

เทคนิคใหม่ทางคอมพิวเตอร์ในการอ่านผล
Treponema pallidum Particle Agglutination Test (TPPA)



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A NOVEL COMPUTER READING FOR *Treponema pallidum*
PARTICLE AGGLUTINATION TEST (TPPA)



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เทคนิคใหม่ทางคอมพิวเตอร์ในการอ่านผล <i>Treponema pallidum</i> Particle Agglutination Test (TPPA)
โดย	นายภาคภูมิ เดชหัสติน
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

----- คณะบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

----- ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สະระชนะ)

----- อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

----- กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ลิขิต ปรียานนท์)

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ ด้วยความกรุณาและได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล กรรมการอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา ความเอาใจใส่ ให้คำปรึกษา ให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไขจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สาระชนะ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ลิขิต ปรียานนท์ ที่ให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้และประสบการณ์แก่ผู้วิจัย ขอขอบคุณคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่พิจารณาโครงการและเห็นชอบอนุมัติให้ทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณหัวหน้าฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิตและเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่อนุญาตให้ใช้เครื่องมือวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอยอำนวยความสะดวกและประสานงานตลอดการศึกษา

ขอขอบคุณศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้ทุนการศึกษา และขอขอบพระคุณผู้อำนวยการและผู้ช่วยผู้อำนวยการ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยที่ให้โอกาสทางการศึกษา มาโดยตลอด และขอขอบคุณรุ่นพี่ เพื่อนร่วมรุ่น และรุ่นน้องนักศึกษาพยาบาลระดับบัณฑิตศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว และกัลยาณมิตรทุกท่านที่ให้กำลังใจ และช่วยเหลือสนับสนุนตลอดมา คุณประโยชน์อันเกิดจากการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

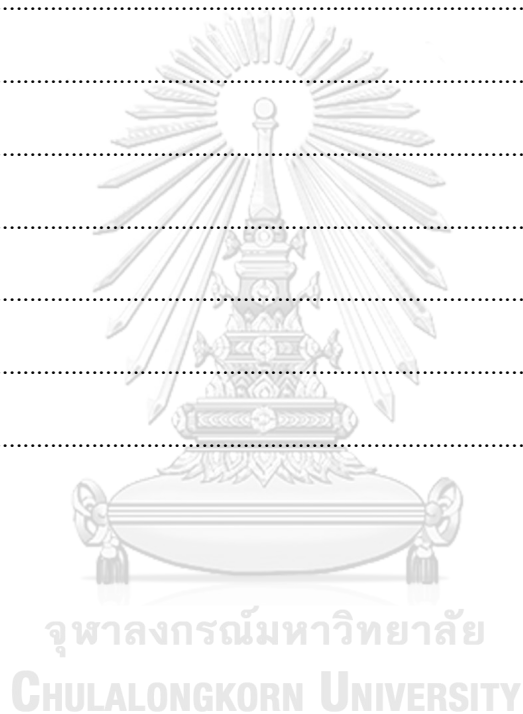
ภาควิชา เภสัชศาสตร์
ภาควิชา เภสัชศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง	ง
กิตติกรรมประกาศ.....จ	จ
สารบัญ.....ฉ	ฉ
สารบัญตาราง.....ฌ	ฌ
สารบัญรูปภาพ.....ญ	ญ
บทที่ 1.....1	1
บทนำ.....1	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1	1
2. กรอบแนวคิดการวิจัย.....2	2
3. คำถามของการวิจัย.....1	1
4. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....1	1
5. สมมติฐาน.....1	1
6. ขอบเขตของงานวิจัย.....1	1
7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....1	1
บทที่ 2.....2	2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....2	2
1. ต้นกำเนิดของโรคซิฟิลิส.....2	2
2. เชื้อก่อโรค.....3	3
3. การติดต่อ.....4	4
4. ระยะของโรคซิฟิลิส.....5	5

5. ระบาดวิทยาของซีฟิลิส.....	7
6. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ	9
7. การคิดค้นอุปกรณ์แปลผลการจับกลุ่ม (Agglutination).....	13
8. ซอฟต์แวร์และภาษาที่ใช้เขียนโค้ด ⁽⁷⁶⁾	17
9. ไมโครคอนโทรลเลอร์ (Microcontroller)	17
10. Arduino Uno	19
11. สเต็ปป์มอเตอร์ (Stepping motor).....	20
บทที่ 3.....	21
วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์.....	21
2. เครื่องมือ	21
3. วิธีการทดลอง	21
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	21
3.2 การขอพิจารณาจริยธรรมในการวิจัย.....	22
3.3 การเตรียมตัวอย่างควบคุมสำหรับใช้ในการปรับแต่งค่าที่เหมาะสมในการอ่านผล TPPA โดยซอฟต์แวร์.....	22
3.4 การสร้างเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ.....	24
3.5 การออกแบบคำสั่งของโปรแกรมซอฟต์แวร์	25
3.5.1 ฟังก์ชันการรับค่าจากกล้อง.....	25
3.5.2 ฟังก์ชันการเชื่อมต่อกับ Arduino	25
3.5.3 ฟังก์ชันถ่ายภาพ	26
3.5.4 ฟังก์ชัน Crop ภาพ.....	26
3.5.5 ฟังก์ชันการเลือกค่าสีที่ต้องการในมาตรฐานสี HSL	26
3.5.6 ฟังก์ชันการแปลผลรูปภาพให้เป็นภาพเดี่ยว	26

3.6 การตรวจซีฟิลิสด้วยวิธี TPPA.....	26
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	27
บทที่ 4	29
ผลการทดลอง.....	29
1. เครื่องบันทึกภาพต้นแบบ	29
3. การอ่านและแปลผลการตรวจซีฟิลิสด้วยวิธี TPPA ด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์35	
บทที่ 5	44
อภิปรายผลการวิจัย.....	44
บทที่ 6	49
สรุปผลการทดลอง.....	49
บรรณานุกรม	50
ภาคผนวก	58
ประวัติผู้เขียน	96



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	เชื้อ T. pallidum สายพันธุ์ Sup-species ต่างๆ และการก่อโรคที่สำคัญ ⁽²¹⁾	3
ตารางที่ 2	คุณสมบัติ Arduino Uno ⁽⁷⁸⁾	20
ตารางที่ 3	รายละเอียดผลปฏิกิริยาของวิธี TPPA ที่ใช้ในการตรวจซีฟิลิส ซึ่งถูกอ่านและแปลผลด้วย เครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ เปรียบเทียบกับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยเจ้าหน้าที่ ผู้ปฏิบัติงาน ผู้ปฏิบัติงาน (N=65).....	35
ตารางที่ 4	ผลสรุปการตรวจซีฟิลิสในตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธี TPPA ซึ่งทำการอ่านผลและแปลผล ด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ เปรียบเทียบกับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยผู้ปฏิบัติงาน	43



สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1	กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	2
รูปที่ 2	เครื่องช่วยแปลผลตกตะกอนที่ก้นหลุมที่ถูกคิดค้นในปี พ.ศ. 2535 ⁽⁷¹⁾	13
รูปที่ 3	เครื่องมือแปลผลตกตะกอนที่ก้นหลุม และตรวจจับแบบ 2 ระนาบด้วย photoelectric ⁽⁷²⁾ ...	14
รูปที่ 4	เทคนิคโครงข่ายใยประสาทสำหรับแปลผลตกตะกอนที่ก้นหลุม ⁽⁷³⁾	14
รูปที่ 5	การเชื่อมต่อเครื่องสแกนเนอร์เข้ากับคอมพิวเตอร์ เพื่อเก็บภาพผลการตกตะกอนและประมวลผลด้วยซอฟต์แวร์สำหรับการแปลผล ⁽⁷⁴⁾	15
รูปที่ 6	การพัฒนาเพลทเป็นรูปชั้นบันไดเฉียงเพื่อใช้ในการอ่านปฏิกิริยา ⁽⁷⁵⁾	16
รูปที่ 7	การพัฒนา Telecentric lens สำหรับถ่ายภาพปฏิกิริยาการจับกลุ่ม หมายเลข 801 คืออุปกรณ์บันทึกภาพ หมายเลข 802 คือ Telecentric lens ที่มีคุณสมบัติในการถ่ายภาพมุมกว้างให้ได้ทุกหลุมปฏิกิริยา-ของเพลท (หมายเลข 803) ⁽⁷⁵⁾	16
รูปที่ 8	โครงสร้างของบอร์ด Arduino Uno ⁽⁷⁸⁾	19
รูปที่ 9	ขนาดของหลุมปฏิกิริยารูปตัว U ที่ใช้ในการในการศึกษาทดลอง	23
รูปที่ 10	แผนผังการออกแบบเครื่องบันทึกภาพปฏิกิริยา TPPA.....	24
รูปที่ 11	วัสดุอุปกรณ์ภายในเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ (บน) ภาพมุมบนภายหลังเปิดฝาครอบด้านบนของเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ หมายเลข 1 คือสแต็ปปีงมอเตอร์ หมายเลข 2 คือเครื่องเลื่อนแกนสองมิติ หมายเลข 3 คือไมโครคอนโทรลเลอร์ (ล่าง) ภาพมุมข้างภายหลังเปิดบานพับด้านข้างของเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ	30
รูปที่ 12	โครงสร้างภายนอกเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ (บน) เครื่องบันทึกภาพต้นแบบพร้อมฝาครอบขณะเปิดบานพับด้านข้าง (ล่าง) เครื่องบันทึกภาพต้นแบบพร้อมฝาครอบขณะปิดบานพับด้านข้าง..	31
รูปที่ 13	ความแตกต่างระหว่างพื้นที่ของปฏิกิริยา TPPA ที่ให้ผลแต่ละแบบ (B) ผลบวก พบว่ารัศมีของวงกลมที่เกิดจากการเกาะกลุ่มของเม็ดเจลาตินจากปฏิกิริยามีความยาวกว่า ในขณะที่ (A) ผลบวกพบว่ารัศมีของวงกลมที่เกิดจากการเกาะกลุ่มของเม็ดเจลาตินจากปฏิกิริยามีความยาวสั้นกว่า.....	32

รูปที่ 14 ผลการปรับแต่งค่ามาตรฐานสี HSL (A) ปฏิบัติการที่บันทึกได้จากการปรับแต่งค่าความสว่าง ค่า Light S เท่ากับ 0.1 และค่า Light F เท่ากับ 1 (B) ปฏิบัติการที่บันทึกได้จากการปรับค่าโทนสี ค่า Hue S เท่ากับ 300 และค่า Hue F เท่ากับ 0 (C) ปฏิบัติการที่บันทึกได้จากการปรับค่าความอิ่มสี ค่า Sat S เท่ากับ 0.2 และค่า Sat F เท่ากับ 1 (D) ปฏิบัติการที่บันทึกได้จากค่ามาตรฐานสี HLS ภายหลังปรับแต่งจนมีความเหมาะสมที่สุดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งมีค่า HSL เท่ากับ 0 - 300, 0.2 - 1 และ 0.1 - 1 ตามลำดับ33

รูปที่ 15 ปฏิบัติการ TPPA ที่ทดสอบกับตัวควบคุมบวกและลบในระหว่างการออกแบบคำสั่งโปรแกรมซอฟต์แวร์ (บน) microtiter plate ที่ใช้ทำปฏิกริยากับตัวควบคุมบวกที่ไต่เตอร์ 1:1, 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 และตัวอย่างควบคุมลบ (ล่าง).....34



บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

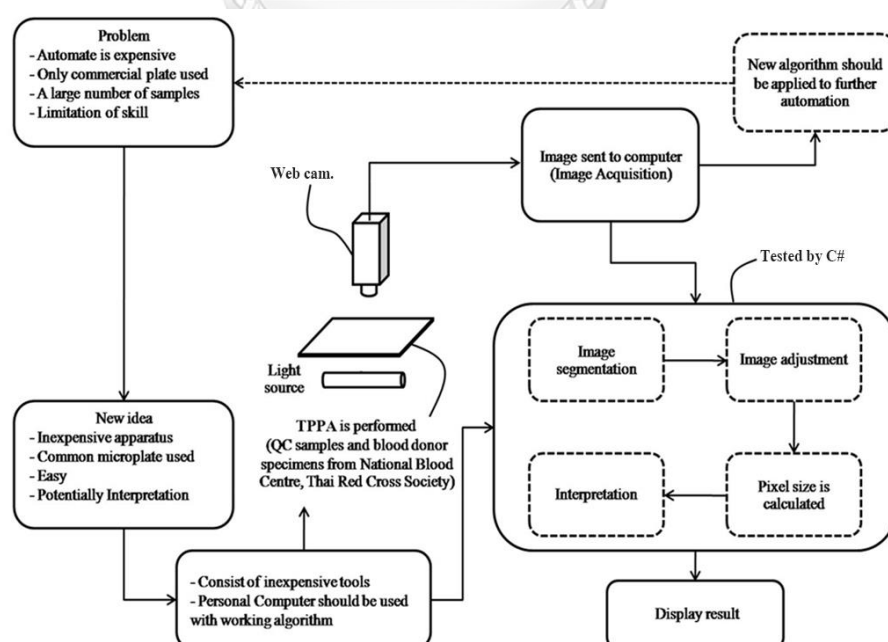
โรคซิฟิลิส (Syphilis) เป็นโรคที่เกิดจากการติดต่อทางกระแสโลหิต สารคัดหลั่ง และเพศสัมพันธ์ และยังสามารถติดต่อผ่านทางแม่สู่ลูกขณะอยู่ในครรภ์หรือแรกคลอด จากข้อมูลรายงานโรคในระบบเฝ้าระวังโรค 506 สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม ถึงวันที่ 22 มิถุนายน 2561 พบผู้ป่วยซิฟิลิสจำนวน 3,564 ราย จากทั้งหมด 77 จังหวัด คิดเป็นอัตราป่วย 5.45 ต่อแสนประชากร อัตราส่วนผู้ป่วยเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 1:0.63 โดยกลุ่มอายุที่พบมากที่สุดเรียงตามลำดับ คือ 15-24 ปี (33.53 %) 25-34 ปี (25.14 %) และ 35-44 ปี (16.53 %) นอกจากนี้ยังพบอัตราผู้ป่วยโรคซิฟิลิสที่มีแนวโน้มสูงขึ้นในทุกปีในตลอดช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา⁽¹⁾ โรคซิฟิลิสมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียที่ชื่อว่า *Treponema pallidum* ซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคและภาวะแทรกซ้อนต่อระบบต่างๆ ของร่างกายได้หลายระบบ เช่น ระบบประสาทส่วนกลาง (Neurosyphilis) ซึ่งทำให้เป็นอัมพาต ระบบหัวใจและหลอดเลือดระบบสายตาที่ก่อให้เกิดอาการตาบอดอย่างถาวรได้^(2, 3) เนื่องจากซิฟิลิสสามารถติดต่อผ่านการรับโลหิตและผลิตภัณฑ์ของโลหิต ด้วยเหตุนี้ในหลายประเทศจึงได้ให้ความสำคัญในการตรวจคัดกรองซิฟิลิสในโลหิตของผู้บริจาคโลหิตทุกราย การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาซึ่งอาศัยวิธีการตรวจหาภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ เป็นหนึ่งในเทคนิคที่ใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคซิฟิลิส⁽⁴⁾ ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ 1. การตรวจแบบ Non-treponemal test ที่มักตรวจพบแอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นในระยะแรกของการติดเชื้อ โดยมีวิธีที่นิยมใช้ คือ วิธี Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) และวิธี Rapid Plasma Reagin (RPR) และ 2. การตรวจแบบ Treponemal test ที่สามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ตลอดชีวิต⁽⁵⁾ และมีความจำเพาะต่อตัวแอนติเจนของเชื้อ *T. pallidum* โดยมีวิธีที่นิยมใช้ คือ วิธี Enzyme Immunoassays (EIAs) วิธี *Treponema pallidum* Particle Agglutination (TPPA) วิธี *Treponema pallidum* Hemagglutination Assays (TPHA) และวิธี Fluorescent Treponemal Antibody Absorption (FTA-ABS) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง⁽⁶⁾ ปัจจุบันงานธนาคารเลือดในหลายประเทศ นิยมใช้วิธี Treponemal test สำหรับการตรวจคัดกรองซิฟิลิสในโลหิตที่ได้รับบริจาค เพื่อคัดแยกผู้บริจาคโลหิตที่มีร่องรอยของการเป็นโรคซิฟิลิสออกจากผู้บริจาคโลหิตที่สุขภาพดี⁽⁷⁾

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เป็นหน่วยงานหลักของประเทศ ในการจัดหาโลหิตให้มีปริมาณเพียงพอ ปลอดภัยและมีคุณภาพสูงสุด และได้มีการตรวจคัดกรองโรคซิฟิลิสในโลหิตของผู้บริจาคทุกราย ด้วยวิธี Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) หากผลการ

ตรวจเป็นบวก ต้องมีการตรวจด้วยวิธีการอื่นร่วมด้วยเพื่อยืนยัน อาทิเช่น วิธี RPR และวิธี TPPA⁽⁸⁾ อย่างไรก็ตามวิธี TPPA เป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาในการตรวจค่อนข้างนาน และต้องอาศัยทักษะของผู้ปฏิบัติงานสูงในการอ่านผล ในกรณีที่มีจำนวนสิ่งส่งตรวจในปริมาณมาก ประกอบกับเวลาในการปฏิบัติงานที่จำกัด อาจทำให้ผู้ปฏิบัติการเกิดความผิดพลาดในการอ่านผลได้ ตลอดจนการทดสอบดังกล่าวต้องอ่านผลปฏิกิริยาด้วยสายตา จึงอาจทำให้เกิดความแตกต่างในการแปลผลการทดสอบเมื่อใช้ผู้ปฏิบัติงานหลายคน นอกจากนี้บางสิ่งส่งตรวจอาจมีผลการทดสอบที่ค่อนข้างคาบเกี่ยว ในการตัดสินผลบวกหรือผลลบ หากไม่มีความชำนาญมากเพียงพอ ซึ่งส่งผลให้การรายงานผลคลาดเคลื่อนได้

การศึกษานี้จึงได้บูรณาการทักษะความรู้ด้านคอมพิวเตอร์ร่วมกับความรู้ทางเทคนิคการแพทย์ เพื่อพัฒนาเทคนิคสำหรับช่วยในการวินิจฉัยโรคซิฟิลิส บนพื้นฐานของการใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ราคาไม่แพง และสามารถแปลผลบวกและผลลบได้จริง โดยพัฒนาเทคนิคการประมวลผลภาพดิจิทัล (Digital Image Processing) เข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ภาพถ่ายของปฏิกิริยาการจับกลุ่มตกตะกอนระหว่างเม็ดเจลาตินที่เคลือบด้วยแอนติเจนของเชื้อที่ถูกทดสอบด้วยวิธี TPPA และนำไปแปลผลด้วยอัลกอริทึมที่เขียนด้วยภาษา C# เนื่องจากเป็นคำสั่งภาษาที่มีฟังก์ชันสำหรับการประมวลผลภาพดิจิทัลมากมาย และมีความสั้นกระชับ จากนั้นทำการประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคการประมวลผลภาพดิจิทัลที่ได้พัฒนาขึ้น โดยเปรียบเทียบกับวิธี TPPA ที่อ่านผลด้วยตาเปล่าโดยผู้ชำนาญการ

2. กรอบแนวคิดการวิจัย



รูปที่ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

3. คำถามของการวิจัย

เครื่องต้นแบบบันทึกภาพและซอฟต์แวร์ที่พัฒนาขึ้นมาสามารถอ่านและแปลผลการทดสอบซีฟิลิสด้วยวิธี TPPA ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับผลการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยผู้ปฏิบัติงานหรือไม่

4. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

4.1 เพื่อสร้างเครื่องต้นแบบบันทึกภาพและซอฟต์แวร์ ที่สามารถอ่านและแปลผลการทดสอบการตรวจวินิจฉัยโรคซีฟิลิสด้วยวิธี TPPA

4.2 เพื่อประเมินประสิทธิภาพการอ่านและแปลผลของเครื่องต้นแบบบันทึกภาพและซอฟต์แวร์ เปรียบเทียบกับวิธี TPPA ที่อ่านผลด้วยตาเปล่า

5. สมมติฐาน

เครื่องต้นแบบบันทึกภาพและซอฟต์แวร์ สามารถอ่านและแปลผลการทดสอบซีฟิลิสด้วยวิธี TPPA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทียบเท่ากับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยผู้ปฏิบัติงาน เพื่อช่วยในการวินิจฉัยซีฟิลิส บนพื้นฐานของการใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ราคาไม่แพง ตัดสินและรายงานผลความแรงของปฏิกิริยาได้โดยถ่ายภาพการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแล้วแปลงเป็นภาพดิจิทัล สามารถนำภาพการเกิดปฏิกิริยาเพื่อทำการวิเคราะห์และแปลผลต่อไปได้

6. ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเครื่องต้นแบบบันทึกภาพและซอฟต์แวร์ ที่สามารถอ่านและแปลผลการทดสอบการตรวจวินิจฉัยโรคซีฟิลิสด้วยวิธี TPPA และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการอ่านและแปลผลระหว่างเครื่องต้นแบบบันทึกภาพและซอฟต์แวร์กับการอ่านและแปลผลด้วยตาเปล่า โดยทำการเก็บพลาสมาจากผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวนทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนมกราคม 2559 ถึงเดือน พฤษภาคม 2563

7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

เพื่อให้ได้เครื่องต้นแบบบันทึกภาพและซอฟต์แวร์สำหรับอ่านผลการทดสอบการตรวจวินิจฉัยโรคซีฟิลิสด้วยวิธี TPPA ที่มีประสิทธิภาพ ราคาถูก และลดความผิดพลาดจากการอ่านผลการทดสอบเนื่องจากตัวบุคคล

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ต้นกำเนิดของโรคซิฟิลิส

ต้นกำเนิดของโรคซิฟิลิสถูกถกเถียงมาเป็นเวลาหลายทศวรรษ⁽⁹⁻¹¹⁾ แต่ยังไม่สามารถสรุปเป็นที่แน่ชัดได้ อย่างไรก็ตามมีทฤษฎีหลักอยู่ 2 ทฤษฎีที่กล่าวถึงต้นกำเนิดของโรคนี้ ได้แก่ ทฤษฎีโคลัมเบีย (Columbian theory) หรือทฤษฎีโลกใหม่ (The New World Theory) และ ทฤษฎีก่อนโคลัมเบีย (Pre-Columbian theory) หรือทฤษฎีโลกเก่า (The Old World Theory) โดยทฤษฎีแรกเชื่อว่าโรคนี้ถูกนำมาจากทวีปอเมริกาโดยลูกเรือของโคลัมบัส นักสำรวจทางทะเล ผู้ค้นพบทวีปอเมริกา แล้วนำมาระบาดในยุโรป ส่วนทฤษฎีก่อนโคลัมเบียเชื่อว่าซิฟิลิสเป็นโรคในเขตร้อนที่มาจากการค้าทาสจากทวีปแอฟริกาไปยังทวีปยุโรปและทวีปอเมริกา

อย่างไรก็ตามการระบาดใหญ่ครั้งแรกที่มีการบันทึกไว้ในประวัติศาสตร์เกิดขึ้นในช่วงศตวรรษที่ 15 โดยเริ่มที่ประเทศฝรั่งเศสเป็นประเทศแรกแล้วจึงแพร่ไปทั่วยุโรปในช่วงปีค.ศ. 1495 จากนั้นจึงกระจายไปสู่ประเทศอินเดียในปี ค.ศ. 1498 และประเทศจีนในปีค.ศ. 1505⁽¹⁰⁾ สำหรับในประเทศไทยโรคซิฟิลิสมีการบันทึกเกี่ยวกับการระบาดไว้โดยนักบุญชาวฝรั่งเศส ในสมัยรัชกาลที่ 4 – 5 และมีหลักฐานการระบาดของโรคที่สำคัญ คือพระราชบัญญัติป้องกันสัจจรโรค ร.ศ. 127 (พ.ศ. 2451) ซึ่งจุดประสงค์หนึ่งคือเพื่อควบคุมโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่รวมโรคซิฟิลิสไว้ด้วย หลังจากนั้นโรคนี้ก็ได้อาศัยในสังคมไทยมาอย่างต่อเนื่อง และมีการระบาดรุนแรงเป็นครั้งคราว⁽¹²⁾ นอกจากนี้ยังมีการค้นพบที่สำคัญเกี่ยวกับโรคซิฟิลิส ดังต่อไปนี้

ในปี ค.ศ.1905 Schaudinn และ Hoffmann ค้นพบว่าเชื้อ *Treponema pallidum* เป็นสาเหตุของโรคซิฟิลิส⁽¹³⁾

ในปี ค.ศ.1906 Wassermann, Neisser และ Bruck ค้นพบปฏิกิริยา Wassermann โดยเป็นการตรวจหา Lipoidal Antibodies กล่าวคือเมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื้อเยื่อจนปล่อยสารที่มีส่วนประกอบของไขมัน มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง Lipoidal Antibodies หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Reagin⁽¹⁴⁾

ในปี ค.ศ.1949 Nelson และ Mayer ค้นพบ Specific Serological Test สำหรับซิฟิลิส เรียกว่า *Treponema pallidum Immobilization*⁽¹⁵⁾

ในปี ค.ศ.1964 Hunter, Deacon และ Mayer ได้ค้นพบวิธีตรวจ Absorbed Florescent *Treponema* Antibody (FTA-ABS)⁽¹⁶⁾

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1964-ปัจจุบัน ได้มีพัฒนาการตรวจให้มีความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ให้มากขึ้น เช่น Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)⁽¹⁷⁾, Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test (FTA-ABS) ชนิด IgM^(18, 19), Immunochromatography Test (ICT)⁽²⁰⁾

2. เชื้อก่อโรค

โรคซิฟิลิสเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ชื่อว่า *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) จัดอยู่ใน Order *Spirochaetales* Family *Treponemataceae* Genus *Treponema* Species *Pallidum* โดยเชื้อประกอบด้วย 4 Sub-species ที่ก่อให้เกิดโรคที่แตกต่างกันไป ดังตารางที่ 1⁽²¹⁾

ตารางที่ 1 เชื้อ *T. pallidum* สายพันธุ์ Sup-species ต่างๆ และการก่อโรคที่สำคัญ⁽²¹⁾

	Sub-species			
	<i>pallidum</i>	<i>Pertenue</i>	<i>endemicum</i>	<i>carateum</i>
โรค	โรคซิฟิลิส (Syphilis)	โรคคุดทะราด (Yaws)	โรคเบเจิล (Bejel)	โรคพินตา (Pinta)
การติดเชื้อ	ทั่วร่างกาย	ผิวหนัง	ผิวหนัง	ผิวหนัง
การติดต่อ	เพศสัมพันธ์ มารดาสู่ทารก	ไม่ติดต่อทาง เพศสัมพันธ์	ไม่ติดต่อทาง เพศสัมพันธ์	ไม่ติดต่อทาง เพศสัมพันธ์
อายุที่พบ	วัยเจริญพันธุ์	ทุกช่วงอายุ	ทุกช่วงอายุ	ทุกช่วงอายุ
รอยโรค	Syphiloma	Papilloma on exposed skin	Dermal, perioral	Dermal on dorsum of the foot

