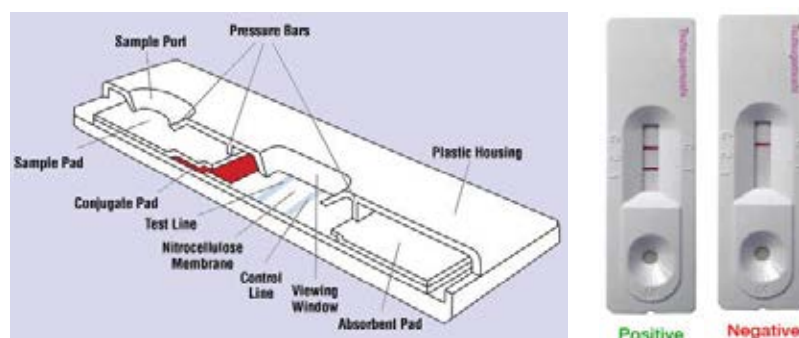


ภาพที่ 2 แสดงลักษณะแผลเอสคาร์ [9]

จากลักษณะอาการดังกล่าวทำให้แพทย์อาจทำการวินิจฉัยได้ยาก หรือในบางกรณีก็ไม่สามารถวินิจฉัยได้ และหากได้รับการรักษาที่ล่าช้า อาจส่งผลให้เกิดอาการแทรกซ้อนต่างๆ ดังที่ได้กล่าวแล้วในข้างต้นจนทำให้ถึงแก่ชีวิต โรคสครับทัยฟัสพบอัตราการตายได้ถึงร้อยละ 30-50 ขึ้นกับการรักษาที่ได้รับและสายพันธุ์ที่ติด [10,11] นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังการติดเชื้อจะคงอยู่นานประมาณ 3 ปีหากเป็นเชื้อสายพันธุ์ (Strain) เดียวกัน แต่หากเป็นกรณีต่างสายพันธุ์ ภูมิคุ้มกันอาจลดลงได้อย่างรวดเร็วภายใน 1-3 เดือน ผู้ป่วยจึงสามารถกลับมาเป็นซ้ำได้อีก โดยเฉพาะเมื่อเกิดการติดเชื้อต่างสายพันธุ์ [3,12] ดังนั้นการวินิจฉัยถึงสาเหตุได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ จะเป็นประโยชน์ต่อทั้งทางด้านสุขภาพและด้านเศรษฐกิจ คือ เป็นการช่วยลดการใช้ยา และอุปสรรคในการวินิจฉัยและรักษาโรค อย่างไรก็ตามวิธีการวินิจฉัยที่ใช้ในปัจจุบันยังมีข้อด้อย เช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ยาก ใช้เวลานาน ผู้ปฏิบัติงานมีความเสี่ยงในการติดเชื้อ และต้องทำในห้องปฏิบัติการที่มีการป้องกันความปลอดภัยอย่างที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ส่วนในการตรวจทางเซรั่มวิทยา การแปลผลจะต้องรอเวลาการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีไตเตอร์ (Antibody titer) ซึ่งส่วนใหญ่ต้องใช้เวลาหลังจากตรวจพบว่ามีอาการป่วย ผลบวกของแอนติบอดีไตเตอร์จึงมักตรวจพบหลังอาการป่วยรุนแรงในระยะแรกหายไปแล้ว และในกรณีผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาตั้งแต่เนิ่นๆ อาจพบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ล่าช้ากว่าหรือไม่พบการตอบสนองก็ได้ และจากการที่โรคสครับทัยฟัสเป็นโรคที่ระบาดเฉพาะพื้นที่ ทำให้ระดับแอนติบอดีไตเตอร์พื้นหลังในกลุ่มประชากรมีระดับสูงอยู่แล้ว จึงอาจเป็นข้อจำกัดในการนำวิธีทางเซรั่มวิทยามาตรวจวินิจฉัย นอกจากนี้ยังต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง และใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการอ่านผลด้วย [5,10,13,14] ส่วนการตรวจด้วยวิธีทางอนุชีวมเลกุลจะมีความจำเพาะและแม่นยำมากกว่า และยังสามารถนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยในกรณีที่ผู้ป่วยมีการกลับมาเป็นซ้ำ และยังช่วยจำแนกผู้ป่วยในกรณีที่ผลทางเซรั่มวิทยาไม่ชัดเจนได้อีกด้วย [14,15]

ในปัจจุบันมีการนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในหลากหลายสาขารวมทั้งด้านทางการแพทย์ จึงเกิดวิทยาการใหม่ เรียกว่า “นาโนเวชศาสตร์ (Nanomedicine)” ซึ่งเป็นการนำเอาวัสดุนาโนมาใช้ทางการแพทย์ เช่น การนำส่งยา บำบัด วินิจฉัย พยากรณ์โรค เป็นต้น [16] โดยวัสดุนาโนที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย คือ “อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles; AuNPs)” เป็นอนุภาคของโลหะที่มีขนาดเล็กอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร สามารถสังเคราะห์ได้ง่าย ไม่มีพิษต่อร่างกาย และมีคุณสมบัติทางแสงที่จำเพาะ จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการนำ AuNPs มาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น การนำมาใช้เป็นตัวเซ็นเซอร์ โดยติดฉลากบนอนุภาคด้วย antibody หรือ DNA/RNA เพื่อใช้เป็นตัวตรวจหาสารชีวโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ การตรวจหา antigen [17], DNA/RNA [18] หรือใช้เป็นตัวนำส่งยาหรือยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายเพื่อใช้ในการรักษาโรค [19]

จากข้อมูลและปัญหาในการตรวจวินิจฉัยโรคที่ได้กล่าวแล้วในข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาและพัฒนาวิธีตรวจคัดกรองโรคสครับทัยฟัส ซึ่งเป็นการประยุกต์นำความรู้ทางด้านนาโนเทคโนโลยี, เทคนิคทางอณูชีววิทยา และหลักการของ Immunochromatography มาใช้ในการพัฒนาแถบตรวจคัดกรองโรคแบบแลทเทอรัลโฟลว์จากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ทำได้โดยการออกแบบ DNA สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเหมือนในเชื้อก่อโรคเพื่อทำเป็น “โพรบ (Probe)” นำมาตรึงบนผิว AuNPs หากในสิ่งส่งตรวจมี DNA ของเชื้อก่อโรค DNA และ Probe สามารถจับกันได้ (Hybridization) โดย AuNPs จะทำหน้าที่เป็นตัวรายงานผล (Reporter) เนื่องจากคุณลักษณะเฉพาะทางแสงที่มีสีแดง ทำให้สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าจากแถบสีแดงของ AuNPs ที่เกิดขึ้นบนเส้นทดสอบ (Test line; TL) และเส้นควบคุม (Control line; CL) หากแถบสีแดงเกิดทั้งที่เส้นทดสอบและเส้นควบคุมจะแปลผลเป็นบวก (มีเชื้อก่อโรค) แต่หากมีแถบสีแดงเกิดขึ้นที่เส้นควบคุมเพียงตำแหน่งเดียวจะแปลผลเป็นลบ (ไม่มีเชื้อก่อโรค) ทำให้การตรวจคัดกรองทำได้โดยง่าย รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญหรือเครื่องมืออื่นๆ มาช่วยในการแปลผล นอกจากนี้การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรคเพื่อนำมาใช้ตรวจจับเชื้อทำได้ยาก มีขั้นตอนที่ซับซ้อน ต้องอาศัยห้องปฏิบัติการที่จำเพาะ และในปัจจุบันยังไม่มีจำหน่ายแอนติบอดีของโรคนี้ทางการค้า ทำให้การตรวจจับเชื้อโดยใช้ Probe จึงมีความเหมาะสมมากกว่าเนื่องจากการสังเคราะห์ Probe ทำได้โดยง่าย และน่าจะให้ผลที่ใกล้เคียงกับการตรวจจับเชื้อด้วยแอนติบอดี



ภาพที่ 3 แสดงส่วนประกอบต่างๆ ของ Lateral flow strip test และการแปลผลการทดสอบ [20]

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาแถบตรวจคัดกรองโรคสครับไทป์ในรูปแบบแลทเทอรัลโฟลว์โดยใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นตัวรายงานผล
2. เพื่อเปรียบเทียบและประเมินประสิทธิภาพในการตรวจคัดกรองด้วยแถบตรวจโรคสครับไทป์ในรูปแบบแลทเทอรัลโฟลว์ที่ใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นตัวรายงานผลกับวิธี PCR

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาข้อมูลของโรคสครับไทป์
2. ศึกษาข้อมูลด้านเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
3. ศึกษาข้อมูลด้านเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแถบตรวจคัดกรองโรคแบบแลทเทอรัลโฟลว์จากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
4. พัฒนาระบบแถบตรวจโรคสครับไทป์ในรูปแบบแลทเทอรัลโฟลว์ที่ใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สามารถใช้ในการคัดกรองผู้ป่วย

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Nanobiotechnology : เทคโนโลยีนาโนชีวภาพ
- Biosensor : เครื่องมือตรวจวัดทางชีวภาพ
- Gold Nanoparticles : อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

- Nucleic acid lateral flow strip test (NALF) : แถบตรวจโรคแบบแลทเทอรัลโฟลว์ที่อาศัยหลักการทางด้านนาโนเทคโนโลยี, เทคนิคทางอณูชีววิทยาและ immunochromatography มาใช้ตรวจวินิจฉัย/คัดกรองโรค
- Scrub typhus : โรคสครับไทฟัส ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *Orientia tsutsugamushi*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาชุดตรวจคัดกรองโรคสครับไทฟัสในรูปแบบของแถบตรวจคัดกรองโรคแบบแลทเทอรัลโฟลว์จากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ผูกตรึงด้วย Probe ที่มีความจำเพาะต่อโรค
2. ได้รับความรู้และมีความเข้าใจเกี่ยวกับการนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยหรือด้านอื่นๆ มากขึ้น
3. สามารถนำชุดตรวจวินิจฉัยมาใช้งานทางคลินิกได้จริง เนื่องจากไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนในการแปลผล ทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยได้ตั้งแต่เนิ่นๆ และให้การรักษาได้อย่างถูกต้อง
4. ช่วยให้ทราบข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ถูกต้อง เพื่อให้สามารถแก้ไขหรือป้องกันการระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น
5. ได้ชุดตรวจวินิจฉัยที่มีราคาถูกกว่าวิธีเดิมที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ทำให้ช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยเอง รวมถึงประหยัดงบประมาณ และช่วยลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจของประเทศได้อีกทางหนึ่ง
6. นำองค์ความรู้ที่ได้มาพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยสำหรับตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ หรือตรวจวินิจฉัยโรคอื่นๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research)

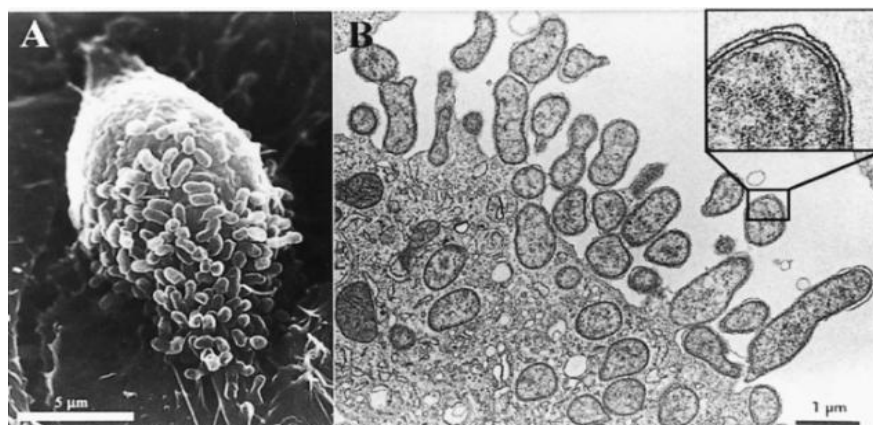
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

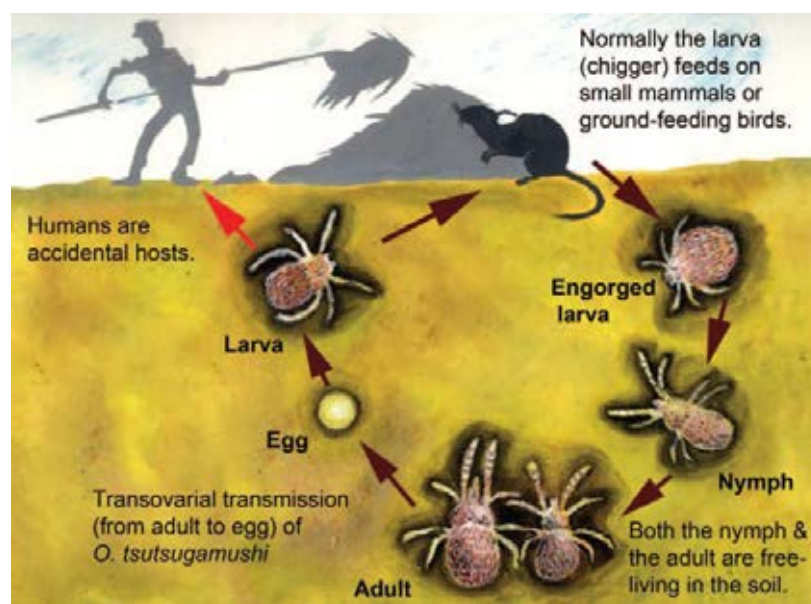
แนวคิดและทฤษฎี

โรคสครับไทฟัส (Scrub typhus)

โรคสครับไทฟัส (Scrub typhus) เกิดจากการติดเชื้อ "*Orientia tsutsugamushi* (หรือ *Rickettsia tsutsugamushi*)" ซึ่งจัดเป็นเชื้อริกเก็ตเซีย (*Rickettsia*) โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบที่ต้องอาศัยอยู่ในเซลล์ (Obligate intracellular gram negative bacteria) มีความยาว 0.8-2.0 μm และเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3-0.5 μm โดยปกติจะพบการติดเชื้อใน Endothelial cells, Macrophage และ Polymorphonuclear leukocytes เชื้อจะกระตุ้นให้เซลล์เจ้าบ้าน (Host cells) เกิดกระบวนการ Phagocytosis แล้วย่อยทำลายผนัง Phagosome แล้วเกิดการแบ่งตัว (Binary fission) ในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) เวลาที่เชื้อจะเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time) ประมาณ 8-9 ชั่วโมง และเกิดการแตกหน่อ (Budding) ในวันที่ 2-3 ของการเพาะเลี้ยง และกระจายสู่เซลล์ข้างเคียงหรือเซลล์อื่นๆ ต่อไป สามารถพบเชื้อในเลือดของผู้ป่วยได้ 5-10 organism/ μl พาหะของโรค (Vector) คือ "ตัวไรอ่อน (Chigger)" ซึ่งเป็นระยะตัวอ่อนของไร (Trombiculid mite) การติดเชื้อเกิดจากการโดนไรอ่อนของหนูหรือสัตว์ฟันแทะที่มีเชื้อกัด โดยปกติเชื้อ *O. tsutsugamushi* จะถูกถ่ายทอดอยู่ในวงจรชีวิตของไร โดยไรแก่ตัวเมียที่ติดเชื้อจะแพร่กระจายเชื้อไปสู่ไข่ (Transovarial infection) ตัวอ่อนที่ออกมาจะมีเชื้อ *O. tsutsugamushi* อยู่และต้องการน้ำในเนื้อเยื่อ (Tissue fluid) เป็นอาหาร จึงกัดกินเลือดจากสัตว์หรือคนก่อนที่จะเจริญเติบโตไปเป็นไรแก่ เมื่อมีการผสมพันธุ์ เชื้อจะสามารถถูกถ่ายทอดไปยังไรอ่อนรุ่นต่อไป ในปัจจุบันพบเชื้อ *O. tsutsugamushi* แล้วมากกว่า 20 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่พบบ่อยมี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Karp, Kato และ Gilliam ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาข้าม (Cross-reactivity) ระหว่างแอนติเจน (Antigen) ในแต่ละสายพันธุ์ได้เมื่อทำการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางเซรั่มวิทยา (Serology) [1,21,22]



ภาพที่ 4 แสดงรูปเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* [23]



ภาพที่ 5 แสดงวงจรชีวิตของตัวไรซึ่งเป็นพาหะของโรคสครับไทฟัส [9]

ตารางที่ 2 แสดงเชื้อ *O. tsutsugamushi* สายพันธุ์ต่างๆ [1]

Table 2. Prototypical and reference *Orientia* strains as determined by antigenicity.

Strain	Source organism; location; date	Remark(s)
Karp	Human; New Guinea; 1943	Original prototype strain
Gilliam	Human; Assam-Burma border; 1943	Original prototype strain
Kato	Human; Niigata, Japan; 1955	Original prototype strain
Volner (JHV)	Human; Samar Island, Philippines; 1945	Strain used for vaccine trial
TA678	<i>Rattus rattus</i> ; Khao Yai, Khorat Plateau, Thailand; Sep 1963	Strain used in DFA studies by Shirai et al.
TA763 (Fan)	<i>Rattus rajah</i> ; Chong Mek, Khorat Plateau, Thailand; Nov 1963	Strain used in DFA studies by Shirai et al.; Karp-related strain
TA696	<i>Tupaia glis</i> ; Khao Yai, Khorat Plateau, Thailand; Sep 1963	Strain used in DFA studies by Shirai et al.; Karp-related strain
TA716 (Chon)	<i>Menetes berdmorei</i> ; Chong Mek, Khorat Plateau, Thailand; Aug 1963	Strain used in DFA studies by Shirai et al.; Karp-related strain
TH1817	Human; Pak Tong Chai, Khorat Plateau, Thailand; Jul 1965	Strain used in DFA studies by Shirai et al.
Buie	Human; New Guinea; 1943	...
Seerangee	Human; Malaya; 1934	...
Kostival	Human; Dobadura, Papua New Guinea; 1943	...
B-15	Chigger pool; Slavyansky district, Primorski Krai, Russia; 1963	...
Irie	Human; Miyazaki, Japan; 1971	Low murine virulence
Hirano	Human; Miyazaki, Japan; 1980	Low murine virulence
Kuroki	Human; Miyazaki, Japan; 1981	...
Shimokoshi	Human; Niigata, Japan; 1980	Low murine virulence
Ikeda	Human; Niigata, Japan; 1979	...
Yamamoto	Human; Niigata, Japan; 1982	...
Kawasaki	Human; Miyazaki, Japan; 1981	...
Saitama	Rodent; Saitama Prefecture, Japan; 1997	...
Boryong (B119)	Human; Boryong, South Chungcheong Province, South Korea; 1990s	Predominant strain reported in Korea
Yonchon	Human; Yonchon County, northern South Korea; 1989	...
Litchfield	Human; Northern Territory, Australia; Aug 1996	...

NOTE. DFA, direct fluorescent antibody assay.

ในปัจจุบันวิธีการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการวินิจฉัยโรคสคริปต์ทัยฟัส และยังใช้ในการประเมินผลการรักษาอีกด้วย วิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อ และสามารถตรวจแยกสายพันธุ์ต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น [1] ซึ่งจะขอกล่าวถึงรายละเอียดของแต่ละวิธีโดยสังเขป ดังนี้

1. การตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Cell culture)

จะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือดหรือแผลเสศคาร์ของผู้ป่วย โดยเชื้อจะย้อมติดสี Giemsa stain ในปัจจุบันไม่ค่อยได้รับความนิยมเนื่องจาก จะต้องเพาะเลี้ยงเชื้อในเซลล์ เช่น HeLa, Vero, L929 เป็นต้น หรือในสัตว์ทดลองโดยฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal) ซึ่งทำได้ยาก ใช้เวลานาน ผู้ที่ทำการเพาะเลี้ยงมีความเสี่ยงในการติดเชื้อ และต้องมีห้องแลปเฉพาะ (Biosafety-level 3 laboratory) [1,3]

2. การตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางเซรั่มวิทยา (Serological method)

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยเพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *O. Tsutsugamushi* เป็นหลัก เนื่องจากสามารถทำได้ง่าย แต่การแปลผลต้องรอเวลาการเพิ่มขึ้นของ

ระดับแอนติบอดีไคเตอร์ (Antibody titer) ซึ่งส่วนใหญ่ต้องใช้เวลาหลังจากตรวจพบว่ามีอาการป่วย ระดับแอนติบอดีที่เริ่มตรวจวัดได้จะพบในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของอาการป่วย ผลบวกของแอนติบอดีไคเตอร์จึงมักตรวจพบหลังอาการป่วยรุนแรงในระยะแรกหายไปแล้ว และในกรณีผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาตั้งแต่เนิ่นๆ อาจพบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ล่าช้ากว่าหรือไม่พบการตอบสนองก็ได้ ทั้งยังไม่ใช่วิธีที่ทำการตรวจหาเชื้อโดยตรง แต่เป็นการตรวจทางอ้อมหาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังจากติดเชื้อ และจากการที่โรคสครับทัยฟัสเป็นโรคที่ระบาดเฉพาะพื้นที่ ทำให้ระดับแอนติบอดีไคเตอร์พื้นหลังในประชากรมีระดับสูงอยู่แล้ว จึงอาจเป็นข้อจำกัดในการนำวิธีทางเซรั่มวิทยามาตรวจวินิจฉัย [5,10,13,14] ซึ่งอาจต้องใช้ในการตรวจด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลมาใช้แทนในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการกลับมาเป็นซ้ำ และยังช่วยจำแนกในกรณีที่ผลทางเซรั่มวิทยาไม่ชัดเจนได้ [14,15] วิธีการวินิจฉัยทางเซรั่มวิทยาที่ใช้ ได้แก่

2.1 Weil-Felix : ใช้เชื้อ *Proteus mirabilis* สายพันธุ์ OX-K เป็นแอนติเจน ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามได้กับเชื้อ *O. tsutsugamushi* ได้ ทำให้เกิดปฏิกิริยา Agglutination สามารถตรวจพบแอนติบอดีในสัปดาห์ที่ 2 ประมาณร้อยละ 50 ของผู้ป่วย วิธีนี้มีความไวร้อยละ 33 และความจำเพาะร้อยละ 97 เมื่อเทียบกับวิธี IFA [10,11] และยังมีโอกาสเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโรคฉี่หนู [7,22] ได้อีกด้วย ในปัจจุบันจึงเป็นวิธีที่ไม่นิยม วิธีนี้จะแปลผลเป็นบวก (มีการติดเชื้อ) เมื่อมีค่าไคเตอร์เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 4 เท่า (ไคเตอร์เริ่มต้นมีค่าอย่างน้อย 1: 50) หรือมีค่าไคเตอร์ 1: 320 หรือมากกว่าในการตรวจเพียงครั้งเดียว [3,22]

2.2 Direct immunofluorescence assay (DFA) : ทำโดยใช้แอนบอดีจำเพาะต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* สายพันธุ์ต่างๆ มาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง นำไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของผู้ป่วย แล้วอ่านผลการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง ผู้ปฏิบัติงานต้องได้รับการฝึกฝนเพื่อให้สามารถแปลผลได้ถูกต้อง วิธีนี้มีความไวมากกว่า Weil-Felix แต่น้อยกว่า IFA [1]

2.3 Indirect immunofluorescence assay (IFA) : เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบัน จะใช้แอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *O. Tsutsugamushi* สายพันธุ์ที่พบบ่อยในประเทศไทย ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่อยู่ในเซรั่มที่เจาะจางในอัตราส่วนต่างๆ แล้วอ่านผลการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง อย่างไรก็ตามเกณฑ์ในการตัดสินผลบวกในแต่ละพื้นที่ระบาดอาจกำหนดไม่เท่ากัน [14] ทำให้มีความไวและความจำเพาะแตกต่างกันไป วิธีนี้จำเป็นต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่ได้รับการฝึกฝนเพื่อให้สามารถแปลผลได้

ถูกต้องเช่นเดียวกับ DFA [3,13] จะแปลผลเป็นบวกเมื่อผลการตรวจมีค่าไตเตอร์เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 4 เท่า (ระยะเวลาห่างกัน 3-7 วัน) หรือมีค่าไตเตอร์ 1:400 หรือมากกว่าเพียงครั้งเดียว [3] วิธีนี้มีความไวมากกว่า DFA มีค่าประมาณร้อยละ 85-91 และความจำเพาะร้อยละ 96-98 เมื่อเทียบกับวิธี IIP [24] ในปัจจุบันได้มีการผลิตชุดทดสอบตรวจวินิจฉัยโรคโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ออกจำหน่ายแล้ว สามารถให้ผลวินิจฉัยภายใน 1 ชั่วโมง [25]

2.4 Indirect immunoperoxidase assay (IIP) : หลักการทดสอบและแอนติเจนที่ใช้ เหมือนกับการทดสอบ IFA แต่ใช้เอนไซม์ Peroxidase แทน ทำให้สามารถอ่านผลการทดสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา การแปลผลใช้หลักการเหมือน IFA โดยหากใช้ค่าไตเตอร์ตัดสินที่ 1:400 จะมีความไวและความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 91 และ 100 เมื่อเทียบกับวิธี IFA [3,26]

2.5 การตรวจหาแอนติบอดีต่อการติดเชื้อในเซรัมโดยวิธีอื่นๆ ได้แก่

- Passive hemagglutination assay : ใช้ Recombinant 56-kDa immunodominant protein จากเชื้อ *O. tsutsugamushi* ซึ่ง 56-kDa protein จะเป็นส่วนของโปรตีนที่อยู่ใน Outer membrane มีคุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี จึงนำมาใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบหาทั้ง IgG และ IgM หากไตเตอร์มีค่าตั้งแต่ 1:80 ขึ้นไปจะแปลผลเป็นบวก วิธีนี้มีความจำเพาะร้อยละ 98.9 เมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธี IFA [13]
- Latex agglutination : ทำโดยนำเม็ด Latex bead มาติดด้วยแอนติเจนของเชื้อ 3 สายพันธุ์รวมกันได้แก่ Karp, Kato และ Gilliam หากในเซรัมตัวอย่างมีแอนติบอดีของเชื้อ เม็ด latex จะเกาะกลุ่มกัน เป็นวิธีที่ใช้ตรวจวินิจฉัยได้ง่ายและรวดเร็ว แปลผลเป็นบวกเมื่อค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่า 1:16 มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 89 และ 98 ตามลำดับเมื่อเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี IFA [11]
- Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) : วิธีตรวจทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีมาตรฐานในการทดสอบ เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบส่วนใหญ่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคทั่วไป มีงานวิจัยมากมายที่นำหลักการของ ELISA มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคสรีบภัยพิส เช่น การพัฒนาชุดตรวจโดยทำเป็น Dipstick dot-blot immunoassay ในชื่อการค้า “Dip-S-

Ticks™” (Integrated Diagnostics, Inc.) ซึ่งจะทำการตรึงแอนติเจนไว้บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) เมื่อหยดเซรัมที่ต้องการทดสอบลงไป แล้วเติมแอนติบอดีที่ถูกตรึงด้วยเอนไซม์และ Chromogenic substrate ทำให้เกิดเป็นสีที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า ให้ผลตรวจวัดภายใน 1 ชั่วโมง มีความไวร้อยละ 90-94 และความจำเพาะร้อยละ 83-99 ข้อดี คือ ใช้เครื่องมือน้อย แต่ข้อเสีย คือ ราคาค่อนข้างสูง (ต้นทุนประมาณ 5 เหรียญสหรัฐฯ/ ชุด) [26,27] จึงไม่ค่อยมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางเท่าใดนัก นอกจากนี้ในปี 2005 G. Watt และคณะได้ทดสอบชุดตรวจ Multi-test strip dot-blot immunoassay (Multi-Test Dip-S-Ticks™; Integrated Diagnostics, Inc.) ที่ใช้ตรวจหาเชื้อกลุ่มโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ ได้แก่ Scrub typhus, Murine typhus, Leptospirosis, Dengue fever และ Typhi fever พบว่าให้ผลบวกต่อหลายโรคต่อ 1 ตัวอย่าง (ประมาณร้อยละ 94 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด) ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้จำแนกโรคได้ ซึ่งอาจต้องทำการพัฒนาต่อโดยใช้การตรวจจับเป้าหมายทางพันธุกรรมแทน [28]

- Immunochromatographic test : เป็นวิธีการตรวจที่ทำได้ง่ายและได้ผลรวดเร็วภายใน 20 นาที เป็นการตรวจหาทั้ง IgG, IgM และ IgA ความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยโรคคิดเป็นร้อยละ 99 และ 96 ตามลำดับ ในปัจจุบันมีการผลิตเพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์แล้ว [29]

ตารางที่ 3 แสดงตารางสรุปค่าความไว, ความจำเพาะ และเกณฑ์ตัดสินผลของวิธีตรวจทางเซรั่ม
วิทยาต่างๆ

วิธีตรวจทางเซรั่มวิทยา	ความไว	ความจำเพาะ	เกณฑ์ตัดสินผล
Weil-Felix*	33	97	ไตเตอร์เพิ่ม 4 เท่า หรือ $\geq 1:320$
IFA**	85-91	96-98	ไตเตอร์เพิ่ม 4 เท่า หรือ $\geq 1:400$
IIP*	91	100	$\geq 1:400$
Passive hemagglutination assay*	-	99	$\geq 1:80$
Latex agglutination*	89	98	$\geq 1:16$
ELISA "Dip-S-Ticks" *	90-94	83-99	ปรากฏ ≥ 1 จุด
Immunochromatographic test	99	96	ปรากฏทั้ง test และ control line

หมายเหตุ * เป็นค่าที่เปรียบเทียบกับวิธี IFA, ** เป็นค่าที่เปรียบเทียบกับวิธี IIP

3. การตรวจด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล (Molecular biology method)

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อโดยอาศัยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) สามารถให้ผลวินิจฉัยได้รวดเร็ว และใช้ตรวจวินิจฉัยโรคได้ตั้งแต่ระยะต้นๆ หลังการติดเชื้อ มีความจำเพาะและแม่นยำมากกว่าวิธีทางเซรั่มวิทยา โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อที่สามารถตรวจพบแอนติบอดีพื้นหลังในเลือดได้สูงอยู่แล้ว ทำให้การวินิจฉัยด้วยวิธีทางเซรั่มวิทยาทำได้ยาก อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่ค่อยได้รับความนิยม เนื่องจากต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง และผู้ที่มีความชำนาญ สิ่งส่งตรวจที่ใช้ใน เช่น เลือด ผิวน้ำมูก แผลเย็บแผล หรือต่อมน้ำเหลือง [14] ในปัจจุบันมีการศึกษาของแอนติเจนขนาด 56 kDa ค่อนข้างมาก [5,30,31] เนื่องจากพบได้มากบนผนังเซลล์ และเป็นบริเวณที่มีส่วนที่มีการแปรผัน (Variation) ของลำดับเบสสูง จึงมักใช้ในการศึกษาและจำแนกสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาแอนติเจนขนาดอื่นๆ อีก เช่น 110 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 47 kDa และ 22-25 kDa [1] รวมทั้ง 16sRNA ซึ่งนำมาใช้ในการแยกในการแยกเชื้อ *O. tsutsugamushi* ออกจาก genus *Rickettsia* [32] อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาด้านอณูชีวโมเลกุลยังคงมีอยู่จำกัด โดยส่วนมากจะมีข้อมูลลำดับเบสของแอนติเจน

ขนาด 60 kDa [4,33,34,35], 56 kDa [5,30,31], 47 kDa [10,15,36] เท่านั้น ส่วนแอนติเจนขนาด 110-kDa, 70-kDa และ 22-25-kDa [37] ในปัจจุบันยังคงมีข้อมูลไม่มากนัก

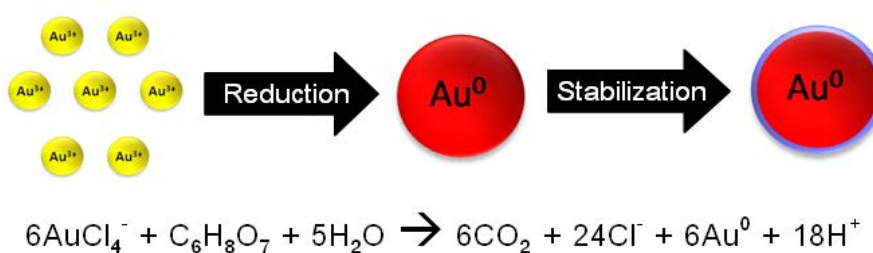
นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology) คือ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการศึกษา การจัดการ การสร้าง การวิเคราะห์ และประยุกต์ใช้วัสดุที่มีขนาดเล็ก ในระดับนาโนเมตร (ประมาณ 1-100 นาโนเมตร) ซึ่งเทียบเท่ากับระดับอะตอมหรือโมเลกุล ซึ่งจะมีคุณสมบัติพิเศษทั้งทางด้านฟิสิกส์ เคมี หรือชีวภาพที่เฉพาะตัวและแตกต่างจากสารเดิมที่มีขนาดใหญ่ รวมถึงการออกแบบหรือการประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อใช้สร้างหรือวิเคราะห์วัสดุในระดับที่เล็กมากๆ เช่น ท่อนาโน เส้นใยนาโน แผ่นฟิล์มนาโน และอนุภาคนาโน โดยส่วนมากนิยมใช้อนุภาคนาโนในการวิจัยมากที่สุด ในปัจจุบันมีการนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในหลากหลายสาขา เช่น ด้านอุตสาหกรรม เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์ เทคโนโลยีชีวภาพ เป็นต้น รวมทั้งทางการแพทย์ (Nanomedicine) ซึ่งจะนำมาประยุกต์ใช้ในการนำส่งยา/ยีน/โปรตีนเพื่อบำบัดรักษาโรค การตรวจวินิจฉัย และภาพชีวภาพ (Bioimaging) เป็นต้น [38,39,40]

ตารางที่ 4 แสดงวัสดุนาโน (Nanomaterial) ที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ [40]

Nanoparticle	Example	Medical application	References
Metal nanoparticles	Quantum dots Gold nanoparticles Gold nanorods Gold nanoshells Gold nanocages	Diagnostics Biosensor Molecular imaging Drug delivery	Chen et al 2005; Loo et al 2005; Yeh et al 2005; Huang et al 2006; Baron et al 2007; Maysinger 2007; Oyelere et al 2007; Skrabalak et al 2007; Villalonga et al 2007; Cho et al 2008
Nanotubes and nanowires	Carbon-nanotubes	Biomolecular sensing Delivery of vaccines or proteins	Baron et al 2007; Maysinger 2007; Cho et al 2008
Dendrimers	Poly(amido) amine PAMAMs	Drug carriers imaging agents Gene delivery	Rawat et al 2006; Maysinger 2007; Villalonga et al 2007; Cho et al 2008
Liposomes	(PEG)ylated immunoliposomes	Drug delivery Gene encoding	Rawat et al 2006; Villalonga et al 2007; Cho et al 2008
Polymeric micelles	[PEG-PAsp (DOX)] Doxorubicin conjugated to poly(ethylene glycol)-poly (α , β -aspartic acid)	Drug delivery of water-insoluble drugs	Sahoo and Labhasetwar 2003; Cho et al 2008
Ceramic nanoparticles	Silica-based nanoparticle entrapping photosensitizing anticancer drug, 2-devinyl-2-(1-hexyloxyethyl) pyropheophorbide	Drug delivery	Sahoo and Labhasetwar 2003
Polymeric nanoparticles	PLGA (Poly(D, L-lactic-co-glycolic acid)) PLA-PGA (Poly-L-glutamic acid)	Drug delivery Protein delivery Gene expression vector	Rawat et al 2006; Sahoo et al 2007; Villalonga et al 2007; Cho et al 2008
Polysaccharide nanoparticles	Cellulose nanocrystals	Targeted delivery Bioimaging	Dong and Roman 2007; Villalonga et al 2007
Magnetic nanoparticles	Superparamagnetic iron oxide	Magnetic Resonance Imaging contrast agents	Baron et al 2007; Lu et al 2007
Bionanoparticles (BNPs) – Protein-based nanosystems	Ferritin Viruses and virus-like particles Heat shock protein cages	Gene delivery Bioimaging Drug delivery Vaccine development	Lee and Wang 2006

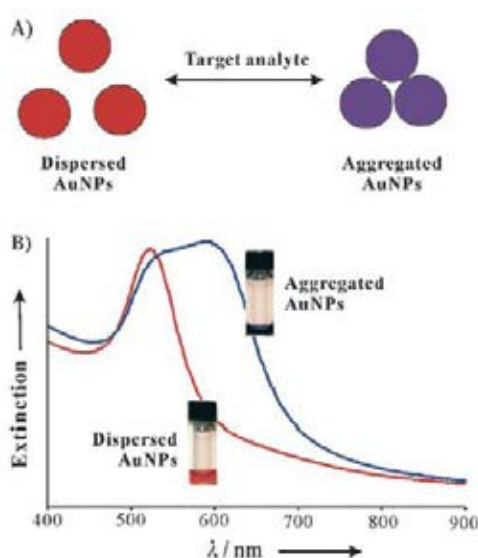
ในการวิจัยครั้งนี้จะนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles; AuNPs) มาใช้ในการศึกษา เนื่องจากการสังเคราะห์ AuNPs สามารถทำได้โดยง่าย ด้วยการนำสารละลายของ Hydrogen tetrachloroauric (III) acid (HAuCl₄) ที่มีทองคำประจุ 3⁺ (Au³⁺) ทำปฏิกิริยากับตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) ได้ AuNPs ที่มีทองคำประจุเป็น 0 (Au⁰) ซึ่งเป็นรูปที่ไม่เสถียร จึงต้องเติมสารช่วยให้เสถียร (Stabilizer) โดยสารนี้จะล้อมรอบบนอนุภาค ป้องกันการรวมตัวหรือเกาะตัวกันจนตกตะกอน ทำให้ AuNPs นั้นสามารถคงขนาดและรูปร่างอยู่ในระดับนาโนเมตรได้ สารที่นิยมใช้เป็นตัวรีดิวซ์และช่วยทำให้อนุภาคทองคำเกิดความเสถียร ได้แก่ Sodium citrate, Tannic acid หรือ Sodium borohydride [41] ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นทั้งตัวรีดิวซ์และทำให้ AuNPs มีความเสถียรในคราวเดียวกัน ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดงการสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย HAuCl₄ และ Sodium citrate ด้วยปฏิกิริยา Reduction [42]

นอกจากนี้ AuNPs ยังมีคุณสมบัติเชิงแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว เมื่ออยู่ในน้ำหรือบนกระจกจะเห็นเป็นสีแดง ปฏิกิริยาการนี้ดังกล่าวนี้เรียกว่า “เซอร์เพลส พลาสมอน เรโซแนนซ์ (Surface plasmon resonance; SPR)” ซึ่งเกิดจากการสั่นของอิเล็กตรอนอิสระที่อยู่ระหว่างผิว AuNPs กับสารไดอิเล็กทริกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสนามแม่เหล็กไฟฟ้าและเมื่อมีแสงที่มีความถี่เท่าๆกับความถี่ในการสั่นของอิเล็กตรอนมาตกกระทบ จะทำให้เกิดการสั่นพ้องและเกิดการดูดกลืนแสงขึ้น AuNPs สามารถดูดกลืนแสงสีเขียวที่มีความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร และสะท้อนแสงสีแดงที่มีความยาวคลื่นประมาณ 700 นาโนเมตรออกมา แต่หาก AuNPs มีขนาดใหญ่ขึ้นจะทำให้แสงตกกระทบได้ไม่สม่ำเสมอทั้งอนุภาค เกิดการดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวสูงขึ้น ทำให้สีเปลี่ยนจากแดงเป็นสีม่วง-น้ำเงิน (Red-shift) และกราฟการดูดกลืนคลื่นแสงจะมีความกว้างมากขึ้นดังแสดงในภาพที่ 7 โดยปกติจะสามารถสังเกตเห็นปรากฏการณ์นี้ได้เมื่อ AuNPs มีการเกาะกลุ่มกัน จึงมีการนำคุณสมบัติการเปลี่ยนสีนี้มาใช้ในการตรวจจับสารเป้าหมาย AuNPs จะทำ

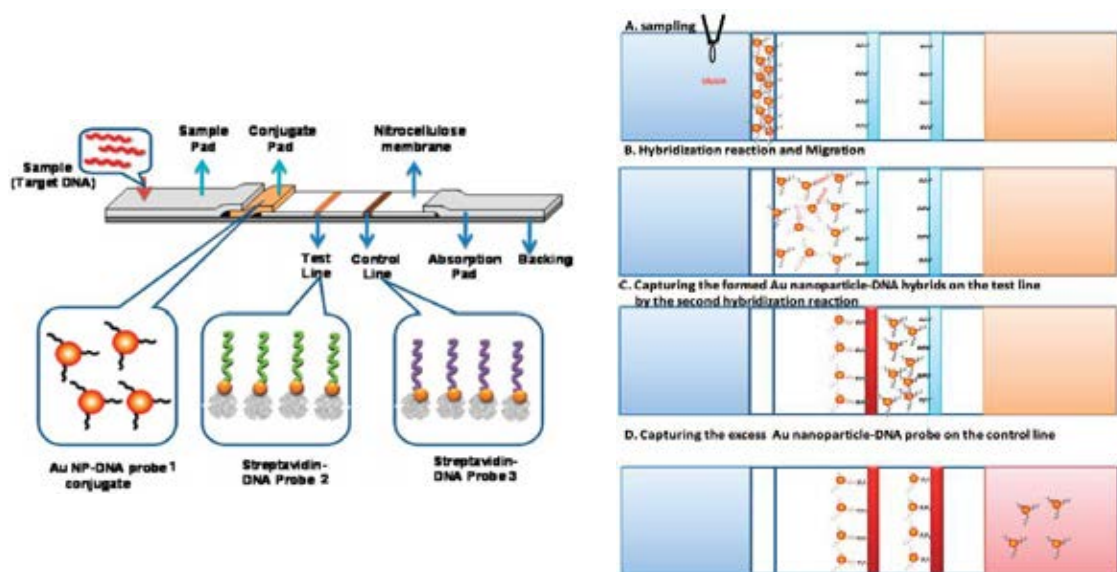
หน้าที่เป็นตัวรายงานผล (Reporter) โดยสารเป้าหมายจะเป็นตัวป้องกันหรือเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของ AuNPs สีที่เปลี่ยนแปลงไป สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงไม่ต้องอาศัยเครื่องมือมาช่วยในการแปลผล [43] นอกจากนี้จากการศึกษาคุณสมบัติของ AuNPs ที่ถูกตรึงด้วย Thiolated probe พบว่าทำให้ AuNPs มีความคงตัวมากกว่า AuNPs ปกติ เนื่องจากช่วยป้องกันไม่ให้ AuNPs เข้าใกล้และมาเกาะกลุ่มกัน ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่จำเป็นในขั้นตอน Hybridization ที่จะต้องใช้เกลือในการกระบวนการ [44] โดยคุณสมบัติของ AuNPs ที่ถูกตรึงด้วยโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวตรวจจับนี้ จะมีความคงตัวและไม่เกิดการเกาะกลุ่มกันทั้งในรูปคอลลอยด์ และรูปแห้ง (Dry form) และสีของ AuNPs จะไม่จางลงเมื่อถูกอุณหภูมอยุ่บนแผ่นเมมเบรนอีกด้วย [45] ดังนั้นจึงได้มีการนำ AuNPs มาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจคัดกรองแบบแลทเทอรัลโฟลว์ดังในการศึกษาครั้งนี้



ภาพที่ 7 แสดงสีของคอลลอยด์ AuNPs ที่เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงินเมื่อ AuNPs เกิดการเกาะกลุ่มกัน (รูป A) และกราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ของ AuNPs ที่เปลี่ยนแปลงไป (รูป B) [43]

หลักการของชุดตรวจคัดกรองแบบแลทเทอรัลโฟลว์ จะอาศัยการเกิด Sandwich hybridization ระหว่าง DNA probe ที่ตรึงบน AuNPs, DNA เป้าหมาย และ DNA probe ที่อยู่บนเมมเบรน ซึ่ง DNA probe ที่ใช้มี 3 ชนิด ได้แก่ (1) DNA probe ที่ตรึงบน AuNPs อยู่ที่ Conjugate pad (2) DNA probe สำหรับเส้นตรวจสอบ (Test line) และ (3) DNA probe สำหรับเส้นควบคุม (Control line) โดย Probe 2 ชนิดหลังจะถูกตรึงอยู่บนเมมเบรน ดังตัวอย่างที่แสดงในภาพที่ 8 เมื่อ

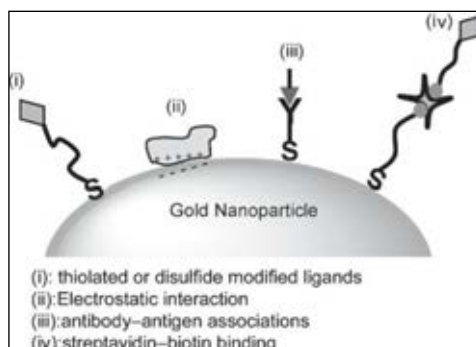
หยด DNA ตัวอย่างที่มีลำดับเบสเป้าหมายลงบน Sample pad สารตัวอย่างจะไหลมาที่ Conjugate pad และเกิดการ Hybridization กับ DNA probe ที่ตรึงบน AuNPs หลังจากนั้นจะไหลผ่านต่อไปยัง Test line ซึ่งมี DNA probe อีกชุดที่จำเพาะกับอีกส่วนของลำดับเบสบน DNA เป้าหมายและเกิดการ Hybridization ขึ้น AuNPs จะเกิดการรวมกลุ่มกันที่บริเวณเส้น Test line บนเมมเบรนทำให้เกิดเป็นแถบเส้นสีแดงซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า AuNPs ที่ถูกตรึงด้วย DNA probe ส่วนเกินจะไหลผ่านต่อไปยัง Control line ซึ่งมีลำดับเบสที่เข้าคู่กับ DNA probe บน AuNPs และเกิดการ Hybridization ทำให้เกิดแถบเส้นสีแดงที่สองขึ้น ดังนั้นหากในตัวอย่างที่มี DNA เป้าหมาย จะเกิดแถบเส้นสีแดง 2 เส้น (แปลผลเป็นบวก) แต่หากไม่มี DNA เป้าหมาย จะเกิดแถบเส้นสีแดงเพียงเส้นเดียวที่ Control line (แปลผลเป็นลบ) โดย Control line จะช่วยทำให้ทราบว่าแถบตรวจคัดกรองยังมีประสิทธิภาพในการทำงานดีอยู่



ภาพที่ 8 แสดงส่วนประกอบต่างๆ (รูปซ้าย) และหลักการทำงาน (รูปขวา) ของ Nucleic acid lateral flow strip test [46]

การนำ AuNPs มาประยุกต์ใช้ในการตรวจจับสารเป้าหมายสามารถทำได้โดยนำโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับสารเป้าหมายมาตรึงบนผิว AuNPs แล้วนำมาใช้เป็นตัวติดตามหรือตัวตรวจจับสารชีวโมเลกุลเป้าหมายชนิดต่างๆ ได้ เช่น DNA-DNA, Aptamer-Target, Antigen-Antibody, Streptavidin-Biotin, Lectin-Sugar, Metal-Ligand หรือใช้ชีวโมเลกุลที่มีหมู่ Thiol ซึ่งสามารถติด

บนผิว AuNPs ด้วยพันธะเคมี เป็นต้น [43] ด้วยเหตุนี้จึงสามารถนำ AuNPs มาสร้างอุปกรณ์ตรวจจับสารทางชีวภาพที่มีความจำเพาะได้อย่างหลากหลาย [47]



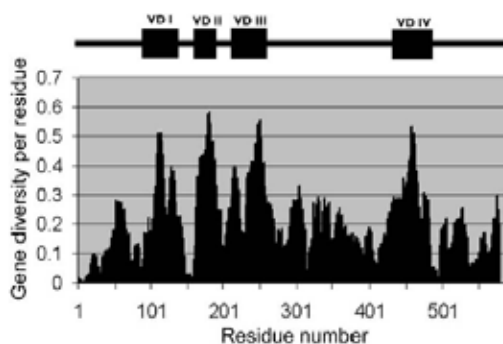
ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงการตรึงสารชีวโมเลกุลต่างๆ บนพื้นผิวของ AuNPs [39]

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้จะใช้การตรวจจับหาโปรตีน 47 kDa, 56 kDa และ 60 kDa antigen ร่วมกันเพื่อเพิ่มเป้าหมายในการตรวจจับเชื้อ *O. tsutsugamushi* โดย 47kDa antigen เป็นแอนติเจนโปรตีนที่จำเพาะกับ *Orientia* genus อยู่ที่ Outer membrane พบว่ามีความสามารถในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ Helper T cell ในหนูได้ [48] มีลำดับเบสความยาวประมาณ 1400 คู่เบส และมีลำดับเบสคล้ายคลึงกับยีน High temperature requirement A (HtrA) ของ Stress response protein ที่มีคุณสมบัติเป็นทั้ง Chaperone และ Serine protease จากคุณสมบัติความเป็น Immunogenicity และยีนมีความเป็นอนุรักษ์ (Conservation) จึงเป็นส่วนที่น่าจะนำมาใช้วินิจฉัยโรคได้ อย่างไรก็ตามพบว่ายีน HtrA ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* มีความใกล้เคียงกับข้อมูลใน GenBank ของเชื้อ *R. typhi* (D78346) แต่จากงานวิจัยของ J. Jiang และคณะในปี 2004 ได้ทำการพัฒนาวิธีตรวจวัดเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วย Real-time polymerase chain reaction และใช้ Fluorescent probe เป็นตัวตรวจจับลำดับเบสของ 47 kDa antigen ผลพบว่ามี ความจำเพาะกับเชื้อ *Orientia* spp. (จำนวน 26 ตัวอย่าง) และไม่แสดงผลบวกกับเชื้อชนิดอื่นๆ เช่น *Rickettsia* spp. (จำนวน 17 ตัวอย่าง) และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (จำนวน 18 ตัวอย่าง) และไม่พบการเพิ่มจำนวนของ PCR product ของ 47 kDa *R. typhi* เมื่อทดลองด้วย Real-time PCR และ Conventional PCR [10] และในปี 2005 T. Singhsilarak และคณะได้นำ Real-time PCR นี้ มาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคสครับไทฟัสจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยในประเทศไทย พบว่าไม่แสดงผล

เป็นบวจากตัวอย่างเลือดจากผู้มีสุขภาพดี ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก และผู้ป่วยโรคฉี่หนู [15] และในปี 2008 D.H. Paris และคณะได้นำ Real-time multiplex PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน 47 kDa HtrA, Citrate synthase (glfA) และ Outer membrane protein B (ompB) มาใช้ตรวจแยกโรคสครับทัยฟัส, โรคทัยฟอยด์ (Typhus group) และโรค Spotted fever group ตามลำดับ ผลพบยีนดังกล่าวมีความจำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิดดี [36]

56-kDa type-specific antigen (TSA) เป็นแอนติเจนที่มีการแสดงออกบนผนังเซลล์ของเชื้อปริมาณมากที่สุด (ประมาณร้อยละ 20 ของโปรตีนทั้งหมด) [49] เป็นแอนติเจนที่มีความจำเพาะกับ *O. tsutsugamushi* และไม่พบการแสดงออกใน *Rickettsiaceae* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำแอนติบอดี [1,50] ยีนของ 56 kDa TSA มีความยาวเบสประมาณ 1600 คู่เบส [30] มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสประมาณร้อยละ 80 [4] และจัดเป็นบริเวณที่มีการแปรผันของลำดับเบสสูงแบ่งเป็น 4 บริเวณ ได้แก่ Variable domain (VD) I, VD II, VD III และ VD IV จึงมักใช้ยีนนี้ในการศึกษาและจำแนกสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อ [1] ในปี 2004 W. Saisongkroh และคณะได้ใช้เทคนิค Nested PCR วิจัยแยกโรคสครับทัยฟัส 10 สายพันธุ์ออกจากผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุได้ด้วย 56 kDa antigen [5]



ภาพที่ 10 แสดงความแปรผันทางพันธุกรรมในช่วงของยีน 56-kDa type-specific antigen [1]

60-kDa outer membrane antigen (หรือ Scrub typhus 58-kDa antigen (Sta 58)) เป็นแอนติเจนที่พบได้มากตั้งแต่ช่วงแรกของการติดเชื้อ และสามารถเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ ยีนมีความยาว 1600-1700 คู่เบส [51] โดยพบว่าลำดับของกรดอะมิโนที่ได้มีความใกล้เคียงกับโปรตีน *groEL* ซึ่งเป็น Heat shock protein (Hsp) 60 (มีความใกล้เคียงประมาณร้อยละ 49) ซึ่งจัดอยู่ใน Heat shock chaperonin system มีหน้าที่ช่วยในการม้วนพับโปรตีนให้อยู่ในรูปร่างที่เหมาะสม และเมื่อเทียบกับลำดับอะมิโนของเชื้ออื่นๆ ที่มีข้อมูลอยู่ พบว่า Sta58 มีความใกล้เคียงน้อยที่สุด จึงมีคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนที่แตกต่างจาก Hsp60 ของแบคทีเรียชนิด

อื่นๆ รวมถึง *Rickettsia* spp. ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับเบสของ Sta58 นี้มีความเป็นอนุรักษ์สูงในเมื่อเทียบภายใน genus *Orientia* จากงานวิจัยของ C.K. Stover และคณะในปี 1990 พบว่าแอนติบอดีต่อเชื้ออื่นๆ ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ Sta58 ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* แต่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อชนิดอื่นๆ ได้ และ anti-*O. tsutsugamushi* ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้ออื่นๆ เช่นกัน ยกเว้น *C. burnetti* ที่เกิดเล็กน้อย จึงอาจกล่าวได้ว่า Sta58 มีการใช้ฟีโพบร่วมกับ Hsp60 family น้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ [51] ในปี 2009 D.H. Paris และคณะได้นำเชื้อจากผู้ป่วยในประเทศไทยและลาวจำนวน 23 ตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับ *groEL* ของเชื้ออ้างอิงจาก GenBank จำนวน 16 ลำดับเบส (แบ่งเป็น Scrub typhus group (STG), Typhus group (TG) และ Spotted fever group (SFG) จำนวน 7, 2 และ 7 ลำดับเบสตามลำดับ) ด้วย Real-time PCR พบว่ายีน *groEL* มีความเป็นอนุรักษ์สูงเมื่อเทียบภายในกลุ่ม STG (ร้อยละ 98.8) และมีค่าร้อยละ 67.5 และ 65.6 เมื่อเทียบกับ TG และ SFG ตามลำดับ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่ายีน *groEL* เป็นส่วนที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคสครับทัยฟัสได้ [4]

ตารางที่ 5 ค่าร้อยละความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของ *groEL* ใน Scrub typhus group (STG) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อกลุ่มเดียวกัน (table 2) และข้ามกลุ่มกับ Typhus group (TG) และ Spotted fever group (SFG) (table 3) [4]

TABLE 2. Mean percentage intragroup identity of all currently available *groEL* gene sequences within the scrub typhus group (STG), typhus group (TG) and spotted fever group (SFG)

Antigenic group	Percentage intragroup identity (range)	
	Nucleotides (range)	Amino acids (range)
STG, Thai	99.5 (98.9–100.0)	98.6 (96.7–100.0)
STG, non-Thai*	96.3 (95.0–100.0)	89.9 (85.6–100.0)
STG, all available groups	98.8 (95.0–100.0)	96.7 (85.6–100.0)
TG	96.7	91.5
SFG (including <i>Rickettsia</i> spp.)	92.8 (86.5–99.8)	81.1 (66.7–99.3)
TG and SFG	92.5 (86.3–99.8)	82.3 (65.4–99.3)
Overall STG, TG and SFG	91.8 (64.0–100.0)	82.2 (26.8–100.0)

*Reported by Lee et al. [13].

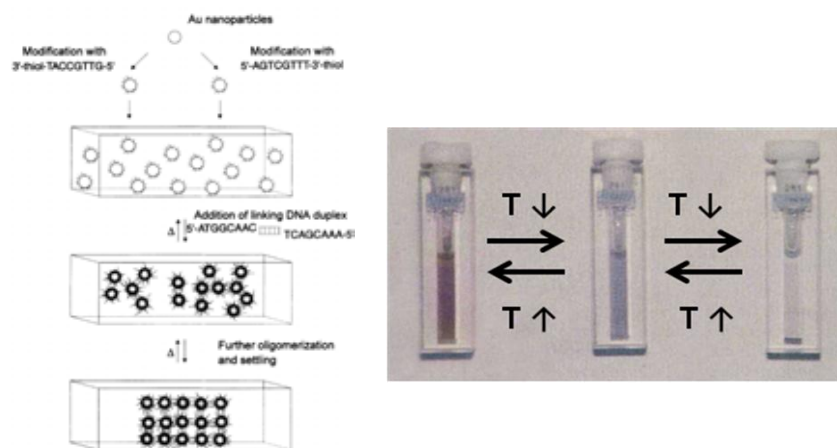
TABLE 3. Mean intergroup percentage identities of *groEL* nucleotide and GroEL amino acid sequences for scrub typhus group (STG), typhus group (TG) and spotted fever group (SFG) isolates

Antigenic group	Identity (%)					
	Isolates (n = 39)	STG, Thai	STG, non-Thai	STG, all isolates	TG	SFG
STG, Thai	23	–	96.7	98.8	67.5	65.6
STG, non-Thai*	7	90.8	–	96.3	67.2	66.0
STG, all isolates	30	94.5	90.8	–	67.5	66.0
TG	2	28.6	29.3	28.7	–	91.4
SFG	7	29.2	29.9	29.3	77.0	–
TG and SFG	9	29.1	29.8	29.2	81.8	–

The values depicted in the upper right section above the dividing diagonal represent nucleotide identities; those in the lower left section under the diagonal represent amino acid identities.
*Reported by Lee et al. [13].

ในปัจจุบันวัสดุนาโนที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย คือ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles; AuNPs) มีการนำ AuNPs มาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น การนำมาใช้เป็นตัวตรวจจับทางชีวภาพ โดยตรึงบนผิวอนุภาคด้วย Antibody หรือ DNA เพื่อใช้เป็นตัวตรวจหาสารชีวโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ การตรวจหา Antigen [17], DNA/RNA [18] หรือใช้เป็นตัวนำส่งยาหรือยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายเพื่อใช้ในการรักษาโรค [19] เป็นต้น

ในปี 1996 C.A. Mirkin และคณะได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ AuNPs ที่ถูกตรึงด้วย Thiolated probe พบว่าหากมี DNA เป้าหมายที่มีลำดับเบสจำเพาะกับ probe จะทำให้ AuNPs เกิดการรวมกลุ่มกัน เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสารละลายสีแดงเป็นสีม่วง ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้โดยการเพิ่มอุณหภูมิให้มีค่าสูงกว่าอุณหภูมิของการแตกตัว (Dissociation temperature; T_m) ของสาย DNA ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นคอลลอยด์สีแดงเช่นเดิม ดังแสดงในภาพที่ 11 นอกจากนี้ยังพบว่า การตรึงผิว AuNPs ด้วย Oligonucleotide จะช่วยให้ AuNPs มีความคงตัวมากกว่า AuNPs ปกติ เนื่องจากช่วยป้องกันไม่ให้ AuNPs เข้าใกล้และเกาะกลุ่มกันได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่จำเป็นในขั้นตอน Hybridization ที่ต้องใช้บัฟเฟอร์ที่มีเกลือในกระบวนการ หลังจากนั้นก็จะมีกลุ่มวิจัยอื่นๆ นำองค์ความรู้นี้มาประยุกต์ใช้ในงานตรวจวินิจฉัยทางชีวภาพอื่นๆ อีกมากมาย [44]



ภาพที่ 11 แสดงหลักการของ AuNPs ที่ถูกตรึงด้วย Thiolated-probe ในการตรวจจับ DNA เป้าหมาย (รูปซ้าย) และการเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (รูปขวา) [44]

ในปี 2007 D.P. Kalogianni และคณะได้พัฒนาชุดตรวจหาสาเหตุของการติดเชื้อที่เกิดหลังการศัลยกรรมตกแต่งข้อ (arthroplasty) เช่น เมื่อข้อเทียมหลวม โดยทำการสกัด DNA จากน้ำไขข้อ (synovial fluid) แล้วนำมาเพิ่มปริมาณ DNA ส่วนของ 23S rRNA โดยใช้ Universal primer และ PCR product ที่ได้จะถูกติดฉลากด้วย Biotin และนำมา Hybridize กับ DNA probe ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium* และ *Haemophilus influenzae* แล้วจึงนำมาทดสอบกับชุดตรวจคัดกรองที่มี AuNPs เป็นตัวรายงานผล เมื่อนำมา

ทดสอบกับน้ำไขข้อของผู้ป่วย 12 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณ DNA ต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ คือ 1.6 fmol ยกเว้น *S. epidermidis* ที่มีค่า 6.25 fmol และจำนวนเชื้ออย่างน้อยที่จะแสดงผลบวก คือ 10 เซลล์ อ่านผลได้ภายใน 15 นาที [52]

ในปี 2009 X. Mao และคณะ ได้คิดค้นชุดตรวจวินิจฉัยอย่างง่ายแบบ Lateral flow strip test โดยใช้ AuNPs ซึ่งถูกตรึงด้วย DNA probe และเอนไซม์ Horseradish peroxidase เพื่อเพิ่มความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นเมื่อเติมซับสเตรต สามารถใช้ตรวจจับ Human genomic DNA โดยไม่ต้องเพิ่มปริมาณ DNA ก่อน ปริมาณ genomic DNA ที่สามารถตรวจจับที่ความเข้มข้นน้อยที่สุด 2.5 µg/ml (1.25 fM) สังเกตผลได้ภายในเวลา 30 นาที [46] นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยยังได้ใช้ Aptamer ซึ่งเป็น artificial nucleic acid ligands มาใช้ในการตรวจจับโปรตีนที่สนใจแทน Thiolated-probe ซึ่ง Aptamer จะมีลักษณะเป็นสาย DNA หรือ RNA ที่สามารถเข้าจับกับไอออนโลหะ, สารอินทรีย์, เปปไทด์, โปรตีน และเซลล์ที่จำเพาะได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองตรวจจับ Thrombin พบว่าสามารถตรวจจับที่ความเข้มข้นน้อยที่สุด 2.5 nM และเมื่อนำมาตรวจจับ Thrombin จากพลาสมาพบว่าตรวจวัดได้ต่ำสุด 0.6 pmol โดยไม่แสดงผลบวกเมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชนิดอื่นๆ เช่น Human serum albumin, IgG, IgM และ Casein สามารถสังเกตผลได้ภายในเวลา 10 นาที อายุการใช้งานไม่ลดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในช่วงระยะเวลา 2 เดือน (RSD ร้อยละ 7) [53]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- Hot plate (IKA[®] C-MAG HS 7)
- Condenser column
- Cylinder (Nikko, Duran)
- Micropipette (Transferpette[®] S)
- Microtip (Axygen, Corning)
- Microtube (Axygen, Corning)
- Transmission electron microscope (TEM) (Hitachi Model H-7650)
- เครื่องวัดขนาดอนุภาคซีต้าและน้ำหนักรวม (Zetasizer ZS Malvern)
- UV-Vis spectrophotometer (Beckman coulter DU 800)
- Nanodrop (Thermo scientific 1000)
- NAP-5 Columns (GE Healthcare)
- 1000 ml Vacuum Filter/ Storage Bottle System, 0.22 μm Pore 62 cm^2 CN Membrane, Sterile #430186 (Corning[®])
- Vortex mixer (LioLab)
- Spin down (Tomos)
- Orbital shaker (Heidolph)
- Centrifuge tube (Corning)
- pH meter (*UltraBASIC*: Denver Instrument)
- Light microscope (Olympus)
- Glass fiber 8964 (Ahlstrom)
- Nitrocellulose membrane HF 18004 (Millipore)
- Cellulose absorbant 319 (Ahlstrom)
- Backing pad
- GS Gene Linker[™] UV chamber (Bio-Rad)
- DSLR camera (Canon 500D)

- กรรไกร คัดเตอร์ แผ่นรองตัด
- Thermocycle 2720 (Applied Biosystem)
- UV transluminator (Bio-Rad)

3.2 สารเคมี

- Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)
- Trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck)
- Milli Q water (Labconco Water Pro PS)
- Ultrapure water (Gibco)
- Hydrochloric acid (HCl) (Merck)
- Nitric acid (HNO_3) (J.T.Baker)
- Detection probe (Thiolated probe) (Sigma)
- Test and control line probe (BioDesign)
- Synthetic target (BioDesign)
- Sodium hydroxide (NaOH) (Merck)
- Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Sigma)
- Sodium phosphate (NaH_2PO_4) (Sigma)
- Sodium chloride (NaCl) (Sigma)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck)
- Potassium chloride (KCl)
- Potassium phosphate (KHPO_4) (Sigma)
- Tris-base (Sigma)
- Triton X-100 (Sigma)
- Boric acid (Sigma)
- Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) (Sigma)
- 20x saline-sodium citrate (SSC) buffer (Abbott Molecular Inc.)
- Medium 199 powder (Gibco™)
- Fetal bovine serum (HyClone)
- GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentus)
- PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma)
- HotStar *Taq* DNA polymerase (Qiagen)
- *Taq* DNA polymerase (Invitrogen)

- dNTP Mix, PCR grade 10 mM each (Qiagen)
- UltraPure™ agarose (Invitrogen)
- GeneRuler 25 bp Low range DNA Ladder #SM1191(Fermentus)
- GeneRuler 100 bp Low range DNA Ladder #SM1191(Fermentus)

3.3 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

ล้างเครื่องแก้วทุกชิ้นและ Magnetic bar ด้วย aqua regia ($\text{HCl} : \text{HNO}_3 = 3:1$) หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำ แล้วล้างน้ำสุดท้ายด้วย Milli Q water (MQW) ที่งไว้ให้แห้ง ปิดเตาสารละลาย 1% Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ปริมาณ 0.5 mL ลงใน flask ที่มี MQW ปริมาณ 24.5 mL นำ flask ประกอบเข้ากับ Condenser ต้มสารละลายบน Hot plate stirrer โดยใช้ Magnetic bar ช่วยกวนตลอดเวลา (เบอร์ 2) เมื่อสารละลายเดือด เติม 38.8 mM Trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ปริมาณ 0.94 mL อย่างรวดเร็ว สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำเงินเข้ม (deep blue) และจะเปลี่ยนเป็นสีแดง (wine red) ต้มต่ออีกประมาณ 15 นาที (สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดงในเวลาประมาณ 2 นาที) ปิด Condenser และ Hot plate แต่ยังคงเปิด Magnetic bar ไว้ให้ช่วยกวนตลอดเวลา ที่งไว้ให้จมนเย็นเท่ากับอุณหภูมิห้อง เก็บ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้ในภาชนะป้องกันแสงที่อุณหภูมิ 4°C



ภาพที่ 12 แสดงการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

- Transmission electron microscope (TEM) ที่ 100 kV : หาขนาดอนุภาค, ตรวจสอบรูปร่าง และดูการเกาะกลุ่มหรือการกระจายของ AuNPs
- UV-vis spectroscopy ที่ 520 nm : ตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสง
- Zetasizer : หาค่า Zeta potential เพื่อดูปริมาณประจุบนผิวอนุภาคทองคำ

3.4 การออกแบบ Probe

ทำการออกแบบ Probe ที่จำเพาะกับยีน 3 ลำดับเบส ได้แก่ 47 kDa, 56 kDa และ 60 kDa antigen โดย Probe ที่มีหมู่ Thiol (SH-) จะเรียกเป็น “Detection probe หรือ P#_DT” จะใช้สำหรับตรึงบนผิว AuNPs และ Probe ที่จะใช้เป็น Test line และ Control line บนเมมเบรนจะเรียกเป็น “Capture probe หรือ P#_TL และ P#_CL” ตามลำดับ

Probe สำหรับตรวจจับ 47-kDa antigen ออกแบบโดยอ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank และเอกสารอ้างอิงหมายเลข [10] จำนวน 5 สายพันธุ์ (6 ลำดับเบส) ได้แก่

ตารางที่ 6 แสดงรายละเอียดของลำดับเบสของ 47-kDa antigen ที่นำมาใช้ในการออกแบบ P47_DT, P47_CL และ P47_TL

Strain	Isolate (GenBank accession No.)
Karp	Kp47 (L31934)
Kato	Pkt5 (L11697)
Gilliam	Gm47 (L31933)
Boryong	Br47 (L31935), Boryong (NC_009488)
Ikeda	Ikeda (NC_010793)