เชื้อ *T. pallidum* มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2 ไมครอน ยาว 6-20 ไมครอน โดยลักษณะโครงสร้างจะเป็นแบบบิดเป็นเกลียว (Spirochete) ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ 2 ชั้น ได้แก่ ชั้นนอก (Outer Membrane) และชั้นใน (Cytoplasmic Membrane or Inner Membrane) โครงสร้างที่เหลือที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในทั้งหมดเรียกโปรโตพลาสติก ไคลินเดอร์ (Protoplasmic Cylinder) ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ทั้ง 2 ชั้นเรียกว่าเพอริพลาสติกสเปซ (Periplasmic Space) ซึ่งจะมีเปปทิโดไกลแคนส์ (Peptidoglycans) บางๆ แทรกอยู่ ทำให้แบคทีเรียสามารถคงรูปร่างและมีความยืดหยุ่นอยู่ได้ และยังเป็นที่อยู่ของแฟลกเจลลา (Flagella) ซึ่งยึดเกาะอยู่ที่บริเวณด้านหัวและท้ายของแบคทีเรีย (Terminal end) มีทิศยื่นไปทางด้านปลายด้านตรงข้ามของตัวแบคทีเรีย การเคลื่อนที่ยึดหดของแฟลกเจลลาดังกล่าวทำให้เกิดการเคลื่อนที่แบบควงสว่าง (Cork-

screw Movement) ไปข้างหน้า นอกจากนี้แฟลกเจลลาที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์นี้ยังเป็นโครงสร้างเฉพาะตัวที่สำคัญที่ช่วยให้แบคทีเรียนี้สามารถเคลื่อนไหวได้ดีในตัวกลางที่หนืดคล้ายเจล ซึ่งมักขัดขวางการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียชนิดที่มีแฟลกเจลลาที่อยู่ภายนอกอื่นๆ (Jun Liu, 2010) นอกจากนี้เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ Dark field (DF) หรือ Phase-contrast microscopy จะสามารถมองเห็นแฟลกเจลลา และเมื่อย้อมด้วย Gram's stain จะติดสีแดงแต่ไม่ชัดเจน (Atypical Gram Negative)⁽²²⁾

เชื้อ *T. pallidum* มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมต่ำ มีชีวิตอยู่ภายนอกร่างกายที่อุณหภูมิห้องได้ 2-3 ชั่วโมง หรือประมาณ 72 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แต่หากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -78 องศาเซลเซียสจะสามารถมีชีวิตอยู่ได้หลายปี นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ยังมีการแบ่งตัวแบบช้า ๆ โดยจะแบ่งตัวตามขวางใช้เวลาประมาณ 30-33 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามระยะฟักตัวของเชื้อบางครั้งอาจใช้เวลานานถึง 90 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Artificial media) หรือในเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (Tissue culture) แต่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอัมตะของกระต่าย (Intratesticular inoculation of rabbits, rabbit infectivity testing; RIT)⁽²²⁾

3. การติดต่อ

เชื้อซิฟิลิสสามารถติดต่อผ่านจากคนสู่คนได้หลายวิธี ส่วนใหญ่จะติดต่อผ่านการมีเพศสัมพันธ์กับคู่นอนที่กำลังติดเชื้ออยู่ โดยเชื้อสามารถผ่านเข้าสู่ร่างกายได้โดยทั้งจากซึมผ่านทางเยื่อเมือก (mucous membrane) หรือผ่านเข้าทางแผลถลอกบริเวณผิวหนัง⁽²³⁾ นอกจากนี้การติดเชื้อเชื้อยังสามารถเกิดขึ้นได้ผ่านการสัมผัสโดยตรงกับแผลซิฟิลิส ซึ่งแผลนี้จะอยู่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก ช่องคลอด ทวารหนัก ปากทวารหนัก รวมไปถึงอาจเกิดบริเวณริมฝีปากและในช่องปาก⁽²⁴⁾ หญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อซิฟิลิส อาจมีการแพร่เชื้อสู่ทารก ส่งผลให้ทารกแรกคลอดติดเชื้อซิฟิลิสได้ (Congenital Syphilis)⁽²⁵⁾ การได้รับเลือดและส่วนประกอบของเลือดจากผู้ที่กำลังติดเชื้อก็สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้เช่นกัน⁽²⁶⁾

หลังจากที่เชื้อ *T. pallidum* เข้าสู่ร่างกายได้ประมาณ 10-14 วัน ร่างกายจะสร้างแอนติบอดีต่อตัวเชื้อชนิด IgM ขึ้นมา แล้วอีกประมาณ 4-8 วัน จะตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgG แอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นจะเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ขณะเดียวกันเชื้อจะแบ่งตัว เพิ่มจำนวน และแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง เซลล์ที่ติดเชื้อและถูกทำลายจะปล่อยสารแอนติเจนที่เรียกว่า Phospholipid (Lipoidal substance) ซึ่งเป็นสารที่ไม่พบในร่างกาย แต่สามารถสกัดได้จาก

กล้ามเนื้อหัวใจว่าเรียกว่า Cardiolipin สารนี้จะกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดี ซึ่งเดิมเรียกว่า Regain หรือ Anti-lipoidal แต่ปัจจุบันนิยมเรียกว่า Anti-cardiolipin ในการสร้างแอนติบอดี ร่างกายจะสร้างชนิด IgM ก่อน หลังจากนั้นในช่วงเวลาสั้น ๆ จะสร้างชนิด IgG ขึ้นมา กล่าวโดยสรุปได้ว่า ร่างกายมีการสร้างแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อซิฟิลิสได้ 2 ประเภท คือ เริ่มสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตัวเชื้อ (Specific treponemal Antibody) ก่อน โดยจะเป็นชนิด IgM และตามด้วย IgG หลังจากนั้นไม่นาน ร่างกายจะสร้างแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะต่อตัวเชื้อ (Non-specific treponemal Antibody) ชนิด IgM และตามด้วย IgG เช่นเดียวกัน

4. ระยะของโรคซิฟิลิส

เมื่อเชื้อ *T. pallidum* เข้าสู่ร่างกาย ผู้ได้รับเชื้อจะแสดงอาการได้หลายรูปแบบขึ้นกับการตอบสนองของแต่ละบุคคล โดยทั่วไปสามารถแบ่งลักษณะทางคลินิกออกเป็น 4 ระยะ อย่างไรก็ตามอาการของผู้ป่วยอาจไม่แสดงตามลำดับของระยะโรค แต่อาจมีการสลับหรือมีระยะที่ทับซ้อนกัน

4.1 ซิฟิลิสระยะที่ 1 (Primary syphilis) อาการของระยะนี้มักจะแสดงด้วยการมีแผลเล็ก ๆ โดยจะเกิดบริเวณที่เชื้อเข้าสู่ร่างกาย เช่น อวัยวะเพศ ริมฝีปาก นิ้วมือ ลิ้น หัวนม ทวารหนัก เป็นต้น ในระยะแรกโรคจะเป็นตุ่มเล็ก ๆ ต่อมาจึงแตกเป็นแผล และค่อย ๆ ขยายขนาดขึ้น ทั่วไปมักมีแผลเดี่ยว ลักษณะกลม ไม่เจ็บ ก้นแผลสะอาด มีน้ำหนองเยิ้ม แผลไม่ไหม้ ขอบแผลนูนแข็ง จึงถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า แผลริมแข็ง (Chancre) ขนาดของแผลมีความหลากหลายตั้งแต่ 1 ถึง 2 เซนติเมตร⁽¹⁾ นอกจากแผลแล้วอาจพบต่อมน้ำเหลืองบริเวณขาหนีบโต ระยะเวลาดังแต่ติดโรคจนเกิดอาการใช้เวลา 10 ถึง 90 วัน เฉลี่ยประมาณ 21 วัน แผลจะอยู่ยาวนาน 3-6 สัปดาห์ และสามารถหายได้เองโดยที่ไม่ต้องได้รับการรักษาใด ๆ อย่างไรก็ตามหากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษา หรือได้รับการรักษาแต่รักษาไม่ถูกต้องหรือรักษาไม่ครบจะสามารถนำเข้าสู่ระยะที่สองได้⁽²⁷⁾

4.2 ซิฟิลิสระยะที่ 2 (Secondary syphilis) ระยะนี้เป็นระยะที่เชื้อแพร่กระจายไปตามกระแสเลือดทำให้เกิดอาการแสดงได้หลายอย่าง โดยมักจะเกิดหลังจากที่เป็นแผลซิฟิลิสระยะที่ 1 ประมาณ 6 ถึง 8 สัปดาห์ แต่ในผู้ป่วยบางรายอาจใช้เวลานานหลายเดือน และมักจะแสดงอาการในอวัยวะหลายระบบภายใน 2 ปี หลังจากเริ่มติดเชื้อ ลักษณะทางคลินิกที่พบบ่อยที่สุดคือ ผื่น (Skin rash) ลักษณะของผื่นที่พบมีหลายแบบ เช่น ผื่นราบ (Macule) ผื่นนูน (Papule) ตุ่มหนอง (Pustule) หรือผื่นนูนมีสะเก็ด (Papulosquamous) กระจายทั่วร่างกาย ผื่นนี้อาจขึ้นทั่วทั้งร่างกายหรืออาจเกิดเพียงบางบริเวณก็ได้ เช่น บริเวณอก และฝ่ามือฝ่าเท้า มีสะเก็ดสีขาวลอกคล้ายกลีบกุหลาบ เรียกว่า Roseola Syphilitica ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะทางคลินิกของโรคซิฟิลิสระยะที่ 2 นี้

อย่างไรก็ตามลักษณะของผื่นอาจคล้ายผื่นที่เกิดจากโรคอื่น ๆ หรือบางครั้งอาจเป็นเพียงผื่นจาง ๆ ไม่ทันได้สังเกตเห็นได้ อาการทางคลินิกอื่น ๆ ที่อาจตรวจพบประกอบไปด้วย Condyloma Lata ซึ่งมีลักษณะเป็นตุ่มหรือผื่นนูนแบน โดยที่ผิวบนเรียบ (Flat top papule) มีสีซีดน้ำเหลืองเยิ้มและอาจมีรอยถลอกเนื่องจากการเปื่อยของผิวหนัง โดยมักจะเกิดขึ้นบริเวณผิวหนังที่อับชื้น เช่น บริเวณรอบอวัยวะเพศหรือทวารหนัก เป็นต้น อีกหนึ่งอาการ คือ Mucous patch ซึ่งจะพบบริเวณเยื่อในช่องปากหรือบริเวณอวัยวะเพศ โดยจะมีลักษณะเป็นแผลตื้น ๆ มีเยื่อสีขาวเทาคลุมอยู่ นอกจากนี้ยังอาจพบอาการผมร่วง (Alopecia) โดยจะร่วงเป็นหย่อม ๆ (Moth-eaten alopecia) หรืออาจพบแบบอื่น ๆ เช่น ร่วงแบบกระจาย (Diffuse alopecia) ได้ อาการอื่น ๆ ที่อาจพบได้ในระยะนี้ ได้แก่ ไข้ เจ็บคอ ปวดศีรษะ น้ำหนักลด ปวดกล้ามเนื้อ ไม่มีแรง อาจมีต่อมน้ำเหลืองบริเวณขาหนีบโตหรืออาจมีตำแหน่งอื่น ๆ โตร่วมด้วย อาการของระยะนี้สามารถหายได้เองแม้ไม่ได้รับการรักษาและอาการอาจกลับมาเป็น ๆ หาย ๆ ได้ในช่วง 1 ถึง 2 ปี⁽¹⁾

4.3 ระยะแฝง (Latent syphilis) หรือ ระยะไม่ปรากฏอาการ (Asymptomatic stage)

ระยะนี้เริ่มต้นหลังจากอาการและอาการแสดงของระยะที่ 2 หายไปจนกระทั่งได้รับการรักษาหรือเมื่อเริ่มแสดงอาการและอาการแสดงของระยะที่ 3⁽²⁸⁾ ผู้ป่วยที่อยู่ในระยะนี้จะไม่แสดงอาการและอาการแสดงแต่ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อซิฟิลิสในเลือดให้ผลบวก เนื่องจากเชื้อ *T. pallidum* จะยังคงอยู่ในร่างกายแม้จะไม่แสดงอาการ ระยะแฝงของซิฟิลิสจะอยู่นานได้เป็นปี และสามารถกลับมาแสดงอาการได้อีกแม้จะผ่านไปแล้ว 10 ถึง 20 ปีหลังจากที่ได้รับเชื้อ ระยะนี้แบ่งออกได้เป็น 2 ระยะ คือ ซิฟิลิสระยะแฝงช่วงแรก (Early latent syphilis) คือติดเชื้อภายใน 2 ปี และซิฟิลิสระยะแฝงช่วงหลัง (Late latent syphilis) คือติดเชื้อเกิน 2 ปี หากไม่ทราบระยะเวลาติดเชื้อที่แน่นอน จะเรียกว่า ซิฟิลิสระยะแฝงไม่ทราบระยะเวลาที่เป็น (Latent syphilis of unknow duration) คือติดเชื้อภายใน 2 ปี ในบางครั้งซิฟิลิสระยะแฝงช่วงหลัง และซิฟิลิสระยะแฝงไม่ทราบระยะเวลาที่เป็นได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มซิฟิลิสระยะหลัง (Late syphilis) เพื่อเป็นประโยชน์ในการให้การรักษา

4.4 ซิฟิลิสระยะที่ 3 (Tertiary syphilis) หรือระยะหลัง (Late syphilis) ระยะนี้เป็น

ระยะที่ดำเนินต่อเนื่องมาจากระยะแฝง ประมาณ 1 ใน 3 ของผู้ที่ไม่ได้รับการรักษาจะแสดงอาการของโรคในระยะท้าย อาการที่ปรากฏในระยะนี้ประกอบไปด้วย ซิฟิลิสกลุ่มกัมมา (Benign late syphilis/ Gummatous syphilis) ซิฟิลิสของระบบหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular syphilis) และซิฟิลิสระบบประสาท (Neurosyphilis) ในผู้ป่วยบางรายอาจพบอาการเหล่านี้ร่วมกันได้ อย่างไรก็ตามอาการของซิฟิลิสของระบบประสาทสามารถพบได้ในผู้ป่วยซิฟิลิสระยะที่ 2

4.4.1 ซิฟิลิสกลุ่มกัมมา (Benign late syphilis/ Gummatous syphilis) เกิดจากแผลซิฟิลิสที่มีเนื้อตายแล้วทิ้งรอยโรค ซึ่งเรียกว่า Gumma การอักเสบนี้สามารถเกิดที่อวัยวะใดก็ได้ แต่พบบ่อยที่กระดูกและผิวหนัง

4.4.2 ซิฟิลิสระบบหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular syphilis) เกิดจากการที่เชื้อ *T. pallidum* ทำลายหัวใจและหลอดเลือดหลอดเลือดแดงใหญ่เอออร์ตา (Aorta) อย่างช้า ๆ อาการที่พบบ่อย ประกอบด้วย หลอดเลือดใหญ่โป่งพอง ลิ้นหัวใจรั่ว ซึ่งจะทำให้การทำงานของหัวใจเสื่อมลงและล้มเหลว

4.4.3 ซิฟิลิสระบบประสาท (Neurosyphilis) เกิดจากการที่เชื้อ *T. pallidum* เข้าทำลายระบบประสาทไปในระยะเวลาหนึ่ง ผู้ป่วยจะมีอาการปวดตามแขนขา เดินผิดปกติ ขาลาก ข้อเข่าเสื่อม สมองอักเสบ สมองเสื่อม หรือมีอาการทางจิตได้ อย่างไรก็ตามผู้ป่วยบางรายอาจเป็นชนิดไม่มีอาการ (Asymptomatic neurosyphilis) แต่ตรวจพบความผิดปกติของน้ำไขสันหลัง เช่น การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์หรือการเพิ่มปริมาณของโปรตีนในน้ำไขสันหลัง หรือการตรวจหาเชื้อซิฟิลิสในน้ำไขสันหลังให้ผลบวก

5. ระบาดวิทยาของซิฟิลิส

องค์การอนามัยโลก⁽²⁹⁾ รายงานความชุกและอุบัติการณ์จำนวนผู้ป่วยโรคซิฟิลิสทั่วโลก ในปี ค.ศ. 2016 ทั้งเพศชายและเพศหญิงคิดเป็นร้อยละ 0.5⁽³⁰⁾ ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้รายงานจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อในปี ค.ศ. 2016 ผู้ป่วยที่มีอาการซิฟิลิสระยะที่ 1 และระยะที่ 2 พบในเพศชาย (15.6 ราย ต่อประชากรชายแสนคน) มากกว่าเพศหญิง (1.9 ราย ต่อประชากรหญิงแสนคน)⁽³¹⁾ และในรายงานปี ค.ศ. 2018 พบจำนวนผู้ติดเชื้อทั้งหมด 35,063 ราย คิดเป็นสัดส่วนอัตรา 10.8 ราย ต่อประชากรแสนคน โดยส่วนใหญ่พบในกลุ่มอายุ 15 – 44 ปี ถึงร้อยละ 80.6 เมื่อเปรียบเทียบจำนวนผู้ติดเชื้อในปี ค.ศ. 2014 พบว่า มีจำนวนผู้ติดเชื้อเพิ่มขึ้นร้อยละ 71.4 (คิดเป็น 6.3 ราย ต่อประชากรแสนคน) และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนผู้ติดเชื้อในปี ค.ศ. 2017 พบว่า มีผู้ติดเชื้อเพิ่มขึ้นร้อยละ 14.9 (คิดเป็นอัตรา 9.4 ราย ต่อประชากรแสนคน) ตามลำดับ⁽²⁴⁾ สำหรับรายงานสถานการณ์โรคซิฟิลิสในทวีปยุโรป พบรายงานความชุกของจำนวนผู้ติดเชื้อทั้งหมดในกลุ่มประเทศยุโรป จำนวน 29 ประเทศ ในเพศหญิงลดลง (ในปี ค.ศ. 2008 พบ 2.3 รายต่อประชากรแสนคน และในปี ค.ศ. 2013 พบ 1.6 รายต่อประชากรแสนคน) ในขณะที่พบการติดเชื้อในเพศชายเพิ่มมากขึ้น (ในปี ค.ศ. 2008 พบ 6.5 รายต่อประชากรแสนคน และในปี ค.ศ. 2013 พบ 8.4 รายต่อประชากรแสนคน) การติดเชื้อซิฟิลิสทางเพศสัมพันธ์ระหว่างคู่ชายหญิงพบในประเทศฝรั่งเศส ประเทศมัลตา และประเทศเนเธอร์แลนด์มากที่สุด และร้อยละ 58 พบในกลุ่มชายที่มีเพศสัมพันธ์กับชาย (Men Who Have Sex with Men, MSM)⁽³¹⁾ ในปี ค.ศ. 2017 พบ

จำนวนผู้ติดเชื้อทั้งหมด 33,189 ราย คิดเป็นสัดส่วนอัตรา 7.1 ราย ต่อประชากรแสนคน นอกจากนี้ยังพบว่า เพศชายติดเชื้อซิฟิลิสมากที่สุดในช่วงอายุ 25-34 ปี (คิดเป็น 28 ราย ต่อประชากรแสนคน) อีกทั้งยังติดเชื้อมากกว่าเพศหญิงถึง 9 เท่า และ 2 ใน 3 ของจำนวนผู้ติดเชื้อมาจากกลุ่ม MSM โดยแนวโน้มอัตราการติดเชื้อในกลุ่ม MSM มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี⁽³²⁾

สำหรับสถานการณ์ในทวีปแอฟริกา ในปี ค.ศ. 2005 WHO รายงานผู้ติดเชื้อโดยรวมในทวีปแอฟริกา มีจำนวนกว่า 14 ล้านคน โดยคิดเป็นเพศหญิงร้อยละ 3.5 และเพศชายร้อยละ 4.5⁽³³⁾ จากการสำรวจผู้ติดเชื้อในพื้นที่ชนบทของประเทศแทนซาเนีย พบความชุกผู้ป่วยติดเชื้อซิฟิลิสที่มีผลการตรวจ TPHA และ RPR เป็นบวก พบในเพศชาย 7.5 และ พบในเพศหญิง 9.1 และพบอุบัติการณ์จำนวนผู้ติดเชื้อมากที่สุดในเพศหญิง กลุ่มอายุ 15-19 ปี ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 3.4 ต่อปี⁽³⁴⁾ สำหรับสถานการณ์ในทวีปออสเตรเลีย จากการรายงานพบอัตราการติดเชื้อซิฟิลิสในประเทศออสเตรเลีย ในปี 2012 พบจำนวนผู้ติดเชื้อ 6.7 คนต่อประชากรแสนคน และพบมากในกลุ่ม MSM โดยจำนวนดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นจากปี ค.ศ. 2008 ถึงร้อยละ 20 ในประชากรเพศชาย⁽³¹⁾ สำหรับสถานการณ์ในทวีปเอเชีย จากการรายงานขององค์การอนามัยโลก ในปี 2005 พบความชุกจำนวนผู้ติดเชื้อในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จำนวน 11.77 ล้านราย และพบอุบัติการณ์ของโรคซิฟิลิส 2.9 ล้านราย (Chan, 2011) และจากการสำรวจจำนวนผู้ติดเชื้อซิฟิลิสในประเทศจีน ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2005-2014 พบจำนวนผู้ติดเชื้อซิฟิลิสในปี ค.ศ. 2005 เท่ากับ 135,210 ราย ส่วนในปี ค.ศ. 2014 พบจำนวนผู้ติดเชื้อซิฟิลิสเท่ากับ 441,818 ราย ซึ่งจะเห็นได้ว่าในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา มีอัตราการแพร่ระบาดของโรคซิฟิลิสมากขึ้นกว่า 3 เท่า⁽³¹⁾

รายงานสถานการณ์โรคซิฟิลิสในประเทศไทย พบว่า มีการระบาดและมีแนวโน้มผู้ติดเชื้อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์สูงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ในปี พ.ศ. 2555 พบรายงานจำนวนผู้ติดเชื้อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์รายใหม่กว่า 39 ล้านคน และในปี พ.ศ. 2556 มีจำนวนผู้ติดเชื้อคิดเป็น 3.67 ต่อประชากรแสนคน^(27, 33, 35, 36) การแพร่ระบาดของโรคซิฟิลิสมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นจากรายงานในช่วงระยะเวลา 10 ปี ในปี พ.ศ. 2553 พบอัตราการติดเชื้อ 2.16 คนต่อประชากรแสนคน ส่วนปี พ.ศ. 2563 พบการติดเชื้อ 11.51 คน ต่อประชากรแสนคน จะเห็นได้ว่ามีอัตราการป่วยของโรคซิฟิลิสเพิ่มขึ้น 5 เท่า⁽³⁷⁾

การติดเชื้อซิฟิลิสนอกจากการติดต่อทางเพศสัมพันธ์ และการติดเชื้อโดยกำเนิดในช่วงตั้งครรภ์แล้ว ยังมีการติดเชื้อผ่านทาง การรับเลือดและส่วนประกอบของเลือด ดังนั้นในปัจจุบันในการบริจาคโลหิตจึงมีการตรวจคัดกรองหาเชื้อซิฟิลิสทุกครั้ง จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการคัดกรองหาเชื้อซิฟิลิสในผู้บริจาคโลหิตของประเทศต่าง ๆ พบว่า ในทวีปแอฟริกามีการศึกษาในหลายประเทศ เช่น ประเทศแองโกลา ประเทศซูดาน และประเทศกานา มีการคัดกรองผู้บริจาคโลหิตพบเชื้อ

ผู้ที่ติดเชื้อซิฟิลิสคิดเป็นร้อยละ 2.9 - 20.0⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ ในทวีปยุโรป เช่น ประเทศเนเธอร์แลนด์ มีการคัดกรองเชื้อซิฟิลิสในผู้บริจาคโลหิตตั้งแต่ปี ค.ศ. 1995 - 2014 โดยมีการแบ่งระยะเวลาออกเป็นสองช่วงเพื่อเปรียบเทียบอัตราผู้ติดเชื้อซิฟิลิส พบว่าในระยะแรก ปี ค.ศ. 1995 - 2002 พบความชุกของการติดเชื้อ 22.3 ราย ต่อประชากรแสนคน และในระยะที่สอง ปี ค.ศ. 2003 - 2014 พบความชุกของการติดเชื้อ 32.8 ราย ต่อประชากรแสนคน ซึ่งมีการอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนผู้ติดเชื้อซิฟิลิสร้อยละ 50^(31, 41) ในทวีปอเมริกา เช่น ประเทศบราซิล พบความชุกของการติดเชื้อในปี ค.ศ. 2014, 2015 และ 2016 คิดเป็นร้อยละ 0.30, 0.57 และ 0.70 ตามลำดับ จะเห็นได้ในประเทศบราซิลพบอัตราความชุกเพิ่มขึ้นทุกปี สำหรับประเทศแม็กซิโก พบความชุกของการติดเชื้อคิดเป็นร้อยละ 1.50^(42, 43) ในทวีปเอเชีย เช่น ประเทศอินเดีย จากรายงานการตรวจคัดกรองเชื้อซิฟิลิส ในปี ค.ศ. 2012- 2016 พบผู้ติดเชื้อคิดเป็นร้อยละ 0.75⁽⁴⁴⁾ ประเทศจีน จากการสำรวจการคัดกรองซิฟิลิสจากผู้ที่มาบริจาคโลหิตในเมืองเฉิงตู ปี 2005 - 2017 พบผู้ติดเชื้อซิฟิลิสร้อยละ 0.88⁽⁴⁵⁾ สำหรับประเทศไทย จากรายงานการเฝ้าระวังการคัดกรองผู้บริจาคโลหิตในปี พ.ศ. 2549 - 2551 พบการติดเชื้อซิฟิลิสร้อยละ 0.44⁽⁴⁶⁾ และพบการศึกษาย้อนหลังจากผู้บริจาคโลหิตเพื่อหาเชื้อซิฟิลิสในโรงพยาบาลหัวหิน ระหว่างปี พ.ศ. 2558 - 2559 พบอัตราการติดเชื้อร้อยละ 0.60⁽⁴⁷⁾

6. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคซิฟิลิส สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ การตรวจหาเชื้อซิฟิลิสโดยตรง (Direct Examination for *T. pallidum*) และการตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลือง (Serological tests)⁽³⁶⁾

6.1 การตรวจหาเชื้อซิฟิลิสโดยตรง (Direct Examination for *T. pallidum*) คือการตรวจหาเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 วิธี ดังนี้

1) Rabbit Infectivity test (RIT) คือการนำตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากร่างกายผู้ที่สงสัยว่ามีเชื้อ *T. pallidum* ฉีดเข้าไปในอวัยวะของกระต่าย ทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 เดือน และทดสอบหา Syphilis antibodies ในกระต่ายเป็นระยะ ถ้าพบว่า สิ่งส่งตรวจที่สงสัยมีเชื้อ *T. pallidum* จริง กระต่ายจะสร้างแอนติบอดีตอบสนองในลักษณะเดียวกับที่พบในคน และจะไม่แสดงอาการของโรคซิฟิลิส แต่ถ้าตรวจไม่พบแอนติบอดี แปลผลได้ว่าไม่มีเชื้อ *T. pallidum* จากสิ่งส่งตรวจ การตรวจด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ยุ่งยาก ซับซ้อน เนื่องจากต้องใช้เวลาในการเลี้ยงกระต่าย จึงไม่เหมาะสำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยทั่วไปได้ แต่วิธีนี้จึงเป็นมาตรฐานสำหรับการประเมินค่าความไว (Sensitivity) ของการทดสอบวิธีอื่น ๆ^(22, 48)

2) Darkfield Microscopy คือการตรวจหาเชื้อที่เฉพาะเจาะจง โดยจะดูสารคัดหลั่งของผู้ติดเชื้อ หรือการนำชิ้นเนื้อจากบริเวณรอยโรคจากปากมดลูกและช่องคลอด ที่ไม่ปนเปื้อนเซลล์เม็ดเลือดแดง สิ่งมีชีวิตอื่น หรือเศษเนื้อเยื่อ มาเป็นตัวอย่งในการส่งตรวจหาเชื้อ โดยต้องทำความสะอาดโดยใช้น้ำหรือน้ำเกลือที่ปราศจากสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและใช้ในปริมาณน้อย เนื่องจากการใช้น้ำหรือน้ำเกลือในปริมาณมากนั้นอาจจะทำให้สิ่งส่งตรวจเจือจางและไม่เห็นเชื้อซิฟิลิสได้ หลังจากทำความสะอาดบริเวณดังกล่าวแล้ว จะล้างรอยโรคและกดเบา ๆ จนกว่าจะมีของเหลวใสออกมา นำสารคัดหลั่งนี้มาหยดลงบนแผ่นสไลด์ และปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ แล้วนำไปตรวจสอบผ่านกล้องจุลทรรศน์ในขณะที่เชื้อยังคงมีการเคลื่อนไหวอยู่ สำหรับเชื้อ *T. pallidum* มีความแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตที่เป็นเกลียวชนิดอื่น (Spiral organism) โดยดูจากความแน่นของเกลียวและลักษณะของการเคลื่อนที่ อย่างไรก็ตาม *T. pallidum subsp. Pallidum* ไม่สามารถแยกออกจาก organism ชนิดอื่นได้ เช่น *T. pallidum subsp. pertenue*, *T. pallidum subsp. Enemicum* และ *T. carateum* โดย *T. Pallidum* มีความละเอียดอ่อน มีรูปร่างเป็นเกลียวแน่น มีขนาดยาว 6-20 mm กว้าง 0.1-0.18 mm ความยาวของเกลียว ขนาด 1.0-1.5 mm และความลึกประมาณ 0.5-0.7 mm ลักษณะการเคลื่อนไหวของ *T. pallidum* เป็นแบบม้วนไปด้านหน้าและด้านหลังตามความยาวของลักษณะลำตัว เมื่อสัมผัส organism จะบิด หรือ ขด และเอียง จนหมุนเป็นเกลียว แต่จะสามารถกลับคืนสู่รูปร่างเดิมได้ *T. pallidum T. refringens* และ *T. denticola* จะมีรูปร่างคล้ายคลึงกันมาก ซึ่งผลตรวจที่เป็นบวกจาก Dark-field examination จะสามารถระบุเชื้อซิฟิลิสได้อย่างรวดเร็ว โดยมีความไวถึงร้อยละ 80^(18, 49)

อย่างไรก็ตาม หากผลที่ได้จากการกล้องจุลทรรศน์ชนิด Dark Filed เป็นผลลบนั้นจะยังคงไม่ถูกตัดออกจากการวินิจฉัยของโรคซิฟิลิส เนื่องจากอาจจะเป็นช่วงระยะหายของโรค ซึ่งจำนวนของเชื้อที่มีชีวิตจะปรากฏให้เห็นอยู่น้อย หรือแบคทีเรียกลุ่มสไปโรคิท (Spirochete) ผู้ตรวจควรคำนึงถึงโรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์อื่น เช่น โรคเริม และโรคแผลริมอ่อน เป็นต้นและอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงจากการรักษาได้ นอกจากนี้ตัวอย่างส่งตรวจนั้นอาจจะมีการปนเปื้อนของเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวนมาก ฟองอากาศ หรือชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ดังนั้นผู้ตรวจจึงจำเป็นต้องได้รับการอบรมในการใช้กล้องชนิดอย่างเหมาะสม เพื่อความแม่นยำในการวินิจฉัยโรค

3) **Direct Fluorescent Antibody test for *T. pallidum* (DFA-TP)** คือการตรวจเชื้อ โดยใช้แอนติบอดีต่อ *T. pallidum* ที่ติดสลาการเรืองแสงทำปฏิกิริยากับตัวเชื้อ *T. pallidum* ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจโดยตรง แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง (Fluorescent Microscope) ซึ่งการเก็บสิ่งส่งตรวจจะใช้หลักการเดียวกันกับการตรวจด้วยวิธี Dark Filed ซึ่งต้องใช้ผู้ตรวจที่มีความชำนาญ ประกอบกับกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีราคาแพง และทดสอบหาตัวเชื้อจากตัวอย่างได้ที่ละราย จึงไม่เหมาะกับการตรวจเป็นประจำทั่วไป⁽⁵⁰⁻⁵³⁾

4) **Polymerase Chain Reaction Detection of *T. pallidum*** คือ การตรวจหา สารพันธุกรรมของเชื้อ *T. pallidum* จาก Whole blood หรือ Serum ของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ เหมาะสำหรับกรณีที่การตรวจทางภูมิคุ้มกันให้ผลลบ ช่วยวินิจฉัยซิฟิลิสในระยะแรกของการติดเชื้อ late latent syphilis, neurosyphilis และ congenital syphilis ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีราคาแพง มีความยุ่งยากในกระบวนการทดสอบจากการปนเปื้อน และไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจคัดกรองโลหิตเมื่อผ่านพ้นซิฟิลิสระยะแรกไปแล้ว^(36, 54, 55)

6.2 Serological tests คือการตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1) **Non-Treponemal Antibody test** เป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีชนิดไม่จำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนของเชื้อ *T. pallidum* แต่จะใช้การตรวจหาแอนติบอดีต่อสาร Phospholipid โดยใช้ Cardiolipin ที่สกัดจากกล้ามเนื้อหัวใจัวเป็นแอนติเจนร่วมกับ Cholesterol และ Lecithin เรียกแอนติบอดีนี้ว่า Anti-Cardiolipin Antibody^(36, 56) ซึ่งมีวิธีที่นิยมใช้ 2 วิธี ได้แก่

1.1) **Venereal Disease Research Laboratory (VDRL)** การนำ เซรั่ม (Serum) ของผู้ป่วยมาหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. pallidum* โดยเริ่มจากการทำการ Inactivated เซรั่ม ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัด non-specific inhibitors เช่น Complement ก่อนนำไปทดสอบกับน้ำยาเฉพาะ และอ่านผลปฏิกิริยาที่เกิดการแขวนตะกอน (Flocculation) ด้วยกล้องจุลทรรศน์⁽⁵⁷⁾

1.2) **Rapid Plasma Reagin (RPR)** สำหรับการตรวจด้วยวิธีนี้ ใช้หลักการในการตรวจเช่นเดียวกับการตรวจด้วยวิธี Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) เพียงแต่ไม่ต้องทำการ Inactivated เซรั่ม (Serum) เนื่องจากน้ำยาเฉพาะที่ใช้ในการตรวจมีส่วนผสมของ Choline Chloride ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ Complement และประกอบด้วย EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) ที่ช่วยรักษาสภาพของ Cardiolipincholesterol-

lecithin ให้คงสภาพไม่ต้องเตรียมบ่อย ๆ และสามารถอ่านผลปฏิกิริยาที่เกิดการแขวนตะกอน (Flocculation) ได้ด้วยตาเปล่า จึงเป็นการทดสอบที่ง่าย สะดวก และทำได้ครั้งละหลาย ๆ ราย^(22, 58)

สำหรับการตรวจทั้ง 2 วิธี ดังที่กล่าวมานิยมใช้ในการตรวจเพื่อคัดกรองโรค (Screening test) เพื่อการวินิจฉัยโรคเบื้องต้น และเพื่อการติดตามการรักษา (Follow Up)⁽¹⁾

2) Treponemal Antibody test เป็นการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อ *T. pallidum* ในเซรัม (Serum) และ น้ำไขสันหลัง (Cerebrospinal Fluid:CSF) โดยสามารถตรวจได้ทั้งแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG และใช้ยืนยันในการตรวจโรคซิฟิลิส^(22, 58) ซึ่งมีวิธีที่นิยมใช้ ดังนี้

2.1) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) หรือ Enzyme Immunoassay (EIA) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีในเซรัม (Serum) หรือ พลาสมา (Plasma) ที่เฉพาะต่อเชื้อ *T. pallidum* โดยใช้ recombinant TP antigen (TpN15, TpN17 และ TpN47) และใช้โดยใช้เอนไซม์ (Enzyme) เพื่อช่วยทำให้สังเกตเห็นสีที่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยาต่อกัน⁽⁵⁹⁻⁶⁵⁾

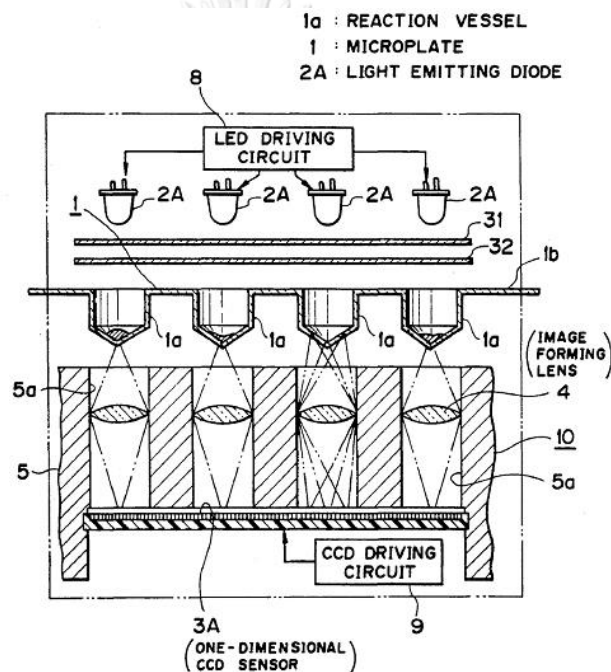
2.2) Chemiluminescent Immunoassay (CMIA) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีในเซรัม (Serum) หรือ พลาสมา (Plasma) ที่เฉพาะต่อเชื้อ *T. pallidum* โดยเคลือบ recombinant TP antigen (TpN15, TpN17 และ TpN47) บน paramagnetic particle ถ้ามีแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. pallidum* เครื่องจะตรวจพบปริมาณแสงที่เกิดขึ้นและสัมพันธ์กับปริมาณแอนติบอดีของผู้ป่วย⁽⁶⁶⁾

2.3) Treponema pallidum hemagglutination test (TPHA) เป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อ *T. pallidum* โดยใช้ แอนติเจนของเชื้อ *T. pallidum* เคลือบบนตัวกลางที่เป็นเม็ดเลือดแดง ถ้ามีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีในเซรัม (Serum) และเชื้อ *T. pallidum* ที่เคลือบบนตัวกลางดังกล่าว แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก (Reactive) ในทางตรงกันข้าม ถ้าไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแสดงว่า ผลการทดสอบเป็นลบ (Non-reactive)^(67, 68)

2.4) Treponema pallidum particle agglutination assay (TPPA) การตรวจด้วยวิธีนี้มีหลักการคล้ายกับการตรวจด้วยวิธี TPHA เพียงแต่เปลี่ยนตัวกลางเป็นเม็ดเจลาติน และดูผลการทดสอบจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีในเซรัม (Serum) และเชื้อ *T. pallidum* ที่เคลือบบนเม็ดเจลาติน ถ้าผลการทดสอบเป็นบวก (Reactive) จะพบว่า เม็ดเจลาตินมีการจับกลุ่มกัน แต่ ถ้าไม่มีการจับกลุ่มกันของเจลาติน แสดงว่าผลการทดสอบเป็นลบ (Non-reactive)^(69, 70)

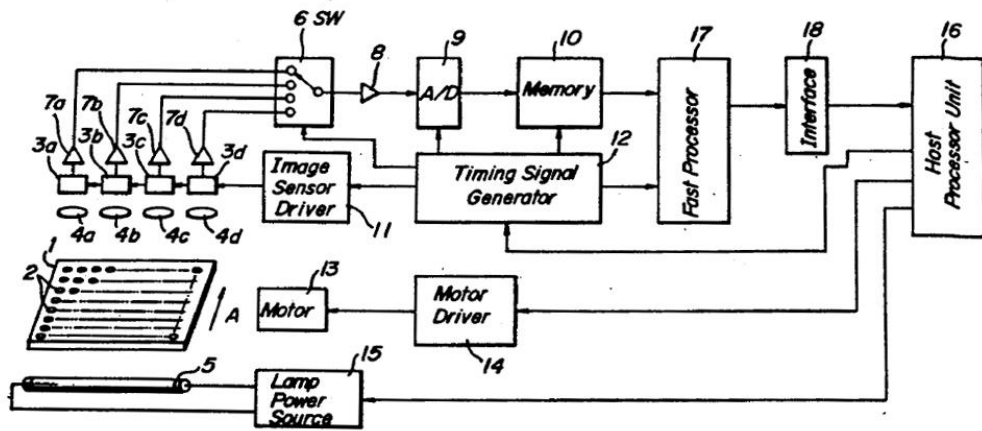
7. การคิดค้นอุปกรณ์แปลผลการจับกลุ่ม (Agglutination)

จากอดีตจนถึงปัจจุบันได้มีความพยายามในการคิดค้นอุปกรณ์ต่างๆ ที่ช่วยอ่านผลปฏิกิริยาตกตะกอนที่ก้นหลุมมาอย่างต่อเนื่อง โดยอาศัยการจำแนกความแตกต่างรูปแบบของการตกตะกอน ในปี พ.ศ. 2535 มีการพัฒนาเครื่องมือแปลผลโดยใช้หลอด L.E.D. เป็นแหล่งกำเนิดแสง แสงดังกล่าวจะยิงผ่านแผ่นกั้นโปร่งแสง ผ่านก้นหลุมที่มีปฏิกิริยาจับกลุ่มขวางกั้นอยู่ เกิดการกระเจิงของแสงรูปแบบต่างกัน ผ่านเลนส์รวมแสง จนกระทั่งตกกระทบวงจรถวจจับเพื่อจำแนกระดับของปฏิกิริยาได้ (รูปที่ 1)⁽⁷¹⁾



รูปที่ 2 เครื่องช่วยแปลผลตกตะกอนที่ก้นหลุมที่ถูกคิดค้นในปี พ.ศ. 2535⁽⁷¹⁾

ในปี พ.ศ. 2536 ได้มีการประดิษฐ์เครื่องมือแปลผลตกตะกอนที่ก้นหลุม และตรวจจับแบบ 2 ระนาบด้วย photoelectric โดยใช้เทคนิคการประมวลผลภาพ เพื่อวิเคราะห์และแยกแยะรูปแบบของการเกิดปฏิกิริยา (รูปที่ 2)⁽⁷²⁾



รูปที่ 3 เครื่องมือแปลผลตกตะกอนที่ก้นหลุม และตรวจจับแบบ 2 ระนาบด้วย photoelectric⁽⁷²⁾

ต่อมาได้มีการนำเทคนิคโครงข่ายประสาท (Neural Network) มาใช้ในการพัฒนาเครื่องแปลผลการตกตะกอนที่ก้นหลุม ซึ่งให้รูปแบบสัญญาณความเข้มของแสงที่ตรวจจับได้ที่แตกต่างกันเป็นตัวแทนแต่ละลักษณะของการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบริเวณก้นหลุม และมีการบันทึกจดจำแต่ละรูปแบบด้วย Neural Network Mode และ Classification Mode (รูปที่ 3)⁽⁷³⁾

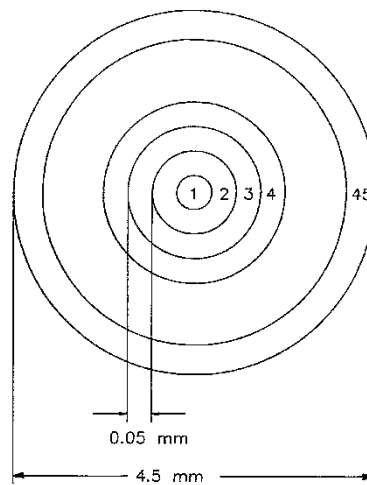
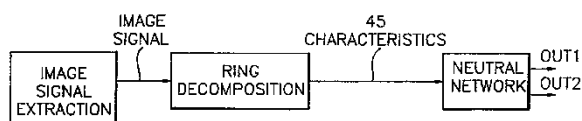
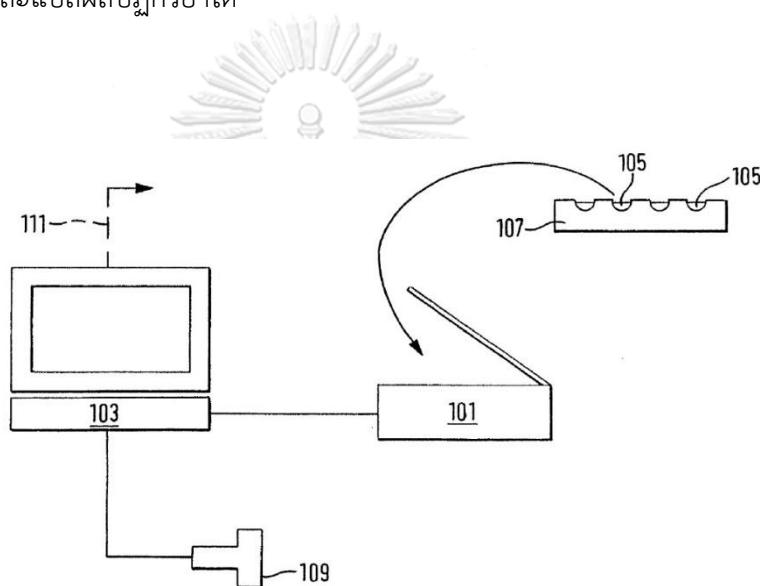


FIG. 3



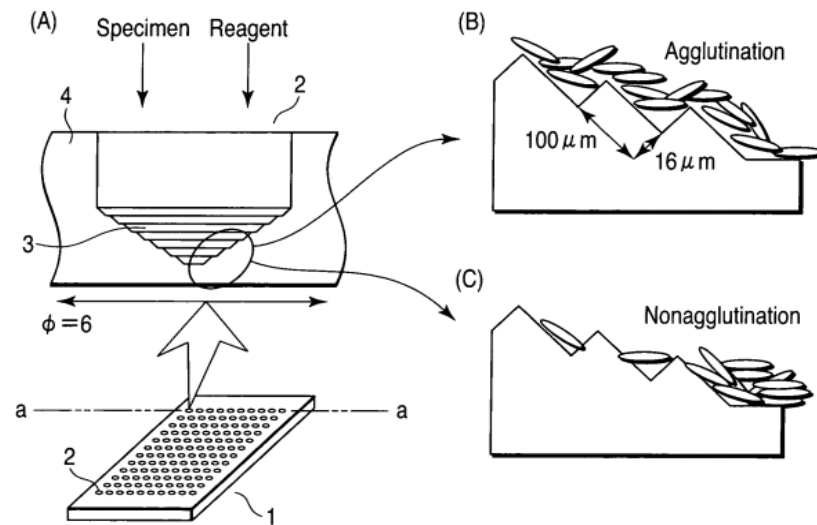
รูปที่ 4 เทคนิคโครงข่ายประสาทสำหรับแปลผลตกตะกอนที่ก้นหลุม⁽⁷³⁾

ปีพ.ศ.2545 ได้มีการเริ่มประยุกต์ใช้เครื่องสแกนเนอร์ โดยเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ เพื่อช่วยในการเก็บภาพผลการตกตะกอน ข้อมูลจะถูกเก็บในรูปแบบภาพดิจิทัล เพื่อนำภาพมาประมวลผลด้วยซอฟต์แวร์สำหรับช่วยแปลผลต่อไป เครื่องมือดังกล่าวนี้สามารถทำได้ง่ายอีกทั้งข้อมูลภาพยังสามารถเชื่อมต่อเข้าสู่ระบบฐานข้อมูลผู้ป่วยได้โดยตรง จากรูปที่ 4 เมื่อนำเพลท (หมายเลข 107) ซึ่งมีหลุมที่เกิดปฏิกิริยา (หมายเลข 105) เข้าไปถ่ายภาพในเครื่องสแกนเนอร์ (หมายเลข 101) จากนั้นภาพปฏิกิริยาการจับกลุ่มจะถูกนำเข้าสู่คอมพิวเตอร์ในรูปแบบของภาพดิจิทัล ทำให้สามารถประมวลผลภาพและแปลผลปฏิกิริยาได้⁽⁷⁴⁾

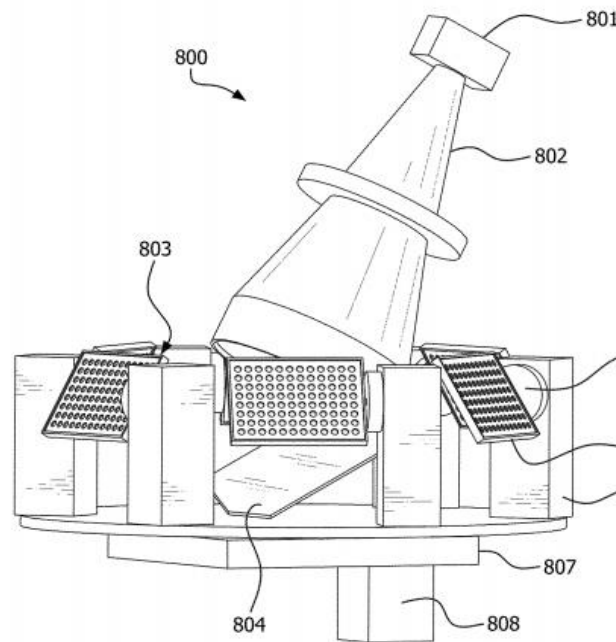


รูปที่ 5 การเชื่อมต่อเครื่องสแกนเนอร์เข้ากับคอมพิวเตอร์ เพื่อเก็บภาพผลการตกตะกอนและประมวลผลด้วยซอฟต์แวร์สำหรับการแปลผล⁽⁷⁴⁾

ในระหว่างปีพ.ศ. 2551-2559 ได้มีการพัฒนาเพลทเป็นรูปขั้นบันไดเอียง (รูปที่ 5)⁽⁷⁴⁾ และได้้นำ Telecentric lens (รูปที่ 6) ซึ่งมีคุณสมบัติของเลนส์ในการถ่ายภาพมุมกว้างให้เห็นชัดเจนทุกหลุมปฏิกิริยา⁽⁷⁵⁾ จึงถูกนำมาใช้ในการถ่ายภาพปฏิกิริยาการจับกลุ่มทั้ง 96 หลุม ในคราวเดียว ทำให้มีความสะดวก รวดเร็ว และภาพคมชัดสามารถนำไปประมวลผลภาพต่อได้ดี



รูปที่ 6 การพัฒนาเพลทเป็นรูปชั้นบันไดเอียงเพื่อใช้ในการอ่านปฏิกิริยา⁽⁷⁵⁾



รูปที่ 7 การพัฒนา Telecentric lens สำหรับถ่ายภาพปฏิกิริยาการจับกลุ่ม หมายเลข 801 คือ อุปกรณ์บันทึกภาพ หมายเลข 802 คือ Telecentric lens ที่มีคุณสมบัติในการถ่ายภาพมุมกว้างให้ได้ทุกหลุมปฏิกิริยา-ของเพลท (หมายเลข 803)⁽⁷⁵⁾

อย่างไรก็ตามวัสดุอุปกรณ์ที่กล่าวมาข้างต้นยังคงมีราคาแพงและส่วนใหญ่สามารถใช้อ่านผลเฉพาะเพลทปฏิบัติการที่ถูกออกแบบเป็นพิเศษ ไม่สามารถใช้กับเพลทปฏิบัติการชนิด U-plate ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ

8. ซอฟต์แวร์และภาษาที่ใช้เขียนโค้ด⁽⁷⁶⁾

Aforge.net เป็น library ที่ถูกเขียนโดยภาษา C# เพื่อใช้ในงาน Computer Vision และ Artificial Intelligence ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 2006 โดย Andrew Kirillov นักวิศวกรรมซอฟต์แวร์ชาวสหราชอาณาจักร และถูกแจกจ่ายให้ใช้งานได้ทั่วไปแบบ Opensource ภายใต้สัญญา GNU General Public License ซึ่ง library Aforge.net จะถูกติดตั้งเป็นค่าปริยายใน Visual Studio 2017 ดังนั้นการเขียนโปรแกรมด้วยภาษา C# จึงสามารถเขียนโค้ดและแก้ไขข้อผิดพลาดได้ง่ายขึ้นผ่านโปรแกรม Visual Studio⁽⁷⁷⁾

9. ไมโครคอนโทรลเลอร์ (Microcontroller)

ไมโครคอนโทรลเลอร์ คืออุปกรณ์ควบคุมขนาดเล็ก ซึ่งบรรจุความสามารถที่คล้ายคลึงกับระบบคอมพิวเตอร์ โดยในไมโครคอนโทรลเลอร์ได้รวมเอาซีพียู หน่วยความจำ และพอร์ต ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักสำคัญของระบบคอมพิวเตอร์เข้าไว้ด้วยกัน

โครงสร้างโดยทั่วไปของไมโครคอนโทรลเลอร์ สามารถแบ่งออกมาได้เป็น 5 ส่วนใหญ่ ๆ ดังต่อไปนี้

- 1) หน่วยประมวลผลกลางหรือซีพียู (CPU : Central Processing Unit)
- 2) หน่วยความจำ (Memory) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ หน่วยความจำที่มีไว้สำหรับเก็บ โปรแกรมหลัก (Program Memory) เปรียบเสมือนฮาร์ดดิสก์ของเครื่องคอมพิวเตอร์ตั้งโต๊ะ กล่าวคือข้อมูลใดๆ ที่ถูกเก็บไว้ในนี้จะไม่สูญหายไปแม้ไม่มีไฟเลี้ยง

อีกส่วนหนึ่งคือหน่วยความจำข้อมูล (Data Memory) ใช้เป็นเหมือนกระดานทาดในการคำนวณของซีพียู และเป็นที่พักข้อมูลชั่วคราวขณะทำงาน แต่หากไม่มีไฟเลี้ยง ข้อมูลก็จะหายไปคล้ายกับหน่วยความจำแรม (RAM) ในเครื่องคอมพิวเตอร์ทั่ว ๆ ไป สำหรับไมโครคอนโทรลเลอร์สมัยใหม่ หน่วยความจำข้อมูลจะมีทั้งที่เป็นหน่วยความจำแรม ซึ่งข้อมูลจะหายไปเมื่อไม่มีไฟเลี้ยง และเป็นอีอีพรอม (EEPROM : Erasable Electrically Read-Only Memory) ซึ่งสามารถเก็บข้อมูลได้แม้ไม่มีกระแสไฟ

3) ส่วนติดต่อกับอุปกรณ์ภายนอก หรือพอร์ต (Port) มี 2 ลักษณะคือ พอร์ตอินพุต (Input Port) และพอร์ตส่งสัญญาณหรือพอร์ตเอาต์พุต (Output Port) ใช้ในการเชื่อมต่อกับอุปกรณ์ภายนอก ถือว่าเป็นส่วนที่สำคัญมาก ใช้ร่วมกันระหว่างพอร์ตอินพุตเพื่อรับสัญญาณ เพื่อนำไปประมวลผลและส่งไปพอร์ตเอาต์พุต เพื่อแสดงผลเช่น การติดสว่างของหลอดไฟ เป็นต้น ฯลฯ

4) ช่องทางเดินของสัญญาณ หรือบัส (BUS) คือเส้นทางการแลกเปลี่ยนสัญญาณข้อมูลระหว่าง ซีพียู หน่วยความจำและพอร์ต เป็นลักษณะของสายสัญญาณจำนวนมากอยู่ในตัวไมโครคอนโทรลเลอร์ โดยแบ่งเป็นบัสข้อมูล (Data Bus) บัสแอดเดรส (Address Bus) และบัสควบคุม (Control Bus)

5) วงจรกำเนิดสัญญาณนาฬิกา นับเป็นส่วนประกอบที่สำคัญมากอีกส่วนหนึ่ง เนื่องจากการทำงานที่เกิดขึ้นในตัวไมโครคอนโทรลเลอร์จะขึ้นอยู่กับกรกำหนดจังหวะ หากสัญญาณนาฬิกาที่มีความถี่สูง จังหวะการทำงานก็จะสามารถทำได้ถี่ขึ้นส่งผลให้ไมโครคอนโทรลเลอร์ตัวนั้น มีความเร็วในการประมวลผลสูงตามไปด้วย

อย่างไรก็ตาม ไมโครคอนโทรลเลอร์ที่ถูกผลิตมามีตระกูลต่างๆ ที่ได้รับความนิยมและมีพัฒนาการมาจนถึงปัจจุบัน อาทิเช่น

Z-80 เป็นลักษณะของ CPU เล็กๆ ที่ต้องอาศัย IO ต่างๆ เพิ่มเติมจำนวนมาก บอร์ดจึงมีขนาดค่อนข้างใหญ่