ตารางที่ 7 แสดงรายละเอียดของ Detection probe (P47_DT) และ Capture probe (P47_CL และ P47_TL) ที่จำเพาะกับ 47-kDa antigen ที่ใช้ในการตรึงบนผิว AuNPs และ Nitrocellulose membrane ตามลำดับ (* Poly-(A)₁₀ spacer)

Probe name	Sequence (5'→3')	Length (bp)	T _m (°C)	% CG content
P47_DT	Thiol -(CH ₂) ₆ - AAAAA AAAAA GAT ATG GGT AAC GGC ATA GTA ACT G	10* + 25	56	44
P47_CL	CAG TTA CTA TGC CGT TAC CCA TAT C	25	56	44
P47_TL	TTC ATA TGG GTA GCT TTG GTG GAC	24	55.7	46

Probe สำหรับตรวจจับ 56-kDa antigen ออกแบบโดยอ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank และเอกสารอ้างอิงหมายเลข [30] จำนวน 7 สายพันธุ์ (23 ลำดับเบส) ได้แก่

ตารางที่ 8 แสดงรายละเอียดของลำดับเบสของ 56-kDa antigen ที่นำมาใช้ในการออกแบบ P56_DT, P56_CL และ P56_TL

Strain	Isolate (GenBank accession No.)
Karp	UT76 (EF213), UT150 (EF213086), UT167 (EF213080), UT169 (EF213092), UT316 (EF213082), FPW2031 (EF213098), UT332 (EF213083), UT418 (EF213090), Karp (M33004)
Kato	Kato (M63382), S0522327_KH (HQ718420), S0923259_KH (HQ718424), S0923262_KH (HQ718425), T1009163Lu_KH (HQ718438), T1027262_KH (HQ718442),
Gilliam	S0617100_KH (HQ718421)
TA678	TA678 (U19904)
TA716	TA716 (U19905)
TA763	UT302 (EF213095), T1125175_KH (HQ731680), 02QNg_VN (HQ718449), 45QN_VN (HQ718459)
Boryong	Boryong (AM494475)

ตารางที่ 9 แสดงรายละเอียดของ Detection probe (P56_DT) และ Capture probe (P56_CL และ P56_TL) ที่จำเพาะกับ 56-kDa antigen ที่ใช้ในการตรึงบนผิว AuNPs และ Nitrocellulose membrane ตามลำดับ (* Poly-(A)₁₀ spacer)

Probe name	Sequence (5'→3')	Length (bp)	T _m (°C)	% CG content
P56_DT	Thiol -(CH ₂) ₆ - AAAAA AAAAA TTG GTG CAG GGT TAG CTT ATA CTT	10* + 24	54	42
P56_CL	AAG TAT AAG CTA ACC CTG CAC CAA	24	54	42
P56_TL	GCA CTT GGT GTA GCA ATT AAT GCT G	25	56	44

Probe สำหรับตรวจจับ 60-kDa antigen ออกแบบโดยอ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank และเอกสารอ้างอิงหมายเลข [4] จำนวน 5 สายพันธุ์ (6 ลำดับเบส) ได้แก่

ตารางที่ 10 แสดงรายละเอียดของลำดับเบสของ 60-kDa antigen ที่นำมาใช้ในการออกแบบ P60_DT, P60_CL และ P60_TL

Strain	Isolate (GenBank accession No.)
Karp	Karp (M31887)
Boryong	Boryong (AM494475), Boryong (AY059015)
Ikeda	Ikeda (AP008981)
Hwasung	Hwasung (AY191589)
TA716-like	FPW1038 (EF551288)

ตารางที่ 11 แสดงรายละเอียดของ Detection probe (P60_DT) และ Capture probe (P60_CL และ P60_TL) ที่จำเพาะกับ 60-kDa antigen ที่ใช้ในการตรึงบนผิว AuNPs และ Nitrocellulose membrane ตามลำดับ (* Poly-(A)₁₀ spacer)

Probe name	Sequence (5'→3')	Length (bp)	T _m (°C)	% CG content
P60_DT	Thiol -(CH ₂) ₆ - AAAAA AAAAA AAG TTG TTA AAG GAA TGA GAT TTG ACC G	10* + 28	55.5	36
P60_CL	CGG TCA AAT CTC ATT CCT TTA ACA ACT T	28	55.5	36
P60_TL	GAA TCG TGA AAA GAT GAT TAC CGA ATT TG	29	55.9	34

3.5 การตรึง Detection probe บนผิวอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

- ล้างหลอดแก้วที่จะใช้ด้วย 12 M NaOH แช่ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างให้สะอาดด้วยน้ำ ล้างน้ำครั้งสุดท้ายด้วย Milli Q water (MQW) ทิ้งไว้ให้แห้ง
- เตรียม 0.2 M Dithiothreitol (DTT) ใน MQW (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
- เติม 0.2 M DTT ปริมาณ 40 μ l ลงใน 100 μ M Detection probe ปริมาณ 40 μ l เพื่อรีดิวส์หมู่ Disulfide ให้เป็นหมู่ Thiol อิสระ ห่อให้พ้นแสง วางทิ้งไว้บน Orbital shaker (120 rpm) นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- 15 นาที ก่อนครบ 1 ชั่วโมง ให้ล้าง NAP-5 column ด้วย MQW 3 เท่าของปริมาตร NAP-5 column (ใส่ MQW จนปริมาตร column รอจน MQW ลดลงเกือบถึงผิวหน้าเรซิน จึงเติม MQW ใหม่อีกครั้ง ทำ 3 รอบ)
- เมื่อ MQW เกือบถึงผิวหน้าเรซิน ให้เติม Probe จากข้อ 3 ลงใน NAP-5 column
- เมื่อ Probe ผ่าน column ลงมาเกือบถึงผิวหน้าเรซิน ให้เติม MQW 540 μ l ปล่อย Fraction ส่วนนี้ทิ้งไป
- เมื่อสารเกือบถึงผิวหน้าเรซิน ให้เติม MQW 740 μ l เก็บ Fraction ส่วนนี้มาผสมกับ AuNPs ในสัดส่วน Detection probe 0.5 nmol ต่อ 100 ppm AuNPs 200 μ l ห่อให้พ้นแสง วางทิ้งไว้บน Orbital shaker (120 rpm) นาน 16-20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- เติม 100 mM Phosphate buffer (pH 7.0) และ 10%w/v Sodium dodecyl sulfate (SDS) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 10 mM และ 0.1%w/v ตามลำดับ ห่อให้พ้นแสง วางทิ้งไว้บน Orbital shaker (120 rpm) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- เติม Salting buffer (10 mM phosphate buffer + 2.0 M NaCl (pH 7.0)) โดยแบ่งเติม Salting buffer ซ้ำๆ และเขย่าไปด้วย จำนวน 8 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 ชั่วโมง จนได้ NaCl ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4 M NaCl และหลังจากเติม salting buffer ครั้งที่ 1, 6, 7 และ 8 ให้นำหลอดไป Sonicate นาน 10 วินาที (เพื่อกำจัด Probe ที่เกาะด้วยแรง Electrostatic ที่เกิดระหว่างลำดับเบสกับผิว AuNPs ออก) ห่อให้พ้นแสง วางทิ้งไว้บน Orbital shaker (120 rpm) นาน 16-20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- ย้ายลง Eppendorf (แช่ทำความสะอาดด้วย 12M NaOH ดังขั้นตอนที่อธิบายในข้อ 1) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 30 นาที ที่ 4°C ดูดสารละลายด้านบนทิ้ง แล้วเติม Washing buffer (10 mM phosphate buffer + 0.1 M NaCl, pH 7.0) ปริมาตรเท่ากับ AuNPs ที่เติมลงไปข้อ 7 ล้างซ้ำเช่นเดิมอีก 2 รอบ

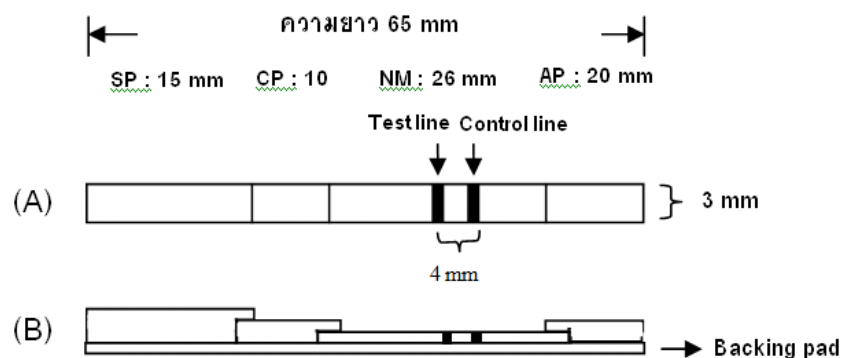
11. กระจาย Conjugate (AuNPs ที่ตรึงด้วย Thiolated-probe แล้ว) ที่ตกตะกอนให้กลับเป็นคอลลอยด์ด้วยสารละลาย Eluent buffer (20 mM Na_3PO_4 , 5% BSA, 0.25% Tween และ 10% sucrose) ปริมาตรเท่ากับ AuNPs ที่เติมลงไปในช่วง 7 เก็บรักษาในภาชนะป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ 4 °C
12. ตรวจสอบผลการตรึง DNA probe บน AuNPs ด้วย Zetasizer [46,54,55,56]

3.6 การตรึง Capture probe บน Nitrocellulose membrane เพื่อทำ Test line และ Control line

นำ Test line probe (P47_TL, P56_TL และ 60_TL) และ Control line probe (P47_CL, P56_CL และ 60_CL) มาละลายด้วย Ultrapure water ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 mM นำมาหยดลงบนส่วนของ Nitrocellulose membrane (ขนาด 3x26 mm) ปริมาณ 0.5 μ l/เส้น โดยให้ Control line มีระยะห่างจากขอบ Nitrocellulose membrane 6 mm และให้ Control line กับ Test line ห่างกัน 4 mm แล้วนำไปฉาย UV เพื่อ Cross-link ที่ 125 mJ นาน 120 วินาที [57] (ในกรณี Multiplex detection NALF จะนำ Probe แต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 แล้วหยด 0.5 μ l/เส้น)

3.7 การเตรียมและประกอบชุด Nucleic acid lateral flow strip test

โครงสร้างของชุด Nucleic acid lateral flow (NALF) strip test ประกอบด้วย 4 ส่วน ได้แก่ Sample pad, Conjugate pad, Nitrocellulose membrane และ Absorption pad ทุกส่วนจะมีส่วนที่ซ้อนทับกัน 2 mm และทั้งหมดจะถูกติดลงบน Backing ดังแสดงในภาพที่ 13 (A)



ภาพที่ 13 แสดงของส่วนประกอบต่างๆ และขนาดของ Nucleic acid lateral flow (NALF) strip test (A) รูปจากด้านบน (B) รูปจากด้านข้าง (SP : Sample pad, CP : Conjugate pad, NM : Nitrocellulose membrane และ AP : Absorption pad)

3.7.1 การเตรียม Sample pad

นำ Glass fiber แฉ่งในสารละลาย Buffer pH 8.0 (0.25% Triton X-100, 0.05 M Tris-HCl, 0.15 mM NaCl) [46] นานประมาณ 30 นาที ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำมาตัดแบ่งในขนาด 3x15 mm แล้วเก็บใน Desiccator

3.7.2 การเตรียม Conjugate pad

นำ Conjugate (AuNPs ที่ถูกตรึงด้วย Thiolated probe บนผิวเรียบร้อยแล้ว) ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5 ปริมาณ 15 μ l หยดลงบน Glass fiber ขนาด 3x10 mm ทิ้งให้แห้งใน Desiccator (ในกรณีที่ทำ Single detection NALF จะใช้ Conjugate 15 μ l/แผ่น/ชนิดของ Thiolated probe และในกรณี Multiplex detection NALF จะใช้ 5 μ l/แผ่น/ชนิดของ Thiolated probe (1:1:1) รวม 15 μ l)

3.7.3 การประกอบชุด Nucleic acid lateral flow strip test

นำส่วนของ Absorption pad (ขนาด 3x20 mm), Nitrocellulose membrane (มี Test line และ Control line แล้ว ขนาด 3x26 mm), Conjugate pad และ Sample pad

มาประกอบกันตามลำดับบนแผ่น Backing pad (ขนาด 3x65 mm) โดยแต่ละส่วนจะมี บริเวณที่วางซ้อนทับกัน 2 mm ดังแสดงในภาพที่ 13 (B)

3.8 การทดสอบหา Hybridization buffer ที่เหมาะสม

นำ NALF ที่ประกอบด้วยชุด Probe แต่ละชุดแยกกัน (Single detection NALF) ได้แก่ P47_DT, P56_DT และ P60_DT มาทดสอบกับ 47 kDa, 56 kDa และ 60 kDa synthetic target ปริมาณ 125 fmol ตามลำดับ ด้วย Hybridization buffer ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 2xSSC, 4xSSC, 6xSSC, 8xSSC, 1xPBS และ 4xSSC+0.5%SDS เพื่อหา Hybridization buffer ที่เหมาะสม โดยหยด Synthetic target ลงบน Sample pad แล้วหยด Hybridization buffer ปริมาตร 35 μ l ทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นหยด 0.1%SDS 100 μ l เพื่อล้าง Background บน Strip รอ 15 นาทีแล้วอ่านผล (n=3) หากปรากฏแถบสีแดง 2 ซีด ให้แปลผลเป็นบวก และหากปรากฏ 1 ซีด ให้แปลผลเป็นลบ วิเคราะห์หา Signal level ที่ Test line ด้วยโปรแกรม ImageJ นำค่าที่ได้มา หาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย Hybridization buffer ที่เหมาะสมจะต้องให้ Signal ที่ดีในกลุ่มทดลอง และไม่ก่อให้เกิด Non-specific binding ในกลุ่ม Negative Control (กลุ่ม Negative Control เป็นกลุ่มที่ใช้ MQW แทน Synthetic target) และ Signal ที่มีค่ามากกว่า ค่าเฉลี่ยของ Background signal+3SD จะถือว่าสามารถอ่านแปลผลได้ (Background signal มาจาก pixel ที่ 401-500 เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่าง Test line และ Conjugate pad)

ตารางที่ 12 แสดง Synthetic target ที่ใช้ในการทดสอบกับ NALF

Target name	Sequence (5'→3')	Length (bp)
P47_+VE	GTC CAC CAA AGC TAC CCA TAT GAA AAA AAA ACA GTT ACT ATG CCG TTA CCC ATA TC	59
P56_+VE	CAG CAT TAA TTG CTA CAC CAA GTG CAA AAA AAA AAA AGT ATA AGC TAA CCC TGC ACC AA	59
P60_+VE	CAA ATT CGG TAA TCA TCT TTT CAC GAT TCA AAA AAA ACG GTC AAA TCT CAT TCC TTT AAC AAC TT	65

3.9 การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe

3.9.1 การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่าง Detection probe กับ Capture probe ที่ต่างชุดกัน

นำ P47_DT, P56_DT และ P60_DT มาทดสอบสลับกับชุด Capture probe ที่ใช้เป็น Test line และ Control line ดังตารางที่ 13 โดยใช้ MQW แทน Synthetic target และใช้ 4xSSC+0.5%SDS เป็น Hybridization buffer (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 3.8) ผลการทดลองที่คาดการณ์ควรเป็นดังตาราง จึงจะถือว่าไม่เกิด Cross-hybridization ระหว่าง Detection probe กับ Test line และ Control line probe ที่ต่างชุดกัน (n=3) เปรียบเทียบผลที่อ่านได้ด้วยตาเปล่ากับผลวิเคราะห์สัญญาณจากโปรแกรม ImageJ

ตารางที่ 13 แสดงการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่าง Detection probe กับ Capture probe ที่ต่างชุดกัน

Capture probe	Detection probe	ผลการทดลองที่คาดว่าจะเกิดขึ้น	
		Test line	Control line
P47_TL และ P47_CL	P47_DT *	X	√
	P56_DT	X	X
	P60_DT	X	X
P56_TL และ P56_CL	P47_DT	X	X
	P56_DT *	X	√
	P60_DT	X	X
P60_TL และ P60_CL	P47_DT	X	X
	P56_DT	X	X
	P60_DT *	X	√

หมายเหตุ * เป็นกลุ่มควบคุมที่ต้องปรากฏเส้นสีแดงที่ Control line เสมอ, √ = ปรากฏเส้นสีแดง, X = ไม่ปรากฏเส้นสีแดง

3.9.2 การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน

นำ Single detection NALF แต่ละชุดมาทดสอบสลับกับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน ดังตารางที่ 14 โดยใช้ Synthetic target ปริมาณ 125 fmol และใช้ 4xSSC+0.5%SDS เป็น Hybridization buffer (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 3.8) ผลการทดลองที่คาดการณ์ควรเป็นดังตาราง จึงจะถือว่าไม่เกิด Cross binding ระหว่างชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน (n=3) (กลุ่ม Negative control จะใช้ MQW แทน Synthetic target) เปรียบเทียบผลที่อ่านได้ด้วยตาเปล่ากับผลวิเคราะห์สัญญาณจากโปรแกรม ImageJ

ตารางที่ 14 แสดงการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน

Single detection NALF	Synthetic target	ผลการทดลองที่คาดว่าจะเกิดขึ้น	
		Test line	Control line
P47-NALF	P56_+VE	X	√
	P60_+VE	X	√
	P47_+VE*	√	√
P56-NALF	P47_+VE	X	√
	P60_+VE	X	√
	P56_+VE*	√	√
P60-NALF	P47_+VE	X	√
	P56_+VE	X	√
	P60_+VE*	√	√

หมายเหตุ * เป็นกลุ่มควบคุมที่ต้องปรากฏเส้นสีแดงทั้งที่ Test line และ Control line เสมอ, √ = ปรากฏเส้นสีแดง, X = ไม่ปรากฏเส้นสีแดง

3.10 การทดสอบหาความไวของ Nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target

ทดสอบหาความไว (Sensitivity) ของ Nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target ที่ปริมาณต่างๆ ได้แก่ 0.0125, 0.125, 1.25, 12.5 และ 125 fmol เพื่อดูปริมาณ Synthetic target ต่ำสุดที่สามารถตรวจจับได้ (Limit of detection; LOD)

3.10.1 การทดสอบหาความไวของ Single detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target

นำ Single detection NALF ทั้ง 3 ชุดมาทดสอบกับ Synthetic target ปริมาณต่างๆ และใช้ 4xSSC+0.5%SDS เป็น Hybridization buffer (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 3.8) เปรียบเทียบค่ากับกลุ่ม Negative control ที่ใช้ MQW แทน Synthetic target โดย LOD จะตัดสินจาก Signal level ที่มีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยของ Signal level จากกลุ่ม Negative control + 3SD (n=3) เมื่อวิเคราะห์สัญญาณด้วยโปรแกรม ImageJ [58]

3.10.2 การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection Nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target

นำ Multiplex detection NALF มาทดสอบกับ Synthetic target ปริมาณต่างๆ และใช้ 4xSSC+0.5%SDS เป็น Hybridization buffer (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 3.8) เปรียบเทียบค่ากับกลุ่ม Negative control ที่ใช้ MQW แทน Synthetic target โดย LOD จะตัดสินจาก Signal level ที่มีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยของ Signal level จากกลุ่ม Negative control + 3SD (n=3) เมื่อวิเคราะห์สัญญาณด้วยโปรแกรม Image [58]

นำค่า LOD ที่ได้จาก Single detection NALF ทั้ง 3 ชุด และ Multiplex detection NALF มาเทียบเทียบกันเพื่อดูประสิทธิภาพในการตรวจจับเป้าหมาย

3.11 การทำ Multiplex PCR ของเชื้อ *Orientia tsutsugamushi*

ในการนำ Genomic DNA (gDNA) ที่ได้จากเชื้อ *O. tsutsugamushi* หรือ Clinical sample มาทดสอบกับ NALF จะต้องนำ gDNA มาเพิ่มจำนวนด้วยการทำ Multiplex PCR ก่อนนำมาทดสอบกับ NALF

หมายเหตุ : คู่มือการเตรียมเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วยการ Inoculate เชื้อเข้าสู่ Vero cells ในภาคผนวก

3.11.1 การออกแบบ Primer

ทำการออกแบบ Primer ที่จำเพาะกับส่วนของ 47 kDa, 56 kDa และ 60 kDa antigen มีรายละเอียดตามตารางที่ 15 โดย PCR product ที่ได้จะครอบคลุมช่วงลำดับเบสที่ต้องการตรวจจับด้วยชุด Probe ของ NALF

ตารางที่ 15 แสดงรายละเอียดของ Primer ที่ใช้ใน Multiplex PCR

Primer name	Sequence (5'→3')	Length (bp)	Tm (°C)	%CG	Product size (bp)
47 kDa_FW	GAT ATG GGT AAC GGC ATA GTA ACT G	25	61.3	44	86
47 kDa_RV	AGA TTA AAC ATC GGT CCA CCA AAG C	25	61.3	44	
56 kDa_FW	GGC CAA GTT AAA CTC TAT GCT GAC	24	61.0	46	166
56 kDa_RV	CAG CAT TAA TTG CTA CAC CAA GTG C	25	61.3	44	
60 kDa_FW	GCT ACT GTT TCA TCT AAT GGA GAC CG	26	63.2	46	334
60 kDa_RV	GAG CTT CTC CGT CTA CAT CAT CAG	24	62.7	50	

3.11.2 การทดลองหาสภาวะของ Multiplex PCR ที่เหมาะสมด้วย Single PCR

เพื่อทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมเริ่มแรกในการทำ Multiplex PCR ด้วย Single PCR มีรายละเอียดดังตารางที่ 16 โดยใช้ gDNA ของ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) (positive control) และ Healthy human (Negative control) เป็น Template

ตารางที่ 16 แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Single PCR

Reagent	Volumn/ Reaction (μ l)	Final concentration
10xPCR buffer	2	1x
25 mM MgCl ₂	-	1.5 mM
dNTP (10 mM each)	0.4	200 μ M each
Forward primer (25 μ M)	0.32	0.4 μ M
Reverse primer (25 μ M)	0.32	0.4 μ M
HotstarTaq (5U/ μ l)	0.1	0.5 U/Reaction
dH ₂ O	15.86	-
Template (5ng/ μ l)	1	5 ng/Reaction
Total	20	-

Step	Temp., Time	Cycles
Initial activation	95 °C, 15 min	1
Denaturation	94 °C, 30 sec	} 35
Annealing	55 °C, 1 min	
Extension	72 °C, 1 min	
Final extension	72 °C, 10 min	1

3.11.3 การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของ Multiplex PCR

การปรับ Extension time

ทดลองปรับ Extension time (A) 1 นาที และ (B) 30 วินาที มีรายละเอียดดังตารางที่ 17 โดยใช้ gDNA ของ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) (positive control) และ Healthy human (Negative control) เป็น Template

ตารางที่ 17 แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR เมื่อใช้ Extension time (A) 1 นาที และ (B) 30 วินาที

Reagent	Volumn/ Reaction (μ l)	Final concentration
10xPCR buffer	2	1x
25 mM MgCl ₂	-	1.5 mM
dNTP (10 mM each)	0.4	200 μ M each
Forward primer (25 μ M)	0.32/ each	0.4 μ M
Reverse primer (25 μ M)	0.32/ each	0.4 μ M
HotstarTaq (5U/ μ l)	0.1	0.5 U/Reaction
dH ₂ O	14.58	-
Template (5ng/ μ l)	1	5 ng/Reaction
Total	20	-

Step	Temp., Time	Cycles
Initial activation	95 °C, 15 min	1
Denaturation	94 °C, 30 sec	} 35
Annealing	55 °C, 1 min	
Extension (A) (B)	72 °C, 1 min 72 °C, 30 sec	
Final extension	72 °C, 10 min	1

การทำ Gradient PCR

ทำ Multiplex PCR ที่ Annealing temperature ต่างๆ ได้แก่ 52.0, 52.5, 53.5, 54.8, 56.4, 57.6, 58.5 และ 59.0 °C เพื่อหา Annealing temperature ที่ให้ PCR product ทั้ง 3 ขนาดได้มากที่สุด และไม่เกิด Nonspecific product มีรายละเอียดดังตารางที่ 18 โดยใช้ gDNA ของ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) เป็น Template

ตารางที่ 18 แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR ที่ Annealing temperature ต่างๆ

Reagent	Volume/ Reaction (μl)	Final concentration
10xPCR buffer	2	1x
25 mM MgCl ₂	-	1.5 mM
dNTP (10 mM each)	0.4	200 μM each
Forward primer (25 μM)	0.32/ each	0.4 μM
Reverse primer (25 μM)	0.32/ each	0.4 μM
HotstarTaq (5U/μl)	0.1	0.5 U/Reaction
dH ₂ O	14.58	-
Template (5ng/μl)	1	5 ng/Reaction
Total	20	-

Step	Temp., Time	Cycles
Initial activation	95 °C, 15 min	1
Denaturation	94 °C, 30 sec	} 35
Annealing	52-59 °C, 1 min	
Extension	72 °C, 30 sec	
Final extension	72 °C, 10 min	1

การปรับปริมาณ MgCl₂

ทดลองปรับปริมาณ MgCl₂ ดังนี้ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 mM เพื่อหาปริมาณ MgCl₂ ที่ให้ PCR product ทั้ง 3 ขนาดได้มากที่สุด และไม่เกิด Nonspecific product มีรายละเอียดดังตารางที่ 19 โดยใช้ gDNA ของ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) เป็น Template

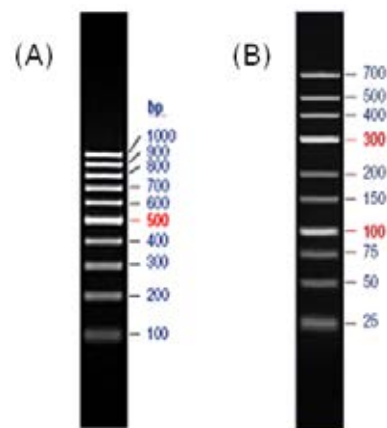
ตารางที่ 19 แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR โดยใช้ปริมาณ MgCl₂ ต่างๆ

Reagent	Volumn/ Reaction (μl)	Final concentration
10xPCR buffer	2	1x
25 mM MgCl ₂	0-2.8	1.5-5.0 mM
dNTP (10 mM each)	0.4	200 μM each
Forward primer (25 μM)	0.32/ each	0.4 μM
Reverse primer (25 μM)	0.32/ each	0.4 μM
HotstarTaq (5U/μl)	0.1	0.5 U/Reaction
dH ₂ O	11.78-14.58	-
Template (5ng/μl)	1	5 ng/Reaction
Total	20	-

Step	Temp., Time	Cycles
Initial activation	95 °C, 15 min	1
Denaturation	94 °C, 30 sec	} 35
Annealing	57.6 °C, 1 min	
Extension	72 °C, 30 sec	
Final extension	72 °C, 10 min	1

การตรวจสอบ PCR product ด้วย Gel electrophoresis

- เตรียม 4% Agarose gel ด้วย 0.5xTBE (อาจปรับเปลี่ยน % Agarose gel ตามคุณสมบัติของ Agarose gel ที่นำมาใช้)
- ใช้ PCR product 3 μ l/ ตัวอย่าง ผสมกับ 6x Loading dye 1 μ l (รวม 4 μ l/ ตัวอย่าง)
- ใช้ Ladder 1 μ l ผสมกับ 6x Loading dye 1 μ l และ DI water 4 μ l (รวม 6 μ l)
- ความต่างศักย์ 75 โวลท์ นาน 75 นาที ใน 0.5xTBE
- ย้อมเจลด้วย Ethidium Bromide (EtBr) นาน 10 นาที (Post staining) และ Destain ด้วย DI water นาน 10 นาที
- PCR product ที่ได้จะมีขนาด 86 bp (47 kDa antigen), 166 bp (56 kDa antigen) และ 334 bp (60 kDa antigen)



ภาพที่ 14 แสดง Ladder ที่ใช้ในการทำ Gel electrophoresis ขนาด (A) 100 bp และ (B) 25 bp

3.12 การทดลองนำ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test มาทดสอบกับเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ต่างๆ

นำ gDNA ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Karp, Kato และ Gilliam มาทำ Multiplex PCR และทดสอบกับ NALF มีรายละเอียดดังตารางที่ 20 โดยใช้ gDNA ของ Healthy human เป็น Negative control (n=3)

ตารางที่ 20 แสดงสถานะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* สายพันธุ์ต่างๆ

Reagent	Volumn/ Reaction (μ l)	Final concentration
10xPCR buffer	2	1x
25 mM MgCl ₂	1.6	3.5 mM
dNTP (10 mM each)	0.4	200 μ M each
Forward primer (25 μ M)	0.32/ each	0.4 μ M
Reverse primer (25 μ M)	0.32/ each	0.4 μ M
HotstarTaq (5U/ μ l)	0.1	0.5 U/Reaction
dH ₂ O	12.98	-
Template (5ng/ μ l)	1	-
Total	20	-

Step	Temp., Time	Cycles
Initial activation	95 °C, 15 min	1
Denaturation	94 °C, 30 sec	} 35
Annealing	57.6 °C, 1 min	
Extension	72 °C, 30 sec	
Final extension	72 °C, 10 min	1

นำ PCR product จาก Multiplex PCR ที่ได้ 17 μ l มา Denature ที่ 95 °C นาน 5 นาที แล้ว Chill ในน้ำแข็งนาน 15 นาที หยดลงบน Sample pad แล้วหยด Hybridization buffer (4xSSC+0.5%SDS อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 3.8) ปริมาตร 35 μ l ทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นหยด 0.1%SDS 100 μ l เพื่อล้าง Background บน NALF รอ 15 นาทีแล้วอ่านผล หากปรากฏ

แถบสีแดง 2 ซีด ให้แปลผลเป็นบวก (เป็นโรค) และหากปรากฏ 1 ซีด ให้แปลผลเป็นลบ (ไม่เป็นโรค) ดูผลเทียบกับผลจาก Gel electrophoresis จาก Multiplex PCR

3.13 การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบสของ 56 kDa antigen

นำ Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบสของ 56 kDa antigen มาทำ Multiplex PCR โดยใช้สภาวะดังรายละเอียดในตารางที่ 21 และ 22 นำ PCR product มาทดสอบกับ NALF ตามวิธีในข้อ 3.12 ดูผลเทียบกับ Gel electrophoresis จาก Multiplex PCR โดยมี gDNA ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) เป็น Positive control และ gDNA ของ Healthy human และน้ำของ Multiplex PCR เป็น Negative control โดยยืนยันผลที่อ่านได้ด้วยตาเปล่าด้วยผลวิเคราะห์สัญญาณจากโปรแกรม ImageJ

หมายเหตุ : คู่มือการเตรียม Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบสของ 56 kDa antigen ในภาคผนวก

ตารางที่ 21 แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR เพื่อหาความไวของ Multiplex detection NALF ด้วย Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบสของ 56 kDa antigen

Reagent	Volume/ Reaction (μ l)	Final concentration
10xPCR buffer	2.5	1x
25 mM MgCl ₂	2	3.5 mM
dNTP (10 mM each)	0.5	200 μ M each
Forward primer (25 μ M)	0.4/ each	0.4 μ M
Reverse primer (25 μ M)	0.4/ each	0.4 μ M
HotstarTaq (5U/ μ l)	0.13	0.5 U/Reaction
dH ₂ O	15.48	-
Template	2	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁸ ng
Total	25	-

Step	Temp., Time	Cycles
Initial activation	95 °C, 15 min	1
Denaturation	94 °C, 30 sec	} 35
Annealing	57.6 °C, 1 min	
Extension	72 °C, 30 sec	
Final extension	72 °C, 10 min	1

ตารางที่ 22 แสดงปริมาณต่างๆ ของ Plasmid ที่ใช้ทดสอบความไวของ Multiplex detection NALF และปริมาณเทียบเท่าเป็น Copies

Template : Plasmid (1 copy = 5,400 bp)				
Concentration (ng/ μ l)	Volumn (μ l)	(ng)	(mol)	(copies)
5×10^{-5}	2	1×10^{-4}	2.85×10^{-20}	1.72×10^4
5×10^{-6}	2	1×10^{-5}	2.85×10^{-21}	1.72×10^3
5×10^{-7}	2	1×10^{-6}	2.85×10^{-22}	1.72×10^2
5×10^{-8}	2	1×10^{-7}	2.85×10^{-23}	1.72×10^1
5×10^{-9}	2	1×10^{-8}	2.85×10^{-24}	1.72×10^0

3.14 การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วยเชื้อ *Orientia tsutsugamushi*

นำ gDNA ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) มาทำ Multiplex PCR โดยใช้สภาวะดังรายละเอียดในตารางที่ 23 และ 24 นำ PCR product มาทดสอบกับ NALF ตามวิธีในข้อ 3.12 ดูผลเทียบกับ Gel electrophoresis จาก Multiplex PCR โดยมี gDNA ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) เป็น Positive control และ gDNA ของ Healthy human และน้ำของ Multiplex PCR เป็น Negative control โดยยืนยันผลที่อ่านได้ด้วยตาเปล่าด้วยผลวิเคราะห์สัญญาณจากโปรแกรม ImageJ

ตารางที่ 23 แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR ของเพื่อหาความไวของ Multiplex detection NALF ด้วยเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain)

Reagent	Volume/ Reaction (µl)	Final concentration
10xPCR buffer	2	1x
25 mM MgCl ₂	1.6	3.5 mM
dNTP (10 mM each)	0.4	200 µM each
Forward primer (25 µM)	0.32/ each	0.4 µM
Reverse primer (25 µM)	0.32/ each	0.4 µM
HotstarTaq (5U/µl)	0.1	0.5 U/Reaction
dH ₂ O	12.98	-
Template	1	5x10 ⁻⁷ -5 ng
Total	20	-

Step	Temp., Time	Cycles
Initial activation	95 °C, 15 min	1
Denaturation	94 °C, 30 sec	} 35
Annealing	57.6 °C, 1 min	
Extension	72 °C, 30 sec	
Final extension	72 °C, 10 min	1

ตารางที่ 24 แสดงปริมาณต่างๆ ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) ที่ใช้ทดสอบความไวของ Multiplex detection NALF และปริมาณเทียบเท่าเป็น Copies