MCS-51 พัฒนาต่อจาก Z-80 โดยจะเป็นการเขียนโปรแกรมในลักษณะของ Assembly Code แล้วโหลดลงบอร์ดเพื่อใช้งาน ไมโครคอนโทรลเลอร์รุ่นนี้จึงช่วยลดอุปกรณ์รอบข้างลง

PIC (Peripheral Interface Controller) ไมโครคอนโทรลเลอร์ชนิดนี้ มีการพัฒนามากขึ้น โดยมีอุปกรณ์ต่อพ่วงน้อย มีหน่วยความจำ EEPROM ในตัว จึงทำให้ง่ายต่อการบันทึกและจัดเก็บข้อมูล และ PORT ต่าง ๆ ได้มีการ latch ในตัว IC อยู่ แล้ว จึงสามารถต่อออกมาใช้งานภายนอกได้โดยตรง อีกทั้งสามารถนำโปรแกรม Boot Loader เข้าไปในตัวไมโครคอนโทรลเลอร์ได้ จึงทำให้ง่ายในการโหลดโปรแกรมจากคอมพิวเตอร์โดยผ่านทาง Serial Port และกดปุ่ม Reset เพียงอย่างเดียว

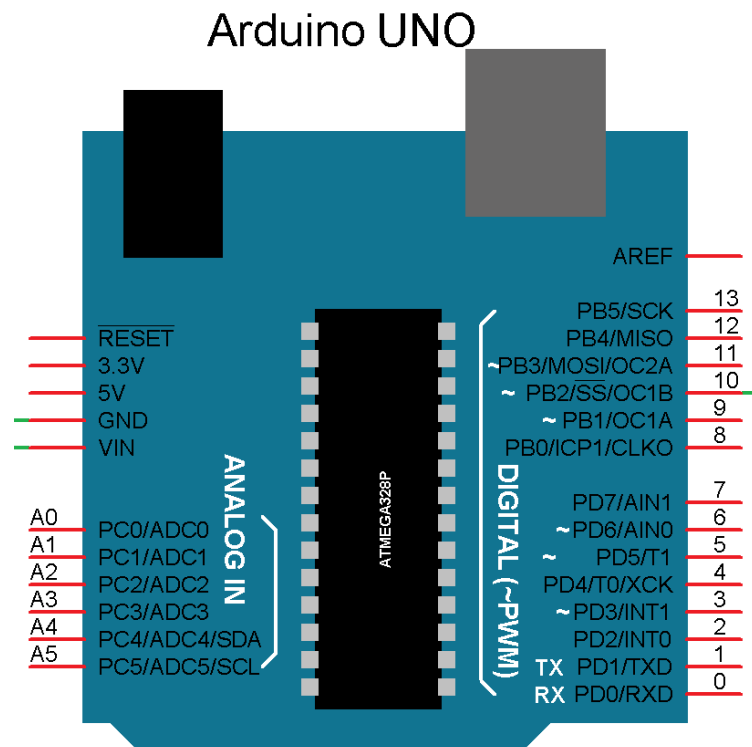
AVR เป็นไมโครคอนโทรลเลอร์รุ่นที่สามารถ Interface ผ่าน USB ได้โดยตรง

Arduino Arduino เป็นไมโครคอนโทรลเลอร์บอร์ดแบบสำเร็จรูปในยุคปัจจุบัน ซึ่งถูกสร้างมาจาก Controller ตระกูล ARM ของ ATMEL ข้อดีของไมโครคอนโทรลเลอร์บอร์ดคือเรื่องของ Open Source ที่สามารถนำไป พัฒนาต่อเป็นอุปกรณ์ต่างๆได้และความสามารถในการเพิ่ม Boot Loader เข้าไปที่ตัว ARM จึงทำให้การ Upload Code เข้าตัวบอร์ดสามารถทำได้ง่ายขึ้น และยังมี

การพัฒนา Software ที่ใช้ในการควบคุมตัวบอร์ด ของ Arduino มีลักษณะเป็นภาษา C++ ที่โปรแกรมเมอร์มีความคุ้นเคยในการใช้งาน ตัวบอร์ดสามารถนำ โมดูลมาต่อเพิ่ม ซึ่งทาง Arduino เรียกว่าเป็น Shield เพื่อเพิ่มความสามารถเพิ่มขึ้น

10. Arduino Uno

คือ บอร์ดไมโครคอนโทรลเลอร์โดยใช้ AVR ขนาดเล็ก (รูปที่ 8) เป็นตัวประมวลผลและสั่งงานเหมาะสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาเรียนรู้ระบบไมโครคอนโทรลเลอร์และนำไปประยุกต์ใช้ งานเกี่ยวกับการควบคุมอุปกรณ์ Input/ Output ต่าง ๆ ได้มากมายทั้งในรูปแบบที่เป็นการทำงานตัวเดียวอิสระหรือเชื่อมต่อสั่งงานร่วมกับอุปกรณ์อื่น ๆ เช่นคอมพิวเตอร์ PC ทั้งนี้ก็เนื่องมาจาก Arduino สนับสนุนการเชื่อมต่อกับอุปกรณ์ Input/ Output ต่าง ๆ ได้มากมายทั้งแบบ Digital และ Analog การรับค่าจากสวิตช์หรืออุปกรณ์ตรวจจับ (Sensor) แบบต่าง ๆ รวมไปถึงการควบคุมอุปกรณ์ Output ต่าง ๆ ตั้งแต่ LED, หลอดไฟ, มอเตอร์, รีเลย์ ฯลฯ Arduino มีรายละเอียดคุณสมบัติและส่วนประกอบต่าง ๆ ดังตารางที่ 1



รูปที่ 8 โครงสร้างของบอร์ด Arduino Uno⁽⁷⁸⁾

ตารางที่ 2 คุณสมบัติ Arduino Uno⁽⁷⁸⁾

Microcontroller	ATmega328
Operating Voltage	5V
Input Voltage (recommended)	7-12V
Input Voltage (limits)	6-20V
Digital I/O Pins	14 (of which 6 provide PWM output)
Analog Input Pins	6
DC Current per I/O Pin	40 mA
DC Current for 3.3V Pin	50 mA
Flash Memory	32 KB (ATmega328) of which 0.5 KB used by bootloader
SRAM	2 KB (ATmega328)
EEPROM	1 KB (ATmega328)
Clock Speed	16 MHz

11. สเต็ปป์มอเตอร์ (Stepping motor)

สเต็ปป์มอเตอร์เป็นอุปกรณ์เอาต์พุต (Output) อย่างหนึ่งซึ่งสามารถนำมาไมโครคอนโทรลเลอร์มาทำการควบคุมได้สะดวก และเป็นมอเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในงานควบคุมการหมุนที่ต้องการตำแหน่งและทิศทางที่แน่นอน การทำงานของสเต็ปป์มอเตอร์จะขับเคลื่อนทีละขั้น ๆ (Step 0.9, 1.8, 5, 7.5, 15 หรือ 50 องศา) ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติแต่ละชนิดของสเต็ปป์มอเตอร์นั้น ๆ สเต็ปป์มอเตอร์มีความแตกต่างจากมอเตอร์กระแสตรงทั่วไป (DC motor) โดยการทำงานของมอเตอร์กระแสตรงจะหมุนไปแบบต่อเนื่อง ไม่สามารถหมุนเป็นสเต็ปได้ ดังนั้นในการนำไปกำหนดตำแหน่งจึงควบคุมได้ยากกว่า สเต็ปป์มอเตอร์ถูกนำมาใช้เพื่อทำการควบคุมอุปกรณ์หลายชนิดในระบบดิจิทัล เช่น Printer, Plotter, Hard drive เป็นต้น⁽⁷⁹⁾

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้งานวิจัย มีรายละเอียด ดังนี้

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการตรวจซีฟิลิส ประกอบด้วย Architect Syphilis TP ซื้อมาจากบริษัท Abbott laboratories สหรัฐอเมริกา และ Serodia TP-PA ซื้อมาจากบริษัท Fujirebio ประเทศญี่ปุ่น

2. เครื่องมือ

เครื่องตรวจซีฟิลิส Architect ซื้อมาจากบริษัท Abbott laboratories สหรัฐอเมริกา ซอฟต์แวร์ Visual Studio 2017 ดาวน์โหลดได้ฟรีจากบริษัท Microsoft ลิงค์ <https://www.visualstudio.com/> สหรัฐอเมริกา เครื่องไมโครคอนโทรลเลอร์ Arduino UNO ซื้อมาจากบริษัท ARDUINO® สหรัฐอเมริกา เว็บแคม 5 ล้านพิกเซล ซื้อมาจากบริษัท Oker ประเทศจีน

3. วิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ในปีพ.ศ. 2548 ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะระหว่างชุดตรวจ ELISA จำนวน 3 ชุดตรวจที่แตกต่างกัน โดยใช้วิธี TPHA เป็นวิธีมาตรฐาน และเนื่องจากการศึกษาหาความไวและความจำเพาะของน้ำยาจึงใช้ตัวอย่างจำนวนมาก โดยใช้ตัวอย่างโลหิตของผู้บริจาคโลหิตปกติจำนวน 1,250 ราย และพบตัวอย่างโลหิตของผู้บริจาคที่ให้ผลบวกต่อซีฟิลิส จำนวน 206 ราย อย่างไรก็ตามความซุกของโลหิตที่ได้รับบริจาคและมีผลการทดสอบต่อซีฟิลิสเป็นบวก มีจำนวนลดลงในแต่ละปีเนื่องจากมีระบบคัดผู้บริจาคโลหิตออกด้วยระบบคอมพิวเตอร์ที่ทันสมัยมากขึ้น การศึกษานี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบความสอดคล้องของวิธีการอ่านผลแบบใหม่เปรียบเทียบกับบุคคล มิใช่การศึกษาเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะระหว่างชุดตรวจ จึงใช้จำนวนตัวอย่างในการศึกษาที่น้อยกว่า แต่ยังคงสามารถคำนวณทางสถิติได้และครอบคลุมประชากรหลายกลุ่ม ตัวอย่างในศึกษาครั้งนี้จึงประกอบด้วย พลาสมาจาก 3 แหล่ง

สำหรับตัวอย่างพลาสมาที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ นำมาจาก พลาสมาของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่คลินิกนิรนาม ศูนย์วิจัยโรคเอดส์ สภากาชาดไทย ที่เหลือจากการทดสอบในงานประจำวัน ซึ่งผ่านการตรวจซีฟิไลต์ด้วย Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) และให้ผลเป็นบวกจำนวน 5 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างมีปริมาตรอย่างน้อย 1,000 ไมโครลิตร และ ตัวอย่างพลาสมาของผู้บริจาคโลหิต ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ผ่านการตรวจซีฟิไลต์ด้วยวิธี Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) ซึ่งให้ผลเป็นบวก จำนวน 30 ตัวอย่าง และผลเป็นลบ จำนวน 30 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างมีปริมาตรอย่างน้อย 1,000 ไมโครลิตร ดังนั้นจึงได้จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา จำนวนทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างพลาสมาที่ได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 2-8 °c เป็นระยะเวลาไม่เกิน 5 วัน ก่อนนำมาปั่นที่ 3,500 rpm. เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

นอกจากนี้ ตัวอย่างพลาสมาที่ใช้ในการควบคุมการทดลอง ได้ใช้ตัวอย่างมาตรฐานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ได้รับมาจากการตรวจ External quality control ประจำปี ที่ให้ผลการตรวจซีฟิไลต์เป็นบวกจำนวน 3 ตัวอย่าง และผลเป็นลบจำนวน 3 ตัวอย่าง นำมาใช้เป็นตัวอย่างควบคุมผลบวกและผลลบ ตามลำดับ

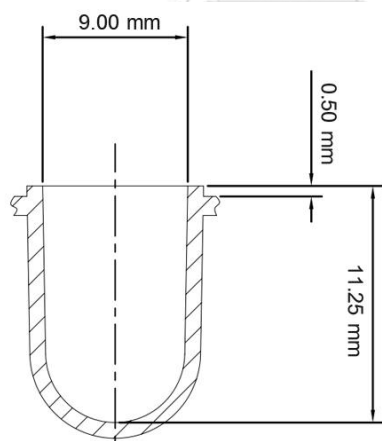
3.2 การขอพิจารณาจริยธรรมในการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการจากการประชุมคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เลขที่รับรองโครงการ 8/2563

3.3 การเตรียมตัวอย่างควบคุมสำหรับการปรับแต่งค่าที่เหมาะสมในการอ่านผล TPPA โดยซอฟต์แวร์

นำตัวอย่างมาตรฐานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ผลการตรวจซีฟิไลต์เป็นบวกจำนวน 3 ตัวอย่าง มาทำการเจือจางให้มีระดับไตเตอร์ที่ลดหลั่นกันลงมา โดยเริ่มจากไตเตอร์ 1:1, 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 เพื่อให้ได้ระดับความแรงของปฏิกิริยาการจับกลุ่มครอบคลุมครบทุกรูปแบบ และถูกใช้เป็นตัวควบคุมบวกสำหรับการปรับแต่งค่าซอฟต์แวร์ ในขณะที่ตัวอย่างมาตรฐานจากกรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ที่ผลการตรวจซีฟิไลต์เป็นลบ จำนวน 3 ตัวอย่าง ไม่ถูกทำการเจือจางและใช้เป็นตัวควบคุมลบสำหรับการปรับแต่งซอฟต์แวร์ ตัวอย่างควบคุมทั้งบวกและลบดังกล่าวถูกนำมาตรวจหาซีฟิไลต์ด้วยวิธี TPPA โดยมีรายละเอียดดังนี้ เตรียม Microtiter plate ขนาด

96 หลุม ที่ก้นหลุมเป็นรูปตัว U ซึ่งมีขนาดของหลุมปฏิกิริยาเท่ากับ 9×11.25 มิลลิเมตร (รูปที่ 9) หยด diluent buffer ปริมาตร 100 μL ลงในหลุมที่ 1 แล้วหยด diluent buffer ปริมาตร 25 μL ในหลุมที่ 2 จนถึงหลุมที่ 4 หยดตัวอย่างควบคุมบวกหรือลบ ปริมาตร 25 μL ลงในหลุมที่ 1 ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต ดูดถ่ายปริมาตร 25 μL ไปยังหลุมที่ 2 จนถึงหลุมที่ 4 แล้วดูดทิ้งปริมาตร 25 μL หยด Unsensitized particle ลงในหลุมที่ 3 และหยด Sensitized particle ลงในหลุมที่ 4 เขย่าให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 30 วินาที บน Microplate shaker แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการจับกลุ่มกันของเม็ดเจลาติน ผลของปฏิกิริยาถูกแบ่งเป็น สัญลักษณ์ (-) หมายถึง Nonreactive เม็ดเจลาตินจับกลุ่มกันแน่นบริเวณก้นหลุมมีขอบเรียบชัดเจน หรือเม็ดเจลาตินจับกลุ่มกันแน่นบริเวณก้นหลุม มีรูที่เล็กมากมองดูคล้ายวงแหวนขอบเรียบ สัญลักษณ์ (+/-) หมายถึง Inconclusive เม็ดเจลาตินจับกลุ่มกันแน่นบริเวณก้นหลุมมีรูขอบเรียบ สัญลักษณ์ (+) หมายถึง Reactive เม็ดเจลาตินจับกลุ่มกันบริเวณก้นหลุมมีรูกลมขนาดใหญ่ ขอบแผ่กระจาย และสัญลักษณ์ (++) หมายถึง reactive เม็ดเจลาตินจับกลุ่มกันแผ่ทั่วก้นหลุมอย่างสม่ำเสมอ นำผลการจับกลุ่มที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุมไปเป็นตัวอย่างสำหรับบันทึกภาพและแปลผลในขั้นตอนการสร้างเครื่องบันทึกภาพและออกแบบคำสั่งของโปรแกรมซอฟต์แวร์ เพื่อทำการปรับแต่งเกณฑ์สำหรับการแปลผลเป็นบวกหรือลบของซอฟต์แวร์ในลำดับต่อไป

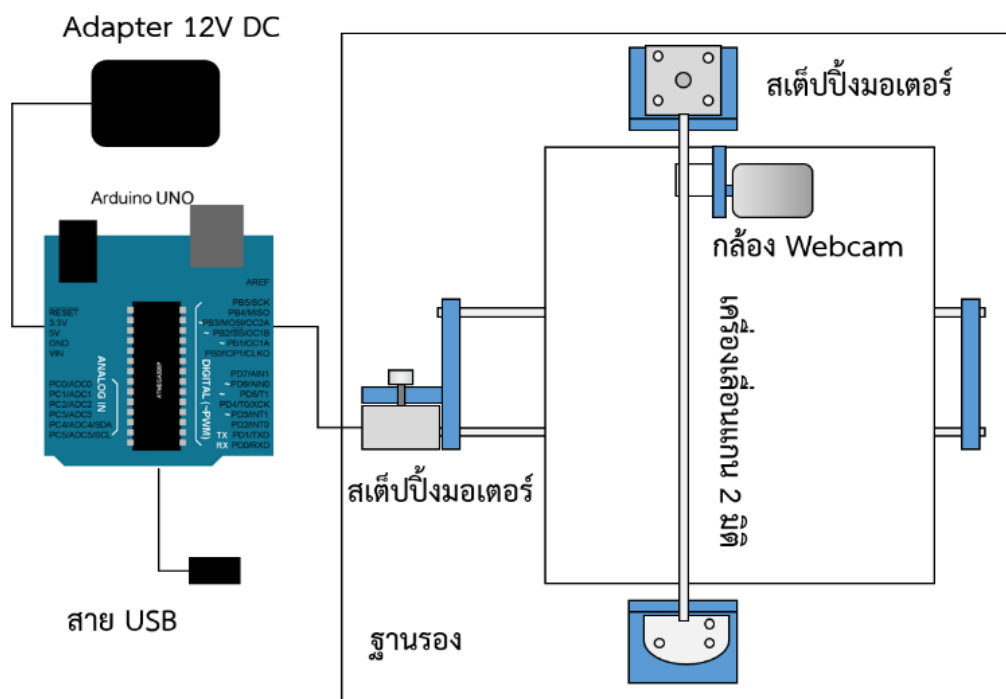


รูปที่ 9 ขนาดของหลุมปฏิกิริยารูปตัว U ที่ใช้ในการในการศึกษาทดลอง

3.4 การสร้างเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ

สร้างเครื่องบันทึกภาพต้นแบบสำหรับการบันทึกผลปฏิบัติการ TPPA โดยประกอบไปด้วยอุปกรณ์หลัก ดังนี้ สเต็ปป์มอเตอร์ เครื่องเลื่อนแกนสองมิติ ไมโครคอนโทรลเลอร์ Arduino Uno กล้องเว็บแคม ฐานรอง Adapter 12V DC และสาย USB

นำกล้องเว็บแคมซึ่งสามารถเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ได้ง่าย มาทำการปรับแต่งสำหรับบันทึกภาพปฏิบัติการที่เกิดจากวิธี TPPA โดยต่อกล้องเว็บแคมเข้ากับเครื่องเลื่อนแกนสองมิติ ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ไปในแนว X และ Y เพื่อถ่ายภาพปฏิบัติการในแต่ละหลุม กล้องเว็บแคมที่ใช้ถูกควบคุมด้วยไมโครคอนโทรลเลอร์ Arduino Uno ซึ่งสามารถตัดภาพให้ได้เฉพาะบริเวณแต่ละหลุมที่ใช้วิเคราะห์ นำภาพปฏิบัติการทั้ง 96 หลุมรวมกันเป็นภาพเดียวเพื่อนำภาพไปวิเคราะห์ต่อไป รายละเอียดแผนผังการเชื่อมต่ออุปกรณ์ที่ถูกออกแบบสำหรับเครื่องบันทึกภาพ ดังรายละเอียดที่แสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แผนผังการออกแบบเครื่องบันทึกภาพปฏิบัติการ TPPA

3.5 การออกแบบคำสั่งของโปรแกรมซอฟต์แวร์

การออกแบบคำสั่งควบคุมการทำงานของซอฟต์แวร์ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้คำสั่งภาษา C# ซึ่งเป็นภาษาโปรแกรมเชิงวัตถุ ที่ทำงานบน Net Framework โดยมีคำสั่งที่ถูกเขียนขึ้นสองส่วน ซึ่งส่วนแรกเป็นการออกแบบเขียนคำสั่งเพื่อควบคุมไมโครคอนโทรลเลอร์และ Arduino Uno เพื่อให้สามารถถ่ายภาพได้ที่ละหลุม ในขณะที่ส่วนที่สองเป็นการเขียนออกแบบเขียนคำสั่งเพื่อทำการประมวลผลภาพ ในการออกแบบคำสั่งควบคุมการทำงานของซอฟต์แวร์แต่ละขั้นตอน ใช้ตัวอย่างควบคุมบวกและลบที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 3.3 ที่ผ่านการตรวจด้วยวิธี TPPA นำมาบันทึกภาพและแปลงผลเพื่อนำภาพปฏิริยามาปรับตั้งค่าโดยซอฟต์แวร์ จากนั้นกำหนดค่าให้เป็นเกณฑ์สำหรับการแปลงผลเป็นบวกหรือลบตามลำดับ โดยออกแบบคำสั่งให้แปลงผลตัวอย่างควบคุมบวกที่ไเตเตอร์ 1:1, 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 และสามารถแยกผลการทดสอบระหว่างตัวควบคุมบวกในทุกไเตเตอร์ ออกจากผลการทดสอบของตัวควบคุมลบได้อย่างชัดเจน

สำหรับการแปลงผลจะใช้ขนาดพื้นที่จำนวนพิกเซลเป็นเกณฑ์ กล่าวคือการแปลงผลลบเมื่อเจลาตินจะตกลงไปรวมกันที่กันหลุมโดยไม่มีกรจับกลุ่ม ทำให้มีขนาดพื้นที่ที่เล็กกว่าผลการตรวจที่เป็นบวกที่แผ่จากการจับกลุ่ม เมื่อนำตัวอย่างควบคุมลบทั้งหมดมาหาพื้นที่ จะได้ช่วงตัวเลขพิกเซลที่ใช้เป็นเกณฑ์แปลงผลต่อไป เช่นเดียวกันกับการแปลงผลบวก นำตัวอย่างควบคุมบวกที่ไเตเตอร์ 1:1, 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 มาหาพื้นที่พิกเซล ซึ่งปฏิริยาที่มีความแรงมากขึ้นจะแปรผันตรงกับขนาดพิกเซล หากปฏิริยาแรงขึ้นพื้นที่พิกเซลจะมากขึ้นตามลำดับ

คำสั่งในแต่ละส่วนประกอบไปด้วยฟังก์ชันคำสั่งย่อย ดังนี้

3.5.1 ฟังก์ชันการรับค่าจากกล้อง

ฟังก์ชันนี้เป็นการเขียนคำสั่งเพื่อทำการเปิดกล้องให้กล้องเริ่มทำงาน และเชื่อมต่อเข้ากับ ไมโครคอนโทรลเลอร์ พร้อมแสดงผลภาพในโปรแกรม

3.5.2 ฟังก์ชันการเชื่อมต่อกับ Arduino

ฟังก์ชันการเชื่อมต่อนี้เป็นการเขียนคำสั่งเพื่อเชื่อมต่อไมโครคอนโทรลเลอร์ ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการทำงานของอุปกรณ์ต่างๆ ให้เชื่อมเข้ากับ Arduino Uno ซึ่งมีหน้าที่ประมวลผลและสั่งงาน ทั้งนี้เพื่อให้คำสั่งที่ถูกเขียนขึ้นโดยภาษา C# สามารถสั่งการให้ให้ Arduino Uno แสดงผลตามที่ตั้งค่าไว้

3.5.3 ฟังก์ชันถ่ายภาพ

เมื่อกล้องกล้องเว็บแคมที่อยู่บนแกน X และ Y เคลื่อนที่ไปยังจุดศูนย์กลางของแต่ละหลุมปฏิกิริยา โปรแกรมจะทำการบันทึกภาพเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป ภายหลังจากการทำงานของคำสั่งฟังก์ชันถ่ายภาพ

3.5.4 ฟังก์ชัน Crop ภาพ

หลังทำการบันทึกภาพ ทำให้ได้ภาพในมุมกว้างและมีส่วนที่ไม่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ติดมาด้วย จึงต้องมีการใช้ฟังก์ชันในการเลือกเฉพาะบริเวณที่สนใจ หรือเรียกว่าเทคนิคการ Crop ภาพ

3.5.5 ฟังก์ชันการเลือกค่าสีที่ต้องการในมาตรฐานสี HSL

ในการศึกษานี้สนใจเฉพาะภาพส่วนที่เป็นปฏิกิริยาที่เป็นเม็ดเจลาตินเท่านั้น บริเวณอื่นๆของภาพที่ไม่เกี่ยวข้องจะถูกตัดออก เช่น เพลท หรือเศษต่างๆที่ไม่ใช่ปฏิกิริยา เนื่องจากเม็ดเจลาตินมีสีชมพู หากทำการเลือกช่วงสีเฉพาะสีชมพูจะทำให้ได้ภาพปฏิกิริยาที่เราสนใจเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การเขียนคำสั่งปรับค่าสีจึงมีความสำคัญในการปรับปรุงภาพและเลือกช่วงสีที่เหมาะสมในการศึกษา ซึ่งช่วงสีที่เราสนใจคือชมพู งานวิจัยนี้ได้ใช้ช่วงค่าในมาตรฐานสี Hue Saturation Lightness (HSL) มาใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งประกอบไปด้วยการปรับค่า Hue คือค่าโทนสี ตั้งแต่ 0 ถึง 300 ค่า Saturation คือ ค่าความอิ่มสี ตั้งแต่ 0.2 ถึง 1 และค่า Light คือ ค่าความสว่าง ตั้งแต่ 0.1 ถึง 1

3.5.6 ฟังก์ชันการแปลงรูปภาพให้เป็นภาพเดี่ยว

เนื่องจากการถ่ายภาพปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเจลาติน จะเป็นการถ่ายภาพทีละหลุม ทำให้มีภาพทั้งหมด 96 ภาพ ตามจำนวนหลุมของเพลท ฟังก์ชันนี้จึงเป็นการรวมภาพถ่ายดังที่กล่าวมา มารวมเป็นภาพเดี่ยว เพื่อให้ง่ายต่อการแสดงผลการทดสอบ โดยมีรายละเอียดของโค้ดคำสั่ง ดังนี้

3.6 การตรวจซีฟิลิสด้วยวิธี TPPA

นำพลาสมาของผู้ป่วยจากคลินิกนิรนาม จำนวน 5 ตัวอย่าง และพลาสมาของผู้บริจาคโลหิต จำนวน 60 ตัวอย่าง รวมเป็น 65 ตัวอย่าง มาทำการตรวจวินิจฉัยซีฟิลิสด้วยวิธี TPPA โดยมีรายละเอียดดังนี้ เตรียม Microtiter plate ขนาด 96 หลุม ที่ก้นหลุมเป็นรูปตัว U หยด diluent buffer ปริมาตร 100 μ L ลงในหลุมที่ 1 แล้วหยด diluent buffer ปริมาตร 25 μ L ในหลุมที่ 2 จนถึงหลุมที่ 4 หยดพลาสมาของผู้ป่วย ปริมาตร 25 μ L ลงในหลุมที่ 1 ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต ดูด

ถ่ายปริมาตร 25 μL ไปยังหลุมที่ 2 จนถึงหลุมที่ 4 แล้วดูดทิ้งปริมาตร 25 μL หยด Unsensitized particle ลงในหลุมที่ 3 และหยด Sensitized particle ลงในหลุมที่ 4 เขย่าให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 30 วินาที บน Microplate shaker แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเจลลาติน โดยนำไปบันทึกภาพและวิเคราะห์แปลผลด้วยอุปกรณ์และซอฟต์แวร์การประมวลผลภาพดิจิทัลที่พัฒนาขึ้น ตามลำดับ โดยมีขั้นตอนการบันทึกภาพและอ่านผลด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ ดังนี้

นำสาย USB ของอุปกรณ์เสียบเข้ากับช่องรับ USB ของคอมพิวเตอร์ จากนั้นเปิดซอฟต์แวร์ขึ้นมา คลิกที่เมนู Start ลูกศรสีเขียว จากนั้นจะปรากฏหน้าต่างซอฟต์แวร์ที่พร้อมใช้งาน คลิกที่ปุ่ม Connect ภาพจากกล้องจะปรากฏขึ้นมา จากนั้นเปิดฝาเครื่องแล้วนำเพลทที่ต้องการอ่านผลไปวางบนตำแหน่งที่กำหนดไว้ซึ่งเป็นพื้นเรียบสีขาว ปิดฝา คลิกที่ปุ่ม Auto เครื่องจะเริ่มอ่านผลแบบอัตโนมัติครบทั้ง 96 หลุม โดยใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 116 วินาที

จากนั้นทำการอ่านผลอีกครั้งด้วยตาเปล่าโดยเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานที่ไม่ทราบผลการตรวจจากซอฟต์แวร์มาก่อน ทบทวนผลทั้งหมดด้วยเจ้าหน้าที่คนที่สอง ทั้งนี้การอ่านผลด้วยตาเปล่าทั้งหมดได้ปฏิบัติตามขั้นตอนมาตรฐานการปฏิบัติงาน (working instruction: WI) ของฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย แล้วทำการบันทึกผลการตรวจที่เกิดขึ้น ผลของปฏิกิริยาจากการอ่านด้วยซอฟต์แวร์และด้วยผู้ปฏิบัติงาน ถูกแบ่งเป็น สัญลักษณ์ (-) หมายถึง nonreactive เม็ดเจลลาตินเกาะกลุ่มกันแน่นบริเวณก้นหลุมมีขอบเรียบชัดเจน หรือเม็ดเจลลาตินเกาะกลุ่มกันแน่นบริเวณก้นหลุม มีรูที่เล็กมากมองดูคล้ายวงแหวนขอบเรียบ สัญลักษณ์ (+/-) หมายถึง inconclusive เม็ดเจลลาตินเกาะกลุ่มกันแน่นบริเวณก้นหลุมมีรูขอบเรียบ สัญลักษณ์ (+) หมายถึง reactive เม็ดเจลลาตินเกาะกลุ่มกันบริเวณก้นหลุมมีรูกลมขนาดใหญ่ ขอบแผ่กระจาย และสัญลักษณ์ (++) หมายถึง reactive เม็ดเจลลาตินเกาะกลุ่มกันแผ่ทั่วก้นหลุมอย่างสม่ำเสมอ

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การแปลผลของการอ่านปฏิกิริยา TPPA ที่ได้จากอุปกรณ์และซอฟต์แวร์การประมวลผลภาพดิจิทัลที่พัฒนาขึ้น ถูกนำมาเปรียบเทียบการแปลผลที่ได้จากการอ่านผลอีกครั้งด้วยตาเปล่าโดยเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน ผลการทดลองที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาค่าความสอดคล้องโดยใช้สถิติ kappa⁽⁸⁰⁾ ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วัดระดับความสอดคล้อง (Agreement) ระหว่างกลุ่มข้อมูล 2 กลุ่ม หรือระหว่าง วิธีตรวจทางห้องปฏิบัติการ 2 วิธี โดยข้อมูลที่ใช้มีระดับการวัดแบบนามบัญญัติ (Nominal) หรือเรียงลำดับ (Ordinal) คำนวณได้จากค่าสัดส่วนความสอดคล้องของข้อมูลที่สังเกตได้ (p_o) และค่าสัดส่วนความสอดคล้องของข้อมูลที่เกิดขึ้นโดยบังเอิญ (p_e) มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$k = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e}$$

$$p_0 = \frac{\text{จำนวนที่ให้ผลตรงกันจริง}}{\text{จำนวนที่ให้ผลตรงกันได้สูงสุด}}$$

$$p_e = \frac{\text{จำนวนที่คาดว่าจะให้ผลตรงกัน}}{\text{จำนวนที่ให้ผลตรงกันได้สูงสุด}}$$

จากการเปรียบเทียบข้อมูลผลการตรวจระหว่างวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 เมื่อกำหนดให้ a เป็นจำนวนที่ให้ผลบวกตรงกันทั้งสองวิธี b เป็นจำนวนที่ให้ผลลบในวิธีที่ 1 แต่ให้ผลบวกในวิธีที่ 2 c เป็นจำนวนที่ให้ผลบวกในวิธีที่ 1 แต่ให้ผลลบในวิธีที่ 2 d เป็นจำนวนที่ให้ผลลบตรงกันทั้งสองวิธี และ N เป็นจำนวนที่ศึกษาทั้งหมด

$$\text{จำนวนที่ให้ผลตรงกัน} = a + d$$

$$\text{จำนวนที่คาดว่าจะให้ผลตรงกัน} = \frac{(a + b)(a + c)}{N} + \frac{(c + d)(b + d)}{N}$$

$$\text{จำนวนที่ให้ผลตรงกันได้สูงสุด} = N$$

ค่าสถิติ Kappa ที่คำนวณได้ มีค่าระหว่าง 0 ถึง 1 ซึ่งแสดงสัดส่วนความสอดคล้องและมีความหมาย ดังนี้

<u>ช่วงค่าสถิติ Kappa</u>	<u>ความหมาย</u>
<0.00	มีความสอดคล้องน้อยมาก (Poor)
0.00-0.20	มีความสอดคล้องน้อย (Slight)
0.21-0.40	มีความสอดคล้องพอใช้ (Fair)
0.41-0.60	มีความสอดคล้องปานกลาง (Moderate)
0.61-0.80	มีความสอดคล้องดี (Substantial)
0.81-1.00	มีความสอดคล้องดีมาก (Almost perfect)

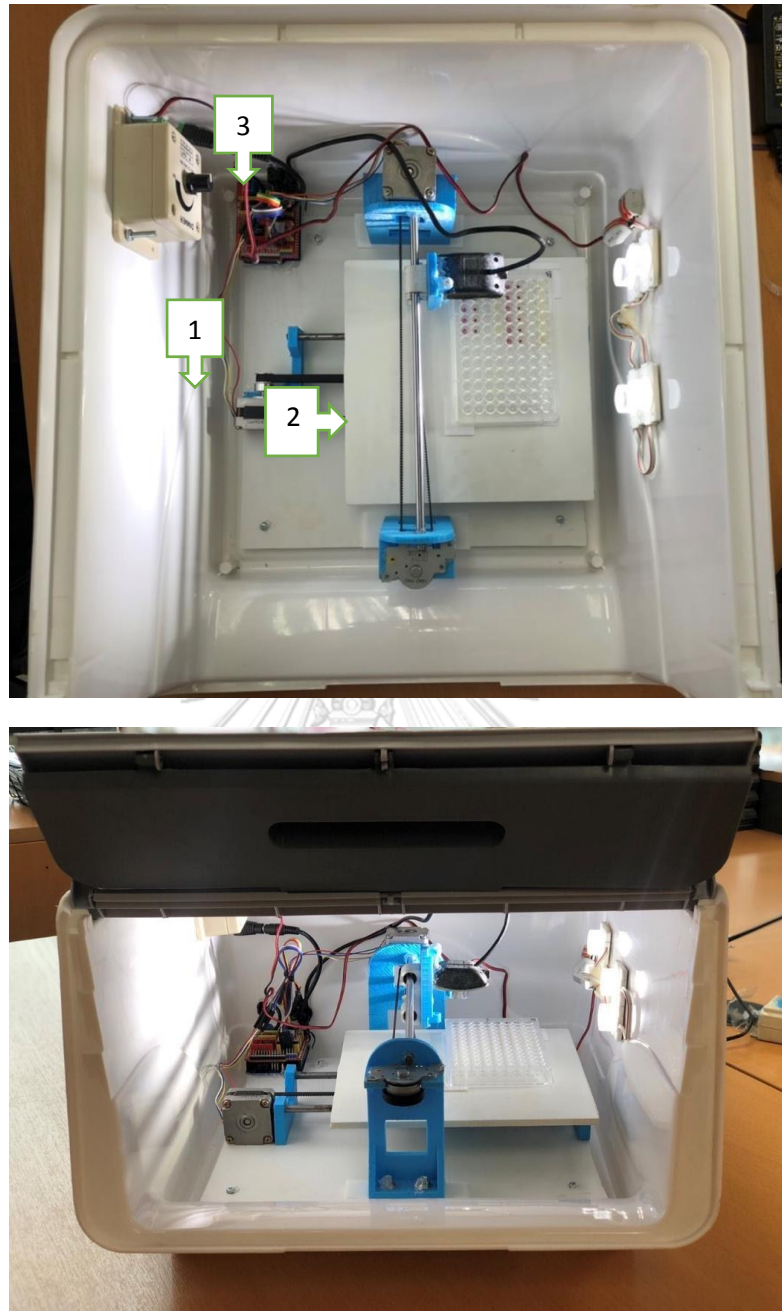
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. เครื่องบันทึกภาพต้นแบบ

ภายหลังจากออกแบบและประกอบอุปกรณ์ต่างๆ ได้แก่ สเต็ปป์มอเตอร์ เครื่องเลื่อนแกน สองมิติ ไมโครคอนโทรลเลอร์ Arduino Uno กล้องเว็บแคม ฐานรอง Adapter 12V DC หลอด LED และสาย USB เข้าด้วยกัน สามารถสร้างเครื่องบันทึกภาพต้นแบบสำหรับบันทึกภาพของผลปฏิกิริยา TPPA ดังที่แสดงในรูปที่ 11 ซึ่งแสดงวัสดุอุปกรณ์ที่ติดตั้งอยู่ในเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ ประกอบด้วยสเต็ปป์มอเตอร์มีหน้าที่ควบคุมการหมุนที่ต้องการตำแหน่งและทิศทางที่แน่นอน การทำงานของสเต็ปป์มอเตอร์จะขับเคลื่อนทีละขั้น เพื่อให้กล้องบันทึกภาพเคลื่อนที่ไปตามหลุม ปฏิกิริยาได้ครบถ้วนทุกหลุม เครื่องเลื่อนแกนสองมิติซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้ตามแกน X และแกน Y เพื่อให้กล้องบันทึกภาพเคลื่อนตัวไปตามหลุมปฏิกิริยาที่ต้องการได้อย่างแม่นยำ โดยใช้เวลาเคลื่อนที่เพื่อบันทึกภาพทั้งหมดเฉลี่ยประมาณ 116 วินาที ทำให้ได้ภาพที่มีความละเอียดคมชัดอยู่ในเกณฑ์ที่ดี มีความเหมาะสมในการนำภาพไปวิเคราะห์ต่อไปได้ ไมโครคอนโทรลเลอร์ซึ่งมีความสามารถที่คล้ายคลึงกับระบบคอมพิวเตอร์ มีหน้าที่ควบคุมอุปกรณ์ต่างๆ ให้แสดงผลตามโค้ดที่เขียนไว้ ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์รุ่น Arduino Uno ซึ่งเป็นไมโครคอนโทรลเลอร์บอร์ดแบบสำเร็จรูปในยุคปัจจุบัน กล้องเว็บแคม มีหน้าที่บันทึกภาพปฏิกิริยาของ TPPA และสาย USB ซึ่งมีหน้าที่เชื่อมต่อข้อมูลระหว่างคอมพิวเตอร์กับไมโครคอนโทรลเลอร์ และกล้องเว็บแคม และหลอด LED ขนาดเล็ก จำนวน 4 หลอด ซึ่งให้แสงสว่างมากแต่ใช้กระแสไฟฟ้าน้อย โดยใช้กับไฟฟ้ากระแสตรง 12 โวลต์ 10 วัตต์ กำลังไฟฟ้า 900 มิลลิแอมป์ มีค่าความสว่าง 800 - 900 ลูเมน มุมกระจายแสงสว่าง 140 องศา

เครื่องบันทึกภาพต้นแบบที่ถูกสร้างขึ้น มีโครงสร้างภายนอกที่เป็นกล่องพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีน (Polyethylene, PE) (รูปที่ 12) มีขนาดกว้าง 28 เซนติเมตร ยาว 28 เซนติเมตร สูงเท่ากับ 26 เซนติเมตร มีน้ำหนักเท่ากับ 0.5 กิโลกรัม ใช้กระแสไฟฟ้า 50 มิลลิแอมป์ ความต่างศักย์กระแสไฟฟ้าเท่ากับ 220 โวลต์ และมีต้นทุนของค่าวัสดุอุปกรณ์ทั้งสิ้น เท่ากับ 3,150 บาทต่อเครื่อง



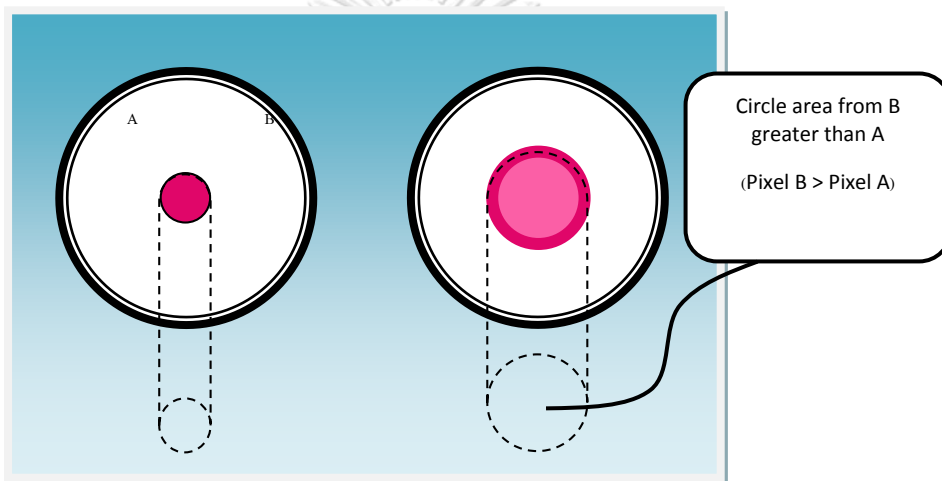
รูปที่ 11 วัสดุอุปกรณ์ภายในเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ (บน) ภาพมุมมองภายในหลังเปิดฝาครอบด้านบนของเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ หมายเลข 1 คือสเต็ปปีงมอเตอร์ หมายเลข 2 คือเครื่องเลื่อนแกนสองมิติ หมายเลข 3 คือไมโครคอนโทรลเลอร์ (ล่าง) ภาพมุมมองข้างภายในหลังเปิดบานพับด้านข้างของเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ



รูปที่ 12 โครงสร้างภายนอกเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ (บน) เครื่องบันทึกภาพต้นแบบพร้อมฝาครอบ
ขณะเปิดบานพับด้านข้าง (ล่าง) เครื่องบันทึกภาพต้นแบบพร้อมฝาครอบขณะปิดบานพับด้านข้าง

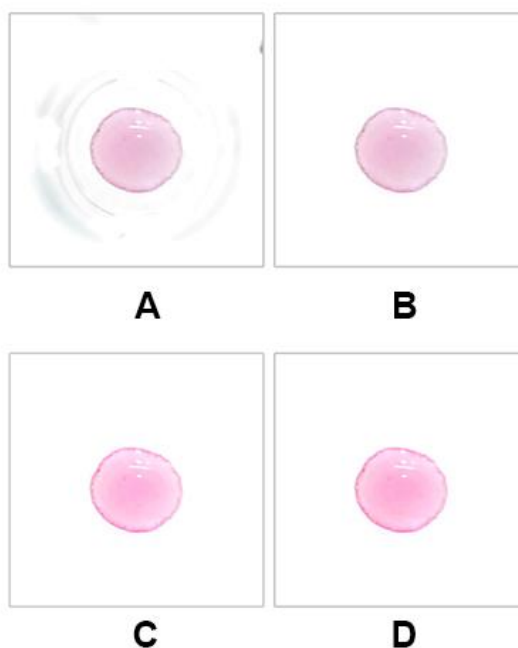
2. ขั้นตอนการทำงานและคำสั่งของโปรแกรมซอฟต์แวร์

ภายหลังการออกแบบคำสั่งควบคุมการทำงานของซอฟต์แวร์โดยใช้คำสั่งภาษา C# ในการเขียนโค้ดคำสั่ง และใช้ตัวอย่างควบคุมบวกที่โตเตอร์ 1:1, 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 และตัวอย่างควบคุมลบ เป็นตัวอย่างเพื่อนำมาถ่ายภาพและแปลผลเพื่อนำภาพปฏิกิริยามาปรับตั้งค่าโดยซอฟต์แวร์ จากนั้นกำหนดค่าให้เป็นเกณฑ์สำหรับการแปลผลเป็นบวกหรือลบ ตามลำดับ จากการอ่านปฏิกิริยา TPPA ของตัวอย่างควบคุม พบว่ารัศมีของวงกลมที่เกิดจากการเกาะกลุ่มของเม็ดเจลาตินจากปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก มีความยาวกว่าของรัศมีวงกลมที่เกิดปฏิกิริยาที่ให้ผลลบ (รูปที่ 13) ดังนั้นจึงออกแบบให้ซอฟต์แวร์ดูค่าเม็ดสีในช่วงของสีชมพูให้ครอบคลุมช่วงสีของเม็ดเจลาตินที่กระจายตัว แล้วทำการวิเคราะห์ขนาดของพื้นที่ที่แตกต่างกันของผลบวกและลบได้



รูปที่ 13 ความแตกต่างระหว่างพื้นที่ของปฏิกิริยา TPPA ที่ให้ผลแต่ละแบบ (B) ผลบวก พบว่ารัศมีของวงกลมที่เกิดจากการเกาะกลุ่มของเม็ดเจลาตินจากปฏิกิริยาที่มีความยาวกว่า ในขณะที่ (A) ผลลบ พบว่ารัศมีของวงกลมที่เกิดจากการเกาะกลุ่มของเม็ดเจลาตินจากปฏิกิริยาที่มีความยาวสั้นกว่า

ผลการปรับแต่งเพื่อกำหนดค่ามาตรฐานสี Hue Lightness Saturation เพื่อให้ได้ภาพที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการประมวลผลภาพดิจิทัล มีรายละเอียดดังนี้ ปรับค่าความสว่าง (Light) เป็นลำดับแรก โดยความสว่างที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ ค่า Light S เท่ากับ 0.1 และค่า Light F เท่ากับ 1 (**รูปที่ 14A**) จากนั้นกำหนดค่าความสว่างตามที่ปรับได้ และทำการปรับค่าโทนสี (Hue) ในลำดับถัดมา โดยค่าโทนสีที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ ค่า Hue S เท่ากับ 300 และค่า Hue F เท่ากับ 0 (**รูปที่ 14B**) สุดท้ายกำหนดค่าความสว่างและค่าโทนสีตามข้างต้น และปรับค่าความอิ่มสี (Sat) โดยค่าความอิ่มสีที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ ค่า Sat S เท่ากับ 0.2 และค่า Sat F เท่ากับ 1 (**รูปที่ 14C**) เมื่อได้ค่ามาตรฐานสี HLS ตามที่ปรับตามรายละเอียดข้างต้นแล้ว ทำให้ได้ภาพที่ได้จากการบันทึก มีพื้นหลังสว่าง ไม่มีสีอื่นรบกวน บริเวณที่เกิดปฏิกิริยามีสีชัดเจนและอ่านผลได้ง่าย (**รูปที่ 14D**)

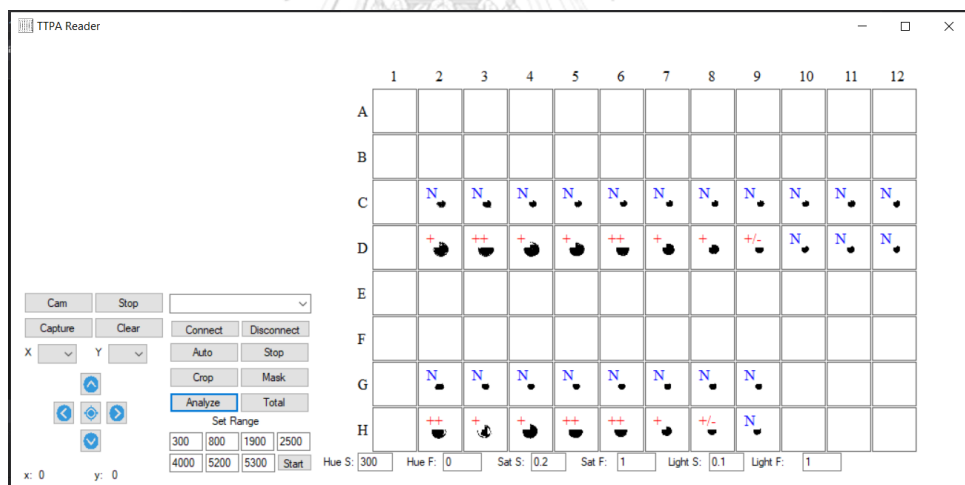


รูปที่ 14 ผลการปรับแต่งค่ามาตรฐานสี HSL (A) ปฏิกริยาที่บันทึกได้จากการปรับแต่งค่าความสว่าง ค่า Light S เท่ากับ 0.1 และค่า Light F เท่ากับ 1 (B) ปฏิกริยาที่บันทึกได้จากการปรับค่าโทนสี ค่า Hue S เท่ากับ 300 และค่า Hue F เท่ากับ 0 (C) ปฏิกริยาที่บันทึกได้จากการปรับค่าความอิ่มสี ค่า Sat S เท่ากับ 0.2 และค่า Sat F เท่ากับ 1 (D) ปฏิกริยาที่บันทึกได้จากค่ามาตรฐานสี HLS ภายหลังจากปรับแต่งจนมีความเหมาะสมที่สุดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งมีค่า HSL เท่ากับ 0 - 300, 0.2 - 1 และ 0.1 - 1 ตามลำดับ

ช่วง pixel ในการแปลผลที่เหมาะสม สามารถครอบคลุมตั้งแต่ผลลบ (-) จนถึงผลบวก (++) มีค่าเท่ากับ 300 ถึง 4000 pixel เมื่อนำซอฟต์แวร์ไปทดสอบกับตัวอย่างควบคุมบวกและลบ พบว่าสามารถแปลผลปฏิกริยาจับกลุ่มได้อย่างถูกต้องทุกไต่เตอร์ และสามารถอ่านปฏิกริยาของผลบวกและลบแตกต่างกันได้อย่างชัดเจน จึงใช้ค่าดังกล่าวเป็นบรรทัดฐานเพื่อใช้ในการซอฟต์แวร์สำหรับการแปลผลการอ่านปฏิกริยา TPPA ในการตรวจซีฟิสิกับพลาสมาของผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิตในลำดับต่อไป

รูปที่ 15 (บน) แสดงปฏิกริยา TPPA บน microtiter plate ที่ทดสอบกับตัวควบคุมบวกที่ไต่เตอร์ 1:1, 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 (กรอบสีแดง) และตัวอย่างควบคุมลบ (กรอบสีน้ำเงิน) ในแถวที่สี่ unsensitized particle สังเกตพบเม็ดเจลาตินเกาะกลุ่มกันแน่นบริเวณก้นหลุมมีขอบเรียบชัดเจน ซึ่งแปลผลได้เป็น (-) หรือ nonreactive ในทุกไต่เตอร์ของตัวควบคุมบวกและในทุกหลุมของตัวควบคุมลบ ในแถวที่สี่ sensitized particle สังเกตพบเม็ดเจลาตินเกาะกลุ่มกันบริเวณก้นหลุมมีรูกลมขนาดใหญ่ ขอบแผ่กระจาย ซึ่งแปลผลได้เป็น (+) หรือ reactive ที่ไต่เตอร์ 1:128 ในขณะที่พบเม็ดเจลาตินเกาะกลุ่มกันแน่นบริเวณก้นหลุมมีขอบเรียบชัดเจนซึ่งแปลผลได้เป็น (-) ที่ตัว

ควบคุมลบทุกหลุม ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นบน microtiter plate ถูกบันทึกภาพเพื่ออ่านผลและประมวลผลโดยซอฟต์แวร์ที่ถูกปรับแต่งตามรายละเอียดด้านบน (รูปที่ 15 ล่าง) ซึ่งถูกประมวลผลเป็นสัญลักษณ์ (-) (+/-) (+) และ (++) ที่แสดงถึงระดับปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุม



รูปที่ 15 ปฏิกริยา TPPA ที่ทดสอบกับตัวควบคุมบวกและลบในระหว่างการออกแบบคำสั่งโปรแกรมซอฟต์แวร์ (บน) microtiter plate ที่ใช้ทำปฏิกริยากับตัวควบคุมบวกที่ไต่เตอร์ 1:1, 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 และตัวอย่างควบคุมลบ (ล่าง)












ปฏิกิริยาที่ถูกบันทึกภาพและแปลผลตามเกณฑ์ที่ปรับแต่งของซอฟต์แวร์ แถว C และแถว G คือหลุมที่ไม่เกิดปฏิกิริยาเนื่องจากใส่ unsensitized particle ให้ผลเป็น (-) หรือ nonreactive สำหรับแถว D และแถว H คือหลุมปฏิกิริยาที่ใช้ในการแปลผลเนื่องจากใส่ sensitized particle ในคอลัมน์ 2, 4, 5, 7 และ 8 (+) หรือ reactive ในคอลัมน์ 3 และ 6 ให้ผลเป็น (++) หรือ reactive ในคอลัมน์ 9 ให้ผลเป็น (+/-) หรือ inconclusive ในคอลัมน์ 10-12 ให้ผลเป็น (-) หรือ nonreactive












3. การอ่านและแปลผลการตรวจซีฟิลิสด้วยวิธี TPPA ด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์












ภายหลังจากนำตัวอย่างพลาสมาจำนวนทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างแต่ละตัวอย่างถูกทดสอบยืนยันซีฟิลิสด้วยเทคนิค CMIA และมีผลบวกจำนวน 35 ตัวอย่าง โดยมีค่า S/Co มากกว่า 1 ขึ้นไป ในขณะที่ตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่างมีผลลบ มีค่า S/Co น้อยกว่า 1 ทั้งนี้ค่า S/Co คือสัดส่วนระหว่างสัญญาณจากตัวอย่าง (ratio of the sample rate; S) กับค่า cutoff (cutoff rate; Co) การแปลผล $S/CO < 1.00$ คือ non reactive และ $S/CO > 1.00$ คือ reactive นำตัวอย่างทั้งหมดมาทดสอบตรวจซีฟิลิสด้วยวิธี TPPA และนำไปบันทึกภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบเพื่ออ่านผลและแปลผลด้วยซอฟต์แวร์ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานสองคน พบว่าแต่ละตัวอย่างมีระดับปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ดังที่แสดงรายละเอียดในตารางที่ 3












ตารางที่ 3 รายละเอียดผลปฏิกิริยาของวิธี TPPA ที่ใช้ในการตรวจซีฟิลิส ซึ่งถูกอ่านและแปลผลด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ เปรียบเทียบกับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน ผู้ปฏิบัติงาน (N=65)



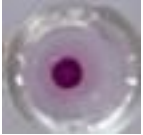








ลำดับที่	S/Co	TPPA อ่านผล โดยผู้ปฏิบัติงาน	TPPA อ่านผล โดยซอฟต์แวร์	ภาพปฏิกิริยา
1	20.95	++	++	
2	16.46	++	++	
3	22.02	++	+	








ลำดับที่	S/Co	TPPA อ่านผล โดยผู้ปฏิบัติงาน	TPPA อ่านผล โดยซอฟต์แวร์	ภาพปฏิกิริยา
4	21.12	++	++	
5	21.22	++	++	
6	17.76	+	+	
7	20.49	++	++	
8	14.17	+	+	
9	12.14	+	+	
10	18.86	++	++	
11	11.22	+	+	
12	21.66	+	+	
13	12.12	++	+	
14	15.11	+	+	

ลำดับที่	S/Co	TPPA อ่านผล โดยผู้ปฏิบัติงาน	TPPA อ่านผล โดยซอฟต์แวร์	ภาพปฏิกิริยา
15	12.84	++	++	
16	18.27	++	++	
17	13.34	++	++	
18	17.28	++	++	
19	14.16	+	+	
20	20.84	++	++	
21	22.92	++	+	
22	16.03	+	+	
23	14.96	+	+	
24	12.61	+	+/-	
25	13.09	+	+	