Template : <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) (1 copy = 2,008,987 bp*)				
Concentration (ng/ μ l)	Volumn (μ l)	(ng)	(mol)	(copies)
5×10^0	1	5×10^0	3.85×10^{-18}	2.31×10^6
5×10^{-1}	1	5×10^{-1}	3.85×10^{-19}	2.31×10^5
5×10^{-2}	1	5×10^{-2}	3.85×10^{-20}	2.31×10^4
5×10^{-3}	1	5×10^{-3}	3.85×10^{-21}	2.31×10^3
5×10^{-4}	1	5×10^{-4}	3.85×10^{-22}	2.31×10^2
5×10^{-5}	1	5×10^{-5}	3.85×10^{-23}	2.31×10^1
5×10^{-6}	1	5×10^{-6}	3.85×10^{-24}	2.31×10^0
5×10^{-7}	1	5×10^{-7}	3.85×10^{-25}	2.31×10^{-1}

หมายเหตุ : ขนาด Whole genome ที่นำมาใช้คำนวณอ้างอิงจากสายพันธุ์ Ikeda [59] เนื่องจากไม่มีข้อมูลของสายพันธุ์ Gilliam

3.15 การทดสอบความจำเพาะของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test กับตัวอย่าง DNA จากตับหนูและเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ

นำตัวอย่าง DNA จากตับหนูซึ่งเป็น Host ชนิดหนึ่งของโรค และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ จำนวน 8 ชนิด มาทดสอบกับ Multiplex detection NALF เพื่อดูความจำเพาะ (Specificity) เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ ได้แก่

- *Enterococcus faecalis* (Gram positive)
- *Staphylococcus aureus* (Gram positive)
- *Klebsiella pneumonia* (Gram negative)
- *Escherichia coli* (Gram negative)
- *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negative)
- *Salmonella spp.* (Gram negative)
- *Leptospira interrogans* (Gram negative)
- *Rickettsia typhi* (Gram negative)

นำ PCR product จาก Multiplex PCR มาทดสอบกับ NALF ตามวิธีในข้อ 3.12 ดูผลเทียบกับ Gel electrophoresis จาก Multiplex PCR โดยมี gDNA ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) เป็น Positive control และ gDNA ของ Healthy human และน้ำของ Multiplex PCR เป็น Negative control

ตารางที่ 25 แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR ของเพื่อหาความจำเพาะของ Multiplex detection NALF ด้วย DNA ของหนูและเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

Reagent	Volumn/ Reaction (μ l)	Final concentration
10xPCR buffer	2	1x
25 mM MgCl ₂	1.6	3.5 mM
dNTP (10 mM each)	0.4	200 μ M each
Forward primer (25 μ M)	0.32/ each	0.4 μ M
Reverse primer (25 μ M)	0.32/ each	0.4 μ M
HotstarTaq (5U/ μ l)	0.1	0.5 U/Reaction
dH ₂ O	12.98	-
Template	1*	-
Total	20	-

หมายเหตุ : * ตัวอย่าง DNA จากหนูใช้ 10 μ l และปรับ dH₂O เป็น 3.98 μ l

Step	Temp., Time	Cycles
Initial activation	95 °C, 15 min	1
Denaturation	94 °C, 30 sec	} 35
Annealing	57.6 °C, 1 min	
Extension	72 °C, 30 sec	
Final extension	72 °C, 10 min	1

3.16 การนำ Clinical sample มาทดสอบกับ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เหลือจากโครงการอื่นของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ซึ่งเป็นการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อโรคเค็ทเซียจากผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่เข้ารับการรักษาที่สถานพยาบาลในกรุงเทพมหานครและส่วนภูมิภาคด้วยวิธี IFA เพื่อใช้ประกอบการวางแผนการรักษาของแพทย์ โดยโครงการดังกล่าวได้ให้ผู้ป่วยที่สมัครใจเข้าร่วมในโครงการลงนามในเอกสารแสดงถ้อยคำยินยอมและผ่านการขอจริยธรรมแล้วเรียบร้อยแล้ว

- กลุ่มทดลอง (Test group) : ให้ผล Duplex nested PCR ยีน 56-kDa antigen ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* เป็นบวก
- กลุ่มควบคุม (Control group) : ให้ผล Duplex nested PCR ยีน 56-kDa antigen ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* เป็นลบ

การสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างสิ่งส่งตรวจมา 200 μ l และสกัด DNA โดยใช้ชุด PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) ซะล้างด้วย Elution buffer ปริมาณ 100 μ l

การทำ Multiplex PCR

นำ gDNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วย Multiplex PCR โดยใช้สภาวะดังรายละเอียดในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 แสดงสถานะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR ของเพื่อหาใช้ตรวจหาเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วย Multiplex detection NALF จากตัวอย่างเลือด

Reagent	Volume/ Reaction (μ l)	Final concentration
10xPCR buffer	2	1x
25 mM MgCl ₂	1.6	3.5 mM
dNTP (10 mM each)	0.4	200 μ M each
Forward primer (25 μ M)	0.32/ each	0.4 μ M
Reverse primer (25 μ M)	0.32/ each	0.4 μ M
HotstarTaq (5U/ μ l)	0.1	0.5 U/Reaction
dH ₂ O	3.98	-
Template	10	-
Total	20	-

Step	Temp., Time	Cycles
Initial activation	95 °C, 15 min	1
Denaturation	94 °C, 30 sec	} 35
Annealing	57.6 °C, 1 min	
Extension	72 °C, 30 sec	
Final extension	72 °C, 10 min	1

การทดสอบชุด Lateral flow strip test

นำ PCR product มาทดสอบกับ NALF ตามวิธีในข้อ 3.12 ดูผลเทียบกับ Gel electrophoresis จาก Duplex nested PCR โดยมี gDNA ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) เป็น Positive control และ gDNA ของ Healthy human และน้ำของ Multiplex PCR เป็น Negative control โดยยืนยันผลที่อ่านได้ด้วยตาเปล่าด้วยผลวิเคราะห์สัญญาณจากโปรแกรม ImageJ นำผลที่ได้มาหาคำนวนหาค่า Sensitivity, Specificity, Positive predictive value (PPV), Negative predictive value (NPV), Pre-test likelihood, Post-test likelihood และ Likelihood ratio ดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 แสดงตารางการคำนวณค่า Sensitivity, Specificity, Positive predictive value (PPV), Negative predictive value (NPV), Pre-test likelihood, Post-test likelihood และ Likelihood ratio

วิธีตรวจ/ ผลการทดสอบ		Duplex nested PCR		รวม
		จำนวนตัวอย่างที่เป็นโรค	จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นโรค	
Multiplex detection NALF	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก	a	b	a+b
	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบ	c	d	c+d
	รวม	a+c	b+d	a+b+c+d

ค่าความไว (Sensitivity) = $a / (a+c)$

ความจำเพาะ (Specificity) = $d / (b+d)$

ค่าพยากรณ์บวก (Positive predictive value; PPV) = $a / (a+b)$

ค่าพยากรณ์ลบ (Negative predictive value; NPV) = $d / (c+d)$

Pre-test likelihood = $(a+c) / (a+b+c+d)$

Post-test likelihood (if test negative) = $c / (c+d)$

Likelihood ratio positive (LR+) = Sensitivity / (1-Specificity)

$$= a (b+d) / b (a+c)$$

Likelihood ratio positive (LR-) = (1-Sensitivity) / Specificity

$$= c (b+d) / d (a+c)$$

ความไว (Sensitivity) คือ ความสามารถของชุดตรวจคัดกรองในการที่จะตรวจแยกบุคคลที่เป็นโรคได้ถูกต้อง

ความจำเพาะ (Specificity) คือ ความสามารถของชุดตรวจคัดกรองในการที่จะตรวจแยกบุคคลที่ไม่เป็นโรคได้ถูกต้อง

ค่าพยากรณ์บวก (Predictive value positive; PPV) คือ โอกาสของบุคคลที่มีผลการทดสอบเป็นบวกจะป่วยเป็นโรคจริง

ค่าพยากรณ์ลบ (Predictive value negative; NPV) คือ โอกาสของบุคคลที่มีผลการทดสอบเป็นลบจะไม่ป่วยเป็นโรคจริง

Pre-test likelihood คือ โอกาสที่บุคคลนั้นจะเป็นโรคก่อนการทดสอบ หรือความชุกของโรคซึ่งอาจได้จากข้อมูลการวิจัยทางระบาดวิทยาของโรค หรือข้อมูลจากประสบการณ์ส่วนตัวของแพทย์เอง

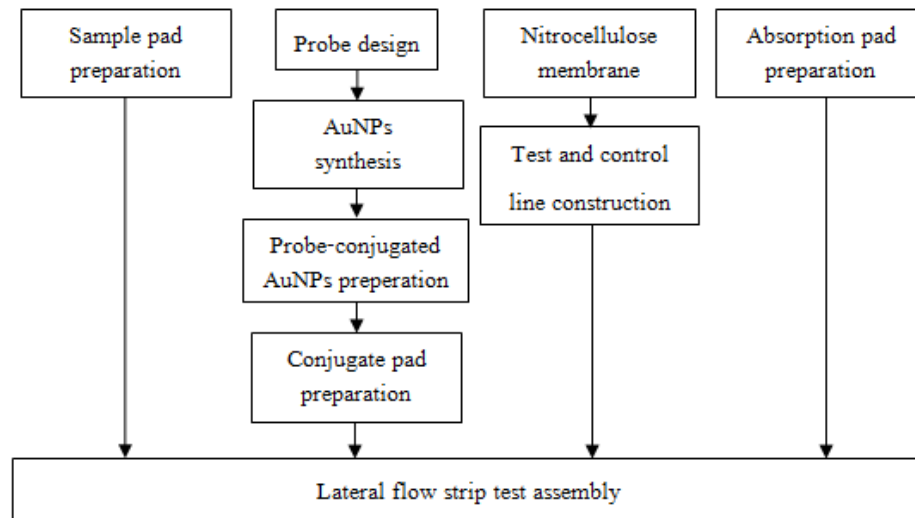
Post-test likelihood (if test negative) คือ โอกาสที่บุคคลนั้นจะเป็นโรคแต่ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

Likelihood ratio positive (LR+) คือ โอกาสของคนที่เป็นโรคจะให้ผลการทดสอบเป็นบวกเป็นกี่เท่าของคนที่ไม่เป็นโรค

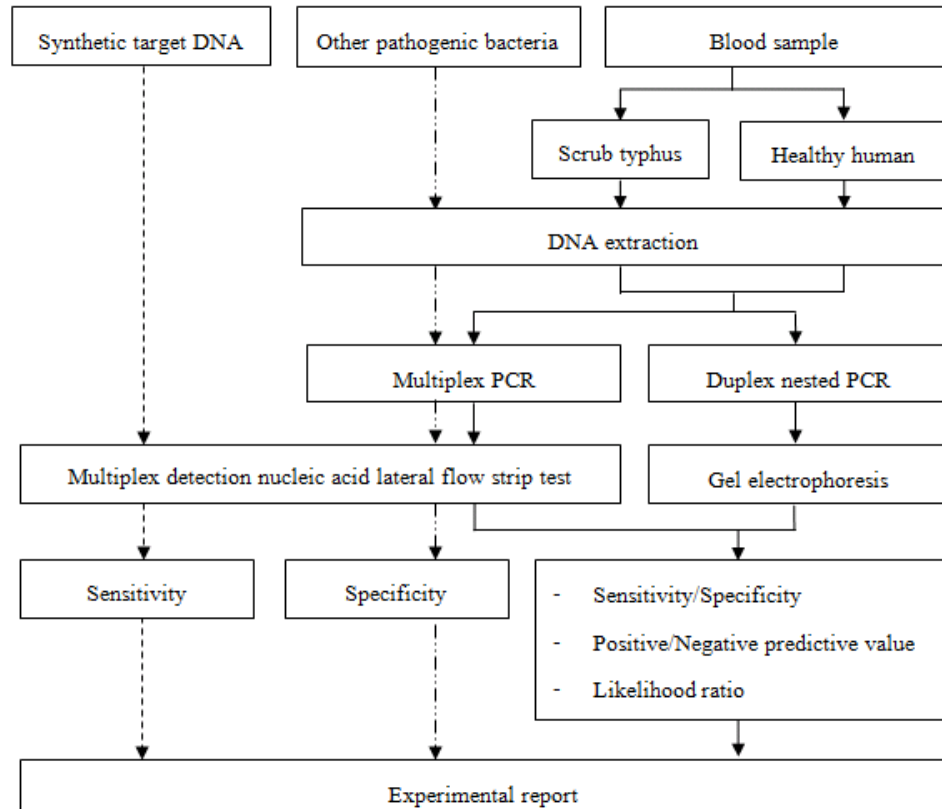
Likelihood ratio negative (LR-) คือ โอกาสของคนที่เป็นโรคจะให้ผลการทดสอบเป็นลบเป็นกี่เท่าของคนที่ไม่เป็นโรค [60,61]

3.17 ลำดับขั้นตอนการทำงานวิจัย

1. ขั้นตอนการเตรียม NALF



2. ขั้นตอนทดสอบประสิทธิภาพของ NALF



3.18 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลในรูปของ mean±SD เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง

คำนวณหา Sensitivity, Specificity, Positive predictive value (PPV), Negative predictive value (NPV), Pre-test likelihood, Post-test likelihood และ Likelihood ratio เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดตรวจคัดกรองโรคสครับทัยฟัสแบบแลทเทอรัลโฟรว์กับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Duplex nested PCR

การคำนวณประชากรที่ใช้ในการศึกษาหาความไวของชุดตรวจคัดกรองแบบแลทเทอรัลโฟรว์

- กำหนดให้ความไวของชุดตรวจคัดกรองแบบแลทเทอรัลโฟรว์เท่ากับร้อยละ 90
- ค่าประมาณความคลาดเคลื่อน (Error) ประมาณร้อยละ 10
- ระดับนัยสำคัญ (Significant level) ร้อยละ 5 (แบบ 2-tailed)

$$\text{สูตร } N = \frac{Z_{\alpha}^2 P(1-P)}{d^2}$$

$$\text{โดย } Z_{\alpha} = 1.96, P = 0.90, 1-P = 0.10, d = 0.10$$

$$N = 35$$

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จะต้องใช้ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคสครับทัยฟัส จำนวน 35

ตัวอย่าง

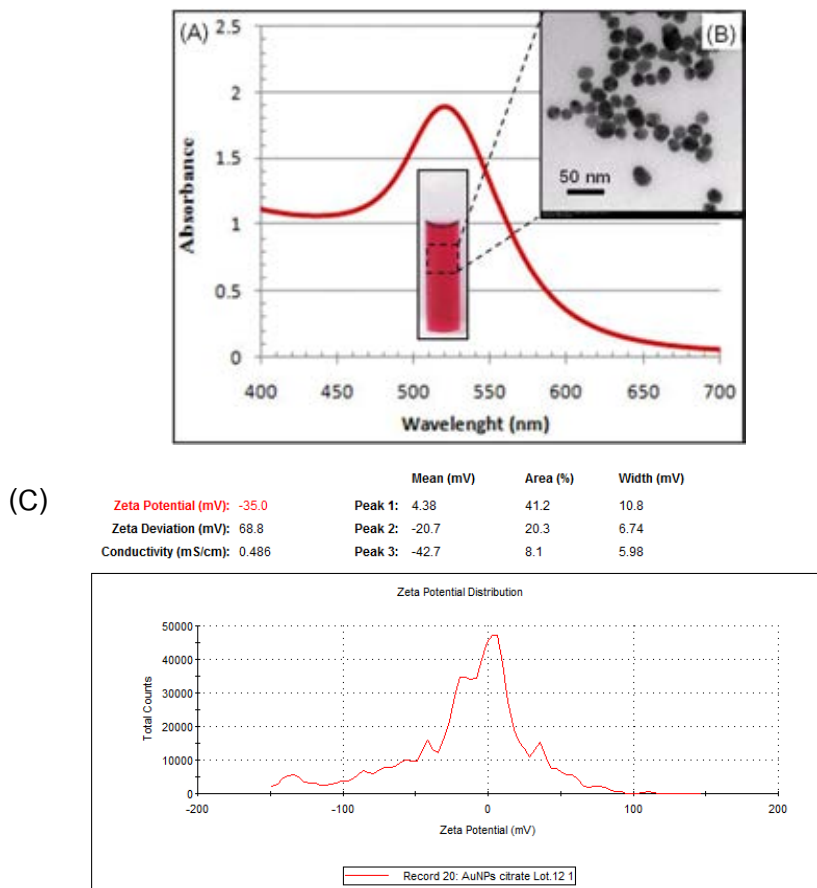
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

4.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (AuNP synthesis)

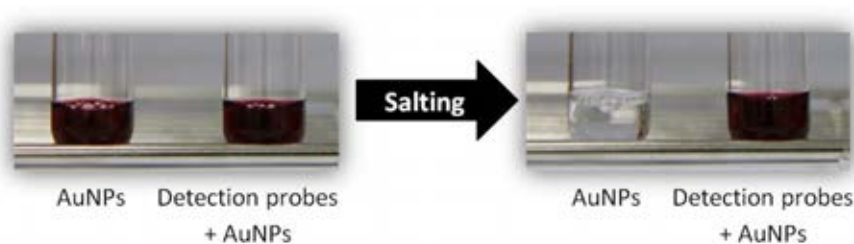
AuNPs ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นคอลลอยด์สีแดงใส เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer พบว่ามีการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.8556 ± 0.0573 ($n=3$) ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 521 nm ส่วนการวัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Transmission Electron Microscopy (TEM) พบว่ามีขนาดในช่วง 20-25 nm และเมื่อวัดค่า Zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer พบว่ามีค่าเฉลี่ย -35 ± 68.8 mV ดังแสดงในภาพที่ 15



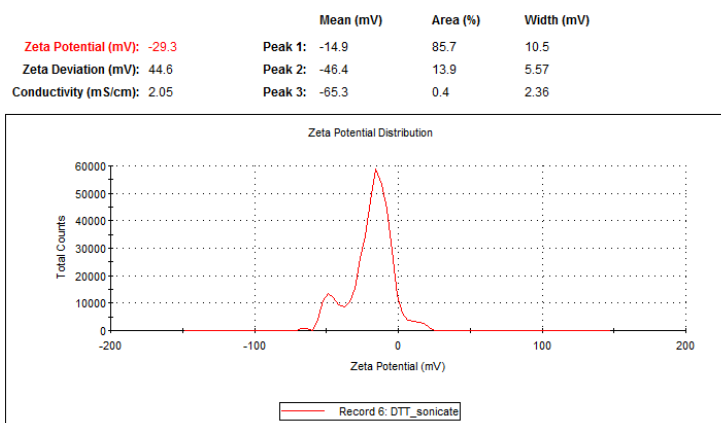
ภาพที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติและคุณลักษณะของ AuNPs ด้วย (A) UV-Vis spectrometer (B) TEM และ (C) Zetasizer

4.2 การตรึง Detection probe บนผิวอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

หลังจากนำ Detection probe ที่มีหมู่ Thiol มาตรึงบนผิวหน้า AuNPs พบว่า AuNPs ยังคงสภาพเป็นคอลลอยด์สีแดงใสเมื่อผ่านขั้นตอน Salting (เป็นขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการตรึง Detection probe ที่จะค่อยๆ เติมน้ำเฟอรัที่มีเกลือโซเดียมไอออนเป็นส่วนประกอบลงไป เพื่อไปลดการผลักกันของประจุลบจากลำดับเบส ทำให้สาย Detection probe เข้าใกล้กันได้และสามารถแทรกติดบนผิวของ AuNPs ได้ปริมาณมากขึ้น) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเติม Detection probe ที่จะตกตะกอนในขั้นตอน Salting และไม่สามารถกระจายตัวกลับได้ ดังแสดงในภาพที่ 16 และเมื่อทำการตรวจสอบด้วย Zetasizer พบว่า Zeta potential มีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจาก -35 ± 68.8 mV เป็น -29.3 ± 44.6 mV ดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 16 แสดงลักษณะของสี AuNPs ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อผ่านกระบวนการ Salting



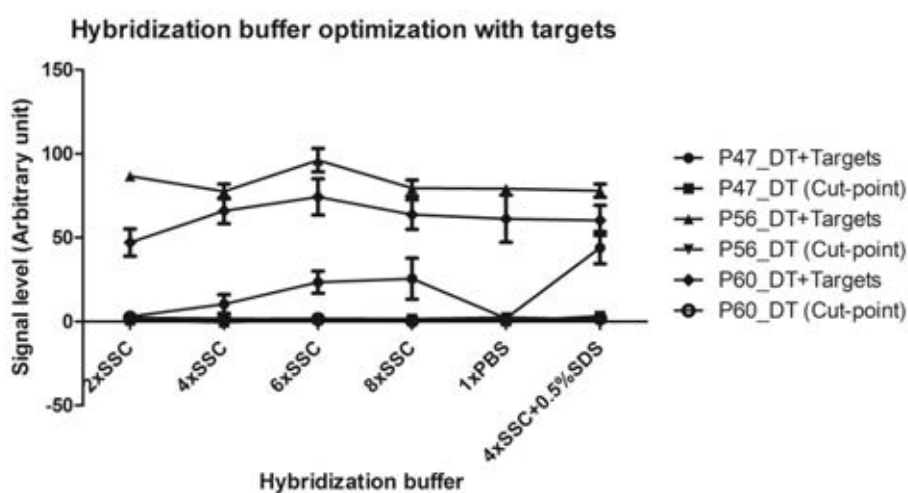
ภาพที่ 17 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของ AuNPs ที่ถูกตรึงด้วย Detection probe บนผิว ด้วย Zetasizer

4.3 การทดสอบหา Hybridization buffer ที่เหมาะสม

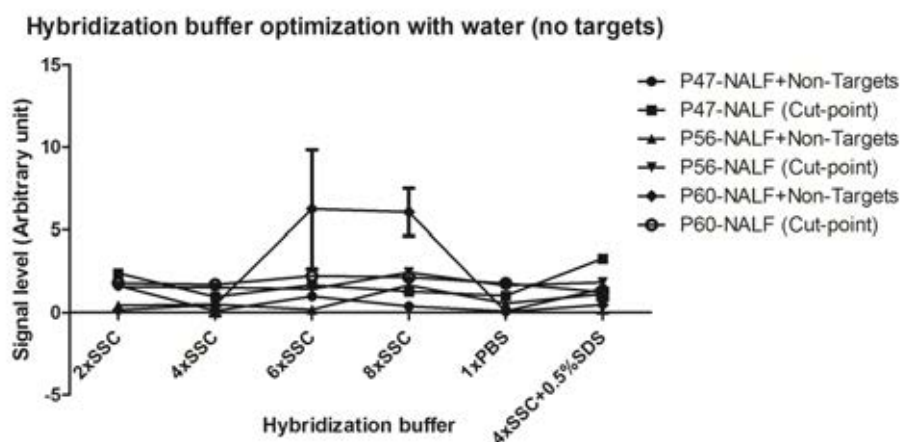
นำ Single detection NALF 3 ชุด ได้แก่ P47-NALF, P56-NALF และ P60-NALF มาทดสอบกับ Synthetic target ปริมาณ 125 fmol ด้วย Hybridization buffer 6 ชนิด ได้แก่ 2xSSC, 4xSSC, 6xSSC, 8xSSC, 1xPBS และ 4xSSC+0.5%SDS และใช้ Milli Q water แทน Synthetic target เป็นกลุ่ม Negative control จากผลการวิเคราะห์ Signal level ด้วยโปรแกรม ImageJ ดังแสดงในกราฟภาพที่ 18 พบว่า Single detection NALF ชุด P47-NALF จะให้ Signal level เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ Ionic strength ใน Hybridization buffer ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจาก Stringency ในการ Hybridization ที่ลดลง ทำให้สาย DNA จับกันได้ดีขึ้น แต่ก็ทำให้มีโอกาสเกิด Non-specific binding สูงขึ้นเช่นกัน ดังจะเห็นได้จาก 2xSSC (3.08 ± 0.35 a.u.) และ 1xPBS (2.03 ± 0.21 a.u.) ให้ Signal ต่ำสุด แล้วสูงขึ้นในกลุ่มที่ใช้ 8xSSC (25.58 ± 12.23 a.u.) และให้ผลเป็นลบในกลุ่ม Negative control

ส่วนใน Single detection NALF ชุด P56-NALF และ P60-NALF พบว่าในกลุ่มที่ใช้ 6xSSC และ 8xSSC จะเกิดคราบสีแดงของ AuNP-thiolated probe บน NALF (Background) ทำให้อ่านผลได้ยาก จึงจำเป็นต้องใช้ 0.1%SDS จำนวนมากในการชะล้างออก (Elution buffer) โดยกลุ่มที่ใช้ 8xSSC (79.56 ± 4.75 a.u. และ 63.75 ± 8.79 a.u. ตามลำดับ) จะให้ Signal level ที่ต่ำกว่ากลุ่ม 6xSSC (96.21 ± 6.96 a.u. และ 74.35 ± 10.80 a.u. ตามลำดับ) เนื่องจาก 8xSSC ทำให้เกิด Background มากกว่า จึงต้องใช้ Elution buffer ในปริมาณมากกว่ากลุ่ม 6xSSC (จุด End point ที่จะหยุดชะล้างด้วย Elution buffer คือ ชะล้างจน Conjugate pad ไม่มี AuNP-thiolated probe หลงเหลือ โดยหยดครั้งละ 50 μ l ห่างกันทุกๆ 15 นาที จึงจะอ่านผล และปริมาตรรวมของ Elution ที่ใช้จะไม่เกิน 200 μ l) ทั้งนี้คราบสีแดงที่เกิดขึ้นเกิดจากการเกาะกลุ่มกันเองของ Thiolated probe ที่ตรึงบน AuNPs เมื่อใช้ Hybridization buffer ที่มี Ionic strength สูงจนเกินไป ทำให้ละลายและไหลออกจาก Conjugate pad ได้ยากและช้า หรือเกิดจากแรง Ionic และ Hydrophobic interaction ระหว่างสาย Thiolated probe กับ Nitrocellulose membrane นอกจากนี้ในกลุ่ม Negative control ของชุด P60-NALF ที่ใช้ 6xSSC (6.24 ± 3.59 a.u.) และ 8xSSC (6.06 ± 1.44 a.u.) ให้ผล False positive เนื่องจากเกิด Non-specific binding เมื่อเปรียบเทียบกับค่าตัดสิน (Cut-point) 2.23 และ 2.15 a.u. ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 19 และตารางที่ 28 (ค่าตัดสิน (Cut-point) คือ ค่าเฉลี่ยของ Background signal+3SD (n=3) หาก Signal level ที่ได้มีค่ามากกว่าค่าตัดสินจะถือว่าสามารถอ่านแปลผลได้) จากผลที่ได้กล่าวแล้วในข้างต้น จึงเลือกใช้ SSC ที่ความเข้มข้น 4x เป็น Hybridization buffer

นอกจากนี้เมื่อนำ 4xSSC มาผสมกับ 0.5%SDS และทดสอบกับ Single detection NALF ทั้ง 3 ชุด พบว่าให้ Signal level 43.99 ± 9.59 a.u., 77.96 ± 3.958 a.u. และ 60.37 ± 8.98 a.u. ตามลำดับ (ภาพที่ 18) โดยในชุด P47-NALF ให้ Signal เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ส่วนในชุด P56-NALF และ P60-NALF แม้จะให้ Signal ใกล้เคียงเดิม แต่ช่วยลด Background ที่เกิดขึ้นได้ดี (กลุ่ม 4xSSC ให้ Signal level 10.42 ± 5.61 a.u., 77.55 ± 4.38 a.u. และ 66.05 ± 7.70 a.u. ตามลำดับ) และไม่เกิด False positive กับกลุ่ม Negative control



ภาพที่ 18 กราฟแสดง Signal level และค่าตัดสิน (Cut-off) จากโปรแกรม ImageJ ของ Single detection NALF ที่ใช้ P47-NALF, P56-NALF และ P60-NALF ทดสอบกับ 47 kDa, 56kDa และ 60 kDa synthetic target 125 fmol ตามลำดับ เมื่อใช้ Hybridization buffer ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 19 กราฟแสดง Signal level และค่าตัดสิน (Cut-off) จากโปรแกรม ImageJ ของ Single detection NALF ที่ใช้ P47-NALF, P56-NALF และ P60-NALF ทดสอบกับ Milli Q water (Negative control) เมื่อใช้ Hybridization buffer ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 28 แสดงการเกิด Cross-hybridization ของ NALF ที่ใช้ P60-NALF และกราฟ Signal curve จากโปรแกรม ImageJ เมื่อใช้ 6xSSC และ 8xSSC เป็น Hybridization buffer และใช้ Milli Q water แทน Synthetic target

Hybridization buffer	รูป NALF และ กราฟ ImageJ
6xSSC	
8xSSC	

4.4 การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด probe

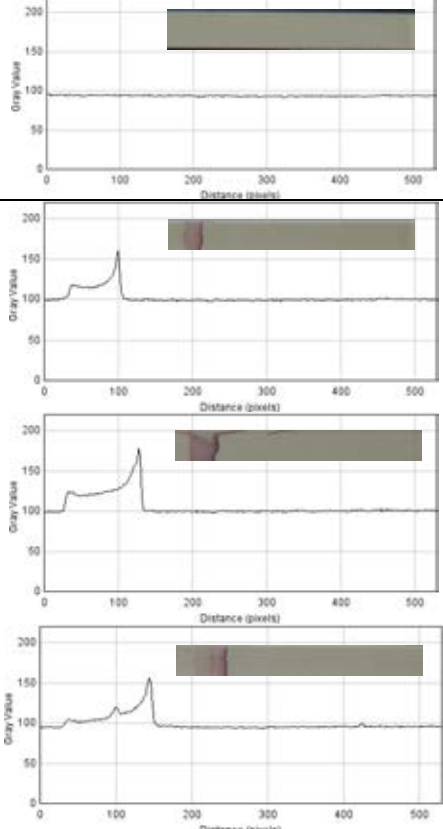
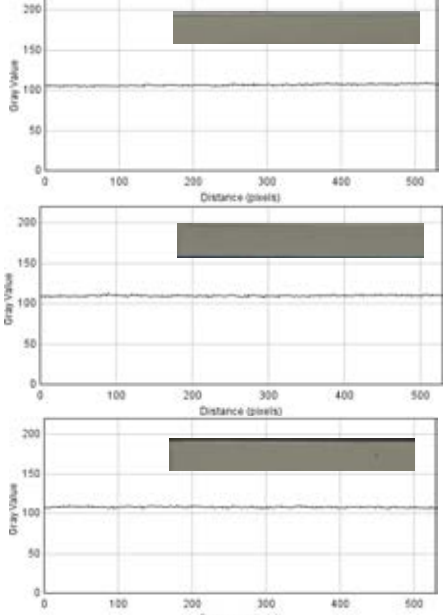
4.4.1 การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่าง Detection probe กับ Capture probe ที่ต่างชุดกัน

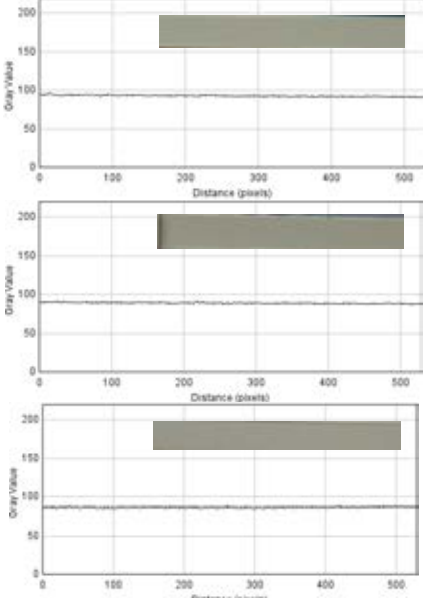
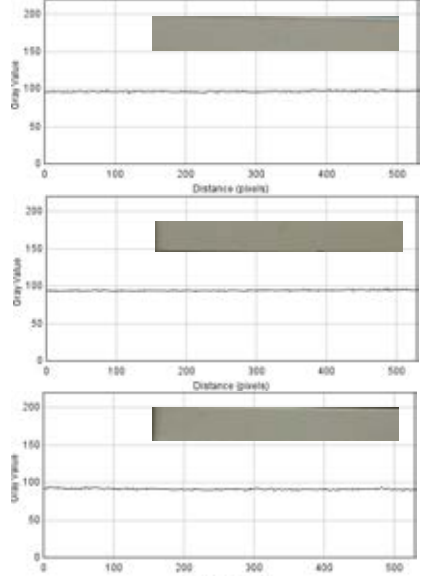
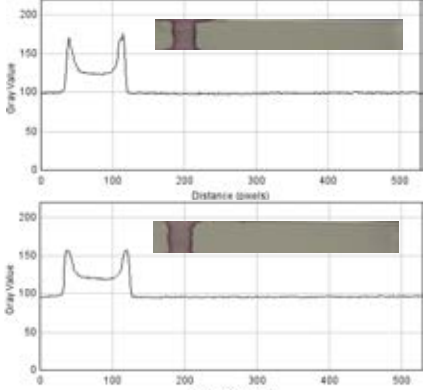
นำ P47_DT, P56_DT และ P60_DT มาทดสอบสลับกับชุด Capture probe ที่ใช้เป็น Test line และ Control line โดยใช้ MQW แทน Synthetic target และใช้ 4xSSC+0.5%SDS เป็น Hybridization buffer (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 4.3) จากผลการทดลองพบว่ามี การเกิด Cross-hybridization ขึ้นเล็กน้อยที่ Control line ระหว่างคู่ P56_DT กับ P47_CL ผลที่ได้มีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 29 และ 30 ซึ่งไม่มีผลต่อการแปลผลของ NALF

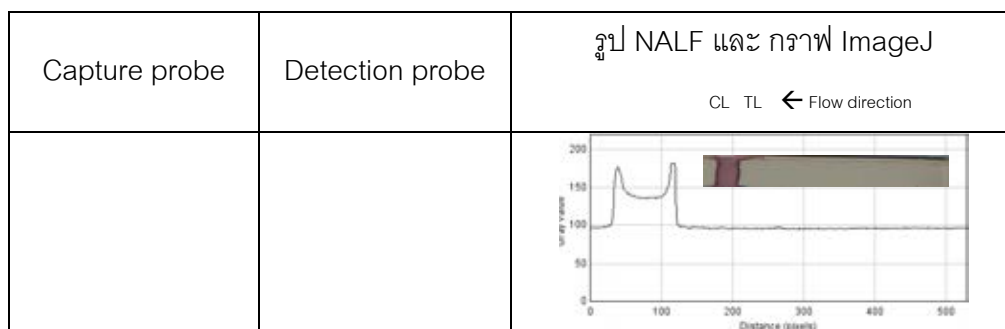
ตารางที่ 29 แสดงผลการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่าง Detection probe กับ Capture probe ที่ต่างชุดกัน