ลำดับที่	S/Co	TPPA อ่านผล โดยผู้ปฏิบัติงาน	TPPA อ่านผล โดยซอฟต์แวร์	ภาพปฏิกิริยา
26	12.24	+	+	
27	15.11	+	+	
28	13.09	++	++	
29	10.31	+	+	
30	16.54	++	++	
31	21.42	++	++	
32	14.89	+	+	
33	8.36	+	+	
34	7.76	++	++	
35	20.55	++	+	
36	<1.00	-	-	

ลำดับที่	S/Co	TPPA อ่านผล โดยผู้ปฏิบัติงาน	TPPA อ่านผล โดยซอฟต์แวร์	ภาพปฏิกิริยา
37	<1.00	-	-	
38	<1.00	-	-	
39	<1.00	-	-	
40	<1.00	-	-	
41	<1.00	-	-	
42	<1.00	-	-	
43	<1.00	-	-	
44	<1.00	-	-	
45	<1.00	-	-	
46	<1.00	-	-	
47	<1.00	-	-	

ลำดับที่	S/Co	TPPA อ่านผล โดยผู้ปฏิบัติงาน	TPPA อ่านผล โดยซอฟต์แวร์	ภาพปฏิกิริยา
48	<1.00	-	-	
49	<1.00	-	-	
50	<1.00	-	-	
51	<1.00	-	-	
52	<1.00	-	-	
53	<1.00	-	-	
54	<1.00	-	-	
55	<1.00	-	-	
56	<1.00	-	-	
57	<1.00	-	-	
58	<1.00	-	-	

ลำดับที่	S/Co	TPPA อ่านผล โดยผู้ปฏิบัติงาน	TPPA อ่านผล โดยซอฟต์แวร์	ภาพปฏิกิริยา
59	<1.00	-	-	
60	<1.00	-	-	
61	<1.00	-	-	
62	<1.00	-	-	
63	<1.00	-	-	
64	<1.00	-	-	
65	<1.00	-	-	

หมายเหตุ : S/Co หมายถึง สัดส่วนระหว่างสัญญาณจากตัวอย่าง (S) กับค่า Cutoff (Co)

(-) หมายถึง nonreactive

(+/-) หมายถึง inconclusive

(+) และ (++) หมายถึง reactive

ตัวอย่างทั้งหมด 65 ตัวอย่าง เมื่อทำการอ่านผลและแปลผลโดยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ และซอฟต์แวร์ พบว่าให้ผล reactive เท่ากับ 34 ตัวอย่าง แบ่งเป็นระดับ (+) จำนวน 19 ตัวอย่าง และระดับ (++) จำนวน 15 ตัวอย่าง ให้ผล inconclusive (+/-) เท่ากับ 1 ตัวอย่าง และให้ผล nonreactive (-) เท่ากับ 30 ตัวอย่าง ในขณะที่เมื่อทำการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยเจ้าหน้าที่ ผู้ปฏิบัติงาน พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผล reactive เท่ากับ 35 ตัวอย่าง แบ่งเป็นระดับ (+) จำนวน 16 ตัวอย่าง และระดับ (++) จำนวน 19 ตัวอย่าง ให้ผล nonreactive (-) เท่ากับ 30 ตัวอย่าง และไม่พบผล inconclusive (+/-) ตารางที่ 3 แสดงผลของการอ่านปฏิกิริยาของวิธี TPPA ด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยเจ้าหน้าที่ ผู้ปฏิบัติงาน จากการเปรียบเทียบการอ่านผลปฏิกิริยาของทั้งสองวิธี พบว่าให้ผลตรงกัน 60 ราย (92.31%) และไม่ตรงกัน 5 ราย (7.69%) ซึ่งจำแนกได้เป็นจำนวน 1 ราย ที่เครื่องบันทึกภาพต้นแบบ และซอฟต์แวร์อ่านผลได้ inconclusive (+/-) ในขณะที่ผู้ปฏิบัติงานอ่านผลได้ reactive (+) และจำนวน 4 ราย ที่เครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์อ่านผลได้ reactive (+) ในขณะที่ผู้ปฏิบัติงานอ่านผลได้ reactive (++) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลระดับความสอดคล้องของทั้งสองวิธีด้วยสถิติ Kappa พบว่ามีค่า Kappa = 0.88 แสดงว่าการอ่านปฏิกิริยาของวิธี TPPA ด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ มีความสอดคล้องในระดับดีมากกับการอ่านผลด้วยตาเปล่า

อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเฉพาะการอ่านผล reactive โดยมีได้คำนึงถึงระดับปฏิกิริยา ทั้งสองวิธีจะให้ผลปฏิกิริยาตรงกัน 64 ราย (98.46%) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลระดับความสอดคล้องของ ทั้งสองวิธีด้วยสถิติ Kappa พบว่ามีค่า Kappa = 0.98 แสดงว่าการอ่านปฏิกิริยาของวิธี TPPA ด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ มีความสอดคล้องกันในระดับดีมากกับการอ่านผลด้วยตาเปล่า

รายละเอียดผลปฏิกิริยาของวิธี TPPA ที่ใช้ในการตรวจซีฟิลิส ซึ่งถูกอ่านและแปลผลด้วย เครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ เปรียบเทียบกับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยเจ้าหน้าที่ ผู้ปฏิบัติงาน (N=65)

ตารางที่ 4 ผลสรุปการตรวจซีฟิลิสในตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธี TPPA ซึ่งทำการอ่านผลและแปลผลด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ เปรียบเทียบกับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยผู้ปฏิบัติงาน

เทคนิคที่ใช้อ่านผลการทดสอบวิธี TPPA		ผู้ปฏิบัติงาน				รวม (ตัวอย่าง)
เครื่อง	ระดับปฏิกิริยา	-	+/-	+	++	
บันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์	-	30	0	0	0	30
	+/-	0	0	1	0	1
	+	0	0	15	4	19
	++	0	0	0	15	15
รวม		30	0	16	19	65

หมายเหตุ : (-) หมายถึง nonreactive

(+/-) หมายถึง inconclusive

(+) และ (++) หมายถึง reactive

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

เนื่องจากโรคซิฟิลิสโรคติดต่อที่สามารถติดต่อผ่านการรับโลหิตและผลิตภัณฑ์ของโลหิต ดังนั้นงานธนาคารเลือดจึงมีความจำเป็นที่ต้องทำการตรวจคัดกรองซิฟิลิสในโลหิตของผู้บริจาคโลหิตทุกราย โดยอาศัยการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา ซึ่งเป็นการตรวจหาภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย มีการตรวจคัดกรองโรคซิฟิลิสในโลหิตของผู้บริจาคทุกราย ด้วยวิธี CMIA และหากมีผลเป็นบวก ต้องทำการตรวจซ้ำด้วยเทคนิค TPPA ตามแนวทางการปฏิบัติในการตรวจการติดเชื้อซิฟิลิสในโลหิตบริจาค โดยคณะกรรมการวิชาการ ในคณะกรรมการจัดหาและส่งเสริมผู้ให้โลหิตแห่งสภากาชาดไทย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย⁽⁸⁾

วิธี TPPA เป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาในการตรวจค่อนข้างนาน และต้องอาศัยทักษะของผู้ปฏิบัติงานสูงในการอ่านผล ในกรณีที่มีจำนวนสิ่งส่งตรวจในปริมาณมาก ประกอบกับเวลาในการปฏิบัติงานที่จำกัด อาจทำให้ผู้ปฏิบัติการเกิดความผิดพลาดในการอ่านผลได้ ตลอดจนการทดสอบดังกล่าวต้องอ่านผลปฏิกิริยาด้วยสายตา จึงอาจทำให้เกิดความแตกต่างในการแปลผลการทดสอบเมื่อใช้ผู้ปฏิบัติงานหลายคน นอกจากนี้บางสิ่งส่งตรวจอาจมีผลการทดสอบที่คาบเกี่ยว ในการตัดสินผลบวกหรือผลลบ หากไม่มีความชำนาญมากเพียงพอ ซึ่งส่งผลให้การรายงานผลคลาดเคลื่อนได้ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงเป็นที่มาของการศึกษาค้นคว้า ในการสร้างเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ ที่สามารถบันทึกภาพผลการทดสอบโรคซิฟิลิสด้วยวิธี TPPA รวมไปถึงอ่านผลและแปลผลการทดสอบได้อย่างถูกต้องและมีความสะดวกในการใช้งาน

การสร้างเครื่องบันทึกภาพต้นแบบถูกออกแบบขึ้นมา โดยอาศัยกล้องเว็บแคมทำงานร่วมกับแกนเลื่อนระนาบ X และ Y เพื่อให้กล้องเคลื่อนที่ไปถ่ายภาพ ณ แต่ละหลุมได้อย่างแม่นยำ โดยถ่ายหนึ่งภาพต่อหนึ่งหลุมปฏิกิริยา ทำให้ได้ภาพที่มีความละเอียดคมชัดเพื่อนำไปประมวลผลต่อไป อย่างไรก็ตามหากทำการสร้างเครื่องบันทึกภาพต้นแบบที่สามารถถ่ายภาพได้คมชัดทุกหลุม จากการถ่ายภาพเพียงหนึ่งครั้ง จำเป็นต้องอาศัยเลนส์ที่มีขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 8 มิลลิเมตร ประกอบกับต้องอาศัยขาตั้งปรับระยะความสูง และการจัดระยะห่างระหว่างกล้องกับตำแหน่งที่จะถ่ายภาพให้มีระยะห่างกันประมาณ 1 เมตร ซึ่งระยะดังกล่าวไม่เหมาะสมที่จะใช้กับเครื่องต้นแบบถ่ายภาพแบบ เนื่องจากต้องการพื้นที่มาก และต้องใช้กล้องโครงภายนอกที่มีขนาดใหญ่มาก นอกจากนี้แม้ระยะห่างระหว่างกล้องกับตำแหน่งที่จะถ่ายภาพ จะสามารถถ่ายภาพได้ทั้งเพลทจากการถ่ายภาพเพียงหนึ่งครั้ง แต่คุณภาพความละเอียดของภาพที่บันทึกได้พบว่าลดลงตามระยะห่างของกล้องกับเพลท และยัง

พบว่าภาพที่บันทึกได้สามารถเห็นปฏิกิริยาชัดเจนเฉพาะหลุมที่อยู่บริเวณกลางเพลท ในขณะที่หลุมอื่นๆ ที่อยู่บริเวณถัดไปเริ่มมีการเอียงของภาพ ซึ่งทำให้มองเห็นปฏิกิริยาเพียงบางส่วน และไม่สามารถนำภาพที่ถ่ายมาทำการวิเคราะห์ต่อได้ การศึกษานำร่องที่ผ่านมา ได้ทดลองนำกล้อง CCD มาใช้ในการถ่ายภาพเนื่องจากกล้องชนิดดังกล่าวสามารถเปลี่ยนเลนส์ได้ อย่างไรก็ตามการใช้กล้องชนิดดังกล่าวจำเป็นต้องมีการเขียนโปรแกรมเพิ่มเติมเพื่อให้คอมพิวเตอร์เชื่อมต่อกับกล้อง การศึกษาที่ผ่านมามีการใช้กล้อง CCD และเทคนิคประมวลผลภาพดิจิทัลในการพัฒนาระบบวัดความไวของแบบที่เรียต่อสารต้านจุลชีพโดยเทคนิค Disc Diffusion พบว่ามีประสิทธิภาพในการวัดขอบเขตการยับยั้งของสารต้านจุลชีพเป็นอย่างดี⁽⁸¹⁾

การออกแบบกล่องโครงภายนอก เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญในการสร้างเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ เพื่อให้สามารถจัดไฟและควบคุมแสงได้ ซึ่งเปรียบเสมือนการสร้างสตูดิโอบันทึกภาพ เนื่องจากหากไม่สามารถควบคุมแสงจากภายนอกได้ อาจมีผลต่อการบันทึกภาพ ทำให้ความสว่างและความคมชัดของภาพที่บันทึกไว้ไม่เหมือนเดิมทุกครั้ง การเลือกกล่องที่ทำจากวัสดุต่างๆ และสีของผนังกล่อง จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้กล่องพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีนที่มีพื้นสีขาว ซึ่งมีน้ำหนักเบา ทำให้เคลื่อนย้ายได้ง่าย พื้นผิววัสดุไม่สะท้อนแสงทำให้ได้ภาพที่คมชัด ไม่มีการส่งผลกระทบต่อภาพถ่าย หรือทำให้สีของภาพผิดเพี้ยนไปจากความเป็นจริง หากเลือกกล่องที่มีพื้นเป็นสี เช่น สีชมพู อาจพบว่าภาพที่ได้ภายหลังจากการบันทึกภาพ จะมีลักษณะเป็นสีชมพูเจืออยู่ในภาพโดยเฉพาะบริเวณที่เป็นเพลท ทำให้พบอุปสรรคในการเขียนโค้ดเพื่อคัดเลือกสี นอกเหนือจากสีของเม็ดเจลาตินที่ถูกดูมาแล้ว ยังติดภาพสะท้อนสีชมพูบริเวณอื่นๆ ด้วย การศึกษาที่ผ่านมา มีการศึกษาการเคลื่อนที่ของลูกปลาโดยการสร้างกล่องทึบ ผนังภายในเป็นสีดำและมีถาดซึ่งทำมาจากพลาสติกใสเพื่อใช้วางเพลทตัวอย่าง ซึ่งใช้ในการบันทึกพฤติกรรมของลูกปลาที่ว่ายอยู่ในแต่ละหลุมของเพลทชนิด 48 หลุม เมื่อเปิดเพลงอะคูสติก พบว่ากล่องต้นแบบสามารถใช้เพื่อวัดพฤติกรรมลูกปลาในหลายหลุมพร้อมกันได้ หลังได้รับสิ่งกระตุ้นทางเสียงหรือการสัมผัสที่อ่อน ซอฟต์แวร์สามารถทำการวิเคราะห์ภาพยนตร์เชิงพฤติกรรมโดยอัตโนมัติด้วยโปรแกรม MATLAB ซึ่งถือว่าเป็นแพลตฟอร์มที่ยืดหยุ่นและง่ายสำหรับการทดลองพฤติกรรมของลูกปลา⁽⁸²⁾

แหล่งกำเนิดแสงที่เลือกใช้ภายในเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ ได้แก่ หลอด LED ขนาดเล็กจำนวน 4 หลอด ซึ่งให้แสงสว่างมากแต่ใช้กระแสไฟฟ้าน้อย หลอด LED ได้ถูกจัดวางในตำแหน่งต่างๆ ภายในกล่องเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ ก่อนทำการทดลองถ่ายภาพเพื่อหาตำแหน่งของแสงที่ให้ภาพชัดเจนที่สุด โดยไม่เกิดลักษณะเส้นขวางในภาพที่ถูกบันทึกมา การศึกษานำร่องก่อนหน้า ได้ทดสอบนำหลอดฟลูออเรสเซนต์แบบตะเกียบ กระแสไฟกระแสตรง 220 โวลต์ 12 วัตต์ แต่ภายหลังจากบันทึกภาพพบว่า ภาพที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นขวาง เนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ไม่ได้เป็นแสงไฟ

ต่อเนื่องอย่างที่ยาสายตามองเห็น เมื่อกล้องบันทึกภาพช่วงที่หลอดไฟกระพริบ จะทำให้เกิดภาพเป็นคลื่น จึงไม่เหมาะสมนำมาใช้กับเครื่องบันทึกภาพต้นแบบในครั้งนี้ การศึกษาที่ผ่านมามีการใช้หลอด LED เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อพัฒนาเครื่องตรวจหารอยร้าวของไข่ภายใต้ระบบสัญญาณด้วยเทคนิคการประมวลผลภาพ ซึ่งพบว่าให้แสงสว่างที่เพียงพอ ส่งผลให้สามารถตรวจหารอยร้าวของไข่ได้ถูกต้องถึง 86.25 %⁽⁸³⁾

การสร้างแกนเลื่อนเพื่อถ่ายภาพแบบอัตโนมัติ จำเป็นต้องใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์ในการควบคุมสแต็ปมอเตอร์ ในการศึกษานี้เลือกใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์รุ่น Arduino Uno ซึ่งเป็นไมโครคอนโทรลเลอร์บอร์ดแบบสำเร็จรูปในยุคปัจจุบัน มีข้อดีคือมีจำหน่ายอยู่ทั่วไป จัดหาได้ง่าย ไม่จำกัดแหล่งที่มา จึงสามารถนำไปใช้พัฒนาต่อยอดเป็นอุปกรณ์ต่างๆได้ง่าย การศึกษาที่ผ่านมามีการนำไมโครคอนโทรลเลอร์รุ่น Arduino Uno ไปใช้ในการพัฒนาโมบายแอปพลิเคชัน สำหรับควบคุมเครื่องให้อาหารสัตว์เลี้ยงด้วยการประยุกต์ใช้บอร์ดไมโครคอนโทรลเลอร์รุ่นเดียวกับการศึกษานี้ และเซ็นเซอร์ราคา ประหยัด มีฟังก์ชันตรวจสอบอุณหภูมิและความชื้น ฟังก์ชันการทำงานของกล้องเว็บแคม และฟังก์ชันการทำงานของโมบายแอปพลิเคชันเชื่อมต่ออินเทอร์เน็ต พบว่าสามารถควบคุมการทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽⁸⁴⁾ การควบคุมการทำงานของไมโครคอนโทรลเลอร์ในครั้งนี้ อาศัยการเขียนโค้ดด้วยภาษา C# ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถควบคุมได้ทั้งฮาร์ดแวร์และประมวลผลภาพดิจิทัลในขณะเดียวกัน ข้อดีของการใช้ภาษา C# ในการพัฒนาซอฟต์แวร์สำหรับการศึกษานี้ ได้แก่ สามารถรวมและทดสอบโปรแกรมที่เขียนขึ้นได้ทันที ซึ่งช่วยอำนวยความสะดวกแก่ผู้เขียนโปรแกรม ให้สามารถเขียนโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้อย่างง่ายดาย รวดเร็ว และสามารถแก้ไขข้อผิดพลาดในการเขียนโปรแกรมได้ง่าย โดยใช้เครื่องมือในการเขียนโปรแกรม คือ Microsoft Visual Studio นอกจากนี้ภาษา C# ซึ่งถูกพัฒนามาจากบริษัทไมโครซอฟต์ จำกัด มีการใช้อย่างแพร่หลาย ทำให้สามารถค้นคว้าและแลกเปลี่ยนองค์ความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือระหว่างนักพัฒนาซอฟต์แวร์ได้ง่าย⁽⁸⁵⁾ การศึกษาที่ผ่านมามีการใช้ภาษา C# ร่วมกับอุปกรณ์อื่นเพื่อการศึกษาวิจัย เช่น พัฒนาเครื่องคัดแยกเกรดปลาหมึกสำหรับกลุ่มชาวประมงลุ่มน้ำชายฝั่งทะเลโดยใช้เทคนิคการประมวลผลภาพ (คัดแยกเกรดปลาหมึกสำหรับกลุ่มชาวประมงลุ่มน้ำชายฝั่งทะเล) การพัฒนาระบบตรวจจับท่าทางผู้ใช้งาน เพื่อควบคุมแผงกันแดดอัตโนมัติและปริมาณแสงสว่างภายในพื้นที่ปิดของอาคารสาธารณะ โดยใช้ภาษา C# ร่วมกับไมโครคอนโทรลเลอร์รุ่น Arduino Uno และเลือกใช้กล้อง HD Web camera ที่มีความคมชัดตั้งแต่ 720p ในการบันทึกข้อมูล⁽⁸⁶⁾

โค้ดคำสั่งสำหรับซอฟต์แวร์ ที่ประกอบไปด้วยชุดคำสั่งฟังก์ชันการรับค่าจากกล้อง ฟังก์ชันการเชื่อมต่อกับ Arduino ฟังก์ชันถ่ายภาพ ฟังก์ชัน Crop ภาพ ฟังก์ชันการเลือกค่าสีที่ต้องการในมาตรฐานสี HSL และฟังก์ชันการแปลงผลรูปภาพให้เป็นภาพเดี่ยว สามารถนำผลการบันทึกภาพมาประมวลและแปลเป็นผลการทดสอบได้ โดยจำแนกการเกาะกลุ่มของเม็ดเจลาตินที่เกิดจากปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกและลบ จากความยาวของรัศมีของวงกลมการเกาะกลุ่ม ซึ่งวงกลมการเกาะกลุ่มเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเม็ดเจลาตินเคลือบด้วยแอนติเจนของเชื้อ *T. pallidum* กับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนดังกล่าว ใช้ได้ทั้งซีรัมและพลาสมา ทั้งนี้การเกาะกลุ่มของเม็ดเจลาตินในปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก มีรัศมีของวงกลมที่ยาวกว่าการเกาะกลุ่มของเม็ดเจลาตินในปฏิกิริยาที่ให้ผลลบ เนื่องจากเม็ดเจลาตินมีการเกาะกลุ่มในลักษณะแผ่กระจาย ตรงข้ามกับปฏิกิริยาที่ให้ผลลบซึ่งเม็ดเจลาตินไม่เกิดการเกาะกลุ่ม ทำให้ตกเป็นเม็ดกระดุมกึ่งที่ก้นหลุมเป็นวงกลมขนาดเล็ก⁽⁸⁷⁾

ข้อควรระวังประการหนึ่งในการอ่านปฏิกิริยาด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์คือ ไม่ควรการอ่านผลก่อนกำหนดที่เวลา เนื่องจากเอกสารกำกับน้ำยาระบุว่า ให้ตั้งเพลททิ้งไว้เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงอ่านผลทันที การถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและอ่านผลก่อนกำหนดด้วยซอฟต์แวร์ที่เพียงเวลา 30 นาทีภายหลังทำปฏิกิริยา พบว่าเม็ดเจลาตินยังไม่ทำปฏิกิริยาจับกลุ่มโดยสมบูรณ์ ทำให้ทุกๆ หลุมเป็นวงกลมขนาดใหญ่ ภาพที่บันทึกได้จึงเป็นภาพที่มีพื้นที่ขนาดพิกเซลกว้างกว่าการตั้งเพลทไว้ระยะเวลา 2 ชั่วโมงซึ่งเป็นระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมตามเอกสารกำกับน้ำยา ส่งผลให้เกิดการแปลผลเป็นบวกปลอมได้ นอกจากนี้ก่อนการเริ่มใช้เครื่อง ควรทำการ Calibrate เครื่องโดยการเลื่อนกล้องให้อยู่ในตำแหน่ง Home และสังเกตว่าภาพปฏิกิริยาที่แสดงในจอคอมพิวเตอร์อยู่บริเวณกึ่งกลางของกรอบสี่เหลี่ยมของโปรแกรมหรือไม่ เพื่อการอ่านผลที่ถูกต้องแม่นยำของซอฟต์แวร์

ภายหลังการอ่านผลและแปลผลโดยเครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ เปรียบเทียบกับการอ่านด้วยตาเปล่าโดยผู้ปฏิบัติงาน ทั้งสองวิธีจะให้ผลปฏิกิริยาตรงกันในแต่ละระดับปฏิกิริยาจำนวน 60 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 65 ตัวอย่าง โดยปฏิกิริยาที่เป็น nonreactive ให้ผลสอดคล้องกันทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ปฏิกิริยาที่เป็น reactive หรือ inconclusive ให้ผลสอดคล้องกันทั้งหมด 30 ตัวอย่าง และมีจำนวน 5 ตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้อง ได้แก่ ตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่าง ที่เครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์อ่านผลได้ inconclusive (+/-) ในขณะที่ผู้ปฏิบัติงานอ่านผลได้ reactive (+) และตัวอย่างจำนวน 4 ตัวอย่าง ที่เครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์อ่านผลได้ reactive (+) ในขณะที่ผู้ปฏิบัติงานอ่านผลได้ reactive (++) การอ่านผลปฏิกิริยา TPPA ด้วยตาเปล่า อาจเกิดผลบวกปลอมได้ในกรณีตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ Human immunodeficiency virus เชื้อ *Toxoplasma* เชื้อ *Helicobacter pylori* หรือยาเสพติดบางบางประเภท ในขณะที่อาจเกิดผล

ลบลอมนได้ในกรณีที่ตั้งเพลทไว์โดยไม่ปิดฝา ส่งผลให้ฝุ่นหรืออนุภาคต่างๆ ตกลงไปในห้องปฏิบัติการ หรือวางเพลทในบริเวณพื้นที่ที่มีแรงสนามสูง ทั้งสองกรณีนี้อาจทำให้การเกาะกลุ่มแยกออกจากกัน หรือไม่ได้ทำการผสมระหว่างตัวอย่างกับน้ำยาให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเพลท ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่สมบูรณ์⁽⁸⁷⁾

จากการวิเคราะห์ข้อมูลการอ่านผลปฏิกิริยา TPPA เปรียบเทียบระหว่างซอฟต์แวร์และผู้ปฏิบัติงาน แสดงให้เห็นว่าซอฟต์แวร์มีแนวโน้มแปลผลปฏิกิริยาได้ต่ำกว่าผู้ปฏิบัติงาน 1 ระดับ โดยเป็นที่น่าสังเกตว่าปฏิกิริยาในห้องใดที่ขอบของปฏิกิริยาไม่เรียบคมชัดเจเน จะทำให้การบันทึกภาพไม่เป็นลักษณะวงกลมเนื่องจากพื้นที่บางส่วนหายไป ซอฟต์แวร์จึงอาจคำนวณจำนวนพิกเซลได้ต่ำกว่าความเป็นจริงและเป็นที่มาของการแปลผลได้ระดับของปฏิกิริยาที่ต่ำกว่าที่ผู้ปฏิบัติงานอ่านได้ 1 ระดับ อย่างไรก็ตามในอนาคต ควรมีการศึกษาพัฒนาเขียนโค้ดในการวิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว เช่น โค้ดที่ใช้ในการพยากรณ์รูปร่างวงกลม หรือพัฒนาโค้ดในรูปแบบของปัญญาประดิษฐ์ (artificial intelligence: AI) เพื่อให้ซอฟต์แวร์สามารถคิด วิเคราะห์ ประมวลผลได้ละเอียดและซับซ้อนมากยิ่งขึ้น ซึ่งอาจทำให้การอ่านปฏิกิริยามีความถูกต้องใกล้เคียงมากที่สุดกับการอ่านด้วยตาเปล่าและแปลผลการทดสอบโดยผู้ปฏิบัติงาน

อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเฉพาะการอ่านผล reactive โดยมิได้คำนึงถึงระดับปฏิกิริยา ทั้งสองวิธีจะอ่านให้ผลปฏิกิริยาตรงกัน 64 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 65 ตัวอย่าง ผลการทดสอบ reactive หมายถึงผู้ป่วยรายนั้นกำลังเป็นหรือเคยเป็นโรคซิฟิลิส โดยที่ระดับปฏิกิริยา (+) (++) มิได้มีนัยยะแตกต่างกันทางการแปลผลทางคลินิก กล่าวคือ แม้ผู้ป่วยมีผลการทดสอบเป็น reactive (+) หรือ (++) จะมีความรุนแรงของโรค และได้รับแนวทางในการรักษาไม่แตกต่างกัน⁽⁸⁾ ในขณะที่ผลการทดสอบ inconclusive หมายถึง ไม่สามารถสรุปผลผลการตรวจได้ ซึ่งหากทดสอบได้ผลลักษณะดังกล่าว ควรทำการทดสอบใหม่ หรือเจาะเลือดทดสอบอีกครั้งหลังผ่านไป 2 สัปดาห์ หากผลยังคงเป็น inconclusive ควรทำการตรวจติดตามเพิ่มเติมและตรวจยืนยันด้วยเทคนิคอื่น เช่น FTA-ABS⁽⁸⁷⁾ อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต โดยเพิ่มตัวอย่างที่มีผลเป็น inconclusive ให้มีจำนวนมากขึ้น เพื่อปรับแต่งค่าซอฟต์แวร์ให้มีความแม่นยำสำหรับการอ่านผลตัวอย่างของกลุ่มดังกล่าว