Capture probe	Detection probe	รูป NALF และ กราฟ ImageJ
P47_TL และ P47_CL	P47_DT *	<p>CL TL ← Flow direction</p>
	P56_DT	

Capture probe	Detection probe	<p>รูป NALF และ กราฟ ImageJ</p> <p>CL TL ← Flow direction</p>
	P60_DT	
P56_TL และ P56_CL	P47_DT	

Capture probe	Detection probe	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction
	P56_DT *	
	P60_DT	

Capture probe	Detection probe	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction
	P47_DT	
P60_TL และ P60_CL	P56_DT	
	P60_DT *	



หมายเหตุ * เป็นกลุ่มควบคุมที่ต้องปรากฏเส้นสีแดงที่ Control line เสมอ

ตารางที่ 30 แสดงสรุปผลการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่าง Detection probe กับ Capture probe ที่ต่างชุดกัน (ช่องที่แรเงา คือ ไม่เกิด Cross-hybridization)

Capture probe	Detection probe	ผลการทดลองที่คาดว่าจะเกิดขึ้น		ผลการทดลองที่เกิดขึ้น	
		Test line	Control line	Test line	Control line
P47_TL และ P47_CL	P47_DT *	X	√	X	√
	P56_DT	X	X	X	√
	P60_DT	X	X	X	X
P56_TL และ P56_CL	P47_DT	X	X	X	X
	P56_DT *	X	√	X	√
	P60_DT	X	X	X	X
P60_TL และ P60_CL	P47_DT	X	X	X	X
	P56_DT	X	X	X	X
	P60_DT *	X	√	X	√

หมายเหตุ * เป็นกลุ่มควบคุมที่ต้องปรากฏเส้นสีแดงที่ Control line เสมอ, √ = ปรากฏเส้นสีแดง, X = ไม่ปรากฏเส้นสีแดง

4.4.2 การตรวจสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน

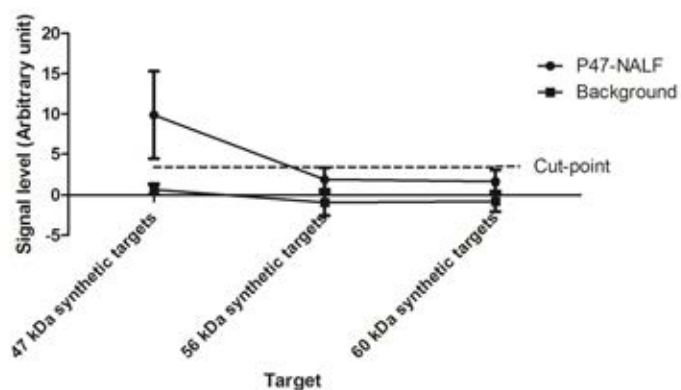
นำ Single detection NALF แต่ละชุดมาทดสอบสลับกับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน โดยใช้ Synthetic target ปริมาณ 125 fmol และใช้ 4xSSC+0.5%SDS เป็น Hybridization buffer (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 4.3) จากผลการทดลองพบว่าไม่เกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน (n=3) (กลุ่ม Negative control จะใช้ MQW แทน Synthetic target) ผลที่ได้มีรายละเอียดดังแสดงใน ตารางที่ 31 และ ภาพที่ 20

ตารางที่ 31 แสดงสรุปผลการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน (ช่องที่แรเงา คือ ไม่เกิด Cross-hybridization)

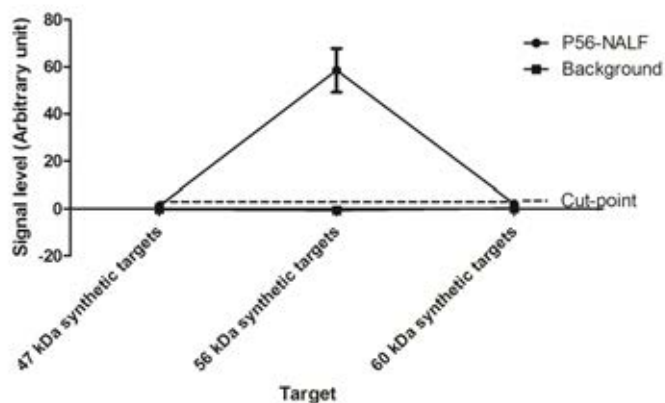
Single detection NALF	Synthetic target	ผลการทดลองที่คาดว่าจะเกิดขึ้น		ผลการทดลองที่เกิดขึ้น	
		Test line	Control line	Test line	Control line
P47-NALF	P56_+VE	X	√	X	√
	P60_+VE	X	√	X	√
	P47_+VE*	√	√	√	√
P56-NALF	P47_+VE	X	√	X	√
	P60_+VE	X	√	X	√
	P56_+VE*	√	√	√	√
P60-NALF	P47_+VE	X	√	X	√
	P56_+VE	X	√	X	√
	P60_+VE*	√	√	√	√

หมายเหตุ * เป็นกลุ่มควบคุมที่ต้องปรากฏเส้นสีแดงทั้งที่ Test line และ Control line เสมอ, √ = ปรากฏเส้นสีแดง, X = ไม่ปรากฏเส้นสีแดง

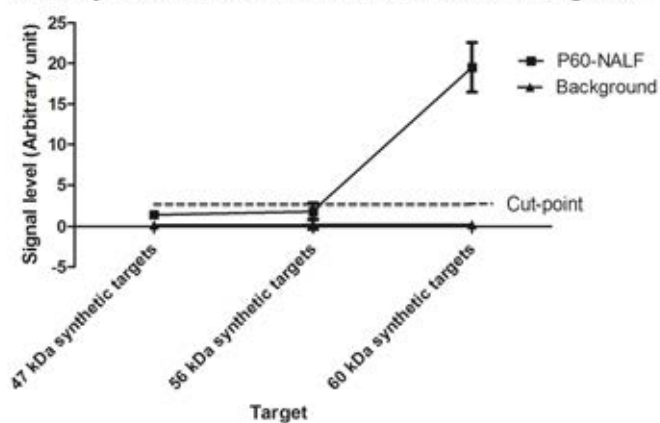
(A) Cross-hybridization between P47-NALF with other target set



(B) Cross-hybridization between P56-NALF with other target set



(C) Cross-hybridization between P60-NALF with other target set



ภาพที่ 20 แสดงกราฟผลการจับคู่ชุด Probe เพื่อทดสอบการเกิด Cross-hybridization ระหว่างชุด Probe กับ Synthetic target ที่ต่างชุดกัน (A) P47-NALF, (B) P56-NALF และ (C) P60-NALF

4.5 การทดสอบหาความไวของ Nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target

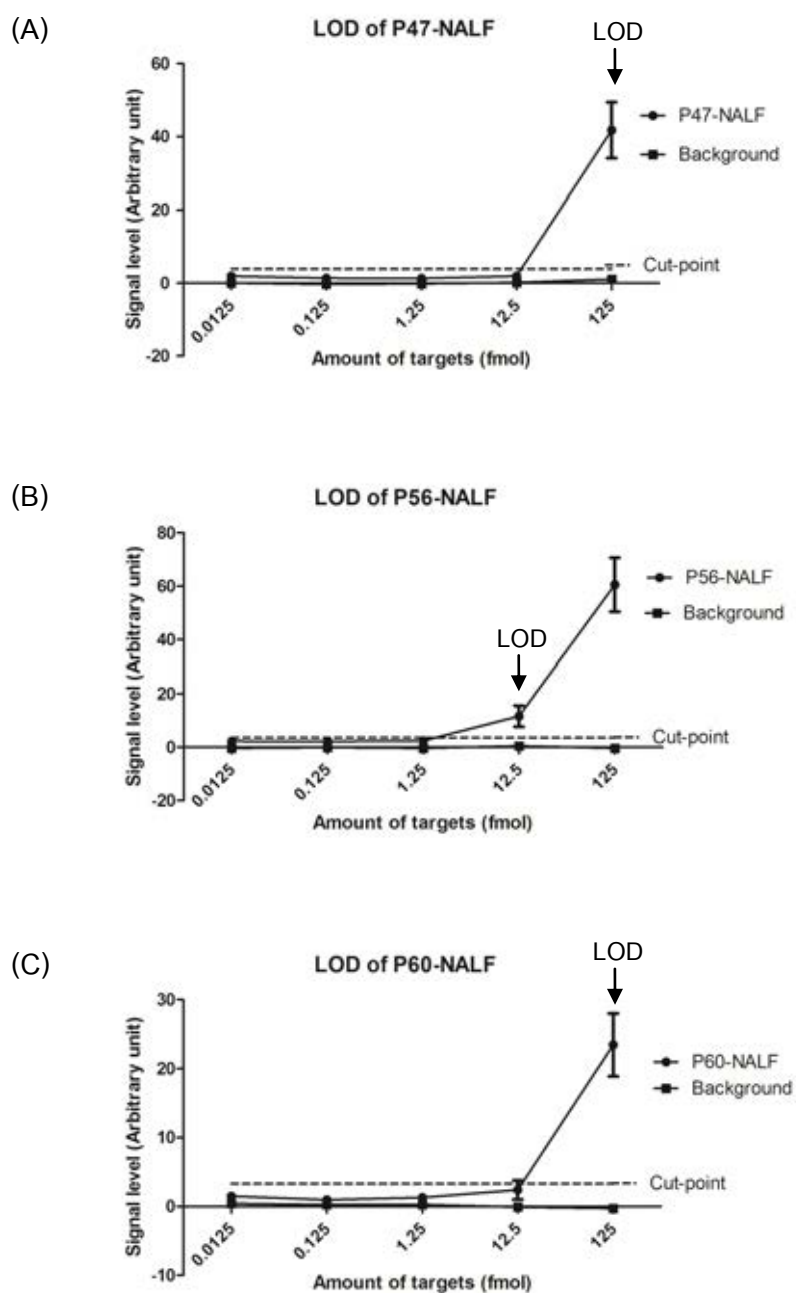
ทดสอบหาความไว (Sensitivity) ของ NALF ด้วย Synthetic target ที่ปริมาณต่างๆ เพื่อดูปริมาณ Synthetic target ต่ำสุดที่สามารถตรวจจับได้ (Limit of detection; LOD)

ตารางที่ 32 แสดงปริมาณ Synthetic target ที่ใช้ทดสอบหาความไวของ NALF และปริมาณเทียบเท่าเป็น Copies

ปริมาณ Synthetic target ที่ใช้ (fmol)	Copies
0.0125	7.53×10^6
0.125	7.53×10^7
1.25	7.53×10^8
12.5	7.53×10^9
125	7.53×10^{10}

4.5.1 การทดสอบหาความไวของ Single detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target

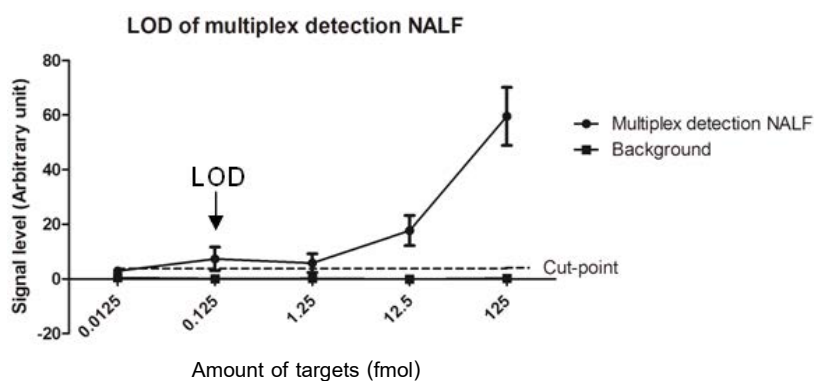
นำ Single detection NALF ทั้ง 3 ชุดมาทดสอบกับ Synthetic target ปริมาณต่างๆ และใช้ 4xSSC+0.5%SDS เป็น Hybridization buffer (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 4.3) กลุ่ม Negative control จะใช้ MQW แทน Synthetic target โดย LOD จะตัดสินจาก Signal level ที่มีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ย Signal level จาก Negative control+3SD (n=3) [58] ผลการทดลองพบว่า P47-NALF, P56-NALF และ P60-NALF มีค่า LOD เท่ากับ 125 fmol (41.76 ± 7.65 a.u. เทียบเท่ากับ 7.53×10^{10} copies) ,12.5 fmol (11.59 ± 3.95 a.u. เทียบเท่ากับ 7.53×10^9 copies) และ 125 fmol (23.45 ± 4.58 a.u. เทียบเท่ากับ 7.53×10^{10} copies) โดยเกณฑ์ตัดสิน LOD ที่ใช้เท่ากับ 3.86, 3.52 และ 3.28 a.u. ตามลำดับ



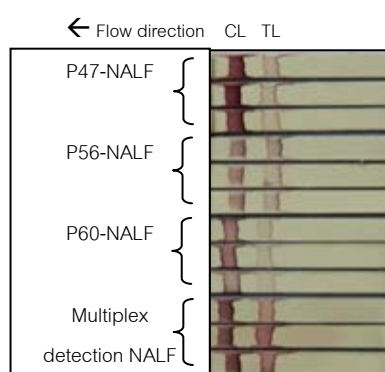
ภาพที่ 21 กราฟแสดงค่า LOD ของ Single detection NALF ของ (A) P47-NALF, (B) P56-NALF และ (C) P60-NALF เมื่อทดสอบด้วย Synthetic target ที่ปริมาณ 0.0125, 0.125, 1.25, 12.5 และ 125 fmol

4.5.2 การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection Nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Synthetic target

ผลการทดลองพบว่า Multiplex detection NALF มีค่า LOD เท่ากับ 0.125 fmol (7.36 ± 4.26 a.u. เทียบเท่ากับ 7.53×10^7 copies โดยเกณฑ์ตัดสินที่ใช้เท่ากับ 3.76 a.u.) และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า LOD ของ Single detection NALF พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นจาก P47-NALF และ P60-NALF 1,000 เท่า และเพิ่มขึ้นจาก P56-NALF 100 เท่า



ภาพที่ 22 กราฟแสดงค่า LOD ของ Multiplex detection NALF เมื่อทดสอบด้วย Synthetic target ที่ปริมาณ 0.0125, 0.125, 1.25, 12.5 และ 125 fmol



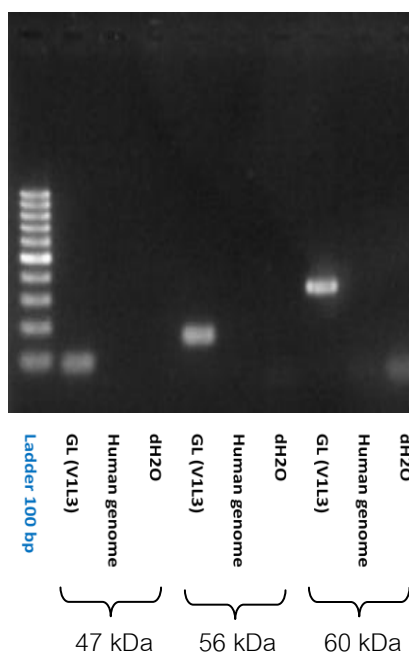
ภาพที่ 23 แสดง รูป NALF ชนิดต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบกับ Synthetic target 125 fmol (n=3)

4.6 การทำ Multiplex PCR ของเชื้อ *Orientia tsutsugamushi*

จากผลการทดลองหาค่า LOD ในหัวข้อ 4.5 ปริมาณขั้นต่ำที่ Multiplex detection NALF จะตรวจจับได้ คือ 7.53×10^7 copies แต่ปริมาณเชื้อที่พบในตัวอย่างเลือดมีประมาณ 5-10 copies/ μ l [10] ในงานวิจัยครั้งนี้จึงจำเป็นต้องนำ Genomic DNA (gDNA) ที่ได้จากเชื้อ *O. tsutsugamushi* หรือ Clinical sample มาเพิ่มจำนวนลำดับเบสเป้าหมายด้วยการทำ Multiplex PCR ก่อนนำไปทดสอบกับ Multiplex detection NALF

4.6.1 การทดลองหาสภาวะของ Multiplex PCR ที่เหมาะสมด้วย Single PCR

ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมเริ่มแรกของ Multiplex PCR ด้วย Single PCR จากผลของ Gel electrophoresis พบว่าขนาด PCR product ของ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) (positive control) มีขนาดถูกต้องตามที่ได้ออกแบบไว้ คือ 47 kDa Ag (86 bp), 56 kDa Ag (166 bp) และ 60 kDa Ag (334 bp) และไม่พบ Band ปรากฏใน Healthy human (Negative control)

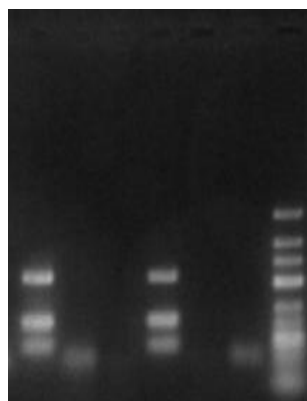


ภาพที่ 24 แสดงผล Gel electrophoresis ของ Single PCR โดยใช้เชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) ได้ PCR product 3 ขนาด ได้แก่ 47 kDa Ag (86 bp), 56 kDa Ag (166 bp) และ 60 kDa Ag (334 bp) และมี Healthy human เป็น Negative control

4.6.2 การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของ Multiplex PCR

การปรับ Extension time

เมื่อทดลองทำ Multiplex PCR เพื่อเปรียบเทียบผลจากการใช้ Extension time นาน 1 นาที และ 30 วินาที พบว่าการใช้ Extension time 30 วินาทีจะให้ band ที่ชัดเจนกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ O. Henegariu และคณะ [62] ที่พบว่า PCR product ขนาด 100-300 bp จะมีความคมชัดเพิ่มขึ้นเมื่อลด Extension time ลง และไม่พบ Band ปรากฏใน Healthy human (Negative control)



GL (V1L3)
Human genome
DH2O

GL (V1L3)
Human genome
DH2O

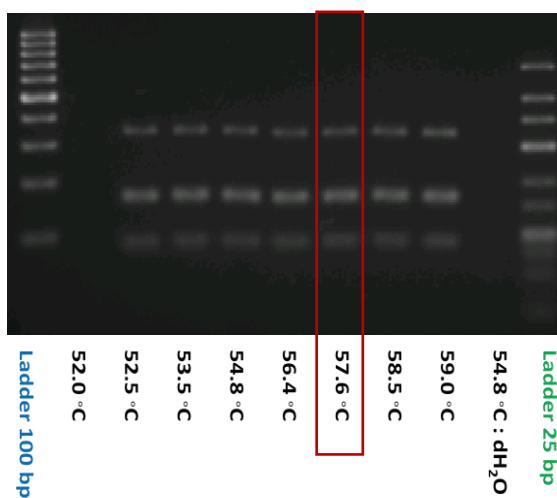
Ladder 25 bp

Extension time : (A) 1 min (B) 30 sec

ภาพที่ 25 แสดงผล Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR เมื่อใช้ Extension time (A) 1 นาที และ (B) 30 วินาที โดยใช้เชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) เป็น Template และมี Healthy human เป็น Negative control

การทำ Gradient PCR

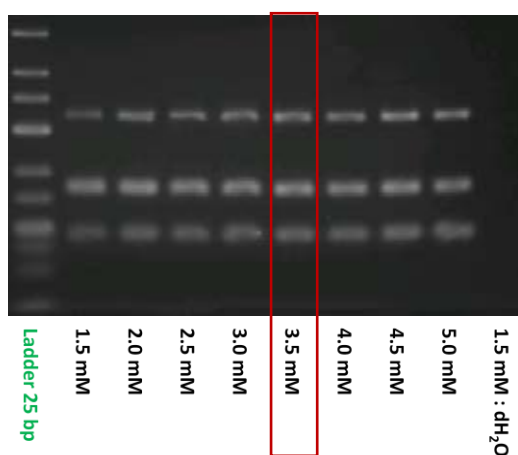
จากผลการทดลองทำ Multiplex PCR ที่ Annealing temperature ต่างๆ ได้แก่ 52.0, 52.5, 53.5, 54.8, 56.4, 57.6, 58.5 และ 59.0 °C โดยใช้ gDNA ของ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) พบว่า Annealing temperature ที่ให้ PCR product ทั้ง 3 ขนาดได้มากที่สุด คือ 57.6 °C และไม่เกิด Nonspecific product



ภาพที่ 26 แสดงผล Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR ที่ Annealing temperature ต่างๆ โดยใช้เชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) เป็น Template

การปรับปริมาณ $MgCl_2$

จากผลการทดลองปรับปริมาณ $MgCl_2$ ที่ใช้ใน Multiplex PCR ดังนี้ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 mM โดยใช้ gDNA ของ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) พบว่าปริมาณ $MgCl_2$ 3.5 mM ให้ PCR product ทั้ง 3 ขนาดได้มากที่สุด และไม่เกิด Nonspecific product



ภาพที่ 27 แสดงผล Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR ที่ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้เชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) เป็น Template

จากผลการทดลอง จึงสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการทำ Multiplex PCR ได้ดังรายละเอียดตามตารางที่ 33

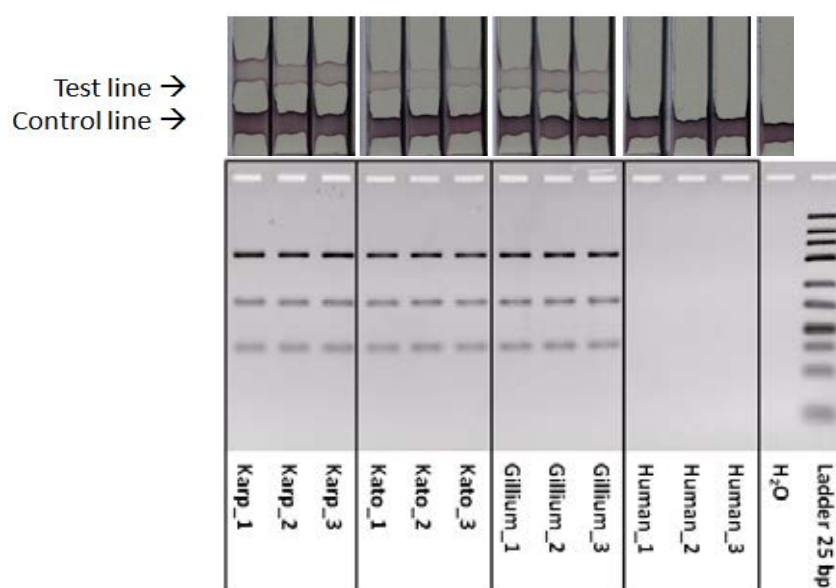
ตารางที่ 33 แสดงสภาวะที่ใช้เตรียม Multiplex PCR

Reagent	Volumn/ Reaction (μ l)	Final concentration
10xPCR buffer	2	1x
25 mM $MgCl_2$	1.6	3.5 mM
dNTP (10 mM each)	0.4	200 μ M each
Forward primer (25 μ M)	0.32/ each	0.4 μ M
Reverse primer (25 μ M)	0.32/ each	0.4 μ M
HotstarTaq (5U/ μ l)	0.1	0.5 U/Reaction
dH ₂ O	-	-
Template	-	-
Total	20	-

Step	Temp., Time	Cycles
Initial activation	95 °C, 15 min	1
Denaturation	94 °C, 30 sec	} 35
Annealing	57.6 °C, 1 min	
Extension	72 °C, 30 sec	
Final extension	72 °C, 10 min	1

4.7 การทดลองนำ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test มาทดสอบกับเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ต่างๆ

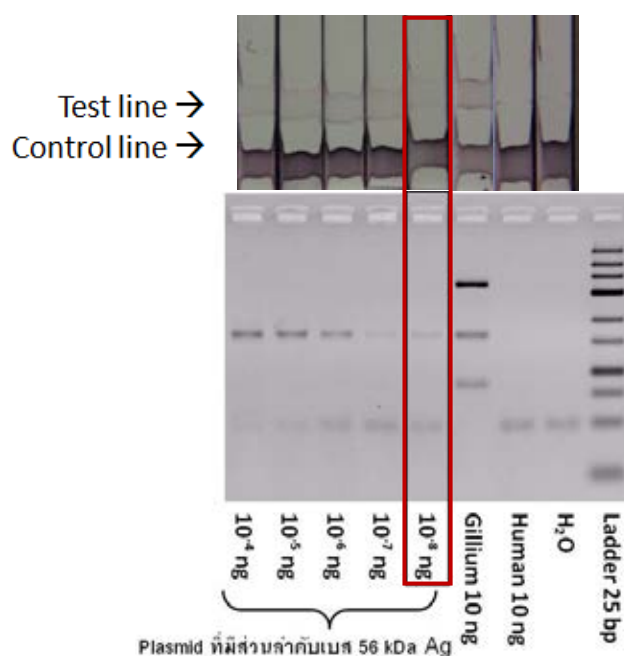
จากผลการทดลองพบว่า Multiplex detection NALF สามารถตรวจคัดกรองหาเชื้อ *O. tsutsugamushi* ได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Karp, Kato และ Gilliam และให้ผลเป็นลบในกลุ่ม Negative control ที่ใช้ gDNA ของ Healthy human เป็น Template (n=3) และมีผลสอดคล้องกับผล Gel electrophoresis จาก Multiplex PCR



ภาพที่ 28 แสดงผล Multiplex detection NALF (แถบบน) และ Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR (แถบล่าง) ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Karp, Kato และ Gilliam โดยใช้ Human genomic DNA เป็น Negative control (n=3)

4.8 การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วย Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบสของ 56 kDa antigen

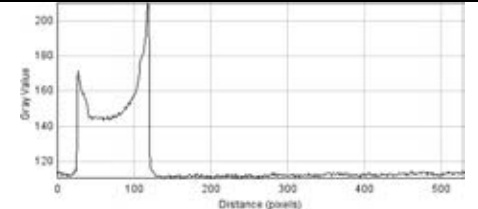
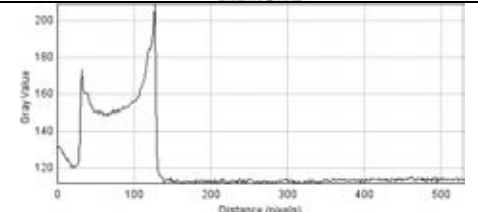
เมื่อนำ Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบสของ 56 kDa antigen มาทำ Multiplex PCR โดยมี gDNA ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain; 10 ng) เป็น Positive control และ gDNA ของ Healthy human (10 ng) เป็น Negative control พบว่าปริมาณของ Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบส 56 kDa antigen ที่ต่ำสุด (Limit of detection; LOD) ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วย Multiplex detection NALF คือ 1×10^{-8} ng หรือเท่ากับ 2.85×10^{-24} mol หรือเท่ากับ 1.72 copies เช่นเดียวกับผล Gel electrophoresis จาก Multiplex PCR



ภาพที่ 29 แสดงผล Multiplex detection NALF (แถวบน) และ Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR (แถวล่าง) ของ Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบส 56 kDa antigen สอดแทรกในปริมาณต่างๆ เพื่อหาปริมาณต่ำสุด (Limit of detection) ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วย Multiplex detection NALF โดยมี Human genomic DNA เป็น Negative control

ตารางที่ 34 แสดงปริมาณต่างๆ ของ Plasmid ที่ใช้ทดสอบความไวของ Multiplex detection NALF ด้วย Plasmid ที่มีส่วนลำดับเบส 56 kDa antigen สอดแทรก และกราฟแสดงระดับสัญญาณจากโปรแกรม ImageJ (CL = Control line, TL = Test line)

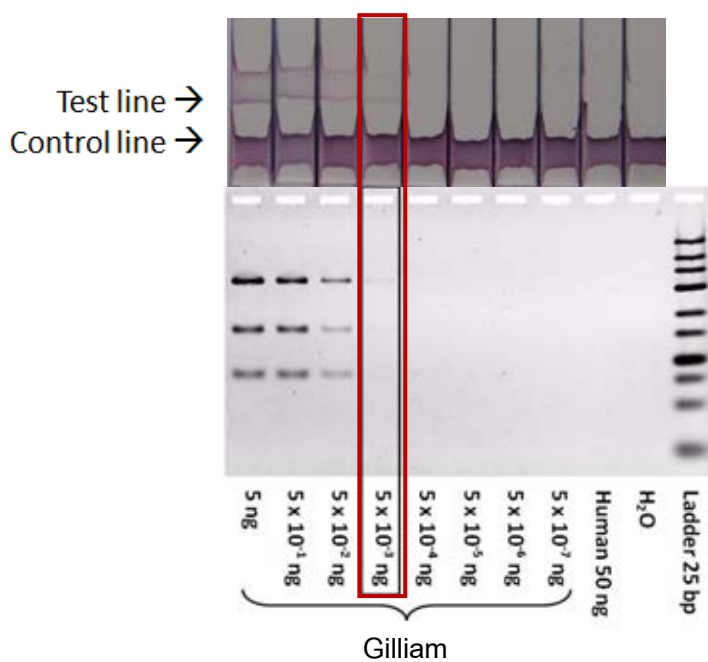
Template : Plasmid (1 copy = 5,400 bp)			รูป NALF และ กราฟ ImageJ
(ng)	(mol)	(copies)	
1×10^{-4}	2.85×10^{-20}	1.72×10^4	
1×10^{-5}	2.85×10^{-21}	1.72×10^3	
1×10^{-6}	2.85×10^{-22}	1.72×10^2	
1×10^{-7}	2.85×10^{-23}	1.72×10^1	
1×10^{-8}	2.85×10^{-24}	1.72×10^0	
<i>O. tsutsugamushi</i> (Positive control)			

Template : Plasmid (1 copy = 5,400 bp)			รูป NALF และ กราฟ ImageJ	
(ng)	(mol)	(copies)	CL	TL
Healthy human (Negative control)				
H ₂ O				

4.9 การทดสอบหาความไวของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test ด้วยเชื้อ *Orientia tsutsugamushi*

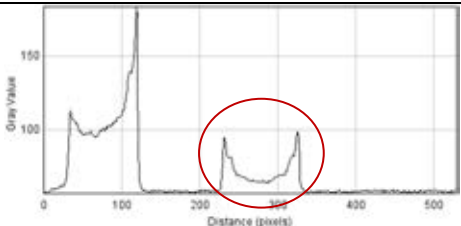
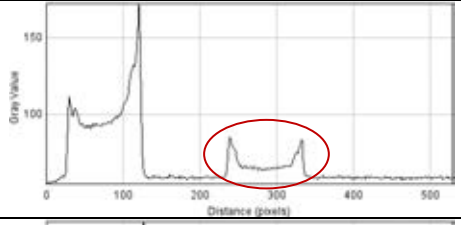
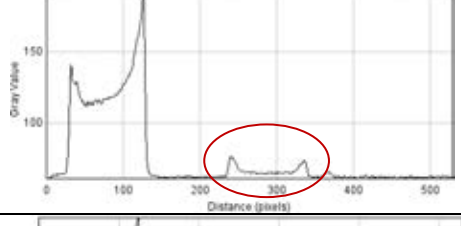
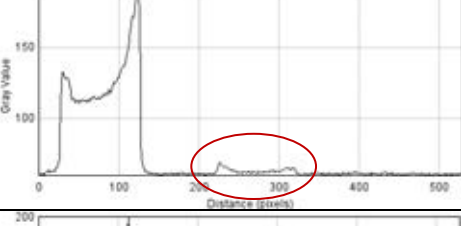
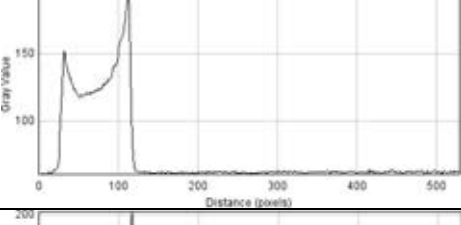
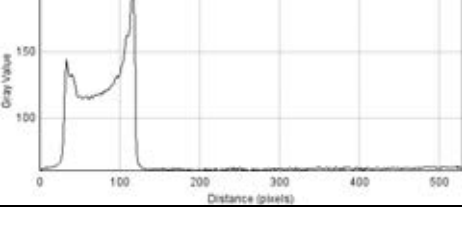
จากการทดลองนำ gDNA ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) มาทำ Multiplex PCR และนำ PCR product ทดสอบกับ Multiplex detection NALF โดยมี Healthy human (50 ng) เป็น Negative control พบว่าปริมาณเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) ที่ต่ำสุด (Limit of detection) ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วย Multiplex detection NALF คือ 5×10^{-3} ng หรือเท่ากับ 3.83×10^{-21} mol หรือเท่ากับ 2,310 copies สอดคล้องกับผลของ Gel electrophoresis

หมายเหตุ : ปริมาณ Template เริ่มต้นที่ใช้ในการทำ PCR จะรวม DNA ของ Vero cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วย



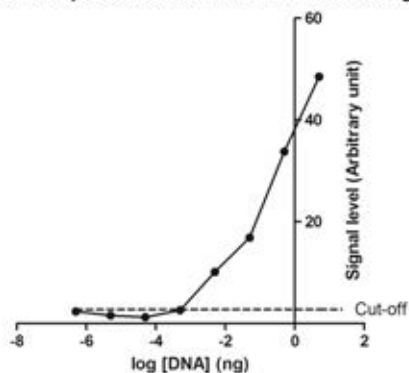
ภาพที่ 30 แสดงผล Multiplex detection NALF (แถบบน) และ Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR (แถบล่าง) ของ เชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) ในปริมาณต่างๆ เพื่อหาปริมาณต่ำสุด (Limit of detection) ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วย Multiplex detection NALF โดยมี Healthy human เป็น Negative control

ตารางที่ 35 แสดงปริมาณต่างๆ ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) ที่ใช้ทดสอบความไวของ Multiplex detection NALF และกราฟแสดงระดับสัญญาณจากโปรแกรม ImageJ (CL = Control line, TL = Test line)

Template : <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) (1 copy = 2,008,987 bp*)			รูป NALF และ กราฟ ImageJ
(ng)	(mol)	(copies)	CL TL
5×10^0	3.83×10^{-18}	2.31×10^6	
5×10^{-1}	3.83×10^{-19}	2.31×10^5	
5×10^{-2}	3.83×10^{-20}	2.31×10^4	
5×10^{-3}	3.83×10^{-21}	2.31×10^3	
5×10^{-4}	3.83×10^{-22}	2.31×10^2	
5×10^{-5}	3.83×10^{-23}	2.31×10^1	