ในการศึกษาครั้งนี้ เครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ที่ถูกพัฒนาขึ้น ได้ใช้ในการทดสอบกับเพลทเพียงยี่ห้อเดียว ดังนั้นในกรณีที่ต้องการผลิตเชิงอุตสาหกรรมในอนาคต จำเป็นต้องมีการทดสอบกับเพลทต่างบริษัทที่มีความหลากหลายมากขึ้น ทดสอบการผลิตซ้ำ ทดสอบการ calibrate เครื่องและปรับแต่งซอฟต์แวร์ใหม่ก่อนนำไปใช้ รวมไปถึงการทดสอบการทำงานของกลไกและซอฟต์แวร์เป็นระยะเวลา (Endurance test) เพื่อทดสอบด้านประสิทธิภาพและอายุการใช้งาน

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

เครื่องบันทึกภาพต้นแบบที่พัฒนาขึ้นการศึกษาครั้งนี้ ประกอบด้วยชิ้นส่วนหลักได้แก่ สเต็ป มอเตอร์ เครื่องเล่นแกนสองมิติ ไมโครคอนโทรลเลอร์ Arduino Uno กล้องเว็บแคม ฐานรอง Adapter 12V DC หลอด LED และสาย USB ในขณะที่ซอฟต์แวร์ที่พัฒนาขึ้น ใช้คำสั่งภาษา C# ในการเขียนโค้ดคำสั่ง โดยกำหนดค่ามาตรฐานสี Hue Lightness Saturation ดังนี้ ค่าโทนสี ค่า Hue S เท่ากับ 300 และค่า Hue F เท่ากับ 0 ค่าความอิ่มสี ค่า Sat S เท่ากับ 0.2 และค่า Sat F เท่ากับ 1 ค่าความสว่าง ค่า Light S เท่ากับ 0.1 และค่า Light F เท่ากับ 1 เมื่อนำเครื่องบันทึกภาพต้นแบบ และซอฟต์แวร์ที่พัฒนาขึ้น มาอ่านปฏิกริยา TPPA จำนวนทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน พบว่าให้ผลตรงกันในแต่ละระดับของปฏิกริยาจำนวน 60 ตัวอย่าง และไม่ตรงกันในแต่ละระดับของปฏิกริยาจำนวน 5 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลระดับความสอดคล้องของทั้งสองวิธีด้วยสถิติ Kappa พบว่ามีค่า $Kappa = 0.88$ แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องในระดับดีมาก อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเฉพาะการอ่านผล reactive โดยมีได้คำนึงถึงระดับปฏิกริยา พบว่าทั้งสองวิธีอ่านให้ผลปฏิกริยาตรงกัน 64 ตัวอย่าง และไม่ตรงกันจำนวนเพียง 1 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลระดับความสอดคล้องของทั้งสองวิธีด้วยสถิติ Kappa พบว่ามีค่า $Kappa = 0.98$ แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องในระดับดีมาก

ดังนั้น เครื่องบันทึกภาพต้นแบบและซอฟต์แวร์ที่พัฒนาขึ้นจากเทคนิคการประมวลผลภาพ ดิจิตอลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถอ่านและแปลผลการทดสอบของวิธี TPPA ในการตรวจวินิจฉัยโรคซิฟิลิส ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน โดยใช้วัสดุอุปกรณ์ราคาถูก สามารถนำไปพัฒนาต่อยอด และประยุกต์ใช้ยังห้องปฏิบัติการทั่วไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะช่วยลดความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นจากการอ่านของแต่ละบุคคล และยังใช้เวลาอ่านผลที่รวดเร็ว

บรรณานุกรม

1. แนวทางระดับชาติเรื่องการกำจัดซิฟิลิสแต่กำเนิดในประเทศไทย พ.ศ. 2558. ใน: อังคณา เจริญวัฒนาโชคชัย, วิวัฒน์ โรจนพิทยากร, editors. นนทบุรี: สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2557.
2. Harrison LW. The origin of syphilis. The British journal of venereal diseases. 1959;35(1):1-7.
3. Wright DJ. John Hunter and venereal disease. Annals of the Royal College of Surgeons of England. 1981;63(3):198-202.
4. Wincelhaus SJ. Screening for syphilis. The Lancet. 1999;353(9162):1441.
5. Olansky S, Price INO. The modern diagnosis of syphilis. Bull World Health Organ. 1956;14(2):249-62.
6. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005;16(1):45-51.
7. Adegoke AO, Akanni OE. Survival of Treponema pallidum in banked blood for prevention of Syphilis transmission. N Am J Med Sci. 2011;3(7):329-32.
8. พิมล เชี่ยวศิลป์. แนวทางการปฏิบัติในการตรวจการติดเชื้อซิฟิลิสในโลหิตบริจาค. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2552;4(19):299-308.
9. Dennie CC. A history of syphilis. Springfield, Ill: Charles Thomas; 1962.
10. Oriel JD. The scars of Venus. London: Springer-Verlag; 1994.
11. U.S. Department of Health EaW. Syphilis, a synopsis. Washington D.C: U.S. Government Printing Office; 1968.
12. National Geographic. ซิฟิลิส: กามโรคที่ไม่เคยห่างหายไปจากมนุษย์ 2562 [1 พ.ย. 63]. เข้าถึงได้จาก: <https://ngthai.com/science/21797/syphiliscomingback/>.
13. Schaudinn F, Hoffmann P. Vorlaufiger Bericht uber das Vorkommen von spirochaeten in syphilitischen Krankheit produkten und bei Papilloment. Arb Gesundheitsamt (Berlin) 1094-1905.22:527-34.
14. Wassermann A, Neisser A, Bruck C. Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. Dtsch Med Wochenschr. 1906;32(19):745-6.
15. Nelson RA, Jr., Mayer MM. Immobilization of Treponema pallidum in vitro by

antibody produced in syphilitic infection. The Journal of experimental medicine. 1949;89(4):369-93.

16. Hunter EF, Deacon WE, Meyer PE. AN IMPROVED FTA TEST FOR SYPHILIS, THE ABSORPTION PROCEDURE (FTA-ABS). Public Health Rep. 1964;79(5):410-2.

17. Castro R, Prieto ES, Santo I, Azevedo J, Exposto Fda L. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against Treponema pallidum. Journal of clinical microbiology. 2003;41(1):250-3.

18. Daniels KC, Ferneyhough HS. Specific direct fluorescent antibody detection of Treponema pallidum. Health laboratory science. 1977;14(3):164-71.

19. Young H, Henrichsen C, Robertson DH. Treponema pallidum haemagglutination test as a screening procedure for the diagnosis of syphilis. The British journal of venereal diseases. 1974;50(5):341-6.

20. Lee JH, Lim CS, Lee MG, Kim HS. Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Treponemal Antibody Test Comparing the Treponema Pallidum Particle Agglutination Assay. Journal of clinical laboratory analysis. 2015;29(5):383-6.

21. Chaiwong K. Evaluation of test kits for syphilis screening in blood donors [Thesis]. Bangkok: Mahidol University; 2005.

22. อรุณรัฐ รมพฤกษ์, ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ. ซิฟิลิสกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2548;15(3):173-83.

23. Peeling RW, Mabey D, Kamb ML, Chen XS, Radolf JD, Benzaken AS. Syphilis. Nature reviews Disease primers. 2017;3:17073.

24. Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted disease. Washington: CDC; 2017.

25. World Health Organization. Elimination of Mother-to-Child Transmission of HIV and Syphilis. Geneva: World Health Organization; 2017.

26. Kaur G, Kaur P. Syphilis testing in blood donors: an update. Blood Transfus. 2015;13(2):197-204.

27. ลาวัณย์ สันติชินกุล. โรคซิฟิลิสและแนวทางการรักษา 2562 [1 พ.ย. 63]. เข้าถึงได้จาก: <https://webcache.googleusercontent.com>.

28. Howles JK. A Synopsis of Clinical Syphilis. St. Louis: The C.V. Mosby; 1943.

29. World Health Organization. WHO guidelines for the treatment of treponema

pallidum (syphilis). Geneva: World Health Organization; 2016.

30. Rowley J, Vander Hoorn S, Korenromp E, Low N, Unemo M, Abu-Raddad LJ, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ.* 2019;97(8):548-62P.

31. Kojima N, Klausner JD. An Update on the Global Epidemiology of Syphilis. *Current epidemiology reports.* 2018;5(1):24-38.

32. Bowen V, Pagaoa M, Braxton J, Picchetti V, Davis D, Presley R, et al. Sexually transmitted disease surveillance 2018. Georgia: Centers for Disease Control and Prevention; 2019.

33. World Health Organization. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections. Geneva: World Health Organization; 2011.

34. Todd J, Munguti K, Grosskurth H, Mngara J, Changalucha J, Mayaud P, et al. Risk factors for active syphilis and TPHA seroconversion in a rural African population. *Sexually transmitted infections.* 2001;77(1):37-45.

35. อภิษฎา รัศมี, จุไรรัตน์ รัตนเลิศนาวิ, ศาริณี เรียวแรง. ความชุกและปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อเอชไอวีและซิฟิลิสในแรงงานข้ามชาติในอำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา. *วารสารควบคุมโรค.* 2563;45(1):75-84.

36. วรางคณา มั่นสกุล. การติดเชื้อซิฟิลิสและเอชไอวี. *วชิรเวชสารและวารสารเวชศาสตร์เขตเมือง.* 2559;60(2):147-58.

37. ฐิติพงษ์ ยิ่งยง. ซิฟิลิสโรคร้ายกลับมาระบาด. *จับตาโรคร้ายและภัยสุขภาพ.* 2562;6(6):1-4.

38. Mohamed B, Gibreel M, Badaneen M. Prevalence of transfusion-transmissible infections among blood donors in Port Sudan. 2019;44(1):72-6.

39. Quintas E, Adc C, Dias C, Sebastiao A, Van-Dúnem J, Pereira A, et al. Trends in Human Immunodeficiency Virus Type 1 / 2 Prevalence among Young Adult Blood Donors, from 2011 to 2016, Attending a Private Clinic in Angola. . *Retrospective Study of Prevalence.* 2018;205(1):1-6.

40. Sarkodie F, Owusu-Dabo E, Hassall O, Bates I, Bygbjerg IC, Ullum H. Recall of symptoms and treatment of syphilis and yaws by healthy blood donors screening positive for syphilis in Kumasi, Ghana. *International Journal of Infectious Diseases.* 2016;50:72-4.

41. Slot E, Janssen MP, Marijt-van der Kreek T, Zaaijer HL, van de Laar TJ. Two

- decades of risk factors and transfusion-transmissible infections in Dutch blood donors. *Transfusion*. 2016;56(1):203-14.
42. da Silva LS, Santos DV, Brietzke CB, Jacociunas LV. Prevalence of hiv infection, Syphilis, and Syphilis/HIV coinfection in blood donors from a blood bank of Porto Alegre, southern Brazil. *Clinical & Biomedical Research*. 2017;37(4):275-80.
43. López-Balderas N, Hernández-Romano J, Cámara-Contreras M, Bravo-Sarmiento E, Hernández-Romano PA. Trends in prevalence of HIV and syphilis in a central blood bank of Veracruz, Mexico. *Transfusion and Apheresis Science*. 2019;58(1):94-9.
44. Prajapati D, Parmar BHJJoP, Oncology. Syphilis in blood donors: Pre-transfusion serological screening by Rapid Plasma Reagin (RPR) Test at the blood bank of a Teaching Medical Institute in North Gujarat, India. 2018;5:18-24.
45. Liu S, Luo L, Xi G, Wan L, Zhong L, Chen X, et al. Seroprevalence and risk factors on Syphilis among blood donors in Chengdu, China, from 2005 to 2017. *BMC Infectious Diseases*. 2019;19(1):509.
46. เครื่องัน สวแดง, ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ. ความชุกของการติดเชื้อไวรัสเอชไอวีไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี และซิฟิลิส ในผู้บริจาคโลหิต: การเฝ้าระวังเพื่อพัฒนาการคัดกรองผู้บริจาคโลหิต. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต*. 2555;22(2):83-91.
47. สายทอง วงศ์คำ. อัตราการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี และเชื้อซิฟิลิส ในเลือดบริจาคของโรงพยาบาลหัวหิน. *เสียงรายเวชสาร*. 2560;9(2):105-13.
48. Grimprel E, Sanchez PJ, Wendel GD, Burstain JM, McCracken GH, Jr., Radolf JD, et al. Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect *Treponema pallidum* in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. *Journal of clinical microbiology*. 1991;29(8):1711-8.
49. Romanowski B, Forsey E, Prasad E, Lukehart S, Tam M, Hook EW. Detection of *Treponema pallidum* by a fluorescent monoclonal antibody test. *Sex Transm Dis*. 1987;14(3):156-9.
50. Hunter EF. Direct fluorescent antibody tissue TES for *treponema pallidum* (DFAT-TP). In: Larsen SA HE, Kraus SJ, editor. *A manual of tests for syphilis*. 8 th ed. Washington, D.C: American Public Health Association; 1990. p. 69-75.
51. Hunter EF, Greer PW, Swisher BL, Simons AR, Farshy CE, Crawford JA, et al. Immunofluorescent staining of *Treponema* in tissues fixed with formalin. *Archives of*

pathology & laboratory medicine. 1984;108(11):878-80.

52. Ito F, Hunter EF, George RW, Pope V, Larsen SA. Specific immunofluorescent staining of pathogenic treponemes with a monoclonal antibody. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(4):831-8.

53. Ito F, Hunter EF, George RW, Swisher BL, Larsen SA. Specific immunofluorescence staining of *Treponema pallidum* in smears and tissues. *Journal of clinical microbiology*. 1991;29(3):444-8.

54. Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, Ferry T, Toutous-Trellu L, Cavassini M, et al. Use of *Treponema pallidum* PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(1):127-9.

55. Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, Fennema HS, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(2):497-502.

56. Eagle H. Introduction. *The laboratory diagnosis of syphilis*. St. Louis: The C. V.; 1937. p. 21-8.

57. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clinical microbiology reviews*. 1995;8(1):1-21.

58. Shah D, Marfatia YS. Serological tests for syphilis. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2019;40(2):186-91.

59. Burdash NM, Hinds KK, Finnerty JA, Manos JP. Evaluation of the syphilis Bio-EnzaBead assay for detection of treponemal antibody. *Journal of clinical microbiology*. 1987;25(5):808-11.

60. Farshy CE, Hunter EF, Hesel LO, Larsen SA. Four-step enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Treponema pallidum* antibody. *Journal of clinical microbiology*. 1985;21(3):387-9.

61. Moyer NP, Hudson JD, Hausler WJ, Jr. Evaluation of the Bio-EnzaBead test for syphilis. *Journal of clinical microbiology*. 1987;25(4):619-23.

62. Nayar R, Campos JM. Evaluation of the DCL Syphilis-G Enzyme Immunoassay Test Kit for the Serologic Diagnosis of Syphilis. *American Journal of Clinical Pathology*. 1993;99(3):282-5.

63. Pedersen NS, Orum O, Mouritsen S. Enzyme-linked immunosorbent assay for

detection of antibodies to the venereal disease research laboratory (VDRL) antigen in syphilis. *Journal of clinical microbiology*. 1987;25(9):1711-6.

64. Pope V, Hunter EF, Feeley JC. Evaluation of the microenzyme-linked immunosorbent assay with *Treponema pallidum* antigen. *Journal of clinical microbiology*. 1982;15(4):630-4.

65. Young H, Moyes A, McMillan A, Patterson J. Enzyme immunoassay for anti-treponemal IgG: screening or confirmatory test? *J Clin Pathol*. 1992;45(1):37-41.

66. Lipinsky D, Schreiber L, Kopel V, Shainberg B. Validation of Reverse Sequence Screening for Syphilis. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(4):1501.

67. Kashyap B, Goyal N, Gupta N, Singh NP, Kumar V. Evaluation of *Treponema pallidum* Hemagglutination Assay among Varying Titers of the Venereal Disease Research Laboratory Test. *Indian journal of dermatology*. 2018;63(6):479-83.

68. Rodríguez I, Noda AA, Echevarria E. Considerations on the use and interpretation of *Treponema pallidum* hemagglutination test for diagnosis of syphilis. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2015;36(2):219-20.

69. Morshed MG, Singh AE. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2015;22(2):137-47.

70. Wang HM, Li YY, He LP, Cao YK, Dong TX, Kuang YQ. TPPA titer as a new adaptation for early diagnosis of congenital syphilis: a retrospective analysis of observation over three years in Yunnan, China. *European journal of medical research*. 2019;24(1):7.

71. Yokomori Y, Ohta M, Kimura M, Kurata K, Kubo Y YM. Method of discriminating particle aggregation pattern 1 9 9 2 [2 0 2 0 Nov 1]. เข้าถึงได้จาก : <https://patents.google.com/patent/US5096835>.

72. Sakai K, Yonekawa H. Method of judging particle agglutination pattern: Google Patents; 1993.

73. Yonekawa H, Skoldberg CM. Method for judging particle agglutination patterns using neural networks: Google Patents; 1995.

74. Sundrehagen E, Bremnes D, Gogstad G. Agglutination assays: Google Patents; 2002.

75. Takakura T, Shibuya T. Agglutination image automatic judging method by MT

system, device, program, and recording medium 2012 [2020 Nov 1]. เข้าถึงได้จาก : <https://patents.google.com/patent/EP2172774B1/en>.

76. Purdum JJ. Beginning C for Arduino: learn C programming for the Arduino and compatible microcontrollers. New York: Apress; 2012.

77. Kirillov AA, Turaev D. The universal rotation curve of spiral galaxies. Mon Not R Astron Soc. 2006;371(1):L31-L5.

78. Shah R, Pandey AB. Concept for Automated Sorting Robotic Arm. Procedia Manufacturing. 2018;20:400-5.

79. Zhao H, Feng H. Mathematical modeling of stepping motor and vibration torque mechanism research on its different operations. Journal of Vibroengineering. 2013;15(3):1102-11.

80. Newcombe R. Practical Statistics for Medical Research 1992.

81. เลิศพงษ์ บุญชู. การพัฒนาระบบวัดความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพโดยเทคนิค Disc Diffusion [วิทยานิพนธ์ปริญญาโท]. กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ; 2548.

82. Pantoja C, Hoagland A, Carroll E, Schoppik D, Isacoff EY. Measuring Behavioral Individuality in the Acoustic Startle Behavior in Zebrafish. Bio Protoc. 2017;7(7):e2200.

83. อมรฤทธิ พุทธิพิพัฒนขจร, พัชรภรณ์ พรหมสุรินทร์. การตรวจหารอยรั่วของไข้ภายใต้ระบบสุญญากาศด้วยเทคนิคการประมวลผลภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2560;25(3):508-19.

84. จิรวัดน์ แทนทอง, สุภลักษณ์ ตาแก้ว, กนกลักษณ์ ศรีพระขรรค์ชัย. การพัฒนาโมบายแอปพลิเคชันสำหรับควบคุมเครื่องให้อาหารสัตว์เลี้ยงด้วยการประยุกต์ใช้บอร์ดไมโครคอนโทรลเลอร์และเทคโนโลยีอินเทอร์เน็ตทุกสรรพสิ่ง. JIST. 2562;9(1):28-40.

85. พื้นฐานการพัฒนาโปรแกรมแบบวิชวล 2555 [1 พ.ย. 63]. เข้าถึงได้จาก : <http://kts.ac.th/kts/kanghan/vb/chp4.pdf>.

86. อริสา ตริวิศวะเวทย์. การพัฒนาระบบตรวจจับท่าทางผู้ใช้งาน เพื่อควบคุมแสงกันแดดอัตโนมัติและปริมาณแสงสว่างภายในพื้นที่ปิดของอาคารสาธารณะ [วิทยานิพนธ์สถาปัตยกรรมศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2558.

87. Fujirebio Diagnostics I. SERODIA-TP•PA reagents for the detection of antibodies to Treponema pallidum 2006 [2020 Nov 1]. เข้าถึงได้จาก : http://nedcon.clindia.nl/_files/Brochures/SerodiaTP-PA_KitInsert_101606.pdf.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โค้ดของเครื่องต้นแบบบันทึกภาพและซอฟต์แวร์

```

using System;
using System.Collections.Generic;
using System.ComponentModel;
using System.Data;
using System.Drawing;
using System.Linq;
using System.Text;
using System.Windows.Forms;
using Touchless.Vision.Camera;
using System.Drawing.Imaging;
using System.IO.Ports;
using System.Threading;
using System.Drawing.Drawing2D;
using AForge.Imaging.Filters;
using AForge;
namespace Demo
{
    public partial class MainForm : Form
    {
        double stepx = 2.49;
        double stepy = 2.49;
        public MainForm()
        {
            InitializeComponent();
        }
        private void MainForm_Load(object sender, EventArgs e)
        {
            int i = 0;
            int j = 0;
            if (!DesignMode)

```

```

{
    comboBoxCameras.Items.Clear();

    foreach (Camera cam in CameraService.AvailableCameras)
        comboBoxCameras.Items.Add(cam);

    if( comboBoxCameras.Items.Count > 0 )
        comboBoxCameras.SelectedIndex = 0;
}

for (j = 0; j < 8; j++)
{
    for (i = 0; i < 12; i++)
    {
        var picture = new PictureBox
        {
            Name = "P" + i.ToString() + j.ToString(),
            Size = new Size(48, 48),
            Location = new System.Drawing.Point(390 + 49 * i, 395 - 49 * j),
            Tag = "P" + i.ToString() + "," + j.ToString(),
            BackColor = Color.White,
            BorderStyle = System.Windows.Forms.BorderStyle.FixedSingle,
            BackgroundImageLayout = ImageLayout.Stretch
        };
        this.Controls.Add(picture);
    }
}

i = 0; j = 0;
for (j = 0; j < 8; j++)
{
    Char aaa = 'A';
    var lbl = new Label
    {
        Name = "LL" + i.ToString() + j.ToString(),

```

```

        Location = new System.Drawing.Point(370 , 400 - 49 * j + 10),
        Font = new Font("Times New Roman", 12.0f),
        Tag = "LL" + i.ToString() + "," + j.ToString(),
        Text = ((Char)(aaa+7 -j)).ToString(),
        ForeColor = Color.Black,
        BackColor = Color.Transparent,
        AutoSize = true,
        Visible = true
    };
    this.Controls.Add(lbl);
    lbl.BringToFront();
}
i = 0; j = 0;
for (i = 0; i < 12; i++)
{
    var lbl = new Label
    {
        Name = "LL" + i.ToString() + j.ToString(),
        Location = new System.Drawing.Point(395 + 49 * i + 10, 29),
        Font = new Font("Times New Roman", 12.0f),
        Tag = "LL" + i.ToString() + "," + j.ToString(),
        Text = (i+1).ToString(),
        ForeColor = Color.Black,
        BackColor = Color.Transparent,
        AutoSize = true,
        Visible = true
    };
    this.Controls.Add(lbl);
    lbl.BringToFront();
}
for (j = 0; j < 8; j++)

```

```

{
    for (i = 0; i < 12; i++)
    {
        var lbl = new Label
        {
            Name = "L" + i.ToString() + j.ToString(),
            Location = new System.Drawing.Point(385 + 49 * i + 10, 390 - 49 * j + 10),
            Font = new Font("Times New Roman", 12.0f),
            Tag = "L" + i.ToString() + "," + j.ToString(),
            Text = "+/-",
            ForeColor = Color.Red,
            BackColor = Color.Transparent,
            AutoSize = true,
            Visible = false
        };
        this.Controls.Add(lbl);
        lbl.BringToFront();
    }
}

string[] ArrayComPortsNames = null;
int index = -1;
string ComPortName = null;
try
{
    ArrayComPortsNames = SerialPort.GetPortNames();
    do
    {
        index += 1;
        cboPorts.Items.Add(ArrayComPortsNames[index]);
    }
    while (!((ArrayComPortsNames[index] == ComPortName)

```

```

        || (index == ArrayComPortsNames.GetUpperBound(0)));
    Array.Sort(ArrayComPortsNames);
    if (index == ArrayComPortsNames.GetUpperBound(0))
    {
        ComPortName = ArrayComPortsNames[0];
    }
    cboPorts.Text = ArrayComPortsNames[0];
    serialPort1.DataReceived +=
        new System.IO.Ports.SerialDataReceivedEventHandler(port_DataReceived_1);
    this.comboBox1.SelectedIndex = 0;
    this.comboBox2.SelectedIndex = 0;
}
catch
{
}
string folderName = @"c:\Result";
System.IO.Directory.CreateDirectory(folderName);
System.IO.Directory.CreateDirectory(folderName + @"\Origin");
System.IO.Directory.CreateDirectory(folderName + @"\Crop");
System.IO.Directory.CreateDirectory(folderName + @"\Mask");
System.IO.Directory.CreateDirectory(folderName + @"\Analyze");
System.IO.Directory.CreateDirectory(folderName + @"\Total");
}
private void MainForm_FormClosing(object sender, FormClosingEventArgs e)
{
    userControl11.Stop();
}
private void btnStop_Click(object sender, EventArgs e)
{
    userControl11.Stop();
}
}

```

```
private CameraFrameSource _frameSource;
private static Bitmap _latestFrame;
private Camera CurrentCamera
{
    get
    {
        return comboBoxCameras.SelectedItem as Camera;
    }
}
private void btnStart_Click(object sender, EventArgs e)
{
    UserControl11.Start();
}
private void startCapturing()
{
    try
    {
        Camera c = (Camera)comboBoxCameras.SelectedItem;
        setFrameSource(new CameraFrameSource(c));
        _frameSource.Camera.CaptureWidth = 640;
        _frameSource.Camera.CaptureHeight = 480;
        _frameSource.Camera.Fps = 50;
        _frameSource.NewFrame += OnImageCaptured;
        cameraPropertyValue.Enabled = _frameSource.StartFrameCapture();
    }
    catch (Exception ex)
    {
        comboBoxCameras.Text = "Select A Camera";
        MessageBox.Show(ex.Message);
    }
}
```

```

private void drawLatestImage(object sender, PaintEventArgs e)
{
    if (_latestFrame != null)
    {
        e.Graphics.DrawImage(_latestFrame, 0, 0, _latestFrame.Width,
        _latestFrame.Height);
    }
}

public void OnImageCaptured(Touchless.Vision.Contracts.IFrameSource
frameSource, Touchless.Vision.Contracts.Frame frame, double fps)
{
    _latestFrame = frame.Image;
    pictureBoxDisplay.Image = frame.Image;
}

private void setFrameSource(CameraFrameSource cameraFrameSource)
{
    if (_frameSource == cameraFrameSource)
        return;
    _frameSource = cameraFrameSource;
}

private void thrashOldCamera()
{
    if (_frameSource != null)
    {
        _frameSource.NewFrame -= OnImageCaptured;
        _frameSource.Camera.Dispose();
        setFrameSource(null);
        pictureBoxDisplay.Paint -= new PaintEventHandler(drawLatestImage);
    }
}

private void btnSave_Click(object sender, EventArgs e)

```

```

{

var pictureBoxes = Controls.OfType<PictureBox>();
foreach (PictureBox c in pictureBoxes)
{
    if (c.Tag != null)
    {
        if (c.Tag.ToString() == "P"+(Int32.Parse(comboBox1.Text)-1).ToString() +","+
(Int32.Parse(comboBox2.Text) - 1).ToString() + "")
        {
            c.BackgroundImage = userControl11.Capp();
        }
    }
}
}

public static Bitmap ResizeImage(Image image, int width, int height)
{
    var destRect = new Rectangle(0, 0, width, height);
    var destImage = new Bitmap(width, height);
    destImage.SetResolution(image.HorizontalResolution, image.VerticalResolution);
    using (var graphics = Graphics.FromImage(destImage))
    {
        graphics.CompositingMode = CompositingMode.SourceCopy;
        graphics.CompositingQuality = CompositingQuality.HighQuality;
        graphics.InterpolationMode = InterpolationMode.HighQualityBicubic;
        graphics.SmoothingMode = SmoothingMode.HighQuality;
        graphics.PixelOffsetMode = PixelOffsetMode.HighQuality;
        using (var wrapMode = new ImageAttributes())
        {
            wrapMode.SetWrapMode(WrapMode.TileFlipXY);