Template : <i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam strain) (1 copy = 2,008,987 bp*)			รูป NALF และ กราฟ ImageJ
(ng)	(mol)	(copies)	CL TL
5×10^{-6}	3.83×10^{-24}	2.31×10^0	
5×10^{-7}	3.83×10^{-25}	2.31×10^{-1}	
Healthy human (Negative control)			
H ₂ O			

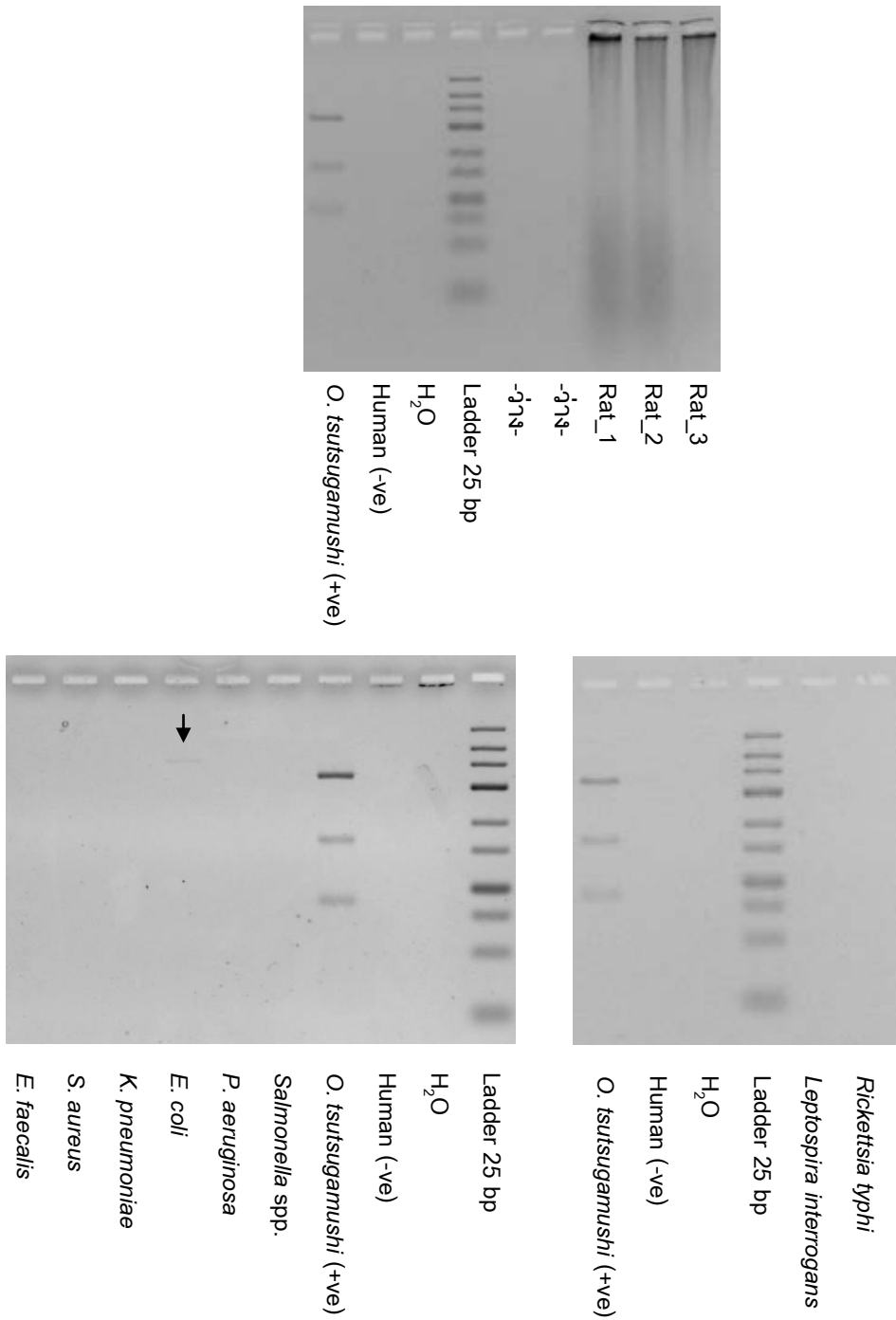
หมายเหตุ : ขนาด Whole genome ที่นำมาใช้คำนวณอ้างอิงจากสายพันธุ์ Ikeda [59] เนื่องจากไม่มีข้อมูลของสายพันธุ์ Gilliam

Sensitivity of multiplex detection NALF with *O. tsutsugamushi*

ภาพที่ 31 แสดง Signal level เมื่อทดสอบ Multiplex detection NALF ด้วยเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Gilliam strain) ในปริมาณต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ (ค่าตัดสินค้านวนจาก Negative control ที่ใช้น้ำจาก Multiplex PCR)

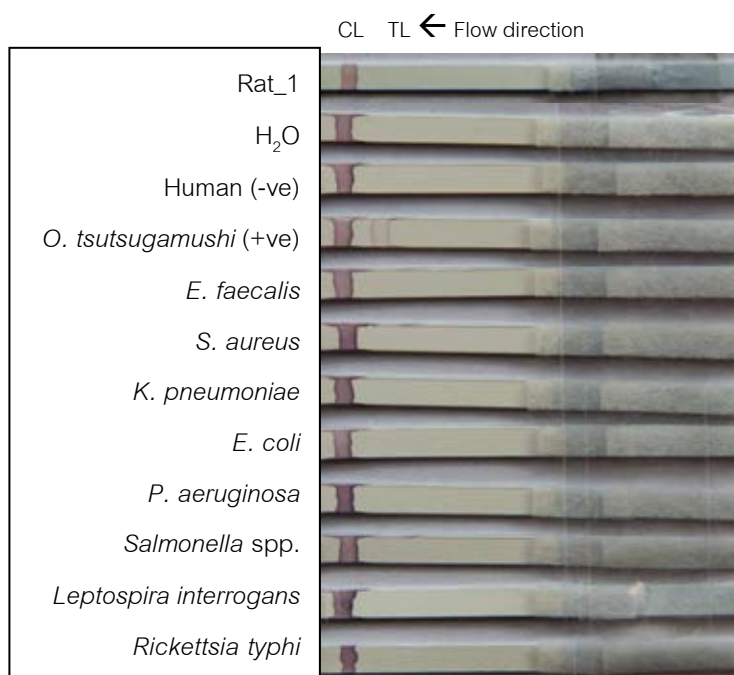
4.10 การทดสอบความจำเพาะของ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test กับตัวอย่าง DNA จากตับหนูและเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

เมื่อนำตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้จากตับหนูซึ่งจัดเป็น Host ของเชื้อสรีบัตยพัสชนิดหนึ่ง และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *E. faecalis* (Gram positive), *S. aureus* (Gram positive), *K. pneumonia* (Gram negative), *E. coli* (Gram negative), *P.aeruginosa* (Gram negative), *Salmonella spp.* (Gram negative), *L. interrogans* (Gram negative) และ *R. typhi* (Gram negative) มาทดสอบกับ Multiplex detection NALF เพื่อดูความจำเพาะในการตรวจคัดกรองโรค จากผล Gel electrophoresis จาก Multiplex PCR พบว่าตัวอย่าง DNA จากตับหนูเกิดเป็น smear และ DNA จากเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ไม่มี band ปรากฏบนเจล ยกเว้น *E.coli* ที่มี band งามๆ บนเจล ขนาดมากกว่า 400 bp ซึ่งไม่ตรงกับขนาด PCR product ที่ต้องการ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Positive control ที่ใช้ *O. tsutsugamushi* เป็น Template



ภาพที่ 32 แสดงผล Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR ของตัวอย่าง DNA จากตับหนูและเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เปรียบเทียบกับเชื้อ *O. tsutsugamushi* (Positive control) และ Healthy human (Negative control) (ลูกศร คือ Non-specific band ของ *E.coli* ที่มีขนาดมากกว่า 400 bp)

หลังจากนั้นนำ PCR product มาทดสอบกับ Multiplex detection NALF พบว่าตัวอย่าง DNA จากตับหนู แบคทีเรียทั้ง 8 ชนิด และ Human (Negative control) ให้ผลเป็นลบทั้งหมด ส่วน *O. tsutsugamushi* ให้ผลเป็นบวก ดังแสดงในภาพที่ 33 แสดงว่า Multiplex detection NALF มีความจำเพาะในการตรวจคัดกรองโรคสครับทัยฟัส



ภาพที่ 33 แสดงผลของ Multiplex detection NALF ที่นำมาทดสอบกับ PCR product ของตัวอย่าง DNA จากตับหนู และเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยมีเชื้อ *O. tsutsugamushi* เป็น Positive control และ Human เป็น Negative control (CL = Control line, TL = Test line)

4.11 การนำ Clinical sample มาทดสอบกับ Multiplex detection nucleic acid lateral flow strip test

เมื่อนำตัวอย่างเลือดจำนวน 55 ตัวอย่างมาสกัด DNA แล้วทดสอบกับ Duplex nested PCR โดยมีเชื้อ *O. tsutsugamushi* เป็น Positive control และ Healthy human เป็น Negative control ผลการทดลองพบว่ามี 25 ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก (เป็นโรค) และ 30 ตัวอย่างที่เป็นลบ (ไม่เป็นโรค) และเมื่อนำมาทดสอบกับ Multiplex detection NALF พบว่ามี 25 ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกและ 30 ตัวอย่างที่เป็นลบ ดังมีรายละเอียดแสดงในตารางที่ 36 นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า Sensitivity, Specificity, Positive predictive value (PPV), Negative predictive value (NPV), Pre-test likelihood, Post-test likelihood และ Likelihood ratio

ตารางที่ 36 แสดงรายละเอียดผลการทดสอบตัวอย่างเลือดด้วย Multiplex detection NALF เทียบกับวิธี Duplex nested PCR

วิธีตรวจ/ ผลการทดสอบ		Duplex nested PCR		รวม
		จำนวนตัวอย่างที่เป็นโรค	จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นโรค	
Multiplex detection NALF	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก	(a) 23	(b) 2	(a+b) 25
	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบ	(c) 2	(d) 28	(c+d) 30
	รวม	(a+c) 25	(b+d) 30	(a+b+c+d) 55

ผลการคำนวณค่าต่างๆ มีดังนี้

- ค่าความไว (Sensitivity) = $a / (a+c) = 23 / 25 = 0.92$
หมายถึง สัดส่วนของผู้ป่วยที่ทำการทดสอบแล้วให้ผลเป็นบวกเท่ากับร้อยละ 92
- ความจำเพาะ (Specificity) = $d / (b+d) = 28 / 30 = 0.93$
หมายถึง สัดส่วนของผู้ที่ไม่ได้ป่วยทำการทดสอบแล้วให้ผลเป็นลบเท่ากับร้อยละ 93
- ค่าพยากรณ์บวก (Positive predictive value; PPV) = $a / (a+b) = 23 / 25 = 0.92$
หมายถึง โอกาสของบุคคลที่มีผลการทดสอบเป็นบวกจะป่วยเป็นโรคจริงเท่ากับร้อยละ 92
- ค่าพยากรณ์ลบ (Negative predictive value; NPV) = $d / (c+d) = 28 / 30 = 0.93$

หมายถึง โอกาสของบุคคลที่มีผลการทดสอบเป็นลบจะไม่ป่วยเป็นโรคจริงเท่ากับร้อยละ 93

- Pre-test likelihood = $(a+c) / (a+b+c+d) = 25 / 55 = 0.45$

หมายถึง โอกาสที่ผู้ป่วยจะเป็นโรคสครับทัยฟัสเท่ากับร้อยละ 45 ของกลุ่มตัวอย่าง

- Post-test likelihood (if test negative) = $c / (c+d) = 2 / 30 = 0.07$

หมายถึง โอกาสที่บุคคลนั้นจะเป็นโรคแต่ให้ผลการทดสอบเป็นลบเท่ากับร้อยละ 7

จากผล PPV และ Post-test likelihood (if test negative) นี้จึงนำมาใช้อธิบายได้ว่า หากผู้ป่วยให้ผลการทดสอบเป็นบวก จะเพิ่มโอกาสของการเป็นโรคจากความเชื่อมั่นเดิมร้อยละ 45 เป็นร้อยละ 92 (จากค่า PPV) แต่ถ้าหากผลการทดสอบเป็นลบ จะลดโอกาสที่จะเป็นโรคจากความเชื่อมั่นเดิมจากร้อยละ 45 เป็นร้อยละ 7 (จากค่า Post-test likelihood (if test negative))

- Likelihood ratio positive (LR+) = Sensitivity / (1-Specificity)

$$= a (b+d) / b (a+c) = 23 (30) / 2 (25) = 13.80$$

หมายถึง โอกาสของคนที่เป็นโรคจะให้ผลการทดสอบเป็นบวกเป็น 13.80 เท่าของคนที่ไม่เป็นโรค

$$\text{Pre-test probability} = (a+c) / (a+b+c+d) = 25 / 55 = 0.45$$

$$\text{Pre-test odd} = \text{Pre-test probability} / (1- \text{Pre-test probability})$$

$$= 0.45 / (1-0.45) = 0.82$$

$$\text{Post-test odd} = (\text{LR+}) \times \text{Pre-test odd} = 13.8 \times 0.82 = 11.32$$

$$\text{Post-test probability} = \text{Post-test odd} / (\text{Post-test odd}+1)$$

$$= 11.32 / (11.32+1) = 0.92$$

ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่าโอกาสที่บุคคลนี้จะเป็นโรคสครับทัยฟัสเท่ากับร้อยละ 92 เมื่อผลการทดสอบเป็นบวก แสดงว่าการทดสอบนี้ช่วยแพทย์ในการคัดกรองได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับความเชื่อมั่นเดิมที่ทราบว่าผู้ป่วยจะมีโอกาสเป็นโรคสครับทัยฟัสเท่ากับร้อยละ 45 และเมื่อผ่านการทดสอบด้วย Multiplex detection NALF จะมีความเชื่อมั่นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 92 ว่าบุคคลนี้ป่วยเป็นโรคเมื่อพบว่าได้ผลเป็นบวก

- Likelihood ratio positive (LR-) = (1-Sensitivity) / Specificity

$$= c (b+d) / d (a+c) = 2 (30) / 28 (25) = 0.09$$

หมายถึง โอกาสของคนที่เป็นโรคจะให้ผลการทดสอบเป็นลบเป็น 0.09 เท่าของคนที่ไม่เป็นโรค

$$\text{Pre-test probability} = (a+c) / (a+b+c+d) = 25 / 55 = 0.45$$

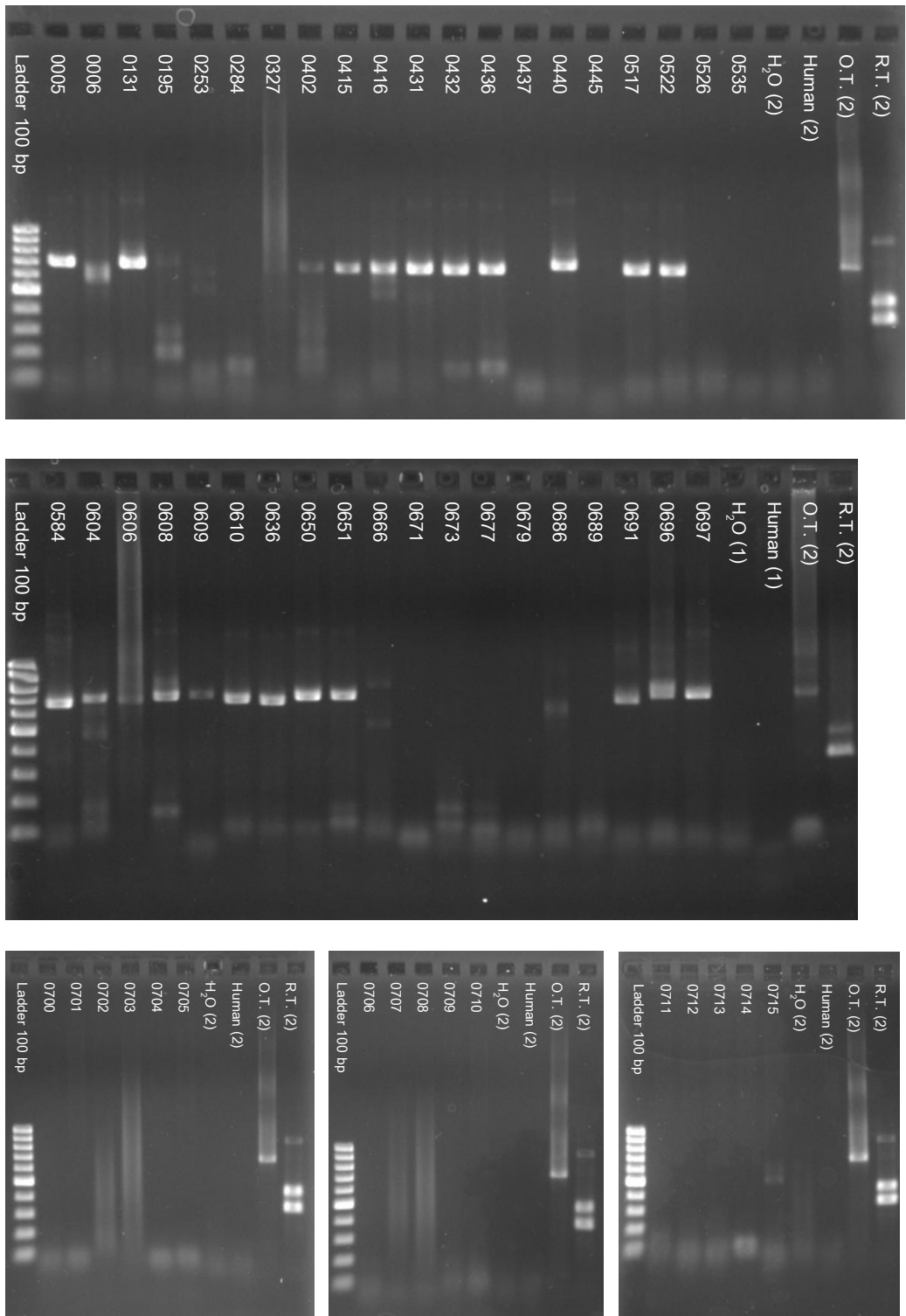
$$\begin{aligned} \text{Pre-test odd} &= \text{Pre-test probability} / (1 - \text{Pre-test probability}) \\ &= 0.45 / (1 - 0.45) = 0.82 \end{aligned}$$

$$\text{Post-test odd} = (\text{LR-}) \times \text{Pre-test odd} = 0.09 \times 0.82 = 0.07$$

$$\begin{aligned} \text{Post-test probability} &= \text{Post-test odd} / (\text{Post-test odd} + 1) \\ &= 0.07 / (0.07 + 1) = 0.07 \end{aligned}$$

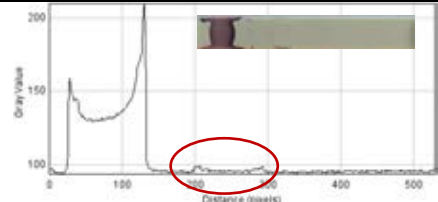
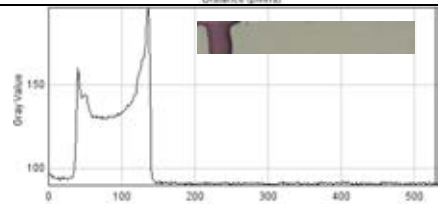


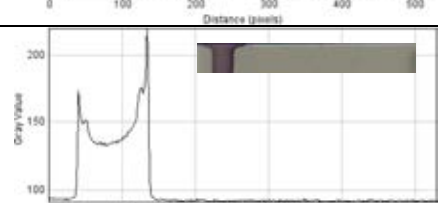
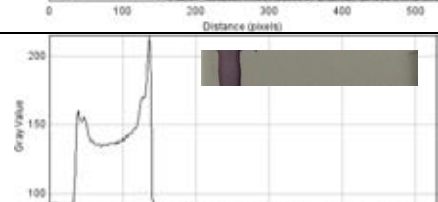
ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่าโอกาสที่บุคคลนี้จะ เป็นโรคสครับทัยฟัสเท่ากับร้อยละ 7 เมื่อผลการทดสอบเป็นลบ แสดงว่าการทดสอบนี้ช่วยแพทย์ในการคัดกรองได้ เมื่อเปรียบเทียบกับความเชื่อมั่นเดิมที่ทราบว่าผู้ป่วยจะมีโอกาสเป็นโรคสครับทัยฟัสเท่ากับร้อยละ 45 และเมื่อผ่านการทดสอบด้วย Multiplex detection NALF จะมีความเชื่อมั่นเหลือเป็นร้อยละ 7 ว่าบุคคลนี้ป่วยเป็นโรคเมื่อพบว่าได้ผลเป็นลบ [60,61]

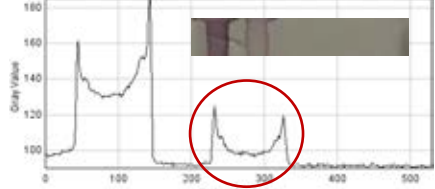
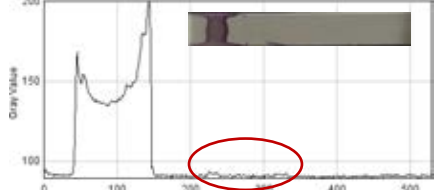

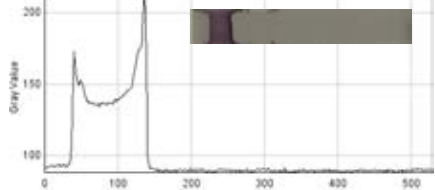


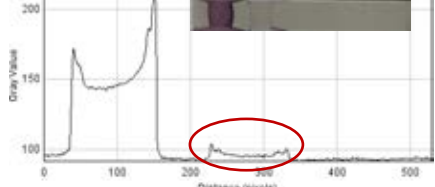
ทั้งนี้จำนวนตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคสครับทัยฟัสที่ใช้มีจำนวนน้อยกว่าจำนวนประชากรที่ได้กำหนดไว้ ซึ่งจากการคำนวณจะต้องใช้ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยทั้งสิ้นจำนวน 35 คน โดยทางผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างเลือดจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร กรมแพทย์ทหารบก (AFRIMS) ที่เคยทำ Duplex nested PCR แล้วได้ผลบวกมาทั้งสิ้น 39 ตัวอย่าง แต่เมื่อนำตัวอย่างเลือดนำมาสกัด DNA ใหม่แล้วทำ Duplex nested PCR ซ้ำ พบว่ามีเพียง 25 ตัวอย่างเท่านั้นที่ให้ผลบวก ทั้งนี้อาจเกิดจากเป็นตัวอย่างเลือดเก่าที่เก็บไว้นาน (พ.ศ. 2546) ทำให้การสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดได้ Yield ที่ลดลง หรือเกิดจากขั้นตอนการสกัด DNA ที่เป็นการสุ่มตัวอย่างเลือดออกมาเพียงบางส่วนเท่านั้น ทำให้ผลที่ได้แตกต่างไปจากเดิม นอกจากนี้ยังจะต้องใช้ผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุทั้งหมด 467 คน หรือใช้ตัวอย่างเลือดของประชากร 35,000 คน (เมื่ออุบัติการณ์ของโรคสครับทัยฟัสคิดเป็นร้อยละ 7.5 ของผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ [6] และอุบัติการณ์ของโรคสครับทัยฟัสคิดเป็นร้อยละ 0.01 ของประชากร [63]) เพื่อมาใช้ในการคำนวณเพื่อหาค่าวิเคราะห์ประสิทธิภาพทางสถิติ แต่ด้วยระยะเวลาในการศึกษาที่จำกัด จึงไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยได้ครบตามจำนวน ดังนั้นตัวอย่างเลือดที่ใช้จริงในงานวิจัยจึงแบ่งเป็นตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคสครับทัยฟัสจำนวน 25 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดผู้ที่มีสุขภาพดีจำนวน 30 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Duplex nested PCR

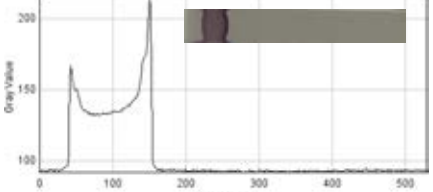
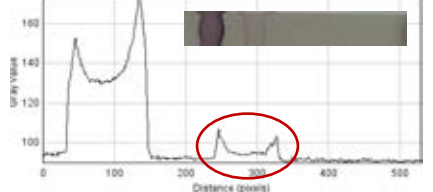


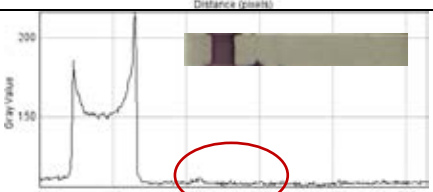
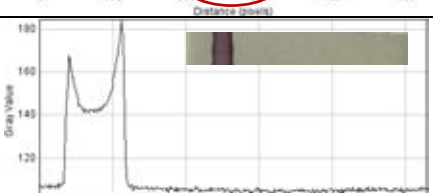
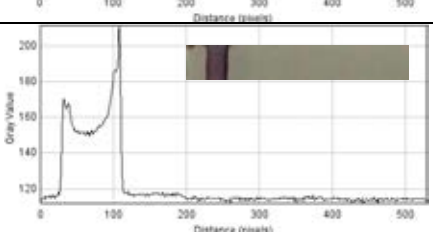


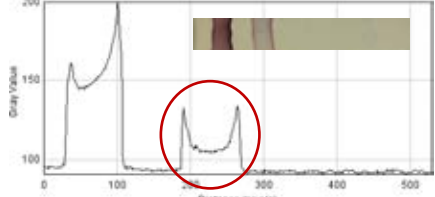
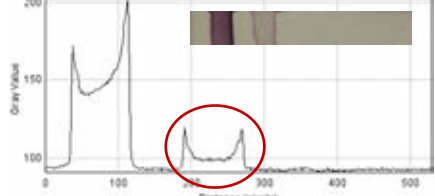
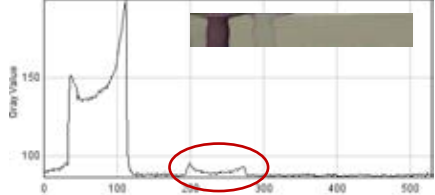
ภาพที่ 34 แสดงผล Gel electrophoresis ของ Duplex nested PCR ของตัวอย่างเลือดจำนวน 55 ตัวอย่าง โดยมีเชื้อ *O. tsutsugamushi* (O.T.) และ *Rickettsia honei* (R.T.) เป็น Positive control และ Healthy human เป็น Negative control

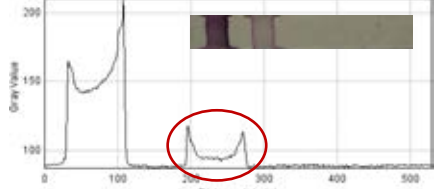
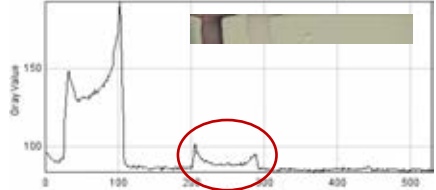
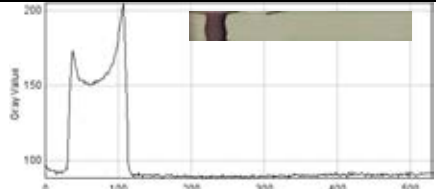

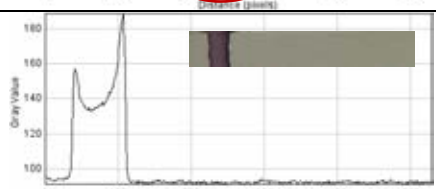

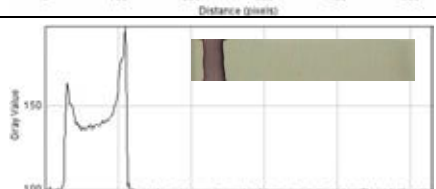
ตารางที่ 37 แสดงผล Multiplex detection NALF และกราฟจากโปรแกรม ImageJ ของตัวอย่างเลือดจำนวน 55 ตัวอย่าง โดยมีเชื้อ *O. tsutsugamushi* เป็น Positive control และ Healthy human เป็น Negative control

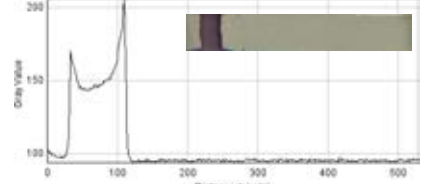
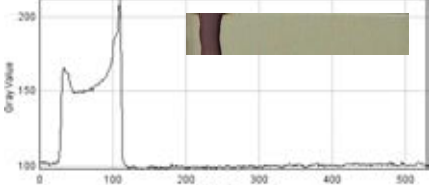


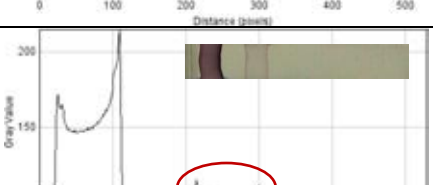
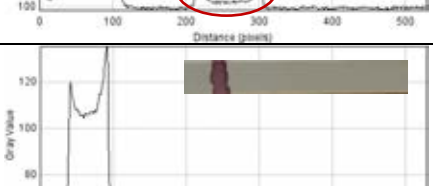
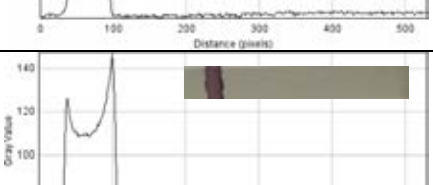
Sample ID	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction	ผล Duplex nested PCR	ผล Multiplex detection NALF
0005		+	+
0006		-	-
0131		+	+
0195		+	-
0253		-	-
0284		-	-

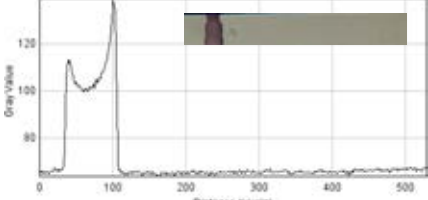
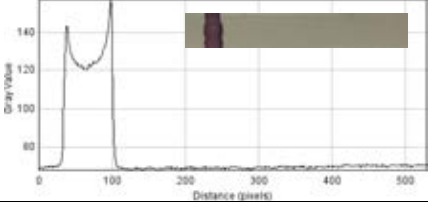
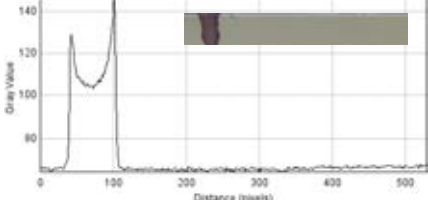
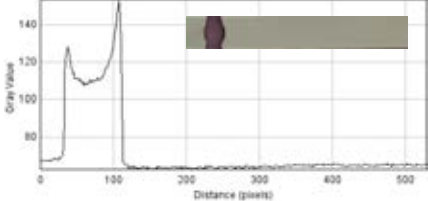
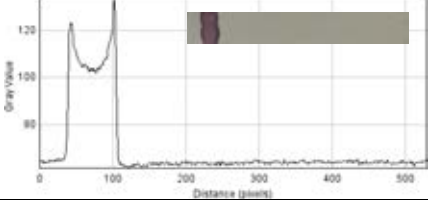
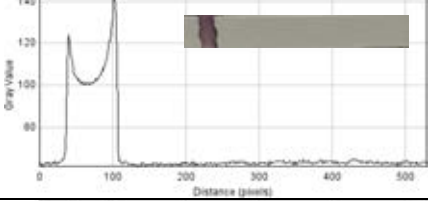
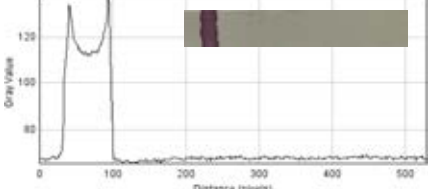
Sample ID	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction	ผล Duplex nested PCR	ผล Multiplex detection NALF
0327		+	+
0402		+	+
0415		+	+
0416		+	-
0431		+	+
0432		+	+
0436		+	+

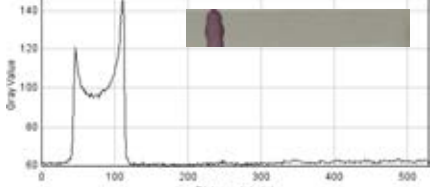
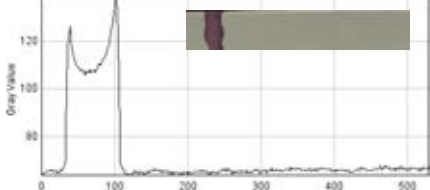
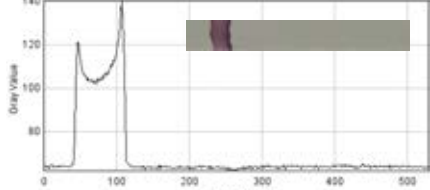
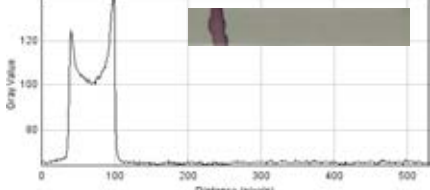
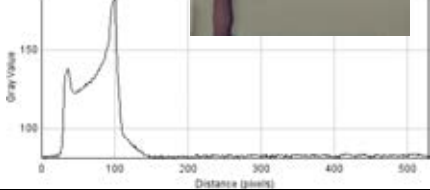

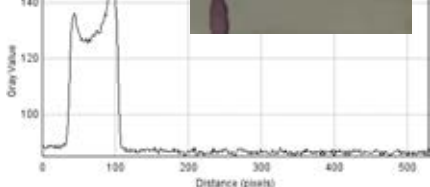
Sample ID	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction	ผล Duplex nested PCR	ผล Multiplex detection NALF
0437		-	-
0440		+	+
0445		-	+
0517		+	+
0522		+	+
0526		-	-
0535		-	-

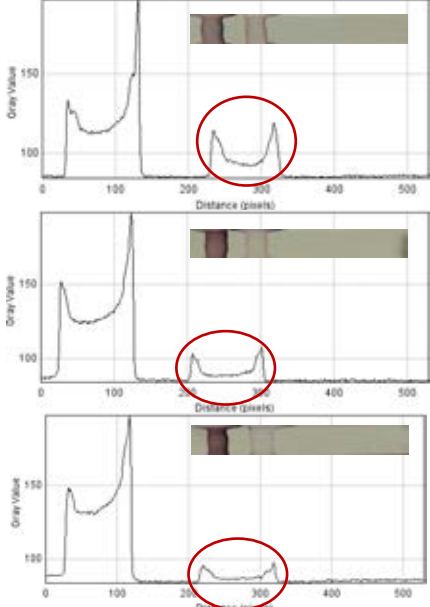
Sample ID	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction	ผล Duplex nested PCR	ผล Multiplex detection NALF
0584		+	+
0604		+	+
0606		+	+
0608		+	+
0609		+	+
0610		+	+
0636		+	+

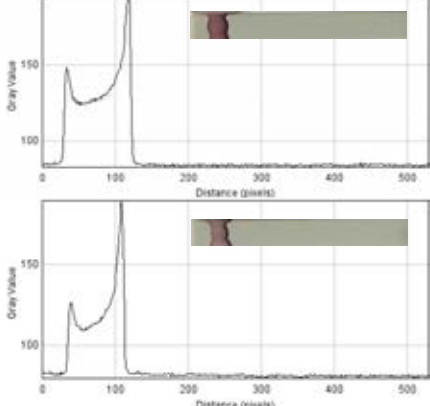
Sample ID	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction	ผล Duplex nested PCR	ผล Multiplex detection NALF
0650		+	+
0651		+	+
0666		-	-
0671		-	+
0673		-	-
0677		-	-
0679		-	-

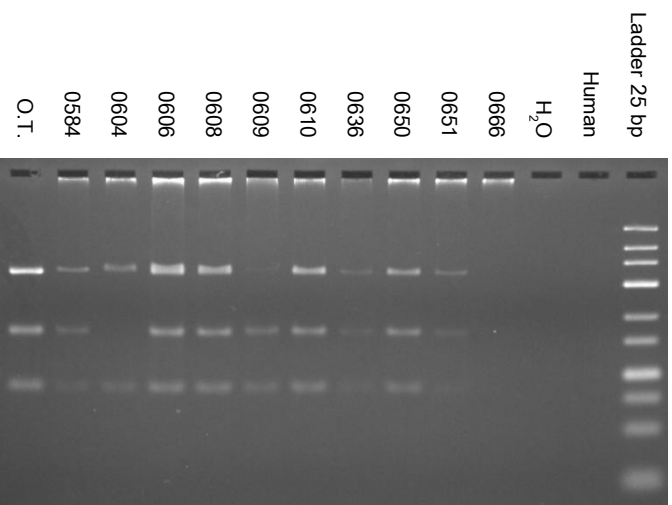
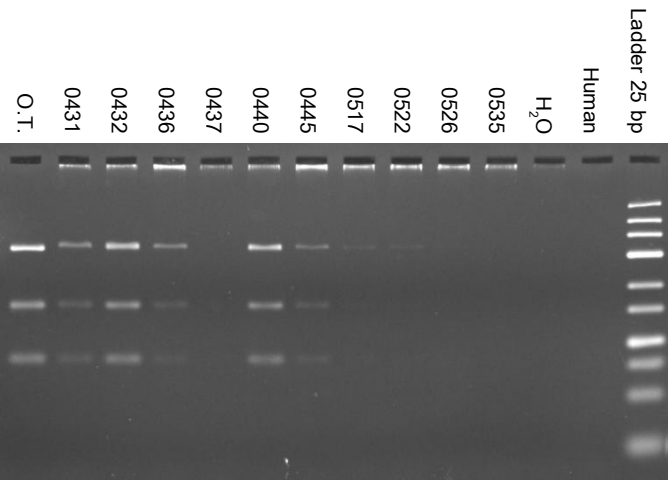
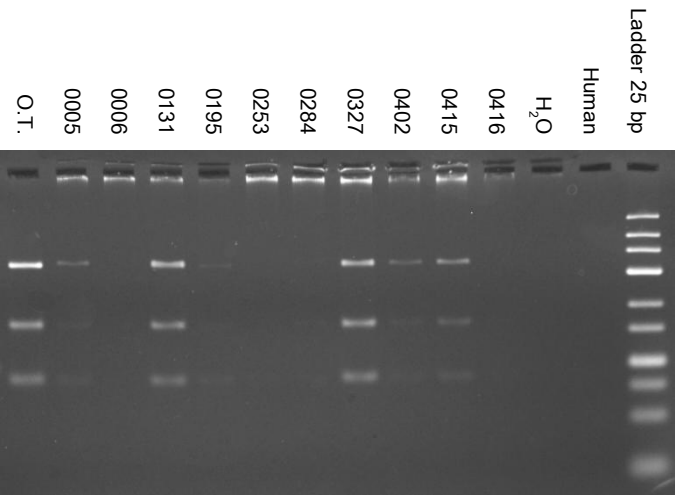
Sample ID	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction	ผล Duplex nested PCR	ผล Multiplex detection NALF
0686		-	-
0689		-	-
0691		+	+
0696		+	+
0697		+	+
0700		-	-
0701		-	-

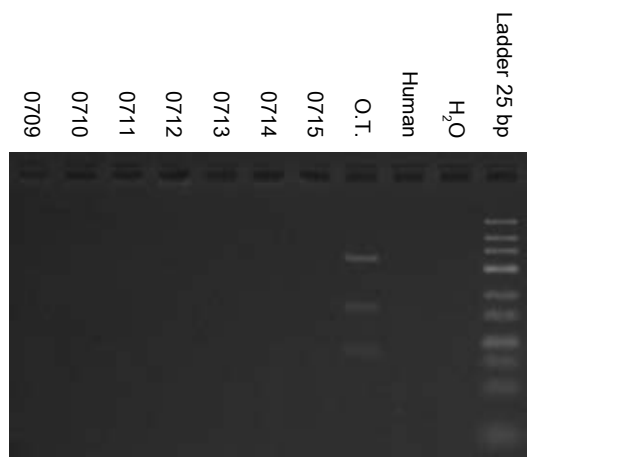
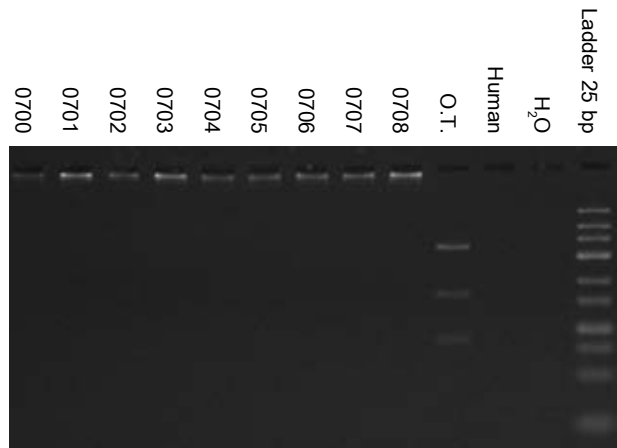
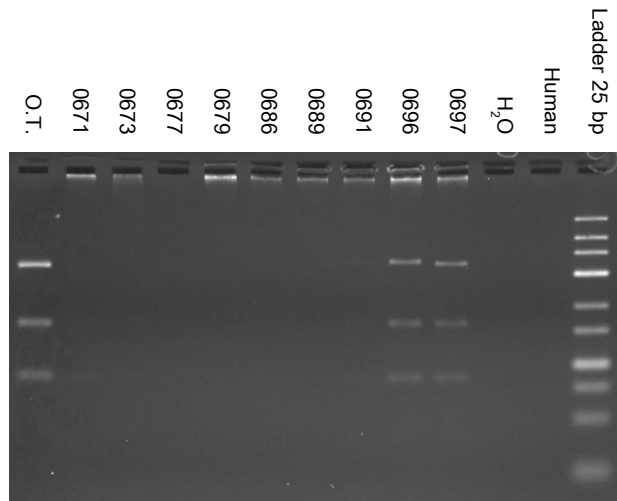
Sample ID	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction	ผล Duplex nested PCR	ผล Multiplex detection NALF
0702		-	-
0703		-	-
0704		-	-
0705		-	-
0706		-	-
0707		-	-
0708		-	-

Sample ID	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction	ผล Duplex nested PCR	ผล Multiplex detection NALF
0709		-	-
0710		-	-
0711		-	-
0712		-	-
0713		-	-
0714		-	-
0715		-	-

Sample ID	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction	ผล Duplex nested PCR	ผล Multiplex detection NALF
<i>O. tsutsugamushi</i> (Positive control)		+	+
Healthy human (Negative control)		-	-
H ₂ O		-	-

Sample ID	รูป NALF และ กราฟ ImageJ CL TL ← Flow direction	ผล Duplex nested PCR	ผล Multiplex detection NALF
			





ภาพที่ 35 แสดงผล Gel electrophoresis ของ Multiplex PCR ของตัวอย่างเลือดจำนวน 55 ตัวอย่าง โดยมีเชื้อ *O. tsutsugamushi* (O.T.) เป็น Positive control และ Healthy human เป็น Negative control

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

จากการทดลองสังเคราะห์ AuNPs เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง TEM พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 20-25 nm และมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 521 nm ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ S. Link และ M.A. El-Sayed [64] และค่า Zeta potential ที่ได้มีค่าติดลบเนื่องจากซิเตรทไอออนที่ทำหน้าที่เป็นตัว Stabilizer ด้วยแรง Electrostatic repulsion ช่วยป้องกัน AuNPs เกาะกลุ่มกันจากแรง van der Waals [65,66] ทำให้ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้มีความคงตัวเป็นคอลลอยด์สีแดงใส

เมื่อนำ AuNPs มาตรึงด้วย Detection probe ที่มีหมู่ Thiol (-SH) ซึ่งสามารถติดบนผิว AuNPs ได้ด้วยพันธะโคเวเลนต์ซึ่งจะเข้าไปแทนที่ซิเตรทไอออน ทำให้มี AuNPs มีความเสถียรมากขึ้นเนื่องจากผลของ Steric effect และ Electrostatic repulsion จาก Detection probe [44,65,67] และจากผล Zeta potential ที่มีค่าเป็นลบลดลง เป็นผลมาจากไซเดียมไอออนที่อยู่ในบัฟเฟอร์ ไปบดบังความเป็นประจุลบของเบสที่ตรึงอยู่บนผิว AuNPs [68] และค่า Zeta potential ที่ได้นี้มีอาการกระจายที่แคบลง แสดงว่าการตรึงด้วย Detection probe ช่วยทำให้ AuNPs คงตัวมากขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้จากงานวิจัยของ S.H. Brewer ยังพบว่า BSA (เป็นส่วนประกอบใน Eluent buffer ที่ใช้กระจาย Conjugate) จะทำให้ค่า Zeta potential เป็นลบลดลงได้เช่นกันเมื่ออยู่ในช่วง pH 5-12 เมื่อเปรียบเทียบกับ AuNPs ที่ล้อมด้วยซิเตรทไอออน [66] นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลของการเติมบัฟเฟอร์ที่มีเกลือไซเดียม (Salting buffer) ลงในกระบวนการตรึง Detection probe จะเห็นได้ว่า Detection probe จะช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มกันของ AuNPs ได้ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้เติม Detection probe ที่เกิดการเกาะกลุ่มกัน (Aggregation) และตกตะกอนเนื่องจากประจุบวกจากเกลือทำให้แรงผลักของประจุลบจากซิเตรทไอออนที่ทำหน้าที่เป็น Stabilizer มีค่าลดลง [65,69] ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่จำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากในกระบวนการ Hybridization จำเป็นต้องอาศัยเกลือ [44]

Hybridization buffer จัดเป็นปัจจัยที่สำคัญมากอย่างหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ NALF เนื่องจากบัฟเฟอร์มีผลต่อความไวและความจำเพาะของผลการทดสอบที่ได้จาก NALF ในการทดลองจึงได้ใช้ 1xPBS และ SSC buffer ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบ NALF แต่ละชุดแยกกันเพื่อให้สามารถแปลผลได้ว่าผลบวกที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจาก Cross-hybridization ระหว่าง

Probe แต่ละชุดข้ามกัน และใช้ Synthetic target เป็นตัวทดสอบหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่ให้ผลได้ชัดเจนที่สุด และใช้น้ำแทน Synthetic target เพื่อดูว่าบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้ไม่ได้ก่อให้เกิดผลบวกลวง (False positive) อันเป็นผลเนื่องจากการใช้บัฟเฟอร์ที่มี Stringency ที่ต่ำจนเกินไป (มี Ionic strength สูง) ในทางกลับกันการใช้บัฟเฟอร์ที่มี Stringency สูงเกินไป (มี Ionic strength ต่ำ) จะทำให้การแปลผลไม่ชัดเจนหรือเกิดผลลบลวง (False negative) ได้เช่นกัน จากผลการทดลองพบว่า 4xSSC ให้ Signal ได้ดีที่สุดและไม่ก่อให้เกิด Cross-hybridization ส่วน SSC ที่มีความเข้มข้นสูงๆ ก่อให้เกิด Cross-hybridization และยังทำให้เกิด Background บน Nitrocellulose membrane ทำให้ต้องใช้เวลาในการทดสอบนานขึ้นอีกด้วย โดยผลการทดลองที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ D.J. Carter และ R.B. Cary [70] และ X. Mao และคณะ [46] นอกจากนี้ Hybridization buffer ที่ดียังคงมีคุณสมบัติช่วยให้ Conjugate ละลายออกจาก Conjugate pad ได้ดี เพื่อให้มีอัตราการไหลเร็วเพียงพอที่จะเกิด Hybridization กับชุด Probe ได้ทัน และยังคงช่วยลด Background ที่เกิดขึ้นได้อีกด้วย จากการทดลองพบว่า SDS เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่ช่วยให้สามารถอ่านผลได้ชัดเจน และลด Background ที่เกิดขึ้น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ K. Glynnou และคณะ (2003) [70,71] ทั้งนี้เนื่องจาก SDS เป็นสารชะล้างที่ช่วยลด Non-specific binding ที่เกิดจากแรง Ionic และ Hydrophobic interaction ระหว่างสาย DNA ที่ตรึงบน AuNPs กับ Nitrocellulose membrane นอกจากนี้ SDS ยังช่วยทำให้ Membrane เปียกได้ง่ายขึ้น จึงช่วยเพิ่มอัตราการไหลได้อีกด้วย [72]

เนื่องจาก Multiplex detection NALF เป็นระบบที่ใช้ Probe หลายชุดตรวจจับร่วมกัน จึงมีโอกาสที่ Probe แต่ละชุดอาจเกิดการจับข้ามกัน (Cross-hybridization) หรือจับข้ามกับ DNA เป้าหมายอื่นๆ อันอาจทำให้เกิดผลบวกลวงได้เช่นกัน หลังจากที่ได้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมแล้ว จึงทดสอบการจับข้ามกันของชุด Probe และ DNA เป้าหมายชนิดต่างๆ จากผลการทดลองพบว่าไม่เกิดการจับข้ามกันที่มีผลต่อการแปลผลการทดลอง โดยการเกิด Sandwich hybridization ที่ Test line ยังเป็นการช่วยลดโอกาสการเกิดผลบวกลวงอีกด้วย แสดงให้เห็นว่าชุด Probe แต่ละชุดมีความจำเพาะต่อแต่ละลำดับเบสเป้าหมายที่ต้องการตรวจจับ

การทดสอบความไวด้วย Synthetic target พบว่าการใช้ Multiplex detection NALF มีความไวมากกว่า Single detection NALF 100-1000 เท่า โดย Multiplex detection NALF มีปริมาณต่ำสุดที่ตรวจจับได้ที่ 0.125 fmol (7.53×10^7 copies) ซึ่งมีค่าต่ำกว่างานวิจัยของ G.S. Rule และคณะ กับ A.J. Baeumer และคณะที่ใช้ไลโปโซมบรรจุสีเป็นตัวรายงานผลซึ่งตรวจจับ Synthetic target ได้ต่ำสุด 1 fmol (6.02×10^8 copies) [58,73] และจากงานวิจัยของ X. Mao และ

คณะที่ใช้ตรวจจับ gDNA ของมนุษย์พบว่าสามารถตรวจจับ Synthetic target ได้ต่ำสุด 65 fmol (3.91×10^{10} copies) [46] เนื่องจากการตรวจจับเป้าหมายหลายชนิดร่วมกันทำให้สามารถขยายสัญญาณและช่วยให้มีความไวในการตรวจสอบมากขึ้นซึ่งเหมาะกับการนำมาใช้ตรวจคัดกรองเป้าหมายที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ดี

จากข้อมูลที่ได้เคยมีการรายงานไว้พบว่าปกติในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจะพบเชื้อในปริมาณที่น้อยมาก (ประมาณ 5-10 copies/ μ l) [10] การนำเชื้อหรือสิ่งส่งตรวจมาเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยวิธี PCR ก่อนที่จะนำมาทดสอบด้วย Multiplex detection NALF จึงเป็นการเพิ่มความไวในการตรวจสอบได้อีกทางหนึ่ง ในงานวิจัยครั้งนี้ได้นำเชื้อหรือสิ่งส่งตรวจมาทำ Multiplex PCR ที่ตำแหน่งแอนติเจนยีน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ 47 kDa, 56 kDa และ 60 kDa อันเป็นแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* [10,30,35] โดยยีนเหล่านี้จะพบเพียง 1 region ต่อเชื้อ 1 ตัวเท่านั้น นอกจากการตรวจจับเป้าหมายร่วมกันจะช่วยให้การตรวจสอบมีความไวเพิ่มขึ้นแล้วยังช่วยให้สามารถตรวจหาเชื้อได้ครอบคลุมหลายสายพันธุ์มากขึ้นอีกด้วย ดังจะเห็นได้จากการนำ Multiplex detection NALF มาทดสอบกับตัวอย่างเชื้อ *O. tsutsugamushi* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Karp, Kato และ Gilliam ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในประเทศไทย [3,21] พบว่ามีความสามารถตรวจคัดกรองได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ และจากข้อมูลที่ยีน 56 kDa antigen มีความแปรปรวนของลำดับพันธุกรรมสูง [1] ทำให้มีโอกาสที่จะตรวจเชื้อไม่พบได้ ดังเช่นในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ #0604 ที่ไม่พบ PCR product ของยีน 56 kDa antigen แต่ก็ยังสามารถตรวจคัดกรองได้ด้วย PCR product ของ 47 kDa และ 60 kDa antigen แทน ดังนั้นการใช้หลายยีนร่วมกันจะช่วยให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อและคัดกรองผู้ป่วยได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การนำ PCR product มาทดสอบด้วย Multiplex detection NALF ยังเป็นการเพิ่มความจำเพาะในการตรวจคัดกรองเชื้อสครับทัยฟัส เนื่องจากการตรวจสอบซ้ำด้วย Probe อีกชุดหนึ่งด้วย

ในการทดลองขั้นต้นจะใช้เชื้อ *O. tsutsugamushi* สายพันธุ์ Gilliam เป็นตัวแทนในการทดลองเพื่อนำมาทดสอบหาความไวของ Multiplex detection NALF จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ตรวจคัดกรองได้ คือ 2,310 copies (5 pg) โดยเชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงด้วย Vero cells ดังนั้นปริมาณ DNA ที่วัดได้เริ่มแรกจะเป็นปริมาณที่รวม DNA จาก Vero cells ด้วย และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ A. Chua และคณะที่ตรวจหา *Vibrio cholerae* ที่นำมาเพิ่มปริมาณด้วย PCR พร้อมกับติดปลาย PCR product ด้วยไบโอติน (Biotin) และ Fluorescein hapten โดยมี AuNPs ที่ตรึงด้วย Anti-fluorescein antibody เป็นตัวรายงานผล พบว่าตรวจจับเชื้อได้ต่ำสุด 5 ng [45] และมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ T.

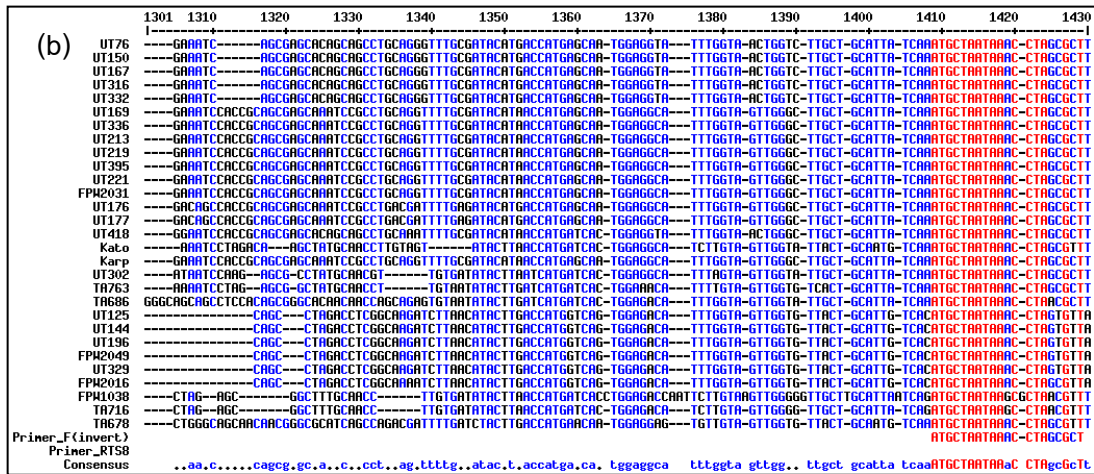
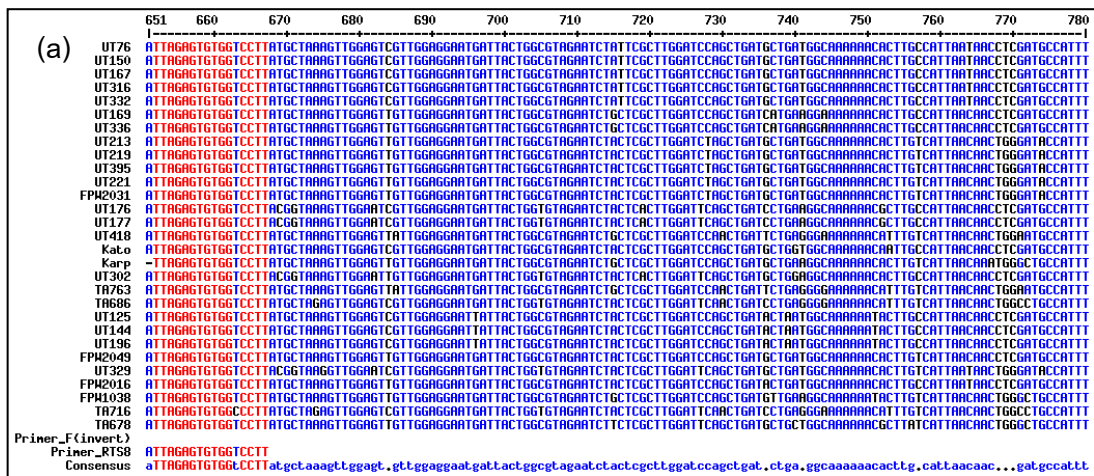
Nimitphak และคณะที่ตรวจหา *Penaeus nucleopolyhedrovirus* ซึ่งเป็นไวรัสก่อโรคในกุ้งด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วย LAMP พร้อมกับติดฉลากด้วยไบโอดีเอ็นเอ PCR product นำมาตรวจจับด้วย Probe ติดฉลากด้วย FITC โดยใช้ AuNPs ที่ตรึงด้วย anti-FITC เป็นตัวรายงานผล พบว่าสามารถตรวจจับ DNA ได้ต่ำสุด 0.1 pg ซึ่งมีผลสอดคล้องกับผล Gel electrophoresis [74] และในกลุ่มวิจัยของ T. Puthawibool และคณะได้ใช้หลักการเดียวกันนี้ทำ RT-LAMP เพื่อตรวจหา *Macrobrachium resenbergi* แล้วทดสอบกับ NALF พบว่าตรวจจับได้ต่ำสุด 2 pg [75] และเมื่อทดลองหาความไวของ Multiplex detection NALF ด้วย Plasmid ที่มีส่วนของแอนติเจนยีน 56 kDa จากผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อได้ต่ำสุดที่ระดับ 1.72 copies จากงานวิจัยของ J.T. Connelly และคณะที่ทำการตรวจหา Oocyte ของ *Cryptosporidium* spp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่ตรวจพบในน้ำดื่ม โดยเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วย Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) และทดสอบกับ NALF ที่ใช้ไลโปโซมบรรจุสีต่อด้วย Probe ที่จำเพาะกับ *hsp70* mRNA ของเชื้อพบว่าสามารถตรวจหา Oocyte ได้ต่ำสุด 1 Oocyte [76] และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ D.P. Kalogianni และคณะที่ตรวจหาเชื้อที่เกิดหลังการศัลยกรรมตกแต่งข้อเข่าจำนวน 6 ชนิดด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วย PCR แล้วนำมาทดสอบกับ NALF ที่ใช้ AuNPs เป็นตัวรายงานผล พบว่าสามารถตรวจหาปริมาณเชื้อต่ำสุด 10 copies [52] นอกจากนี้จากงานวิจัยของ K. Glynou และคณะที่ทดลองนำ Plasmid ที่มีลำดับเบสของ Prostate-specific antigen สอดแทรก พบว่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจหาได้เท่ากับ 500 copies [71] จะเห็นได้ว่า Multiplex detection NALF ที่พัฒนาได้มีความไวที่สูงกว่า

นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้จากตับหนูซึ่งจัดเป็น Host ชนิดหนึ่งของเชื้อสรีบ์ทัยฟัส และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ทั้งแกรมบวก (2 ชนิด) และแกรมลบ (6 ชนิด) มาทดสอบกับ Multiplex detection NALF เพื่อดูความจำเพาะในการตรวจคัดกรองโรค พบว่า Multiplex detection NALF ให้ผลเป็นลบทั้งหมด จึงกล่าวได้ว่า Multiplex detection NALF มีความจำเพาะต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* และไม่มีความจำเพาะกับ DNA จากหนู ดังนั้นจึงอาจนำ Multiplex detection NALF ไปใช้ในการตรวจคัดกรองตัวอย่างเลือดจาก Host ของโรคชนิดอื่นๆ ได้ด้วย แต่ทั้งนี้อาจต้องทำการทดลองเพิ่มเติมกับ Host ชนิดอื่นๆ ด้วย และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ D.P. Kalogianni และคณะ (2007) ที่ตรวจหาเชื้อที่เกิดหลังการศัลยกรรมตกแต่งข้อเข่าจำนวน 6 ชนิดด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วย PCR แล้วนำมาทดสอบกับ NALF ที่มี AuNPs เป็นตัวรายงาน แต่จากผลการทดลองพบว่ามีกาเกิด Cross-hybridization ระหว่างเชื้อขึ้น [52]

จากผลการทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิกจำนวน 55 ตัวอย่าง พบว่า Multiplex detection NALF มีความไวร้อยละ 92 ,ความจำเพาะร้อยละ 93 ,ค่าพยากรณ์บวก 0.92 ,ค่าพยากรณ์ลบ 0.93, Likelihood ratio positive เท่ากับ 13.80 และ Likelihood ratio negative เท่ากับ 0.09 เมื่อเทียบกับวิธี Duplex nested PCR ซึ่งจัดว่ามีประสิทธิภาพที่ยอมรับได้ในระดับการตรวจคัดกรองทางคลินิก และจากผลของตัวอย่าง #0195 ที่พบว่า Duplex nested PCR ให้ผลเป็นบวก (band ขึ้นบางๆ) ซึ่งสอดคล้องกับผล Multiplex PCR ที่ปรากฏ band บางๆ ขึ้นเช่นกัน แต่ Multiplex detection NALF แปลผลเป็นลบเนื่องจากการวิเคราะห์ผลจากโปรแกรม ImageJ ได้ค่าเท่ากับ 1.84 a.u. ไม่ผ่านตามเกณฑ์ค่าตัดสิน (2.78 a.u.) และในตัวอย่าง #0416 ที่ให้ผล Duplex nested PCR เป็นบวก แต่ NALF เป็นลบ และตัวอย่าง #0445 กับ #0671 ให้ผล Duplex nested PCR เป็นลบ แต่ NALF ให้ผลเป็นบวก จะเห็นได้ว่าผลจาก NALF มีความสอดคล้องกับผล Gel electrophoresis ที่ได้จากการทำ Multiplex PCR ทั้งนี้ความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการสุ่มดูดตัวอย่าง Template มาทำ PCR หรือการออกแบบ Probe และ Primer ที่แตกต่างกัน ดังจะเห็นได้จากการนำ Primer ของแอนติเจนยีน 56 kDa ที่ใช้ทำ Duplex nested PCR มาเปรียบเทียบกับตัวอย่างลำดับเบสของเชื้อ *O. tsutsugamushi* สายพันธุ์ต่างๆ จะพบว่ามีบางลำดับเบสที่จับคู่ได้อย่างไม่สมบูรณ์ เช่น Karp (FPW2016 (EF213085)), Gilliam (UT125 (EF13096), UT144 (EF213091), UT196 (EF213079), UT329 (EF213099), FPW2049 (EF213093)), TA678 (U19904), TA686 (U80635) และ TA716 (FPW1038 (EF213087), TA716 (U19905)) ดังแสดงในภาพที่ 36 ซึ่งการใช้ยีน 47 kDa และ 60 kDa antigen ซึ่งเป็นยีนที่มีความเป็นอนุรักษ์สูง [4,10,51] มาตรวจสอบร่วมด้วย จะเป็นการเพิ่มโอกาสในการตรวจหาเชื้อได้อีกทางหนึ่ง

เวลาที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดรวมประมาณ 3.25 ชั่วโมง โดยอาจแบ่งเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนโดยประมาณดังนี้ Multiplex PCR 2.5 ชั่วโมง, เตรียม PCR product สำหรับการทดสอบ 20 นาที (Denature (5 นาที) และ Chill น้ำแข็ง (15 นาที)) และทดสอบบน Multiplex detection NALF 25 นาที ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Duplex nested PCR ที่ใช้เวลาประมาณ 7 ชั่วโมง (ไม่รวมขั้นตอนการสกัด DNA) และเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ D.P. Kalogianni และคณะ ซึ่งใช้เวลาในการทดสอบ 3.37 ชั่วโมง (ขั้นตอน PCR นานประมาณ 3 ชั่วโมง โดยไม่รวมขั้นตอนการสกัด DNA) [52] และ NALF ยังไม่จำเป็นต้องใช้ Ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งและเครื่อง UV transilluminator ในการอ่านผล ทั้งยังมีขั้นตอนในการใช้งานที่ง่ายและไม่ซับซ้อน นอกจากนี้การอ่านผลยังสามารถอ่านเมื่อใดก็ได้หลังจากครบกำหนดเวลาทดสอบโดยไม่มีผลต่อการแปลผล ซึ่งต่างจากการย้อม Gel electrophoresis ด้วย Ethidium bromide ที่ต้องอ่านผล

ทันที เนื่องจาก Band จะจางลงและไม่คมชัดเมื่อเวลาผ่านไป การแปลผลด้วย Gel electrophoresis ยังเป็นวิธีที่จำเพาะน้อยกว่า เนื่องจากเป็นการตรวจสอบขนาดของ PCR product ที่เกิดขึ้นเท่านั้น ซึ่งแตกต่างจาก Multiplex detection NALF ที่จะเป็นการตรวจสอบซ้ำด้วย Probe อีกชุดหนึ่งซึ่งมีความจำเพาะมากกว่า นอกจากนี้เมื่อคิดต้นทุนของ Multiplex detection NALF มีค่าใช้จ่ายประมาณ 34-38 บาท/ ตัวอย่าง (ขึ้นกับยี่ห้อของ PCR reagent ที่เลือกใช้) ซึ่งต่ำกว่าต้นทุนของ Duplex nested PCR (ประมาณ 53 บาท/ ตัวอย่าง) และยังช่วยลดปริมาณสารเคมีหรือบัฟเฟอร์ที่ใช้อีกด้วย



ภาพที่ 36 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของตัวอย่างเชื้อ *O. tsutsugamushi* สายพันธุ์ต่างๆ กับลำดับเบสของ Primer ที่จำเพาะต่อแอนติเจนยีน 56 kDa ที่ใช้ในการทำ Duplex nested PCR ด้วยโปรแกรม MultAlin (a) Primer RTS8 และ (b) Primer F (invert); กลับลำดับเบสเพื่อให้เปรียบเทียบลำดับเบสได้)

5.2 สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาแถบตรวจคัดกรองโรคสครับทัยฟัสในรูปแบบแลทเทอรัลโฟลว์ที่ใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นตัวรายงานผล ใช้สำหรับตรวจจับ PCR product ของยีนเป้าหมายของเชื้อจำนวน 3 ตำแหน่งที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Multiplex PCR ร่วมกันเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจจับเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* ผลพบว่าสามารถตรวจจับเป้าหมายสังเคราะห์ได้ปริมาณต่ำสุด 0.125 fmol และเมื่อนำพลาสมิดที่สอดแทรกด้วยยีน 56 kDa antigen มาเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี Multiplex PCR พบว่าตรวจจับเป้าหมายได้ต่ำสุด 1.72 copies และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับวิธี Duplex nested PCR พบว่ามีความไวและความจำเพาะใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 92 และ 93 ตามลำดับ) สามารถใช้ในการตรวจคัดกรองเชื้อจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยและตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ได้โดยไม่พบการเกิด Cross-hybridization กับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ หรือหนูซึ่งเป็นหนึ่งใน Host ของเชื้อ นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่า Stringency ของ Hybridization buffer ที่เลือกใช้และ Sodium dodecyl sulfate มีผลต่อความไวและความจำเพาะของชุดตรวจ ซึ่งองค์ความรู้ดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจคัดกรองอื่นๆ เช่น ชุดตรวจคัดกรองกลุ่มโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุต่อไป

5.3 ข้อเสนอแนะ

- ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างเลือดของคนที่ไม่ได้เป็นโรคสครับทัยฟัสที่นำมาทดสอบกับ Multiplex detection NALF เพื่อให้ทราบค่า Sensitivity และ Specificity ถูกต้องตามหลักการทางสถิติที่ควรนำร้อยละความชุกของโรคมาคำนวณหาจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และนำมาเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการนำไปใช้ตรวจคัดกรองโรคสครับทัยฟัสต่อไป
- ทำ Isothermal multiplex PCR เช่น เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) หรือ Helicase-dependent amplification (HDA) แทน Multiplex PCR เพื่อให้สามารถใช้งานได้ง่าย แต่ค่าใช้จ่ายของการทดสอบต่อครั้งอาจเพิ่มขึ้น จึงควรพัฒนาแถบตรวจโรคที่สามารถตรวจคัดกรองหลายๆ ได้โรคในคราวเดียว เช่น แถบตรวจคัดกรองกลุ่มโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ หรือการตรวจคัดแยกหาสายพันธุ์ของโรคต่างๆ
- ควรทำ Internal control สำหรับการตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา PCR เช่น Housekeeping gene
- ควรใช้เครื่องพ่นทำเส้นตรวจสอบบน NALF เพื่อให้ Probe มีการกระจายสม่ำเสมอ เส้นตรวจสอบมีความคมชัด ซึ่งจะช่วยให้สามารถวิเคราะห์ผลและอ่านผลด้วยตาเปล่าชัดเจนยิ่งขึ้น
- ควรนำตัวอย่าง gDNA จากหนู สัตว์ฟันแทะ หรือสัตว์อื่นๆ ที่เป็น Host ของโรคสครับทัยฟัส ทั้งที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคมาร่วมด้วย เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงในการนำ Multiplex detection NALF มาใช้ตรวจคัดกรองโรคได้กว้างขวางยิ่งขึ้น
- สามารถนำหลักการนี้มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุได้ โดยจะเห็นได้ว่าการใช้ Probe หลายชุดร่วมกันในแถบชุดตรวจ ไม่ก่อให้เกิดการแปลผลผิดพลาดเมื่อออกแบบ Probe และทดสอบในสภาวะที่เหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

- [1] Kelly, D.J., Fuerst, P.A., Ching, W.M., and Richards, A.L. Scrub typhus : The geographic distribution of phenotypic and genotypic variation of *Orientia tsutsugamushi*. Clinical infectious diseases 48 (2009) : S203-S230.
- [2] Fournier, P.E., et al. Detection of new genotypes of *Orientia tsutsugamushi* infecting humans in Thailand. Clinical Microbiology and Infection 14 (2008) : 168-173.
- [3] ยุพิน ศุภทตมมงคล. โรคติดเชื้ อริกเก็ตเซีย : การวินิจฉัยและการรักษา. ใน An update and current practice in infectious disease, หน้า 79-89. กรุงเทพมหานคร : เมติคัล มีเดีย, 2552.
- [4] Paris, D.H., Aukkanit, N., Jenjaroen, K., Blacksell, S.D., and Day, N.P.J. A highly sensitive quantitative real-time PCR assay based on the *groEL* gene of contemporary Thai strains of *Orientia tsutsugamushi*. Clinical Microbiology and Infection 15 (2009) : 488-495.
- [5] Saisongkorh, W., Chenchittikul, M., and Silpapojakul, K. Evaluation of nested PCR for the diagnosis of scrub typhus among patients with acute pyrexia of unknown origin. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 98 (2004) : 360-366.
- [6] อมร ลีลารัศมี. Acute fever of undetermined origin. ใน Current practice in common infectious disease, หน้า 121-139. กรุงเทพมหานคร : สวิชาญการพิมพ์, 2544.
- [7] ภัทรชัย กীরตสิน. *Rickettsia, Orientia, Coxiella and Ehrlichia*. ใน ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์: Textbook of Medical Bacteriology, หน้า 647-659. กรุงเทพมหานคร : วีเจ ฟรินติ้ง, 2549.

- [8] Kim, D.M., et al. Clinical usefulness of eschar polymerase chain reaction for the diagnosis of scrub typhus : A prospective study. Clinical Infectious Diseases 43 (2006) : 1296–1300.
- [9] Jeong, Y.J., Kim, S., Wook, Y.D., Lee, J.W., Kim, K.I., and Lee, S.H. Scrub typhus : Clinical, pathologic, and imaging findings. RadioGraphics 27 (2007) : 161-172.
- [10] Jiang, J., Chan, T.C., Temenak, J.J., Dasch, G.A., Ching, W.M., and Richards, A.L. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for *Orientia tsutsugamushi*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70 (2004) : 351-356.
- [11] Wongchotigul, V., Waicharoen, S., Riengrod, S., Chimsumang, S., Rattanadakul, J., and Chinprasatsak, S. Development and evaluation of a latex agglutination test for the rapid diagnosis of scrub typhus. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 36 (2005) : 108-112.
- [12] Mackowiak, P.A., and Durack, D.T. Fever of unknown origin. In G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin (ed.), Principles and practice of infectious diseases edition 5th, pp.622-633. Philadelphia : Churchill Livingstone, 2000.
- [13] Kim, I.S., Seong, S.Y., Woo, S.G., Choi, M.S., Kang, J.S., and Chang, W.H. Rapid diagnosis of scrub typhus by a passive hemagglutination assay using recombinant 56-kilodalton polypeptides. Journal of Clinical Microbiology 31 (1993) : 2057-2060.
- [14] Blacksell, S.D., Bryant, N.J., Paris, D.H., Doust, J.A., Sakoda, Y., and Day, N.P.J. Scrub typhus serologic testing with the indirect immunofluorescence method as a diagnostic gold standard: A lack of

- consensus leads to a lot of confusion. Clinical Infectious Diseases 44 (2007) : 391-401.
- [15] Singhsilarak, T., et al. Short report: Detection of *Orientia tsutsugamushi* in clinical samples by quantitative real-time polymerase chain reaction. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 72 (2005) : 640-641.
- [16] Chen, P.C., and Oyelere, A.K. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. Nanotechnology, Science and Applications 1 (2008) : 45–66.
- [17] Yeh, C.H., Hung, C.Y., Chang, T.C., Lin, H.P., and Lin, Y.C. An immunoassay using antibody-gold nanoparticle conjugate, silver enhancement and flatbed scanner. Microfluid Nanofluid 6 (2009) : 85-91.
- [18] Thaxton, C.S., Georganopoulou, D.G., and Mirkin, C.A. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. Clinica Chimica Acta 363 (2006) : 120-126.
- [19] Oyelere, A.K., Chen, P.C., and Huang, X. Peptide-conjugated gold nanorods for nuclear targeting. Bioconjugate Chemistry 18 (2007) : 1490-1497.
- [20] Seal, J., Braven, H., and Wallace, P. Point-of-care nucleic acid lateral-flow tests [online]. 2006. Available from : <http://www.ivdtechnology.com/article/point-care-nucleic-acid-lateral-flow-tests> [2009, Oct 31]
- [21] Manosroia, J., Chutipongvivateb, S., Auwanitc, W., and Manosroi, A. Determination and geographic distribution of *Orientia tsutsugamushi* serotypes in Thailand by nested polymerase chain reaction. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 55 (2006) : 185–190.

- [22] Saah, A.J. Introduction to Rickettsioses and ehrlichioses. In G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin (ed.), Principles and practice of infectious diseases edition 5th, pp.2033-2034. Philadelphia : Churchill Livingstone, 2000.
- [23] Seong, S.Y., Choi, M.S., and Kim, I.S. *Orientia tsutsugamushi* infection : overview and immune responses. Microbes and Infection 3 (2001) : 11-21.
- [24] Coleman, R.E., et al. Comparative evaluation of selected diagnostic assays for the detection of IGG and IGM antibody to *Orientia Tsutsugamushi* in Thailand. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 67 (2002) : 497-503.
- [25] JSP. Scrub Typhus-IFA Test kit [online]. Available from : <http://www.jsppharma.com/index.php?lay=show&ac=article&Id=538771744&Ntype=11> [2009, Aug 20]
- [26] Pradutkanchana, J., Silpapojakul, K., Paxton, H., Pradutkanchana, S., Kelly, D.J., and Strickman, D. Comparative evaluation of four serodiagnostic tests for scrub typhus in Thailand. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 91 (1997) : 425-428.
- [27] Weddle, J.R., et al. Effectiveness of a dot-blot immunoassay of anti-*Rickettsia tsutsugamushi* antibodies for serologic analysis of scrub typhus. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 53 (1995) : 43-46.
- [28] Watt, G., Jongsakul, K., Ruangvirayuth, R., Kantipong, P., and Silpapojakul, K. Short report : Prospective evaluation of a multi-test strip for the diagnoses of scrub and murine typhus, leptospirosis, dengue fever, and

Salmonella typhi infection. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 72 (2005) : 10-12.

- [29] MP Group. ชุดตรวจไข้ไม่ทราบสาเหตุ [online] Available from : http://www.mpmedgroup.com/th/th_product_wd.php#3 [2009, Oct 9]
- [30] Blacksell, S.D., et al. Genetic typing of the 56-kDa type-specific antigen gene of contemporary *Orientia tsutsugamushi* isolates causing human scrub typhus at two sites in north-eastern and western Thailand. FEMS Immunology and Medical Microbiology 52 (2008) : 335-342.
- [31] Fournier, P.E., et al. Detection of new genotypes of *Orientia tsutsugamushi* infecting humans in Thailand. Clinical Microbiology and Infection 14 (2007) : 168-173.
- [32] Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., and Miyamura, S. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 45 (1995) : 589-591.
- [33] Lee, J.H., et al. Differentiation of rickettsiae by *groEL* gene analysis. Journal of Clinical Microbiology 41 (2003) : 2952-2960.
- [34] Paris, D.H., Blacksell, S.D., Newton, P.N., and Day, N.P.J. Simple, rapid and sensitive detection of *Orientia tsutsugamushi* by loop-isothermal DNA amplification. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 102 (2008) : 1239-1246.
- [35] Park, H.S., et al. Rapid and simple identification of *Orientia tsutsugamushi* from other group rickettsiae by duplex PCR assay using *groEL* gene. Microbiology and Immunology 49 (2005) : 545-549.

- [36] Paris, D.H., et al. Real-time multiplex PCR assay for detection and differentiation of rickettsiae and orientiae. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 102 (2008) : 186-193.
- [37] Ge, H., Tong, M., Li, A., Mehta, R., and Ching, W.M. Cloning and sequence analysis of the 22-kDa antigen genes of *Orientia tsutsugamushi* strains Kato, TA763, AFSC 7, 18-032460, TH1814, and MAK 119. Annals of the New York Academy of Sciences 1063 (2005) : 231-238.
- [38] Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W., and Sijiao, L. Nanotechnology and biosensors. Biotechnology advances 22 (2004) : 505-518.
- [39] Wang, Z., and Ma, L. Gold nanoparticle probes. Coordination Chemistry Reviews 253 (2009) : 1607-1618.
- [40] Chen, P.C., Mwakwari, S.C., and Oyelere, A.K. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. Nanotechnology, Science and Applications 1 (2008) : 45-66.
- [41] Baptista, P., Pereira, E., and Eaton, P. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. Analytical and bioanalytical chemistry 391 (2007) : 943-950.
- [42] Hu, M., et al. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. Chemical Society Reviews 35 (2006) : 1084-1094.
- [43] Zhao, W., Brook, M.A., and Li, Y. Design of Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensing Assays. ChemBioChem 9 (2008) : 2363-2371.

- [44] Mirkin, C.A., Letsinger, L.L., Mucic, R.C., and Storhoff, J.J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. Nature 382 (1996) : 607-609.
- [45] Chua, A., Yean, C.Y., Ravichandran, M., Lim, B., and Lalitha, P. A rapid DNA biosensor for the molecular diagnosis of infectious disease. Biosensors and Bioelectronics 26 (2011) : 3825-3831.
- [46] Mao, X., Ma, Y., Zhang, A., Zhang, L., Zeng, L., and Liu, G. Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip. Analytical Chemistry 81 (2009) : 1660–1668.
- [47] Pingarrón, J.M., Yáñez-Sedeño, P., and González-Cortés, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. Electrochimica Acta 53 (2008) : 5848–5866.
- [48] Niu, D., et al. Immunogenicity of a 40kDa fragment of the 47kDa recombinant protein and DNA vaccine from Karp strain of *Orientia tsutsugamushi*. Annals of the New York Academy of Sciences 990 (2003) : 527-534.
- [49] Ohashi, N., Nashimoto, H., Ikeda, H., and Tamura, A. Diversity of immunodominant 56-kDa type-specific antigen (TSA) of *Rickettsia tsutsugamushi*. Sequence and comparative analyses of the genes encoding TSA homologues from four antigenic variants. The Journal of biological chemistry 267 (1992) : 12728-12735.
- [50] Stover, C.K., Marana, D.P., Carter, J.M., Roe, B.A., Mardis, E., and Oaks, E.V. The 56-kilodalton major protein antigen of *Rickettsia tsutsugamushi*: molecular cloning and sequence analysis of the sta56 gene and precise identification of a strain-specific epitope. Infection and immunity 58 (1990) : 2076-2084.

- [51] Stover, C.K., Marana, D.P., Dasch, G.A., and Oaks, E.V. Molecular cloning and sequence analysis of the Sta58 major antigen gene of *Rickettsia tsutsugamushi*: sequence homology and antigenic comparison of Sta58 to the 60-kilodalton family of stress proteins. Infection and immunity 58 (1990) : 1360-1368.
- [52] Kalogianni, D.P., et al. Dry reagent dipstick test combined with 23S rRNA PCR for molecular diagnosis of bacterial infection in arthroplasty. Analytical Biochemistry 361 (2007) : 169-175.
- [53] Xu, H., Mao, X., Zeng, Q., Wang, S., Kawde, A.N., and Liu, G. Aptamer-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for protein analysis. Analytical Chemistry 81 (2009) : 669-675.
- [54] Hill, H.D., and Mirkin, C.A. The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. NATURE PROTOCOLS 1 (2006) : 324-335.
- [55] Hurst, S.J., Lytton-Jean, A.K.R., and Mirkin, C.A. Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. Analytical Chemistry 78 (2006) : 8313-8318.
- [56] Udomthongsuk, N., Sereemasapun, A., Korkiatsakul, V., Ngambenjawong, C., and Supaphol, P. Optimization of influencing parameters for fabrication of gold nanoparticle-based nucleic acid lateral flow strip test. International Conference on Biomedical Engineering and Technology 11 (2011) : 65-69.
- [57] Mongkol Pongsuchart. Strategies and improve sensitivity of nucleic acid lateral flow (NALF) in HIV-1 nucleic acid. Master's Thesis, Medical science, Faculty of Medicine, Chulalongkorn university, 2012.

- [58] Baeumner, A.J., Pretz, J., and Fang, S. A Universal Nucleic Acid Sequence Biosensor with Nanomolar Detection Limits. Analytical Chemistry 76 (2004) : 888-894.
- [59] Nakayama, K., et al. The Whole-genome sequencing of the obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* revealed massive gene amplification during reductive genome evolution. DNA Research 15 (2008) : 185-199.
- [60] วิษณุ ธรรมลิขิตกุล. การวินิจฉัยทางคลินิก : การวางแผนและการนำผลไปประยุกต์ใช้. Siriraj Medical Journal 58 (2006) : 1112-1120.
- [61] Kampeera, T. How to interpret diagnostic medical journal [online]. 2011. Available from: http://mahidol.academia.edu/TiwaKampeera/Papers/313175/How_to_interpret_diagnostic_medical_journal [2012, Apr 1]
- [62] Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., and Vogt, P.H. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. BioTechniques 23 (1997) : 504-511.
- [63] นงนุช จตุรวัฒน์ทิติ และคนอื่นๆ. การสอบสวนการระบาดของโรคไข้รากสาดใหญ่ (สครับไทฟัส) อำเภอเมือง, กะปง และตะกั่วป่า จังหวัดพังงา เดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2553. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข 42 (2554) : 49-56.
- [64] Link, S., and El-Sayed, M.A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. American Chemical Society 103 (1999) : 4212-4217.
- [65] Li, H., and Rothberg, L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 (2004) : 14036-14039.

- [66] Brewer, S.H., Glomm, W.R., Johnson, M.C., Knag, M.K., and Franzen, S. Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. Langmuir 21 (2005) : 9303-9307.
- [67] Ojea-Jimenez, I., and Puentes, V. Instability of Cationic Gold Nanoparticle Bioconjugates : The Role of Citrate Ions. Journal of the American Chemical Society 131 (2009):13320-13327.
- [68] Massich, M.D., Giljohann, D.A., Schmucker, A.L., Patel, P.C., and Mirkin, C.A. Cellular Response of Polyvalent Oligonucleotide-Gold Nanoparticle Conjugates. American Chemical Society 4 (2010) : 5641–5646.
- [69] Storhoff, J.J., Elghanian, R., Mirkin, C.A., and Letsinger, R.L. Sequence-Dependent Stability of DNA-Modified Gold Nanoparticles. Langmuir 18 (2002) : 6666-6670.
- [70] Carter, D.J., and Cary, R.B. Lateral flow microarrays: a novel platform for rapid nucleic acid detection based on miniaturized lateral flow chromatography. Nucleic Acids Research 35 (2007) : e74.
- [71] Glynou, K., Ioannou, P.C., Christopoulos, T.K., and Syriopoulou, V. Oligonucleotide-Functionalized Gold Nanoparticles as Probes in a Dry-Reagent Strip Biosensor for DNA Analysis by Hybridization. Analytical Chemistry 75 (2003) : 4155-4160.
- [72] Herzer, S., and Englert, D.F. Nucleic Acid Hybridization. In A.S. Gerstein (ed.), Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide, pp.399-460. New York : Wiley-Liss, Inc., 2001.

- [73] Rule, G.S., Montagna, R.A., and Durst, R.A. Rapid method for visual identification of specific DNA sequences based on DNA-tagged liposomes. Clinical chemistry 42 (1996) : 1206-1209.
- [74] Nimitphak, T., Meemetta, W., Arunrut, N., Senapin, S., and Kiatpathomchai, W. Rapid and sensitive detection of *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick. Molecular and Cellular Probes 24 (2010) : 1-5.
- [75] Puthawibool, T., Senapin, S., Flegel, T.W., and Kiatpathomchai, W. Rapid and sensitive detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawns by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. Molecular and Cellular Probes 24 (2010) : 244-249.
- [76] Connelly, J.T., Nugen, S.R., Borejsza-Wysocki, W., Durst, R.A., Montagna, R.A., and Baeumner, A.J. Human pathogenic *Cryptosporidium* species bioanalytical detection method with single oocyst detection capability. Analytical and Bioanalytical Chemistry 391 (2008) : 487-495.

ภาคผนวก

การนำ Plasmid ที่มีส่วนยีน 56 kDa antigen สอดแทรกเข้าสู่ Competent cells

1. นำ DH5 α (Competent cells) มา 100 μ l เติม Plasmid ที่ต้องการเพิ่มปริมาณลงไป 2 μ l (0.1 ng) ผสมให้เข้ากันด้วย Pipette อย่างเบา มือ วางทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที เพื่อให้ Plasmid เกาะติดบนผิวเซลล์
2. นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 50 วินาที เพื่อให้เกิดการ Flip-Flop ของ Phospholipid ให้ Plasmid เข้าสู่เซลล์ หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งอีกรอบเพื่อหยุดปฏิกิริยา
3. เติม Luria-Bertani (LB) broth 1 mL แล้วย้ายลง Plate
4. วางบน Orbital shaker ความเร็ว 150 rpm นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C
5. นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm นาน 3 นาที
6. ดูดของเหลวด้านบนออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 200 μ l
7. นำมากระจายบน LB broth plate ที่มี Ampicillin (100 μ g/ mL) บ่มเลี้ยงในตู้ Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 14-16 ชั่วโมง
8. นำ Loop เขี่ย Colony มา Streak บน LB broth plate บ่มเลี้ยงในตู้ Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 14-16 ชั่วโมง
9. นำ Loop เขี่ย Colony ลงใน LB broth 6 mL บ่มเลี้ยงในตู้ Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 14-16 ชั่วโมง
10. สกัด Plasmid ที่ได้ด้วย GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
11. นำ Plasmid ที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วย Duplex nested PCR เพื่อดูยีน 56 kDa antigen

การเพาะเลี้ยง Vero cells

เพาะเลี้ยงเซลล์ Vero cells (เป็นเซลล์ Epithelium จากเนื้อเยื่อไตของ African green monkey) ในอาหารเลี้ยง Medium 199 powder with Earle's salt, 2mM L-glutamine, without Na bicarbonate (GIBCO™) ที่เติม 5% Fetal bovine serum (FBS) และ 5% tryptose phosphate broth (TPB) ในช่วง pH 7.2-7.4 (ปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaHCO₃) เพาะเลี้ยงในตู้ Incubator ที่ อุณหภูมิ 35°C และ CO₂ 5%

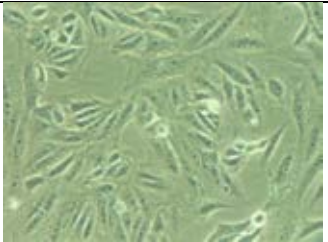
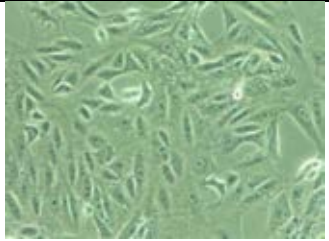
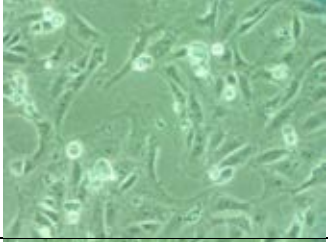
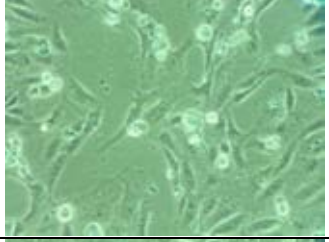
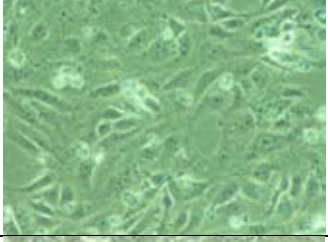
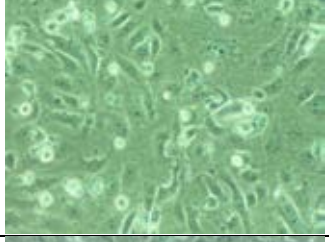
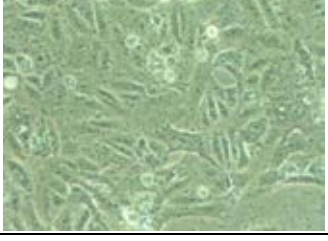
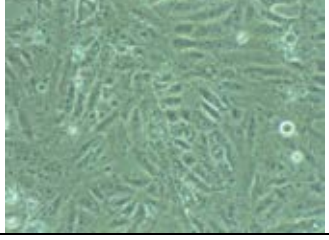
การเพาะเลี้ยงเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วย Vero cells

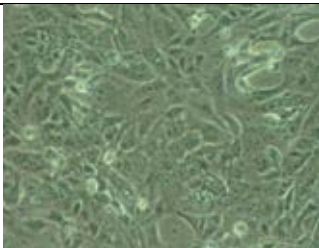
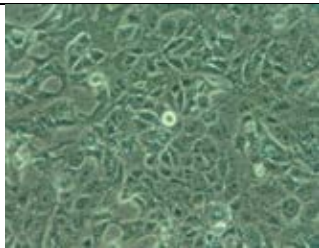
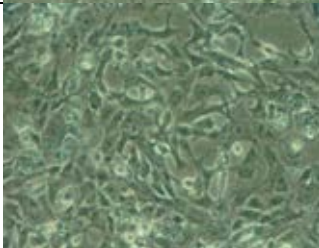
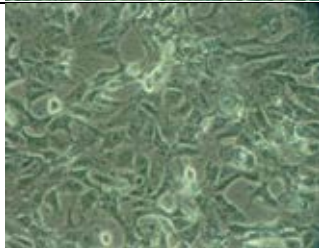
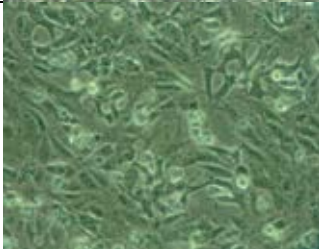
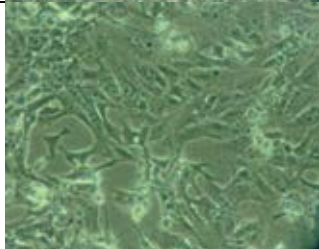
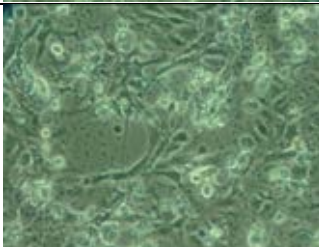
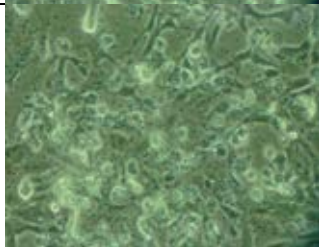
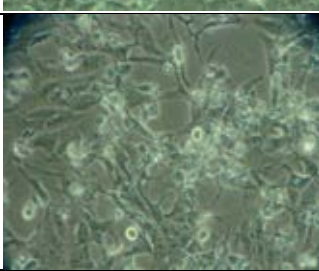
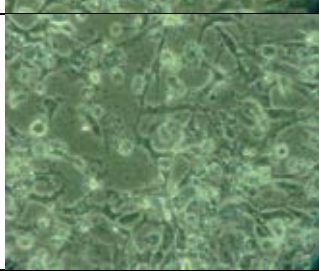
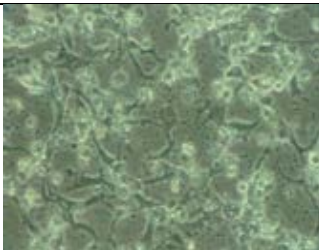
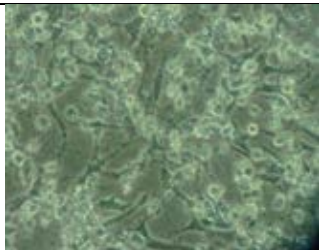
1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จาก Flask ที่เลี้ยง Vero cells ทิ้ง
2. เติม BHI (Brain heart infusion) broth 400 µl ลงใน Flask ในข้อ 1 (BHI ช่วยให้เชื้อเกาะติดและเข้าเซลล์)
3. ทำความสะอาดที่ปากหลอดเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วยแอลกอฮอล์ ดูดขึ้นลงเพื่อกระจายเชื้อ ดูดแบ่งเชื้อมา 50 µl ใส่ลงใน Flask
4. Rocking : นำ Flask ตั้งบน Orbital shaker (โดยวางที่ริมภาชนะด้านใดด้านหนึ่ง) ตั้ง speed เบอร์ 7 นาน 1 ชม. (เปลี่ยนทิศที่วาง Flask 4 ทิศ นานทิศละ 15 นาที)
5. เติม M199 media 4.5 mL (ปริมาตรสุดท้าย 5 mL/ Flask)
6. บ่มเลี้ยงที่ในตู้ Incubator บันทึกผลประจำวัน โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

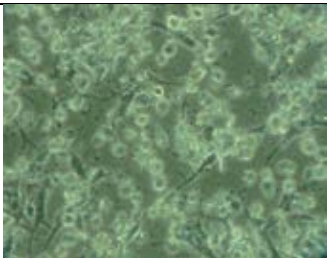
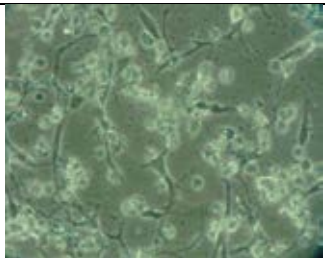
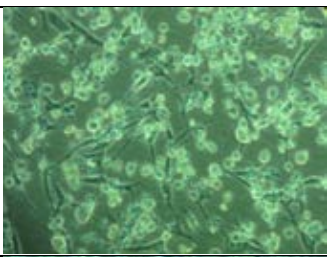
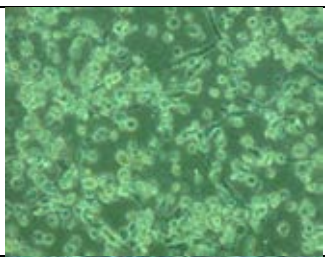
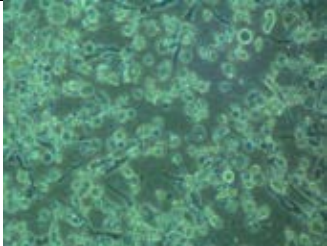
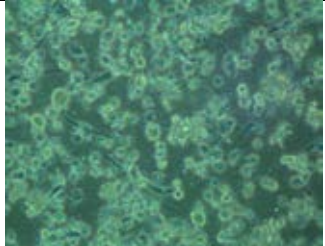
ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วย Vero cells

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *O. tsutsugamushi* ใน Vero cells เนื่องจากเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในเซลล์ เชื้อที่ได้จะนำมาใช้เป็นตัวอย่าง DNA สำหรับการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดตรวจคัดกรองโรค และ Positive control โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 38

ตารางที่ 38 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ Vero cells หลังจากเติมเชื้อ *O. tsutsugamushi* ที่เวลาต่างๆ (นับวันที่เติมเชื้อ (Inoculation) เป็น day 0)

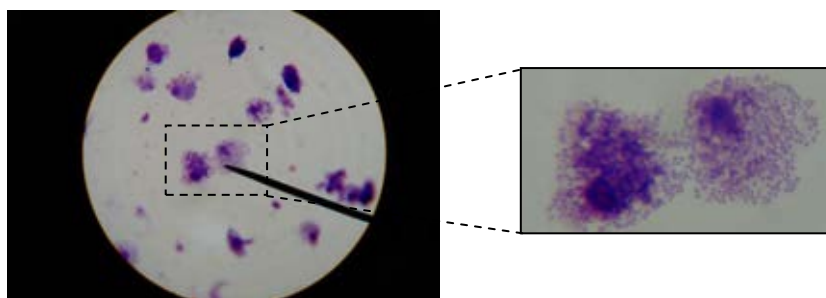
ขั้นตอน/ ระยะเวลา	Flask 1	Flask 2
Day 0 : ก่อนใส่เชื้อ		
Day 0 (Inoculation) : หลังใส่เชื้อทันที		
Day 0 : หลังใส่เชื้อ 1 ชั่วโมง		
Day 1		
Day 2	วันหยุด ไม่ได้บันทึกผล	วันหยุด ไม่ได้บันทึกผล
Day 3	วันหยุด ไม่ได้บันทึกผล	วันหยุด ไม่ได้บันทึกผล

ขั้นตอน/ ระยะเวลา	Flask 1	Flask 2
Day 4		
Day 5		
Day 6		
Day 7		
Day 8		
Day 9	วันหยุด ไม่ได้บันทึกผล	วันหยุด ไม่ได้บันทึกผล
Day 10	วันหยุด ไม่ได้บันทึกผล	วันหยุด ไม่ได้บันทึกผล
Day 11		

ขั้นตอน/ ระยะเวลา	Flask 1	Flask 2
Day 12		
Day 13	วันหยุด ไม่ได้บันทึกผล	วันหยุด ไม่ได้บันทึกผล
Day 14		
Day 15 : Harvest day		

การย้อมเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วยเทคนิค Cytospin

1. เตรียมชุด Cytospin : ทำความสะอาดกระจกสไลด์ด้วยแอลกอฮอล์ วางลงในที่ล็อคโลหะ ใส่กระดาษ Filter และแผ่นกรวยพลาสติกสำหรับเติมเชื้อ ปิดล็อคให้เรียบร้อย
2. เติม PBS 50 μ l ลงใน Eppendorf
3. สุ่มดูดตัวอย่างเชื้อจาก Flask ที่เลี้ยงเชื้อไว้ 50 μ l ใส่ลง Eppendorf ในข้อ 2 ผสมให้เข้ากัน
4. นำตัวอย่างเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3 ใส่ลงในชุด Cytospin ที่เตรียมไว้ในข้อ 1
5. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Cytospin ที่ความเร็ว 1,000 rpm นาน 5 นาที
6. เมื่อครบตามเวลา นำสไลด์ออกจากเครื่อง Cytospin และเอา Filter ออก ทิ้งสไลด์ไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
7. นำสไลด์ที่แห้งแล้วแช่ลงใน Methanol นาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง
8. หยดสีย้อม Giemsa (Giemsa : PBS = 1:5) ลงบนสไลด์ให้ท่วมตำแหน่งที่ต้องการย้อม โดยใช้ 5 mL ต่อ 1 สไลด์
9. บ่มทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
10. รวบรวมสไลด์ด้วย Distilled water ทิ้งไว้ให้แห้ง
11. เมื่อสไลด์แห้ง หยดน้ำมัน 1 หยด แล้วนำไปส่องกล้อง



ภาพที่ 37 แสดงผลการทำ Cytospin ในวันที่ 14 ของการ Inoculation จะสังเกตเห็นเชื้อ *O. tsutsugamushi* อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของ Vero cells (เชื้อจาก Sample : PBS = 1:1)

การเก็บเกี่ยวเชื้อ *O. tsutsugamushi*

1. เมื่อ Vero cells หลุดจาก Flask เกือบหมด ให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จาก Flask ที่เพาะเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดก้นกลม
2. เติม K36 buffer (16.5 mM KH₂P₄, 33.3 mM K₂HPO₄, 100 mM KCl and 15.5 mM NaCl, pH 7.2-7.3) 1 mL ลงใน Flask เพื่อช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์แตก
3. นำเม็ดแก้ว (Glass bead) ใส่ลงใน Flask และกลิ้งไปมาเพื่อให้เซลล์หลุด
4. ดูดเชื้อจากข้อ 3 ปริมาณ 1 mL เติมนลงในหลอดก้นกลมในข้อ 1
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C
6. ดูของเหลวส่วนบนทิ้งจนเหลือแต่ Pellet ที่ก้นหลอด
7. เติม SRM buffer (4.9 mM L-glutamine, 3.6 mM KH₂P₄, 7.1 mM K₂HPO₄, 218 mM sucrose, 1% Renografin 76 and 5 mM MgCl₂) 1 mL ผสมให้เข้ากัน
8. ดูดแบ่งมา 100 µl ผสมกับ PBS 100 µl แล้วนำไปสกัด DNA

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว นารีธร อุดมทองสุข เกิดเมื่อวันที่ 15 ธันวาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาในหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต (สาขาเภสัชอุตสาหกรรม) จาก คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547 และศึกษาต่อในระดับปริญญา มหาบัณฑิต ในหลักสูตรวิศวกรรมชีวเวช คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี การศึกษา 2551