```



```

        graphics.DrawImage(image, destRect, 0, 0, image.Width, image.Height,
GraphicsUnit.Pixel, wrapMode);
    }
}
return destImage;
}
private void btnConfig_Click(object sender, EventArgs e)
{
}
#region Camera Property Controls
private IDictionary<String, CameraProperty> displayPropertyValues;
private IDictionary<String, CameraProperty> DisplayPropertyValues
{
    get
    {
        if( displayPropertyValues == null )
            displayPropertyValues = new Dictionary<String, CameraProperty>()
            {
                { "Pan (Degrees)", CameraProperty.Pan_degrees },
                { "Tilt (Degrees)", CameraProperty.Tilt_degrees },
                { "Roll (Degrees)", CameraProperty.Roll_degrees },
                { "Zoom (mm)", CameraProperty.Zoom_mm },
                { "Exposure (log2(seconds))", CameraProperty.Exposure_lgSec },
                { "Iris (10f)", CameraProperty.Iris_10f },
                { "Focal Length (mm)", CameraProperty.FocalLength_mm },
                { "Flash", CameraProperty.Flash },
                { "Brightness", CameraProperty.Brightness },
                { "Contrast", CameraProperty.Contrast },
                { "Hue", CameraProperty.Hue },
                { "Saturation", CameraProperty.Saturation },
                { "Sharpness", CameraProperty.Sharpness },
            }
    }
}

```

```

        { "Gamma", CameraProperty.Gamma },
        { "Color Enable", CameraProperty.ColorEnable },
        { "White Balance", CameraProperty.WhiteBalance },
        { "Backlight Compensation", CameraProperty.BacklightCompensation },
        { "Gain", CameraProperty.Gain },
    };
    return displayPropertyValues;
}
}
private IDictionary<CameraProperty, CameraPropertyCapabilities>
CurrentCameraPropertyCapabilities
{
    get;
    set;
}
private IDictionary<CameraProperty, CameraPropertyRange>
CurrentCameraPropertyRanges
{
    get;
    set;
}
private CameraProperty SelectedCameraProperty
{
    get
    {
        Int32 selectedIndex = cameraPropertyValue.SelectedIndex;
        String selectedItem = cameraPropertyValue.Items[ selectedIndex ] as String;
        CameraProperty result = DisplayPropertyValues[ selectedItem ];
        return result;
    }
}

```

```
private Boolean IsSelectedCameraPropertySupported
{
    get;
    set;
}

private Boolean IsCameraPropertyValueValue
{
    get
    {
        return ( ( String ) cameraPropertyValueSelection.SelectedItem ) == "Value";
    }
}

private Boolean IsCameraPropertyValuePercentage
{
    get
    {
        return ( ( String ) cameraPropertyValueSelection.SelectedItem ) ==
"Percentage";
    }
}

private Int32 CameraPropertyValue
{
    get
    {
        Decimal value = cameraPropertyValueValue.Value;
        Int32 result;
        if( IsCameraPropertyValueValue || IsCameraPropertyValuePercentage )
        {
            value = Math.Round( value );
            result = Convert.ToInt32( value );
        }
    }
}
```

```

else
    throw new NotSupportedException( String.Format( "Camera property value
type '{0}' is not supported.", ( String ) cameraPropertyValueSelection.SelectedItem ) );
return result;
}
}
private Boolean IsCameraPropertyAuto
{
get
{
return cameraPropertyValueAuto.Checked;
}
}
private Boolean SuppressCameraPropertyValueValueChangedEvent
{
get;
set;
}
private Boolean CameraPropertyControlInitializationComplete
{
get;
set;
}
private void InitializeCameraPropertyControls()
{
CameraPropertyControlInitializationComplete = false;
CurrentCameraPropertyCapabilities = CurrentCamera.CameraPropertyCapabilities;
CurrentCameraPropertyRanges = new Dictionary<CameraProperty,
CameraPropertyRange>();
cameraPropertyValueSelection.SelectedIndex = 0;
cameraPropertyValue.Items.Clear();

```

```

cameraPropertyValue.Items.AddRange( DisplayPropertyValues.Keys.ToArray() );
CameraPropertyControlInitializationComplete = true;
cameraPropertyValue.SelectedIndex = 0;
}
private void UpdateCameraPropertyRange( CameraPropertyCapabilities
propertyCapabilities )
{
    String text;
    if( IsSelectedCameraPropertySupported &&
propertyCapabilities.IsGetRangeSupported && propertyCapabilities.IsGetSupported )
    {
        CameraPropertyRange range = CurrentCamera.GetCameraPropertyRange(
SelectedCameraProperty );
        text = String.Format( "[ {0}, {1} ], step: {2}", range.Minimum, range.Maximum,
range.Step );
        Int32 decimalPlaces;
        Decimal minimum, maximum, increment;
        if( IsCameraPropertyValue )
        {
            minimum = range.Minimum;
            maximum = range.Maximum;
            increment = range.Step;
            decimalPlaces = 0;
        }
        else if( IsCameraPropertyValueTypePercentage )
        {
            minimum = 0;
            maximum = 100;
            increment = 0.01M;
            decimalPlaces = 2;
        }
    }
}

```

```

else
    throw new NotSupportedException( String.Format( "Camera property value
type '{0}' is not supported.", ( String ) cameraPropertyValueSelection.SelectedItem ) );
cameraPropertyValueValue.Minimum = minimum;
cameraPropertyValueValue.Maximum = maximum;
cameraPropertyValueValue.Increment = increment;
cameraPropertyValueValue.DecimalPlaces = decimalPlaces;
if( CurrentCameraPropertyRanges.ContainsKey( SelectedCameraProperty ) )
    CurrentCameraPropertyRanges[ SelectedCameraProperty ] = range;
else
    CurrentCameraPropertyRanges.Add( SelectedCameraProperty, range );
CameraPropertyValue value = CurrentCamera.GetCameraProperty(
SelectedCameraProperty, IsCameraPropertyValueValueTypeValue );
SuppressCameraPropertyValueValueChangedEvent = true;
cameraPropertyValueValue.Value = value.Value;
cameraPropertyValueAuto.Checked = value.IsAuto;
SuppressCameraPropertyValueValueChangedEvent = false;
}
else
    text = "N/A";
cameraPropertyRangeValue.Text = text;
}

private void cameraPropertyValueSelection_SelectedIndexChanged( Object
sender, EventArgs e )
{
    if( CameraPropertyControlInitializationComplete )
    {
        CameraPropertyCapabilities propertyCapabilities =
CurrentCameraPropertyCapabilities[ SelectedCameraProperty ];
        CameraPropertyRange range = CurrentCameraPropertyRanges[
SelectedCameraProperty ];

```

```

Decimal previousValue = cameraPropertyValue.Value;
UpdateCameraPropertyRange( propertyCapabilities );

Decimal newValue;

if( IsCameraPropertyValueTypeValue
    newValue = range.DomainSize * previousValue / 100 + range.Minimum;
else if( IsCameraPropertyValueTypePercentage )
    newValue = ( previousValue - range.Minimum ) * 100 / range.DomainSize;
else
    throw new NotSupportedException( String.Format( "Camera property value
type '{0}' is not supported.", ( String ) cameraPropertyValueTypeSelection.SelectedItem ) );
newValue = Math.Round( newValue );
if( newValue > range.Maximum )
    newValue = range.Maximum;
else if( newValue < range.Minimum )
    newValue = range.Minimum;
SuppressCameraPropertyValueValueChangedEvent = true;
cameraPropertyValue.Value = newValue;
SuppressCameraPropertyValueValueChangedEvent = false;
}
}
private void cameraPropertyValue_ValueChanged( Object sender, EventArgs e
)
{
    if( CameraPropertyControlInitializationComplete &&
!SuppressCameraPropertyValueValueChangedEvent )
    {
        CameraPropertyValue value = new CameraPropertyValue(
IsCameraPropertyValueTypePercentage, CameraPropertyValue, IsCameraPropertyAuto );
        CurrentCamera.SetCameraProperty( SelectedCameraProperty, value );
    }
}
}

```

```

private void cameraPropertyValueAuto_CheckedChanged( Object sender, EventArgs
e )
{
    if( CameraPropertyControlInitializationComplete )
    {
        CameraPropertyValue value = new CameraPropertyValue(
IsCameraPropertyValuePercentage, CameraPropertyValue, IsCameraPropertyAuto );
        CurrentCamera.SetCameraProperty( SelectedCameraProperty, value );
    }
}
private void cameraPropertyValue_SelectedIndexChanged( Object sender,
EventArgs e )
{
    if( CameraPropertyControlInitializationComplete )
    {
        IsSelectedCameraPropertySupported =
CurrentCamera.IsCameraPropertySupported( SelectedCameraProperty );
        CameraPropertyCapabilities propertyCapabilities =
CurrentCameraPropertyCapabilities[ SelectedCameraProperty ];
        UpdateCameraPropertyRange( propertyCapabilities );
        cameraPropertyValueAuto.Enabled = cameraPropertyValueValue.Enabled =
cameraPropertyValueTypeSelection.Enabled = IsSelectedCameraPropertySupported &&
propertyCapabilities.IsFullySupported;
    }
}
private void cameraPropertyValueValue_EnabledChanged( Object sender, EventArgs
e )
{
    if( CameraPropertyControlInitializationComplete &&
!SuppressCameraPropertyValueValueChangeEvent && cameraPropertyValueValue.Enabled )
    {

```



```

        CameraPropertyValue value = CurrentCamera.GetCameraProperty(
SelectedCameraProperty, IsCameraPropertyValue );

        cameraPropertyValue.Value = value.Value;
        cameraPropertyValue.Auto.Checked = value.IsAuto;
    }
}

private void cameraPropertyValue_EnabledChanged( Object sender, EventArgs e )
{
    if( cameraPropertyValue.Enabled )
        InitializeCameraPropertyControls();
}

#endregion

private void button2_Click(object sender, EventArgs e)
{
    serialPort1.PortName = Convert.ToString(cboPorts.Text);
    serialPort1.Open();
    while (serialPort1.IsOpen != true)
    {
    }
    if (serialPort1.IsOpen == true)
    {
        currentposition_x = 0;
        currentposition_y = 0;
        serialPort1.Write("G1\0X" + (currentposition_x).ToString() + "\0F200\r");
        serialPort1.Write("G1\0Y" + (currentposition_y).ToString() + "\0F200\r");
        label8.Text = (currentposition_x).ToString();
        label10.Text = (currentposition_y).ToString();
    }
}

delegate void SetTextCallback(string text);

string InputData = String.Empty;

```

```

private void port_DataReceived_1(object sender, SerialDataReceivedEventArgs e)
{
    InputData = serialPort1.ReadExisting();
    if (InputData != String.Empty)
    {
        this.BeginInvoke(new SetTextCallback(SetText), new object[] { InputData });
    }
}

private void SetText(string text)
{
    this.label3.Text += text;
}

private void button1_Click(object sender, EventArgs e)
{
    serialPort1.Close();
}

double currentposition_x = 0;
double currentposition_y = 0;
double lastposition_y = 0;

private void button11_Click(object sender, EventArgs e)
{
    if (serialPort1.IsOpen == true)
    {
        currentposition_x = currentposition_x + stepx;
        serialPort1.Write("G1\0X" + (currentposition_x).ToString() + "\0F200\r");
        label8.Text = (currentposition_x).ToString();
    }
}

private void button10_Click(object sender, EventArgs e)
{
    if (serialPort1.IsOpen == true)

```

```
{
    if (currentposition_x > 0)
    {
        currentposition_x = currentposition_x - stepx;
        serialPort1.Write("G1\0X" + (currentposition_x).ToString() + "\0F200\r");
        label8.Text = (currentposition_x).ToString();
    }
}

private void button7_Click(object sender, EventArgs e)
{
    if (serialPort1.IsOpen == true)
    {
        currentposition_y = currentposition_y + stepy;
        serialPort1.Write("G1\0Y" + (currentposition_y).ToString() + "\0F200\r");
        label10.Text = (currentposition_y).ToString();
    }
}

private void button9_Click(object sender, EventArgs e)
{
    if (serialPort1.IsOpen == true)
    {
        if (currentposition_y > 0)
        {
            currentposition_y = currentposition_y - stepy;
            serialPort1.Write("G1\0Y" + (currentposition_y).ToString() + "\0F200\r");
            label10.Text = (currentposition_y).ToString();
        }
    }
}

private void button8_Click(object sender, EventArgs e)
```

```

{
    if (serialPort1.IsOpen == true)
    {
        currentposition_x = 0;
        currentposition_y = 0;
        serialPort1.Write("G1\0X" + (currentposition_x).ToString() + "\0F200\r");
        serialPort1.Write("G1\0Y" + (currentposition_y).ToString() + "\0F200\r");
        label8.Text = (currentposition_x).ToString();
        label10.Text = (currentposition_y).ToString();
    }
}

private void button5_Click(object sender, EventArgs e)
{
    if (serialPort1.IsOpen == true)
    {
        currentposition_x = 0 ;
        currentposition_y = 0 ;
        serialPort1.Write("G1\0X" + (currentposition_x).ToString() + "\0F200\r");
        serialPort1.Write("G1\0Y" + (currentposition_y).ToString() + "\0F200\r");
    }
    timer1.Enabled = true;
}

bool invert = false;

private void timer1_Tick(object sender, EventArgs e)
{
    if (serialPort1.IsOpen == true)
    {
        serialPort1.Write("G1\0X" + (currentposition_x).ToString() + "\0F1000\r");
        serialPort1.Write("G1\0Y" + (currentposition_y).ToString() + "\0F200\r");
        if (lastposition_y != currentposition_y)
        {

```



```

img2.Dispose();
img3.Save(jpg3, System.Drawing.Imaging.ImageFormat.Jpeg);
img3.Dispose();
}
private void button4_Click(object sender, EventArgs e)
{
}
private void button3_Click_1(object sender, EventArgs e)
{
}
private void button12_Click(object sender, EventArgs e)
{
    var pictureBoxes = Controls.OfType<PictureBox>();
    foreach (PictureBox c in pictureBoxes)
    {
        if (c.Tag != null)
        {
            if (c.Tag.ToString() == "P" + (Int32.Parse(comboBox1.Text) - 1).ToString() + ","
+ (Int32.Parse(comboBox2.Text) - 1).ToString() + "")
            {
                c.BackgroundImage = null;
            }
        }
    }
}
private void button3_Click_2(object sender, EventArgs e)
{
    timer1.Enabled = false;
}
private void timer2_Tick(object sender, EventArgs e)
{

```

```

timer2.Enabled = false;
var pictureBoxes = Controls.OfType<PictureBox>();
foreach (PictureBox c in pictureBoxes)
{
    if (c.Tag != null)
    {
        if (c.Tag.ToString() == "P" + (currentposition_x / stepx).ToString() + "," +
(currentposition_y / stepy).ToString() + "")
        {
            c.BackgroundImage = userControl11.Capp();
            c.BackgroundImage.Save(@"c:\Result\Origin\" + c.Tag.ToString()+".png",
ImageFormat.Png);
        }
    }
}
if (Math.Round(currentposition_x, 2) == 0 && Math.Round(currentposition_y, 2)
== Math.Round(7*stepy, 2))
{
    currentposition_x = 0;
    currentposition_y = 0;
    label8.Text = (currentposition_x).ToString();
    label10.Text = (currentposition_y).ToString();
    serialPort1.Write("G1\0X" + (currentposition_x).ToString() + "\0F200\r");
    serialPort1.Write("G1\0Y" + (currentposition_y).ToString() + "\0F200\r");
    timer1.Enabled = false;
    invert = false;
}
else
{
    if (Math.Round(currentposition_x, 2) == Math.Round(stepx*11, 2) && invert ==
false)

```

```
{
    invert = true;
    currentposition_y += stepy;
    timer1.Enabled = true;
}
else if (Math.Round(currentposition_x, 2) == 0 && invert == true)
{
    invert = false;
    currentposition_y += stepy;
    currentposition_y = Math.Round(currentposition_y, 2);
    timer1.Enabled = true;
}
else
{
    if (invert == false)
    {
        currentposition_x += stepx;
        currentposition_x = Math.Round(currentposition_x, 2);
    }
    else
    {
        currentposition_x -= stepx;
        currentposition_x = Math.Round(currentposition_x, 2);
    }
}
}
}
private void button4_Click_1(object sender, EventArgs e)
{
    int i = 0;
    int j = 0;
```



```

for (j = 0; j < 8; j++)
{
    for (i = 0; i < 12; i++)
    {
        Image myImage = Image.FromFile(@"C:\Result\Origin\P" + i.ToString() + "," +
j.ToString() + ".png");

        Bitmap croppedBitmap = new Bitmap(myImage);
        croppedBitmap = croppedBitmap.Clone(
            new Rectangle(
                205, 115,
                250,
                250),
            System.Drawing.Imaging.PixelFormat.DontCare);
        var pictureBoxes = Controls.OfType<PictureBox>();
        foreach (PictureBox c in pictureBoxes)
        {
            if (c.Tag != null)
            {
                if (c.Tag.ToString() == "P" + i.ToString() + "," + j.ToString() + "")
                {
                    c.BackgroundImage = croppedBitmap;
                    croppedBitmap.Save(@"c:\Result\Crop\" + c.Tag.ToString() + ".png",
ImageFormat.Png);
                }
            }
        }
    }
}

private void button6_Click(object sender, EventArgs e)
{

```

```

int i = 0;
int j = 0;
int x = 0;
int y = 0;
Color newColor = Color.White;
Color actualColor;
for (j = 0; j < 8; j++)
{
    for (i = 0; i < 12; i++)
    {
        try
        {
            HSLFiltering filter = new HSLFiltering();
            try
            {
                int hs = int.Parse(this.textBox8.Text);
                int hf = int.Parse(this.textBox9.Text);
                float ss = float.Parse(this.textBox11.Text);
                float sf = float.Parse(this.textBox10.Text);
                float ls = float.Parse(this.textBox13.Text);
                float lf = float.Parse(this.textBox12.Text);

                filter.Hue = new IntRange(hs, hf);
                filter.Saturation = new Range(ss, sf);
                filter.Luminance = new Range(ls, lf);
            }
            catch (Exception)
            {
                throw new ApplicationException("Color Fail");
            }
            Bitmap finalImage = new Bitmap(@"C:\Result\Crop\P" + i.ToString() + ","
+ j.ToString() + ".png");

```

```

System.Drawing.Bitmap newImage = filter.Apply(finalImage);
newImage = ChangeColor(newImage);
var pictureBoxes = Controls.OfType<PictureBox>();
foreach (PictureBox c in pictureBoxes)
{
    if (c.Tag != null)
    {
        if (c.Tag.ToString() == "P" + i.ToString() + "," + j.ToString() + "")
        {
            c.BackgroundImage = newImage;
            newImage.Save(@"c:\Result\Mask\" + c.Tag.ToString() + ".png",
ImageFormat.Png);
        }
    }
}
catch (Exception)
{
    throw new ApplicationException("Failed loading image");
}
}
}

public static Bitmap ChangeColor(Bitmap scrBitmap)
{
    Color newColor = Color.White;
    Color actualColor;
    Bitmap newBitmap = new Bitmap(scrBitmap.Width, scrBitmap.Height);
    for (int i = 0; i < scrBitmap.Width; i++)
    {
        for (int j = 0; j < scrBitmap.Height; j++)

```

```

    {
        actualColor = scrBitmap.GetPixel(i, j);
        if (actualColor.R == 0)
            newBitmap.SetPixel(i, j, newColor);
        else
            newBitmap.SetPixel(i, j, Color.Black);
    }
}

return newBitmap;
}

private void button13_Click(object sender, EventArgs e)
{
    int i = 0;
    int j = 0;
    var nonblackPixels = 0;
    String result1 = "0";
    for (j = 0; j < 8; j++)
    {
        for (i = 0; i < 12; i++)
        {
            try
            {
                Bitmap bmp = new Bitmap(@"C:\Result\Mask\P" + i.ToString() + "," +
j.ToString() + ".png");

                nonblackPixels = 0;
                for (int x = 0; x < bmp.Width; x++)
                {
                    for (int y = 0; y < bmp.Height; y++)
                    {
                        if (bmp.GetPixel(x, y).ToArgb().Equals(Color.White.ToArgb()))
                        {

```

```
    }
    else
    {
        nonblackPixels++;
    }
}
}
if (i == 10 && j == 6)
{
    nonblackPixels = nonblackPixels + 1 - 1;
}
if (nonblackPixels < Int16.Parse(this.textBox1.Text))
{
    result1 = "";
}
else if (nonblackPixels < Int16.Parse(this.textBox2.Text))
{
    result1 = "N";
}
else if (nonblackPixels < Int16.Parse(this.textBox3.Text))
{
    result1 = "N";
}
else if (nonblackPixels < Int16.Parse(this.textBox4.Text))
{
    result1 = "+/-";
}
else if (nonblackPixels < Int16.Parse(this.textBox5.Text))
{
    result1 = "+";
}
}
```

```

else if (nonblackPixels < Int16.Parse(this.textBox6.Text))
{
    result1 = "++";
}
else if (nonblackPixels < Int16.Parse(this.textBox7.Text))
{
    result1 = "++";
}
else
{
    result1 = "+";
}
var labels = Controls.OfType<Label>();
foreach (Label c in labels)
{
    if (c.Tag != null)
    {
        if (c.Tag.ToString() == "L" + i.ToString() + "," + j.ToString() + "")
        {
            c.Text = result1;
            c.Visible = true;

            if (result1 == "N")
            {
                c.ForeColor = Color.Blue;
            }
            else
            {
                c.ForeColor = Color.Red;
            }
            string AddText = result1;
            PointF firstLocation = new PointF(10f, 10f);

```

```

        string imagePath = @"c:\Result\Crop\" +
c.Tag.ToString().Replace("L","P") + ".png";
        Bitmap newBitmap;
        using (var bitmap = (Bitmap)Image.FromFile(imageFilePath))
        {
            using (Graphics graphics = Graphics.FromImage(bitmap))
            {
                using (Font arialFont = new Font("Arial", 48))
                {
                    if (AddText == "N")
                    {
                        graphics.DrawString(AddText, arialFont, Brushes.Blue,
firstLocation);
                    }
                    else
                    {
                        graphics.DrawString(AddText, arialFont, Brushes.Red,
firstLocation);
                    }
                }
            }
        }
        newBitmap = new Bitmap(bitmap);
    }
    newBitmap.Save(@"c:\Result\Analyze\" +
c.Tag.ToString().Replace("L", "P") + ".png");
    newBitmap.Dispose();
}
}
}
}
catch (Exception)

```

```

        {
            throw new ApplicationException("Failed loading image");
        }
    }
}

private void button14_Click(object sender, EventArgs e)
{
    int i = 0;
    int j = 0;
    int width = 3600;
    int height = 2400;
    Bitmap img3 = new Bitmap(width, height);
    Graphics g = Graphics.FromImage(img3);
    g.Clear(Color.Black);

    for (j = 0; j < 8; j++)
    {
        for (i = 0; i < 12; i++)
        {
            try
            {
                Image img = Image.FromFile(@"C:\Result\Analyze\P" + i.ToString() + "," +
j.ToString() + ".png");

                g.DrawImage(img, 300*i, 300*j, 300, 300);
                img.Dispose();
                var labels = Controls.OfType<Label>();
                foreach (Label c in labels)
                {
                    if (c.Tag != null)
                    {

```



```

        if (c.Tag.ToString() == "L" + i.ToString() + "," + j.ToString() + "")
        {
            c.Text = "0";
            c.Visible = false;
        }
    }
}

var pictureBoxes = Controls.OfType<PictureBox>();
foreach (PictureBox c in pictureBoxes)
{
    if (c.Tag != null)
    {
        if (c.Tag.ToString() == "P" + i.ToString() + "," + j.ToString() + "")
        {
            c.BackgroundImage = null;
        }
    }
}
catch (Exception)
{
    throw new ApplicationException("Failed loading image");
}
}

g.Dispose();

SaveFileDialog saveFileDialog1 = new SaveFileDialog();
saveFileDialog1.Filter = "Jpeg Image|*.jpg|Bitmap Image|*.bmp|Gif Image|*.gif";
saveFileDialog1.Title = "Save an Image File";
saveFileDialog1.ShowDialog();

if (saveFileDialog1.FileName != "")

```

```

    {
        saveFileDialog1.InitialDirectory = @"C:\Result\Total\Total\";
        img3.Save(saveFileDialog1.FileName,
System.Drawing.Imaging.ImageFormat.Jpeg);

    }
    img3.Dispose();
    MessageBox.Show("Combine Done!");
}
private void cboPorts_SelectedIndexChanged(object sender, EventArgs e)
{
}
private void comboBoxCameras_SelectedIndexChanged(object sender, EventArgs e)
{
}
private void timer3_Tick(object sender, EventArgs e)
{
    var pictureBoxes = Controls.OfType<PictureBox>();
    foreach (PictureBox c in pictureBoxes)
    {
        if (c.Tag != null)
        {
            if (c.Tag.ToString() == "P" + (currentposition_x / stepx).ToString() + "," +
(currentposition_y / stepy).ToString() + "")
            {
                c.BackgroundImage = userControl11.Capp();
                c.BackgroundImage.Save(@"c:\Result\Origin\" + c.Tag.ToString() + ".png",
ImageFormat.Png);
            }
        }
    }
}
}
}
}

```

```

        if (Math.Round(currentposition_x, 2) == 0 && Math.Round(currentposition_y, 2)
== Math.Round(7 * stepy, 2))
    {
        currentposition_x = 0;
        currentposition_y = 0;
        label8.Text = (currentposition_x).ToString();
        label10.Text = (currentposition_y).ToString();
        serialPort1.Write("G1\0X" + (currentposition_x).ToString() + "\0F200\r");
        serialPort1.Write("G1\0Y" + (currentposition_y).ToString() + "\0F200\r");
        timer1.Enabled = false;
        invert = false;
        MessageBox.Show("Done!");
    }
    else
    {
        if (Math.Round(currentposition_x, 2) == Math.Round(stepx * 11, 2) && invert
== false)
        {
            invert = true;
            currentposition_y += stepy;
        }
        else if (Math.Round(currentposition_x, 2) == 0 && invert == true)
        {
            invert = false;
            currentposition_y += stepy;
            currentposition_y = Math.Round(currentposition_y, 2);
        }
        else
        {
            if (invert == false)
            {

```

```
        currentposition_x += stepx;
        currentposition_x = Math.Round(currentposition_x, 2);
    }
    else
    {
        currentposition_x -= stepx;
        currentposition_x = Math.Round(currentposition_x, 2);
    }
}
timer1.Enabled = true;
}
timer3.Enabled = false;
}
private void button15_Click(object sender, EventArgs e)
{
    button5.PerformClick();
    timer4.Enabled = true;
}
private void timer4_Tick(object sender, EventArgs e)
{
    timer4.Enabled = false;
    button4.PerformClick();
    timer5.Enabled = true;
}
private void timer5_Tick(object sender, EventArgs e)
{
    timer5.Enabled = false;
    button6.PerformClick();
    timer6.Enabled = true;
}
private void timer6_Tick(object sender, EventArgs e)
```

```
{  
    timer6.Enabled = false;  
    button13.PerformClick();  
}  
private void textBox3_TextChanged(object sender, EventArgs e)  
{  
}  
}  
}
```



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายภาคภูมิ เดชหัสดิน
วัน เดือน ปี เกิด	10 ธันวาคม 2522
สถานที่เกิด	จังหวัดชัยภูมิ
วุฒิการศึกษา	2545 : วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	14/301 ซอยพุทธบูชา แยก 1 แขวงบางมด เขตทุ่งครุ 10140



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY