

การพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip แบบอ่านผลด้วยตาเปล่าอย่างรวดเร็ว สำหรับวินิจฉัยวัณโรคจาก
ปฏิกิริยา Multiplex-recombinase polymerase amplification



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Development of MTB Strip for rapid naked eye diagnosis of tuberculosis by Multiplex-
recombinase polymerase amplification



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	การพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip แบบอ่านผลด้วยตาเปล่า อย่างรวดเร็ว สำหรับวินิจฉัยวัณโรคจากปฏิกิริยา Multiplex-recombinase polymerase amplification
โดย	น.ส.วิลาณี เดชขจร
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

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

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์)

วิลาณี เดชขจร : การพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip แบบอ่านผลด้วยตาเปล่าอย่างรวดเร็ว สำหรับวินิจฉัยวัณโรคจากปฏิกิริยา Multiplex-recombinase polymerase amplification. (Development of MTB Strip for rapid naked eye diagnosis of tuberculosis by Multiplex-recombinase polymerase amplification) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่มีการระบาดทั่วโลก และยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย วัณโรคยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตจากโรคติดต่อสูงเป็นอันดับสองรองจากโรคเอดส์ โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ เป็นหนึ่งปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค การนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามาใช้วินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีความรวดเร็วมากกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิมและสามารถวินิจฉัยโรคได้ภายใน 1 วัน มีบทบาทที่สำคัญในการวินิจฉัยโรคในปัจจุบัน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip แบบอ่านผลด้วยตาเปล่าอย่างรวดเร็ว สำหรับวินิจฉัยวัณโรคจากปฏิกิริยา Multiplex-recombinase polymerase amplification (M-RPA) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ IS1081 และ IS6110 ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ MTBC และตรวจสอบผลผลิตของทั้งสอง IS ร่วมกัน เพื่อเพิ่มความไวของเทคนิคในการวินิจฉัยวัณโรค การทดสอบเบื้องต้นกับดีเอ็นเอที่สกัดจากโคลนนิ่งของเชื้อ แสดงให้เห็นว่าเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip สามารถจำแนกเชื้อ MTBC ออกจาก NTM ได้อย่างถูกต้อง เมื่อนำเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip มาวินิจฉัยกับดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจเสมหะจำนวน 131 ตัวอย่าง พบว่ามีความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 91.03% และ 84.91% ตามลำดับ โดยมีค่าความสอดคล้องในเกณฑ์ดี ($K=0.762$) เมื่อเปรียบเทียบกับการย้อมสีทึบกรด ในขณะที่มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100.0% และ 94.55% ตามลำดับ และมีค่าความสอดคล้องในเกณฑ์ดีมาก ($K=0.953$) เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Real-time PCR เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ใช้ระยะเวลาทำปฏิกิริยาเพียง 25 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip ภายในเวลา 15 นาที โดยตรวจสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยที่สุดได้เท่ากับ 0.1 ng/ μ l และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มักก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ ดังนั้นเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip จึงเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็ว ไม่ซับซ้อน อ่านผลง่าย ราคาถูก มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถนำไปใช้ตรวจคัดกรองสำหรับการวินิจฉัยวัณโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรงพยาบาลขนาดเล็ก ที่ไม่มีเครื่องมือเฉพาะทางอณูชีววิทยา ทำให้สามารถระบุตัวผู้ป่วยวัณโรคได้รวดเร็วขึ้น ส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม ซึ่งช่วยในการควบคุมวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2563	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6176755537 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Tuberculosis, Multiplex-recombinase polymerase amplification (M-RPA), MTB Strip, IS1081, IS6110, Nucleic acid lateral flow

Wilanee Dechkhajorn : Development of MTB Strip for rapid naked eye diagnosis of tuberculosis by Multiplex-recombinase polymerase amplification. Advisor: Asst. Prof. PANAN RATTHAWONGJIRAKUL

Tuberculosis (TB) is an infectious disease spreading globally and is still a significant health problem in Thailand. TB has been posed as the second cause of death from infectious disease after an acquired immunodeficiency syndrome. TB is caused by the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). Implementation of molecular techniques in a laboratory, which is more rapid than culture-based methods and can be diagnosed within one day, plays a crucial role in TB diagnosis. This study aimed to develop the MTB Strip that could be read out by a naked eye from directed amplification by multiplex-recombinase polymerase amplification (M-RPA) using IS1081 and IS6110 primers specific to MTBC. The amplified products of both primers were inspected simultaneously to improve the sensitivity of detection. A preliminary examination with colony DNA demonstrated that M-RPA coupled with MTB Strip enabled differentiate MTBC from nontuberculous mycobacteria correctly. M-RPA coupled with MTB Strip was then evaluated with DNA extracted from 131 sputum samples. The sensitivity and specificity were 91.03% and 84.91%, respectively, and were in substantial agreement ($K=0.762$) compared to acid-fast staining, while the sensitivity and specificity were 100.0% and 94.55%, respectively, and were in almost perfect agreement ($K=0.953$) compared to real-time PCR. The reaction time of M-RPA was 25 minutes under 37°C and the detection time with MTB Strip was 15 minutes. The limit of detection of the M-RPA coupled MTB Strip was 0.1 ng/μl, and no cross-reaction with other bacterial respiratory pathogens was observed. Thus, M-RPA coupled with MTB Strip was rapid, simple, easy to read out, and inexpensive. The developed technique also has high sensitivity and specificity, which can be integrated for TB screening diagnosis, particularly in small healthcare settings with no specific instrument. M-RPA coupled with MTB Strip may be used to promptly identify TB patients, leading to appropriate therapy that facilitates TB control effectively.

Field of Study: Molecular Science of Medical Student's Signature

Microbiology and Immunology

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จและลุล่วงไปได้ด้วยดีจากการได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ จึงขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาอบความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือและคำปรึกษาในทุกด้าน ตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ ในฐานะนิสิตปริญญาโทที่ทำงานไปด้วยได้อย่างดี

ขอขอบพระคุณสำนักนวัตกรรมการแข่งขัน (องค์การมหาชน) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย และบริษัท ไอเมต ลาบอราทอรี จำกัด ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยและอนุเคราะห์วัสดุวิจัยบางส่วน

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตินิรันดร์ หัวหน้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากโคลีนของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้จากสิ่งส่งตรวจกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วย และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอและทำการทดสอบเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณ นางสาวขวัญชนม์ เจียรกิตติวิช นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ งานจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลเลิดสิน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์จัดหาสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วยวัณโรคเพื่อนำมาสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอในการศึกษานี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ที่กรุณาเป็นประธานสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบภายนอกมหาวิทยาลัย ในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. รัชนิพร ตียะวิสุทธิศรี ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์

นอกจากนี้ขอขอบคุณพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ประตาบ สิงห์ควานนท์ อดีตคณบดีคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ได้อนุญาตให้ศึกษาต่อระดับปริญญาโท และทุนสนับสนุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อุไร ไชยศรี อดีตหัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน และศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงพรณเพ็ญ วิริยเวชกุล หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน ที่อนุญาตให้ศึกษาต่อระดับปริญญาโทและสนับสนุนเวลาในการเรียนและการปฏิบัติงานวิจัย ตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์

และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สัตวแพทย์หญิงเยาวพา มณีรัตน์ หัวหน้าหน่วยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ที่เป็นหัวหน้างานโดยตรงแก่ข้าพเจ้า ที่สนับสนุนทุก ๆ ด้านแก่ข้าพเจ้า อีกทั้งอนุญาตให้ข้าพเจ้าปฏิบัติงานวิจัยในห้องปฏิบัติการของหน่วยในสถานการณ์ช่วงระบาศโควิด-19 จนสามารถทำงานวิจัยในวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สอนและถ่ายทอดวิชาความรู้ต่างๆ ตลอดจนพี่ ๆ เพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติ ชั้น 5 ตึกจุฬาพัฒน์ ที่ให้ความช่วยเหลือ รวมถึงให้คำปรึกษาต่างๆ จนทำให้ข้าพเจ้าทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

และสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาต่อ และให้กำลังใจจนผ่านช่วงเวลายากลำบากมาได้ จนข้าพเจ้าบรรลุเป้าหมายที่ตั้งใจไว้ได้

จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

วิลาณี เดชขจร



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฑ
สารบัญรูปภาพ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	5
3. ขอบเขตของงานวิจัย	5
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
1. วัณโรค (Tuberculosis, TB).....	7
2. สถานการณ์วัณโรค	7
3. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	8
4. อาการ การติดต่อและการเกิดพยาธิสภาพของวัณโรค	10
5. การวินิจฉัยวัณโรคในห้องปฏิบัติการ	12
5.1. การเก็บสิ่งส่งตรวจ	13
5.1.1. การเก็บสิ่งส่งตรวจเสมหะ	13
5.1.2. การเก็บสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น.....	13
5.2. การทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	14

5.3. การเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture).....	14
5.4. การทดสอบทางอณูชีววิทยา (Molecular examination)	15
5.4.1. Xpert® MTB/RIF	17
5.4.2. Tuberculosis-Loop-mediated isothermal amplification; TB-LAMP	18
6. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Recombinase polymerase amplification..	19
6.1. ปัจจัยที่มีผลต่อการดำเนินปฏิกิริยา RPA.....	22
6.2. ข้อได้เปรียบของปฏิกิริยา RPA ที่มีต่อเทคนิค Isothermal amplification ชนิดอื่น.	23
6.3. การประยุกต์ใช้เทคนิค RPA ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ	25
6.4. ปฏิกิริยา Multiplex-RPA (M-RPA).....	28
7. การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA.....	30
7.1. การตรวจสอบผลผลิต RPA ขณะที่ยังดำเนินปฏิกิริยา.....	30
7.2. การตรวจสอบผลผลิต RPA เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา	33
7.2.1. เทคนิค Agarose gel electrophoresis.....	33
7.2.2. การตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR® Green I.....	34
7.2.3. การตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นตรวจ Lateral flow.....	35
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	39
1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์.....	39
1.1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction.....	39
1.2. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Recombinase polymerase amplification.....	39
1.3. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip.....	39
1.4. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณสาร พันธุกรรมด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis.....	40

1.5. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจ เสมหะของผู้ป่วย	40
2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	40
3. การออกแบบงานวิจัย	41
3.1. การพัฒนาเทคนิค Multiplex-recombinase polymerase amplification	41
3.2. การพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip	41
3.3. การพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip ร่วมกับผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย เทคนิค M-RPA	42
3.4. การประเมินประสิทธิภาพเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip และคุณภาพ ของแถบตรวจ MTB Strip.....	42
3.5. การวินิจฉัยวัณโรคด้วยแถบตรวจ MTB Strip.....	42
3.6. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของแถบตรวจ MTB Strip ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค.....	42
4. วิธีการทดลอง	43
4.1. การคำนวณหาจำนวนกลุ่มตัวอย่าง.....	43
4.2. การพิจารณาขอจริยธรรมการวิจัย	44
4.3. ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษา.....	44
4.4. การสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอ	45
4.5. การออกแบบไพรเมอร์.....	46
4.6. การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ IS6110 สำหรับปฏิกิริยา RPA ด้วย เทคนิค PCR.....	47
4.6.1. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม IS6110 ด้วยเทคนิค PCR.....	47
4.6.2. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตปฏิกิริยา PCR.....	47
4.7. การพัฒนาเทคนิค Multiplex-recombinase polymerase amplification	48
4.7.1. การทดสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	48
4.7.2. การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	49

4.7.3.	การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	49
4.7.4.	การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	49
4.8.	การออกแบบแถบตรวจ MTB strip เพื่อตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา M-RPA	50
4.8.1.	โครงสร้างของแถบตรวจ MTB strip	50
4.8.2.	หลักการการทำงานของแถบตรวจ MTB Strip	52
4.8.3.	การอ่านผลของแถบตรวจ MTB Strip	53
4.9.	การพัฒนาสถานะแถบตรวจ MTB Strip เพื่อตรวจสอบผลผลิต M-RPA	55
4.9.1.	การทดสอบการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross-reaction) กับสารละลายใน ส่วนประกอบของปฏิกิริยา M-RPA	55
4.9.2.	การหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip	56
4.9.2.1.	การทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ที่เหมาะสมสำหรับพัฒนา แถบตรวจ MTB Strip	57
4.9.2.2.	การทดสอบหาความเข้มข้นของ Anti-FITC และ Anti-IgG ที่ เหมาะสมสำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip	58
4.9.2.3.	การทดสอบหาความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate ที่ เหมาะสมสำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip	58
4.9.2.4.	การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจสอบต่อผลผลิต M- RPA สำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip	58
4.9.2.5.	การผลิตแถบตรวจ MTB Strip ด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม	59
4.10.	การทดสอบหาความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) ของ เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	59
4.11.	การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	59
4.12.	การทดสอบความคงตัวของผลที่ปรากฏอยู่บนแถบตรวจ MTB Strip	60
4.13.	การทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ MTB Strip	60

4.14. การวินิจฉัยกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ MTBC และ NTM ด้วย ปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip.....	61
4.15. การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วย ปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip.....	62
4.15.1. การทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ที่ เหมาะสมสำหรับแถบตรวจ MTB Strip	62
4.15.2. การทดสอบหาปริมาณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	63
4.15.3. การทดสอบหาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์สำหรับ IS1081 ที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยา.....	63
4.15.4. การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	64
4.15.5. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	64
4.16. การวินิจฉัยวัณโรคจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยปฏิกิริยา M- RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	65
4.17. การคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของแถบตรวจ MTB strip.....	65
4.18. การคำนวณค่าความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยสถิติ Kappa coefficient	67
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย.....	70
1. ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัย.....	70
2. ผลการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์สำหรับ IS6110 ในปฏิกิริยา RPA ด้วย เทคนิค PCR	71
3. ผลการพัฒนาเทคนิค Multiplex-recombinase polymerase amplification.....	72
3.1. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....	73
3.2. การทดสอบหาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	74
3.3. การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	75
3.4. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	76

3.5.	สรุปสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค M-RPA ที่พัฒนาขึ้น	77
4.	ผลการพัฒนาสถานะแถบตรวจ MTB Strip เพื่อตรวจสอบผลผลิต M-RPA	79
4.1.	ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารละลายในส่วนประกอบของปฏิกิริยา M-RPA	80
4.2.	ผลการหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip	81
4.2.1.	ผลการทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ที่เหมาะสมสำหรับแถบตรวจ MTB Strip	81
4.2.2.	ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ Anti-FITC และ Anti-IgG ที่เหมาะสม ...	83
4.2.3.	การทดสอบหาความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate ที่เหมาะสม	84
4.2.4.	ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจสอบต่อผลผลิต M-RPA	86
4.2.5.	สรุปสถานะที่เหมาะสมของแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้น.....	87
4.2.6.	ผลการผลิตแถบตรวจ MTB Strip ด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม	88
4.2.7.	ผลการทดสอบเบื้องต้นของแถบตรวจ MTB Strip ที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม.....	89
5.	ผลการทดสอบหาความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) ของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	90
6.	ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip.....	91
7.	ผลการทดสอบความคงตัวของผลที่ปรากฏอยู่บนแถบตรวจ MTB Strip	94
8.	การทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ MTB Strip.....	95
9.	ผลการวินิจฉัยกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ MTBC และ NTM ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	98
10.	ผลการวินิจฉัยวัณโรคจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	102
10.1.	ผลการหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะ ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip.....	102

10.1.1. ผลการทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ที่ เหมาะสมสำหรับแถบตรวจ MTB Strip	103
10.1.2. การทดสอบปริมาตรของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	104
10.1.3. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 ที่เหมาะสมในการ ทำปฏิกิริยา.....	108
10.1.4. ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	110
10.1.5. ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	115
10.1.6. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจ เสมหะ ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip.....	119
10.2. การวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับ แถบตรวจ MTB Strip.....	120
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	129
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย.....	144
บรรณานุกรม.....	146
ภาคผนวก.....	164
ประวัติผู้เขียน.....	170

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบเทคนิค Isothermal amplification ชนิดต่าง ๆ.....	25
ตารางที่ 3.1 โพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้.....	46
ตารางที่ 3.2 สภาวะตั้งเครื่องที่ใช้ในการทดสอบอายุการเก็บรักษาแถบตรวจ MTB Strip.....	61
ตารางที่ 3.3 ความสัมพันธ์ของการวินิจฉัยเชื้อ MTBC ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis.....	66
ตารางที่ 3.4 ความสัมพันธ์ของการวินิจฉัยเชื้อ MTBC ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับ การวินิจฉัยด้วยการย้อมสีทึบทรด	66
ตารางที่ 3.5 ความสัมพันธ์ของการวินิจฉัยเชื้อ MTBC ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับ การวินิจฉัยด้วยเทคนิค Real-time PCR.....	67
ตารางที่ 3.6 การวิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MTBC จากวิธีต่าง ๆ ด้วยค่าสถิติ Kappa	68
ตารางที่ 3.7 เกณฑ์พิจารณาความสอดคล้องกันของสถิติ Kappa	69
ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษา	70
ตารางที่ 4.2 สรุปลักษณะที่เหมาะสมของเทคนิค M-RPA ที่พัฒนาขึ้น	78
ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารละลายที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยา M-RPA กับแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้น.....	80
ตารางที่ 4.4 สรุปลักษณะที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้น	88
ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบผลการวินิจฉัย MTBC กับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%.....	102
ตารางที่ 4.6 สรุปลักษณะที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะ	120

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบผลการวินิจฉัย MTBC จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะ
จำนวน 131 ตัวอย่าง ของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip กับการตรวจสอบผลผลิต
ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis วิธีการย้อมสีทึบกรด และเทคนิค Real-time PCR 124

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบผลการวินิจฉัย MTBC จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะ
จำนวน 131 ตัวอย่าง ของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip และผลการย้อมสีทึบกรดที่
ระดับต่าง ๆ..... 126



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Lowenstein-Jensen medium (LJ).....	9
รูปที่ 2.2 การติดต่อและการเกิดพยาธิสภาพของวัณโรค	12
รูปที่ 2.3 กระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา RPA	21
รูปที่ 2.4 หลักการทำงานของ Exo probe และ Fpg probe ในการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	32
รูปที่ 2.5 การอ่านผลจากการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยสี SYBR® Green I	34
รูปที่ 2.6 โครงสร้างพื้นฐานและส่วนประกอบของ Lateral flow (LF).....	36
รูปที่ 2.7 การทำงานของแถบตรวจ NALF.....	37
รูปที่ 3.1 โครงสร้างของแถบตรวจเปล่าที่ไม่ได้พันสารที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และได้รับความอนุเคราะห์แถบตรวจจากบริษัท ไอเมต ลาบอราทอรี จำกัด.....	50
รูปที่ 3.2 ตัวอย่างจำลองตำแหน่งของสารต่าง ๆ บนแถบตรวจ MTB Strip สำหรับวินิจฉัยวัณโรค .	52
รูปที่ 3.3 ตัวอย่างจำลองการเกิดปฏิกิริยาระหว่างผลผลิตปฏิกิริยา M-RPA กับแถบตรวจ.....	53
รูปที่ 3.4 การอ่านผลการทดสอบของแถบตรวจ MTB Strip ภายหลังตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่จำเพาะต่อ IS1081 และ IS6110 ของเชื้อ MTBC สำหรับการวินิจฉัยวัณโรค.....	54
รูปที่ 4.1 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS6110 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบในการศึกษานี้ และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	71
รูปที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างผลผลิต PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ IS6110 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ IS6110 ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv (Accession no. NC_000962).....	72

รูปที่ 4.3 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%	73
รูปที่ 4.4 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเท่ากับ 1 5 10 15 และ 20 ng/ μ l และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%.....	74
รูปที่ 4.5 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA โดยใช้ไพรมอร์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.12 0.24 และ 0.48 μ M และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%.....	75
รูปที่ 4.6 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA โดยใช้ระยะเวลาที่ 5 10 15 และ 20 นาที และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%.....	76
รูปที่ 4.7 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA โดยใช้อุณหภูมิ 35 37 39 41 และ 43 องศาเซลเซียส และตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%.....	77
รูปที่ 4.8 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA ในสภาวะที่เหมาะสม และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%	78
รูปที่ 4.9 ผลการตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค M-RPA ด้วยแถบตรวจ MTB Strip ที่อยู่ในขั้นตอนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม	79
รูปที่ 4.10 ผลการตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%	82
รูปที่ 4.11 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้อัตราส่วนถูกเจือจางผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS เท่ากับ 1:3 1:6 และ 1:10 (M-RPA:PBS)	82
รูปที่ 4.12 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้ความเข้มข้นของ Anti-FITC และ Anti-IgG ที่ตำแหน่ง Test line และ Control line ตามลำดับ เท่ากับ 1 0.8 0.6 0.4 และ 0.2 mg/ml.....	84
รูปที่ 4.13 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้ความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate เท่ากับ OD10 OD8 OD6 OD4 และ OD2	85

รูปที่ 4.14 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้ระยะเวลาของการจุ่มทดสอบเท่ากับ 5 10 15 20 25 และ 30 นาที 87

รูปที่ 4.15 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ในสภาวะที่เหมาะสมที่พัฒนาขึ้น 88

รูปที่ 4.16 แถบตรวจและบรรจุภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม 89

รูปที่ 4.17 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม 89

รูปที่ 4.18 ผลการทดสอบหาค่า LOD ของเทคนิค M-RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip 90

รูปที่ 4.19 ผลการทดสอบหาค่า LOD ของเทคนิค M-RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 2.5% 91

รูปที่ 4.20 ผลการทดสอบหาปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นของเทคนิค M-RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip 92

รูปที่ 4.21 ผลการทดสอบหาปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นของเทคนิค M-RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% 93

รูปที่ 4.22 ผลการทดสอบความคงตัวของผลที่ปรากฏอยู่บนแถบตรวจ MTB Strip หลังจากตรวจสอบ 94

รูปที่ 4.23 ผลการทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ MTB Strip ที่ถูกจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ก่อนนำไปใช้ตรวจสอบผลผลิต M-RPA..... 96

รูปที่ 4.24 ผลการทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ MTB Strip ที่ถูกจัดเก็บที่อุณหภูมิห้อง ไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ก่อนนำไปใช้ตรวจสอบผลผลิต M-RPA 97

รูปที่ 4.25 ผลการทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ MTB Strip ที่ถูกเก็บรักษาในสภาวะดีกรีเยต เพื่อจำลองการจัดเก็บที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 1 1.5 2 และ 3 ปี ก่อนนำไปใช้ตรวจสอบผลผลิต M-RPA 98

รูปที่ 4.26 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ MTBC ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip 99

รูปที่ 4.27 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ MTBC ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%	100
รูปที่ 4.28 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ NTM ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	100
รูปที่ 4.29 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ NTM ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%	101
รูปที่ 4.30 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะบนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้อัตราส่วนถูกเจือจางผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS เท่ากับ 1:3 1:5 และ 1:10 (M-RPA:PBS)	103
รูปที่ 4.31 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะบนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาตรเท่ากับ 1 2 5 และ 10 μ l	105
รูปที่ 4.32 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาตรเท่ากับ 1 2 5 และ 10 μ l	107
รูปที่ 4.33 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะบนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้เข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 เท่ากับ 0.24 μ M	109
รูปที่ 4.34 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% ที่ใช้เข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 เท่ากับ 0.24 μ M	110
รูปที่ 4.35 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะบนแถบตรวจ MTB Strip ที่ระยะเวลาบ่ม 15 20 25 และ 30 นาที	112
รูปที่ 4.36 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% ที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 15 20 25 และ 30 นาที	114
รูปที่ 4.37 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะบนแถบตรวจ MTB Strip ที่อุณหภูมิ 37 39 และ 41 องศาเซลเซียส	116
รูปที่ 4.38 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% ที่อุณหภูมิ 37 39 และ 41 องศาเซลเซียส	118

รูปที่ 4.39 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ ด้วยเทคนิค M-RPA
 ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip 121

รูปที่ 4.40 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ ด้วยเทคนิค M-RPA
 ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% 122



บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วัณโรค หรือ Tuberculosis (TB) เกิดจากการติดเชื้อกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) และเป็นโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากที่สุดในโลก จึงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในปัจจุบัน โดยส่วนใหญ่พบการแพร่ระบาดของวัณโรคอยู่ในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา (1-4) ในปี ค.ศ. 2018 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้รายงานจำนวนผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ จำนวนทั้งสิ้น 9 ล้านราย และมีจำนวนผู้เสียชีวิต 2 ล้านราย จากสถิติพบว่าในทุกหนึ่งนาที่จะพบผู้เสียชีวิตจากวัณโรคอย่างน้อย 3 ราย (1) ในขณะที่ประเทศไทยติดอันดับในกลุ่ม 14 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรคสูงสุด โดยพบทั้งผู้ป่วยวัณโรค ผู้ป่วยวัณโรคที่มีการติดเชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) ร่วมด้วย (TB-HIV) และผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multiple drug-resistant TB, MDR-TB) (3) ปัจจุบันประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 120,000 ราย และเสียชีวิตปีละ 12,000 ราย การลดอัตราการเกิดของวัณโรคจึงเป็นเป้าหมายสำคัญที่กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย ได้กำหนดแนวทางปฏิบัติ เพื่อให้สอดคล้องตามเป้าหมายยุติวัณโรคขององค์การอนามัยโลก (5)

วัณโรคสามารถเกิดได้ในทุกอวัยวะของร่างกายของผู้ป่วย แต่ประเภทของวัณโรคที่พบมากที่สุดคือ วัณโรคปอด (Pulmonary tuberculosis) ซึ่งติดต่อผ่านการหายใจเอาละอองของเชื้อที่แพร่กระจายผ่านทางอากาศ (Airborne transmission) ทำให้การติดต่อเกิดขึ้นได้ง่ายในวงกว้าง การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการเพื่อช่วยยืนยันการวินิจฉัยทางคลินิกมีความสำคัญมาก เนื่องจากหากตรวจพบผู้ป่วยวัณโรคได้รวดเร็ว จะสามารถให้การรักษาได้อย่างถูกต้อง ซึ่งส่งผลต่อการลดการแพร่ระบาดของโรคได้ (3, 4) การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน นิยมเก็บสิ่งส่งตรวจเสมหะ (Sputum) เพื่อนำมาวินิจฉัยด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การย้อมด้วยสีทึนกรด (Acid fast stain) ร่วมกับการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นที่ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง มีความจำเพาะและสามารถตรวจได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่มีความไวต่ำและไม่สามารถแยกกว่าเป็นวัณโรคดื้อยาหรือไวต่อยาได้ (6-9) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เป็นการตรวจยืนยันวัณโรคที่เป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ที่มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ใช้เวลานานหลายสัปดาห์ (7, 9-12) และการทดสอบทางอณูชีววิทยา (Molecular testing) ที่อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) มีความจำเพาะสูง และใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีการทดสอบทางอณูชีววิทยาที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก สำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจเสมหะและโคลนิจของเชื้อ ได้แก่ เทคนิค Xpert[®] MTB/RIF (บริษัท Cepheid จำกัด, สหรัฐอเมริกา) ซึ่งอาศัยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ IS1081 และ IS6110 และยีน *rpoB* สำหรับวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยา Rifampicin ซึ่งมีประสิทธิภาพในการทดสอบที่รวดเร็วและจำเพาะ แต่ต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะและมีราคาค่าใช้จ่ายสูง (1, 6, 10-14)

ในปี ค.ศ. 2003 Iwamoto และคณะ (15) ได้พัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ (Isothermal amplification) ภายในระยะเวลาไม่ถึง 1 ชั่วโมง (16) เพื่อนำมาตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ในเสมหะครั้งแรก (15) จนได้มีการพัฒนาต่อมาเป็น Tuberculosis-Loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) (บริษัท Eiken Chemical จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น) ที่องค์การอนามัยโลกรับรองให้นำมาใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคได้ และเป็นเทคนิคที่มีความไว และความจำเพาะสูง อีกทั้งมีขั้นตอนการปฏิบัติที่ง่าย สามารถนำมาใช้เป็นการทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วย (Point-of-care-testing, POCT) (12, 17) อย่างไรก็ตาม พบข้อจำกัดบางประการ อาทิเช่น การปนเปื้อนง่ายระหว่างปฏิกิริยา และความซับซ้อนในการออกแบบไพรเมอร์ ที่ต้องใช้ไพรเมอร์อย่างน้อย 4-6 ตำแหน่งต่อยีนเป้าหมาย (18, 19)

เทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ และเริ่มมีการศึกษานำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องมาจากข้อได้เปรียบที่มากกว่าเทคนิค Isothermal amplification อื่น ๆ หลายประการ อาทิเช่น การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิ 25-42 องศาเซลเซียส และปฏิกิริยาส่วนใหญ่สามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จึงสามารถใช้เพียงกล่องควบคุมอุณหภูมิทั่วไปที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการในการดำเนินปฏิกิริยา มีขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์และขั้นตอนการทดสอบไม่ยุ่งยาก มีระยะเวลาการทดสอบที่รวดเร็วประมาณ 10 - 40 นาที (20-22) อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจหาสารพันธุกรรม

จำนวนตั้งต้นในระดับต่ำได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงมีการนำเทคนิค RPA มาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยทางอณูชีววิทยาต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในปัจจุบัน อาทิเช่น การวินิจฉัยวัณโรคด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ (23) หรือการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจ (20) เป็นต้น นอกจากนี้เทคนิค RPA ยังมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจแบบรวดเร็ว และการตรวจแบบ POCT เพื่อวินิจฉัยทางอณูชีววิทยาได้อีกมากมาย (24)

การศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำยีนที่มีความอนุรักษ์ (Conserved region) และจำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* มาใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ตัวอย่างเช่น ยีน 16S rRNA (25) 23S rDNA (26, 27) และยีน *rpoB* (28) เป็นต้น แต่พบว่ามีควมไวและความจำเพาะที่ต่ำต่อเชื้อ *M. tuberculosis* ปัจจุบันการวินิจฉัยวัณโรคนิยมใช้กลุ่ม Insertion sequence element (IS) ซึ่งเป็นลำดับดีเอ็นเอสายสั้นๆ และจำนวนซ้ำกันที่อยู่ภายในจีโนมของแบคทีเรียทำหน้าที่เป็น Transposable element ซึ่งหมายถึงลำดับดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนที่เปลี่ยนตำแหน่งภายในจีโนมได้ โดย Insertion sequence มีลักษณะที่สำคัญสองประการ ได้แก่ มีขนาดประมาณ 700 – 2,500 bp เหมือนกับ Transposable element อื่น ๆ และส่วนที่ถอดรหัสไปเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ Transposition activity นอกจากนี้ตำแหน่งที่ถอดรหัส (Coding protein) ใน Insertion sequence มักมีลำดับดีเอ็นเอที่ซ้ำ ๆ กัน ซึ่งถูกล้อมรอบด้วย Inverted repeat ของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 15 เบส (29, 30) Insertion sequence ที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ประกอบไปด้วย Insertion sequence 1081 หรือ IS1081 ซึ่งพบได้ประมาณ 5-8 copies ในเชื้อ *M. tuberculosis* ทุกสายพันธุ์ (23, 27, 31-33) ในขณะที่ Insertion sequence 6110 หรือ IS6110 พบได้เชื้อ *M. tuberculosis* เกือบทุกสายพันธุ์ โดยพบสูงสุด 25 copies แต่มีบางสายพันธุ์พบเพียง 1 copy หรือตรวจไม่พบเลย ตำแหน่ง Insertion sequence จึงเป็นตำแหน่งที่มีความไวและความจำเพาะสูงต่อเชื้อ *M. tuberculosis* จึงมีการนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยเทคนิคอณูชีววิทยาหลายเทคนิค รวมไปถึงเทคนิค Xpert® MTB/RIF (34) ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก หรือเทคนิคอื่นที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นมา การศึกษาของ Singpanomchai และคณะ (23) ได้ใช้ IS1081 และ IS6110 เป็นต้นแบบในการพัฒนาเทคนิค RPA เพื่อวินิจฉัยวัณโรค ร่วมกับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยการเติมสี SYBR®Green I พบว่ามีความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 97.95-99.32% และ 100% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR

การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยหลักการ Lateral flow ถูกนำมาใช้ ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และถูกเรียกว่า Nucleic acid lateral flow immunoassay (NALF) โดยอาศัยหลักการดัดแปลงไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มสาร พันธุกรรมเป้าหมายด้วยการติดฉลากไว้ปลายด้าน 5' ของไพรเมอร์ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ผลผลิตดี เอ็นเอสายคู่ถูกติดฉลากไว้ทั้ง 2 ด้าน ฉลากด้านแรกใช้เป็นส่วนที่จับกับโมเลกุลของแอนติบอดีที่ จำเพาะที่ถูกเคลือบอยู่บนแถบตรวจ ทำให้ผลผลิตอยู่บนตำแหน่งที่ต้องการบนแถบตรวจนั้น ฉลาก ด้านที่สองจับกับโมเลกุลที่เป็นตัวปล่อยสัญญาณ เพื่อใช้ในการอ่านผลจากสัญญาณที่เกิดขึ้นบนแถบ ตรวจ NALF (35) มีข้อได้เปรียบมากกว่าเทคนิค Agarose gel electrophoresis ที่เป็นเทคนิคพื้นฐาน ในการอ่านผลของปฏิกิริยาภายหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เนื่องจากไม่ต้องอาศัยเครื่องมือ เพิ่มเติมในการอ่านผล สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าทันที ใช้ระยะเวลาในทดสอบเพียง 5-15 นาที อีกทั้งสามารถพกพาออกนอกพื้นที่ห้องปฏิบัติการ จึงสามารถนำไปใช้ในงาน ณ จุดดูแลคนไข้ได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาแบบ Multiplex ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเมื่อ เทียบกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR®Green I ที่ไม่สามารถใช้ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสาร พันธุกรรมแบบ Multiplex ได้ (36) Hu และคณะ (37) พัฒนาเทคนิค RPA ร่วมกับ NALF ในการ ตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ในนม โดยใช้ไพรเมอร์ STF1, STF2 และ STF3 ที่มี การ ติดฉลากด้วย FAM และ Digoxin เพื่อใช้ตรวจจับผลผลิตด้วย NALF โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา RPA เพียง 10 นาที ภายใต้อุณหภูมิช่วง 40-42 องศาเซลเซียส และสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ภายในเวลา 10 นาที Lalremruata และคณะ (38) ใช้เทคนิค Real-time-RPA ร่วมกับ Lateral Flow ตรวจสอบเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในผู้ป่วยมาลาเรีย และสามารถตรวจพบปริมาณเชื้อใน เลือดน้อยที่สุด เท่ากับ 64 Parasites/ml และมีความไวถึง 90% เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Real-time quantitative PCR ในขณะที่ Jiang และคณะ (39) ได้พัฒนาเทคนิค Recombinase polymerase amplification-lateral flow (RPA-LF) assay ร่วมกับ Immunomagnetic separation (IMS) สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในหอยนางรมดิบ พบว่ามี ความไวและความสูงจำเพาะ สามารถทดสอบได้ผลรวดเร็วมากกว่าเทคนิค (IMS-PCR) ซึ่งเป็นวิธีการ ดั้งเดิม

ในการศึกษาครั้งนี้ จึงสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคสำหรับการตรวจทางห้องปฏิบัติ เพื่อวินิจฉัยวัณโรค ภายใต้แนวความคิดของการทดสอบที่ใช้เวลาน้อย มีความไวและความจำเพาะสูง ไม่ใช้เครื่องมือ

วิทยาศาสตร์ที่มีราคาแพง สามารถนำไปใช้ในโรงพยาบาลขนาดเล็ก โรงพยาบาลภาคสนาม หรือจุดดูแลผู้ป่วย ได้ง่าย ดังนั้น จึงเป็นที่มาของพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip แบบอ่านผลด้วยตาเปล่าอย่างรวดเร็ว สำหรับวินิจฉัยวัณโรคจากปฏิกิริยา Multiplex-recombinase polymerase amplification โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ IS1081 และ IS6110 ร่วมกับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Multiplex-RPA (M-RPA) และการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วย NALF ที่สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่า ซึ่งเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถทดสอบเสร็จสิ้นได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่ถึง 1 ชั่วโมง ทำให้นำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อวัณโรคได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และสามารถนำไปใช้ในโรงพยาบาลขนาดเล็กได้ หรือโรงพยาบาลที่อยู่ห่างไกลความเจริญ ทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากสามารถเข้าถึงการวินิจฉัยได้ง่ายขึ้น ส่งผลต่อการพิจารณาให้การรักษาที่เหมาะสมต่อไป อันจะช่วยลดจำนวนผู้ป่วยวัณโรคได้

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip แบบอ่านผลด้วยตาเปล่าอย่างรวดเร็ว สำหรับวินิจฉัยวัณโรคจากปฏิกิริยา M-RPA

2.2 เพื่อประเมินประสิทธิภาพแถบตรวจ MTB Strip แบบอ่านผลด้วยตาเปล่าอย่างรวดเร็ว สำหรับวินิจฉัยวัณโรคจากปฏิกิริยา M-RPA เปรียบเทียบกับการย้อมสีทึบกรด และเทคนิค Real-time PCR

3. ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษานี้ได้พัฒนาแถบตรวจ MTB Strip แบบอ่านผลด้วยตาเปล่าอย่างรวดเร็ว ที่ใช้เทคนิค M-RPA ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิเดียวคงที่ และตรวจสอบผลผลิตสารพันธุกรรมด้วยแถบตรวจ MTB Strip ซึ่งอาศัยหลักการ NALF สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่า โดยแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้นทำการตรวจวินิจฉัยวัณโรคจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากโคลนินของเชื้อ *Mycobacterium* จำนวน 130 ตัวอย่าง และตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ จำนวน 131 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่เหลือจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล และห้องปฏิบัติการงานจุลชีววิทยา โรง

พยาบาลเลิดสิน กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอจากโคโลนีถูกนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT 64 (SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test (สำหรับเชื้อกลุ่ม MTBC) และเทคนิค Sanger DNA Sequencing บริเวณยีน 16S rRNA (สำหรับเชื้อกลุ่ม Nontuberculous mycobacteria, NTM) ในขณะที่ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะถูกนำมาเปรียบเทียบกับการย้อมสีทึบกรด และเทคนิค Real-time PCR เพื่อประเมินประสิทธิภาพของแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้ร่วมกับปฏิกิริยา M-RPA

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

สามารถพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจวินิจฉัยคัดกรองวัณโรคได้อย่างรวดเร็ว ราคาไม่แพง ใช้งานง่าย ทำให้ผู้ป่วยสามารถได้รับการรักษาได้อย่างเหมาะสมและทันท่วงที ส่งผลต่อการลดการแพร่ระบาดของวัณโรค



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. วัณโรค (Tuberculosis, TB)

วัณโรคเป็นโรคติดต่อทางเดินหายใจชนิดเรื้อรังซึ่งแพร่กระจายได้ในอากาศ (40) โดยมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) ประกอบด้วย 11 สปีชีส์ ได้แก่ *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium suricattae*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium dassie* และ *Mycobacterium oryx* (7) อย่างไรก็ตาม เชื้อกลุ่ม MTBC สายพันธุ์ที่พบว่าเป็นสาเหตุหลักของการเกิดวัณโรค คือ เชื้อ *M. tuberculosis* โดยส่วนใหญ่พบการก่อโรคในปอด (Pulmonary TB) และอาจก่อให้เกิดวัณโรคนอกปอด (Extrapulmonary TB) ที่มีการติดเชื้อจากปอดผ่านทางกระแสเลือดไปยังอวัยวะอื่น เช่น ต่อม น้ำเหลือง กระดูก เยื่อหุ้มสมอง เป็นต้น วัณโรคมีการดำเนินของโรค โดยแบ่งเป็น (1, 41)

- วัณโรคแฝง (Latent TB หรือ Inactive TB) คือ การติดเชื้อ *M. tuberculosis* แอบแฝงอยู่ในเนื้อเยื่อของร่างกาย แต่มีปริมาณเชื้อที่น้อยและไม่ก่อให้เกิดอาการแสดงออก เนื่องมาจากการถูกควบคุมด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่ให้มีการแบ่งตัวและไม่สามารถแพร่กระจายไปยังผู้อื่นได้
- วัณโรคแสดงอาการ (Active TB) คือ การติดเชื้อ *M. tuberculosis* และมีการแสดงอาการต่าง ๆ ของโรค เนื่องมาจากภูมิคุ้มกันของร่างกาย ไม่สามารถกำจัดหรือเก็บกักตัวเชื้อ สามารถตรวจพบเชื้อในเสมหะ และแพร่กระจายเชื้อติดต่อไปยังผู้อื่นได้

2. สถานการณ์วัณโรค

วัณโรคเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญระดับประเทศและระดับโลก ถึงแม้ปัจจุบันวัณโรคสามารถรักษาหายได้ แต่อัตราการติดเชื้อและอัตราการตายยังคงสูงทั่วโลก โดยอัตราการตายที่มีสาเหตุมาจากวัณโรคเป็นอันดับสองรองจากโรคเอดส์ จากรายงานการประชุมเกี่ยวกับวัณโรคขององค์การ

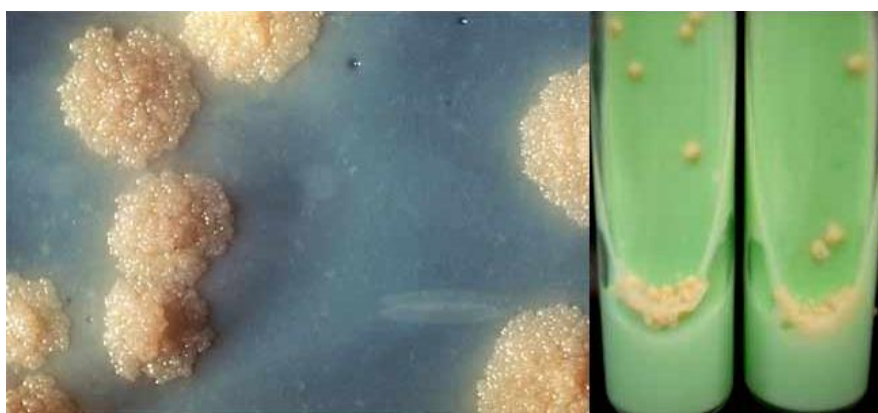
อนามัยโลก ประจำปี พ.ศ. 2561 ระบุว่าในปี พ.ศ. 2560 มีประชากรจากทั่วโลกถึง 10 ล้านคน ติดเป็นวัณโรค โดยมีประชากรจำนวน 1.3 ล้านคน เสียชีวิตจากการติดวัณโรคที่ไม่ได้ติดเชื้อร่วมกับเชื้อ Human immunodeficiency virus (HIV) ในขณะที่มีประชากรจำนวน 3 แสนคน เสียชีวิตจากการติดวัณโรคร่วมกับเชื้อ HIV การเกิดวัณโรคสามารถพบได้ในทุกกลุ่มอายุ อย่างไรก็ตามพบว่า 90% ของผู้ที่ติดเชื้อเป็นผู้ใหญ่ที่มีอายุมากกว่า 15 ปีขึ้นไป วัณโรคมีอุบัติการณ์สูงในประเทศแถบภูมิภาคเอเชียและแอฟริกาโดยประเทศที่มีอัตราผู้ป่วยวัณโรคสูงที่สุดอันดับหนึ่ง คือ ประเทศอินเดีย รองลงมาคือประเทศอินโดนีเซียและประเทศไนจีเรียตามลำดับ ในขณะที่ประเทศไทยเป็น 1 ใน 22 ประเทศที่มีวัณโรคสูงสุดของโลก และเป็น 1 ใน 14 ประเทศที่มีอัตราการป่วยเป็นวัณโรคสูงสุดทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ วัณโรค วัณโรคร่วมกับการติดเชื้อ HIV (HIV/TB) และวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) โดยในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีอัตราผู้ป่วยวัณโรคเท่ากับ 120,000 คน ซึ่งมีผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อร่วมกับเชื้อ HIV จำนวน 11,000 คน (1, 3, 5) วัณโรคจึงนับเป็นปัญหาวิกฤตทางสาธารณสุขในประเทศไทย ซึ่งมีปัจจัยเสี่ยง 5 ปัจจัยหลัก ที่ก่อให้เกิดวัณโรคในประเทศ ได้แก่ การสูบบุหรี่ การขาดสารอาหาร โรคเบาหวาน การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV (3, 5)

3. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *M. tuberculosis*

เชื้อ *M. tuberculosis* เป็นสาเหตุหลักของวัณโรคที่พบในคน จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ *Mycobacteriaceae* จินัส *Mycobacterium* ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Obligate aerobe) ไม่สามารถเคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) และไม่สร้างแคปซูล (non-capsule forming)

ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic morphology) ของเชื้อ *M. tuberculosis* มีรูปร่างเป็นแท่งตรง (Bacilli) หรือโค้งงอเล็กน้อย เรียวยาว ขนาดประมาณ 1-10 μm โดย *M. tuberculosis* ย้อมติดสีแกรมบวก ซึ่งบางครั้งอาจติดสีไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อประกอบไปด้วยไขมันที่มีชื่อว่า Mycolic acid จำนวนมาก ทำให้ผนังเซลล์มีความหนา สามารถทนกรด-ด่าง และสารเคมีต่าง ๆ และสามารถทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่แห้งได้หลายสัปดาห์ (39, 41-43) จากคุณสมบัติของชั้นไขมันที่หนาที่ผนังเซลล์ ยังส่งผลให้เชื้อสามารถย้อมติดสีทนกรด ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* และนำมาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อได้

ลักษณะโคโลนีของเชื้อ (Macroscopic morphology) *M. tuberculosis* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบสารอาหารของกรดอะมิโน (Amino) หรือแอมโมเนีย (Ammonia) เป็นแหล่งไนโตรเจนและ กลีเซอรอล (Glycerol) เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตช้า โดยสามารถสังเกตเห็นโคโลนีภายใต้ระยะเวลาประมาณ 4 ถึง 6 สัปดาห์ ลักษณะของโคโลนีสามารถพบได้ตั้งแต่โคโลนีแบบเรียบ หรือมีผิวขรุขระ สีเหลืองครีม คล้ายดอกกะหล่ำ (Cauliflower-like appearance) (39, 41, 44, 45)



รูปที่ 2.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *M. tuberculosis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Lowenstein-Jensen medium (LJ)(46)

ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์แรก ที่ถูกถอดรหัสลำดับดีเอ็นเอทั้งจีโนมอย่างสมบูรณ์ คือ H37Rv ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการและยังมีปัจจัยในการก่อความรุนแรงของโรค (47, 48) ขนาดจีโนมของ *M. tuberculosis* H37Rv (NC_00962.3) มีขนาดประมาณ 4.4 ล้านคู่เบส (bp) และมีจำนวนยีน 4,090 ยีน ที่ทราบหน้าที่ชัดเจน 73.2% (48) โดยแต่ละยีนมีความยาวเฉลี่ย 1,079 bp ต่อ 1 ยีน ภายในจีโนมมีสัดส่วนของดีเอ็นเอที่มีการซ้ำกัน (Repetitive DNA sequence) ประมาณ 3.4% มีการกระจายอยู่ทั่วจีโนม โดยเฉพาะบริเวณที่เรียกว่า Insertion sequence element (IS) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอขนาดเล็กที่สามารถย้ายตำแหน่ง (Transposition) ได้

เชื้อ *M. tuberculosis* พบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป สามารถก่อให้เกิดโรคได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ที่ติดเชื้อ HIV ผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ที่มีสภาวะขาดสารอาหาร ผู้ป่วย

โรคมะเร็ง หรือผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เนื่องจากจากสภาวะภูมิคุ้มกันของกลุ่มคนดังกล่าวไม่สามารถต้านทานหรือกำจัดเชื้อได้ (49)

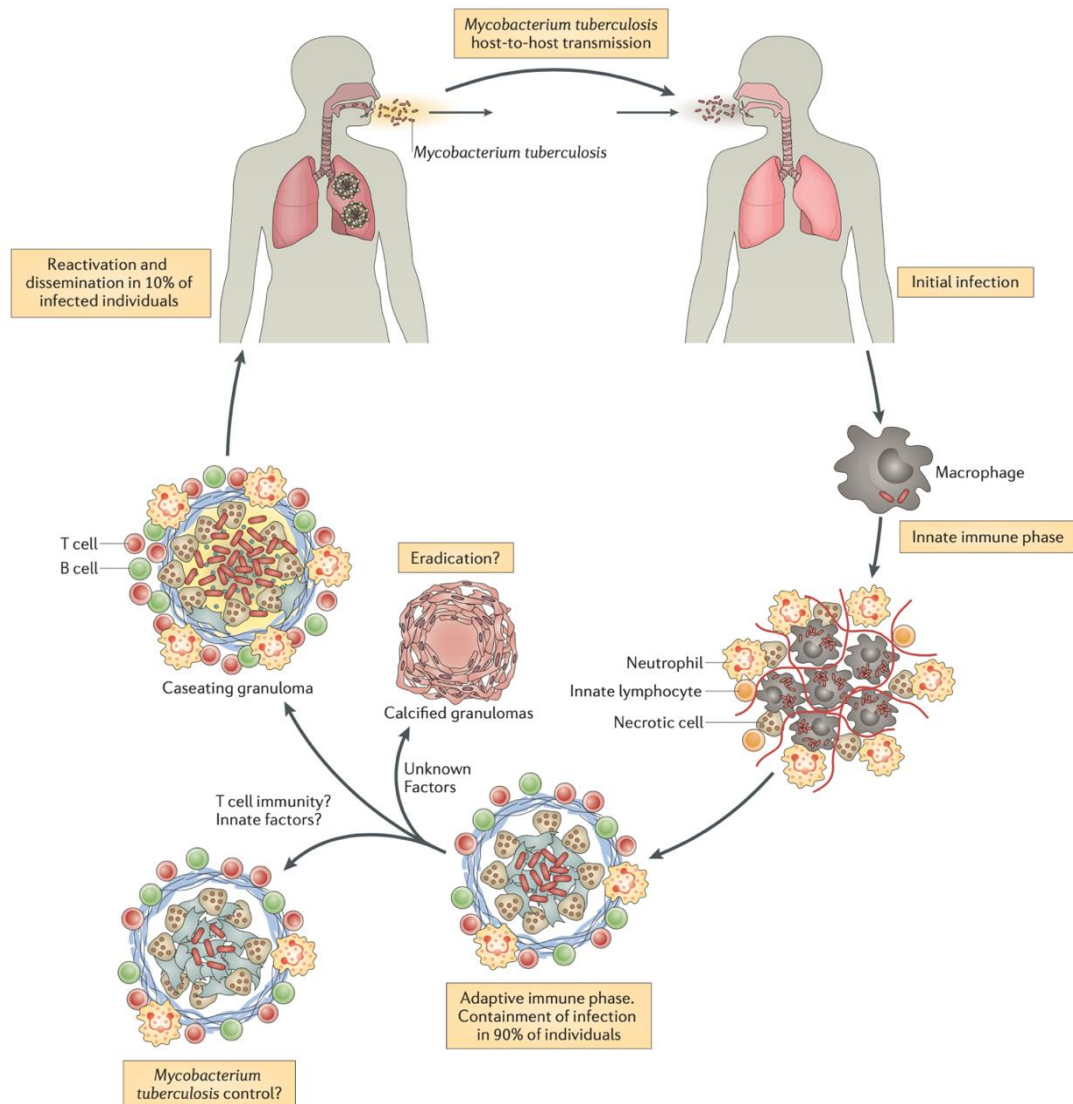
4. อาการ การติดต่อและการเกิดพยาธิสภาพของวัณโรค

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่แพร่กระจายผ่านทางอากาศ จึงมักติดต่อผ่านการหายใจเป็นหลัก เมื่อผู้ป่วยติดวัณโรค จะมีการแสดงอาการที่พบบ่อย ได้แก่ อาการไอเรื้อรัง (Chronic cough) มากกว่า 2 สัปดาห์ มีลักษณะไอแห้งในช่วงแรก และกลายเป็นไอมีเสมหะ หรือไอปนเลือดในภายหลัง เจ็บหน้าอก จากอาการปอดอักเสบเรื้อรังและหายใจหอบถี่ มีไข้ต่ำ โดยมักเป็นช่วงบ่ายร่วมกับมีเหงื่อออกในเวลากลางคืนจากการสร้างไข้ อ่อนเพลียไม่มีแรง น้ำหนักลด เนื่องจากการขาดความอยากอาหาร หรืออาจมีอาการภาวะต่อมน้ำเหลืองโตบริเวณคอ หากทำการตรวจหารอยโรคที่ปอด พบลักษณะเนื้อปอดเป็นฝ้า (Infiltration) เป็นโพรง (Cavity) ก้อนกลม (Nodule) หรือเป็นเนื้อแข็ง (Consolidation) ซึ่งเกิดจากการอักเสบเรื้อรัง (4, 9)

วัณโรคติดต่อผ่านทางเดินหายใจจากละอองฝอยขนาดเล็ก (Aerosol transmission) โดยอาจพบการติดต่อผ่านระบบทางเดินอาหารหรือผิวหนัง (50) การติดต่อผ่านการฉีดวัคซีนเข้าร่างกายโดยตรง (Direct inoculation) (23) การสัมผัสเนื้อเยื่อที่เป็นวัณโรค การได้รับเชื้อผ่านทางบาดแผลหรือเยื่อตาขาว และการติดต่อจากแม่สู่ลูก (51, 52) ได้เพียงส่วนน้อย กลไกการเกิดวัณโรคเริ่มจากภายหลังได้รับเชื้อ *M. tuberculosis* ที่อยู่ในละอองฝอย (Aerosol droplets) ขนาดประมาณ 1 ถึง 5 μm ที่แพร่มาจากผู้ป่วยวัณโรค ผ่านการไอ จาม หรือพูดคุย เชื้อจะเดินทางเข้าสู่ปอดไปยังถุงลม (Alveoli) และถูกจับกิน (Phagocytosis) ด้วยแมคโครฟาจ (Macrophage) ที่อยู่ในถุงลม ทำให้เกิดการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immunity) โดยแมคโครฟาจเหล่านี้ยังไม่ถูกกระตุ้นด้วยเซลล์ลิมโฟไซท์ชนิดที (T-lymphocyte) ทำให้มีความสามารถในการทำลายเชื้อต่ำ เมื่อแมคโครฟาจไม่สามารถทำลายเชื้อได้ เชื้อวัณโรคจะแบ่งตัวในเซลล์ทำให้แมคโครฟาจตาย และกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องให้มายังบริเวณนั้น เพื่อจับกินและควบคุมเชื้อ และสร้างแกรนูโลมาขึ้นมาปกคลุม หากเชื้อ *M. tuberculosis* ไม่ถูกทำลาย แต่หลบซ่อนอยู่ภายในแกรนูโลมา จะทำให้เกิดเป็นวัณโรคแฝง ในทางตรงกันข้ามหากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่เพียงพอในการควบคุมและกำจัดเชื้อ *M. tuberculosis* ทำให้เกิดการแบ่งตัวและแสดงอาการออกมา (รูปที่ 2.2) อีกหนึ่งสาเหตุมาจากระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ ส่งผลให้แกรนูโลมาสูญเสียหน้าที่และโครงสร้าง ทำให้เชื้อ *M. tuberculosis*

มีการแบ่งตัวและกระจายไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงหรืออวัยวะอื่น ๆ ผ่านทางระบบไหลเวียนโลหิตและน้ำเหลือง โดยมักไปที่ต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้ก่อน คือ ต่อมน้ำเหลืองที่ซั้วปอด (Hilar lymph nodes) ทำให้มีอีกเสบภายในปอดและแสดงอาการออกมา นอกจากนี้เชื้อจะแพร่กระจายออกนอกปอด ไปยังอวัยวะอื่น ๆ ก่อให้เกิดวัณโรคนอกปอด สำหรับผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคแฝงจะถูกกระตุ้น (Reactivation) ให้กลายเป็นผู้ป่วยวัณโรคแสดงอาการภายหลังได้ เมื่อสภาวะภูมิคุ้มกันภายในร่างกายอ่อนแอลง ส่งผลโครงสร้างแกรนูโลมาถูกทำลาย และเชื้อสามารถหลบหนีออกมา ทำให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งของไซโตไคน์ออกมาและทำลายเนื้อเยื่อปอด จึงพบรอยโรคที่มีลักษณะเป็นโพรง ซึ่งตรวจพบได้จากการถ่ายภาพรังสี (X-ray) ทรวงอก นอกจากนี้เชื้อยังสามารถแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนในแมคโครฟาจ ทำให้เซลล์แมคโครฟาจตาย และมีการปล่อยไซโตไคน์ เช่น TNF-alpha ที่กระตุ้นการสร้างแกรนูโลมาพร้อมกับทำลายเนื้อเยื่อต่าง (53, 54)





รูปที่ 2.2 การติดต่อและการเกิดพยาธิสภาพของวัณโรค (55)

5. การวินิจฉัยวัณโรคในห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคประกอบไปด้วย การซักประวัติ การตรวจร่างกาย การตรวจรังสีวินิจฉัย ทรวงอก และการตรวจทางจุลชีววิทยาในห้องปฏิบัติการที่ช่วยยืนยันผลการวินิจฉัยวัณโรคแก่ผู้ป่วย ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

5.1. การเก็บสิ่งส่งตรวจ

การเก็บสิ่งส่งตรวจต้องมีขั้นตอนที่ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือ เพื่อให้ผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการมีความถูกต้องและแม่นยำมากที่สุด ดังนั้นการเก็บสิ่งส่งตรวจสำหรับเชื้อวัณโรค ซึ่งมักเกิดขึ้นที่ปอดจึงมีการเก็บเสมหะ (Sputum) หรือตัวอย่างอื่น ๆ จากปอด เช่น น้ำล้างปอด (Bronchoalveolar lavage; BAL) ส่วนวัณโรคนอกปอด อาจมาในรูปแบบอื่น ๆ ได้แก่ ชี้นเนื้อ ผิวหนัง ปัสสาวะ เลือด น้ำไขสันหลัง หรือสิ่งส่งตรวจอื่น ๆ ตามอวัยวะที่ติดเชื่อนั้น

5.1.1. การเก็บสิ่งส่งตรวจเสมหะ

เสมหะ เป็นสิ่งส่งตรวจหลักที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค โดยควรมีการเก็บเสมหะให้ได้ทั้งคุณภาพและปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจากอาจส่งผลต่อการตรวจวิเคราะห์ ในการเก็บเสมหะ ควรเก็บต่อเนื่องกัน 3 ครั้ง ติดต่อกันใน 3 วัน โดยระยะห่างระหว่างการเก็บแต่ละตัวอย่าง 8-24 ชั่วโมง ทั้งนี้ 1 ใน 3 ของตัวอย่างต้องเป็นตัวอย่างที่ถูกเก็บในตอนเช้าหลังตื่นนอน (Early morning sputum) เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อ (56) จากการรายงานพบว่าการเก็บตัวอย่างเสมหะครั้งแรก สามารถตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ประมาณ 85% ในขณะที่ครั้งที่สองและครั้งที่สามสามารถพบได้ประมาณ 10% และ 3% ตามลำดับ (57) ปริมาตรของเสมหะในการเก็บแต่ละครั้งควรมีประมาณ 5-10 ml บรรจุใส่ในภาชนะปากกว้าง ที่มีความลึก 5-6 cm มีฝาปิดแบบเกลียว และควรส่งไปยังห้องปฏิบัติการโดยเร็ว หรือเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.1.2. การเก็บสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น

ในบางกรณีที่ไม่สามารถเก็บสิ่งส่งตรวจเสมหะได้ เช่น ในเด็กเล็ก หรือในผู้ป่วยบางราย จึงมีความจำเป็นต้องเก็บสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น เช่น การเก็บเสมหะโดยการกระตุ้น (Induced sputum) ซึ่งใช้เครื่องพ่นละอองฝอย เพื่อช่วยกระตุ้นการสร้างเสมหะ ทำให้เสมหะที่ได้มีลักษณะคล้ายกับน้ำลายมาก การเก็บตัวอย่างน้ำล้างกระเพาะ (Gastric aspiration) ซึ่งทำการเก็บต่อเมื่อผู้ป่วยไม่สามารถใช้วิธีการเก็บเสมหะแบบการกระตุ้นได้ การเก็บวิธีนี้จะมีโอกาสตรวจพบเชื้อน้อยลงไป และการเก็บตัวอย่างน้ำล้างหลอดลม (Bronchoalveolar lavage, BAL) เป็นสิ่งส่งตรวจอีกชนิดที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค แต่ต้องอาศัยขั้นตอนที่มีการลุกล้ำเข้าไปในตัวผู้ป่วย (Invasive procedure) จึงต้องดำเนินการโดยแพทย์เฉพาะทางและใช้อุปกรณ์ที่จำเพาะ (54)

5.2. การทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยวิธีการย้อมสีและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็ว ประหยัด และมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยวัณโรค เนื่องจากมีความจำเพาะสูง สามารถจำแนกเชื้อ *Mycobacterium* ออกจากเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ โดยการย้อมสีทึบกรด ซึ่งใช้ตัวละลายสี ได้แก่ 3% HCl alcohol ไม่ว่าจะเป็นการย้อมด้วยวิธี Ziehl-Neelsen หรือ Hot stain (58) หรือการย้อมด้วยวิธี Kinyoun หรือ Cold stain (59) และดูการติดสีของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X โดยเชื้อ *M. tuberculosis* จะมีลักษณะเป็นรูปแท่งติดสีแดงติดกับสี Carbol fuchin นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีการย้อมด้วย Fluorochrome ซึ่งเป็นการย้อมสีทึบกรดที่ใช้สีฟลูออเรสเซนต์ซึ่งเป็นสารเรืองแสง โดยสีฟลูออเรสเซนต์ที่นิยมใช้งานส่วนใหญ่ ได้แก่ สี Auramine-O และสี Auramine-O/Rhodamine ซึ่งมีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการย้อมด้วยสี Carbol fuchsin คือ มีความไวสูงกว่า และสามารถอ่านผลได้รวดเร็ว ใช้กำลังขยายต่ำทำให้อ่านผลได้ทั่วถึงทั้งแผ่นสไลด์ แต่การอ่านผลทดสอบจำเป็นต้องใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีราคาสูง และต้องใช้ห้องมืดในการทดสอบภายใต้กล้อง (60) แม้ว่าการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นการวินิจฉัยวัณโรคที่มีความจำเพาะสูง และนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะ นอกเหนือจากกล้องจุลทรรศน์ แต่พบว่ามีข้อจำกัดในเรื่องความไวของการตรวจพบเชื้อ โดยจะต้องมีเชื้อในสิ่งส่งตรวจประมาณ 5,000 – 10,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงจะสามารถตรวจพบได้ และไม่สามารถบอกชนิดของเชื้อได้อย่างชัดเจน (61)

5.3. การเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture)

การเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ ถือเป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ (Gold standard) ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค โดยมีข้อดี คือ เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถบ่งชี้ถึงควมมีชีวิตของเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนั้นโคโลนีของเชื้อที่เจริญเติบโตขึ้นมา สามารถนำไปทดสอบวินิจฉัยจำแนกชนิดและทดสอบความไวต่อยาได้ การเพาะเลี้ยงวัณโรคนิยมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ประเภท ได้แก่ 1) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ตัวอย่างเช่น Lowenstein-Jensen (LJ) media ซึ่งมีไข่แดงและกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ และมี Malachite green เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอื่น โดยสามารถสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ประมาณ 3 สัปดาห์ 2) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ตัวอย่างเช่น Mycobacterium growth indicator tube (MGIT) ซึ่งใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Middlebrook M7H9 บรรจุอยู่ในหลอดชนิดพิเศษ ที่กันหลอดถูกเคลือบด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ที่มีความไวต่อออกซิเจน และเมื่อใช้ร่วมกับเครื่องบ่มเชื้ออัตโนมัติ BACTEC MGIT 960 system (บริษัท Becton, Dickinson จำกัด, ประเทศสหรัฐอเมริกา) จะทำงานโดยตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เปล่งออกมาเมื่อมีการเจริญเติบโตของเชื้อภายในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเชื้อมีการใช้ออกซิเจน ทำให้ออกซิเจนมีปริมาณลดลง ส่งผลให้สารฟลูออเรสเซนต์สามารถเปล่งสัญญาณออกมา ทั้งนี้ MGIT สามารถให้ผลการเพาะเลี้ยงที่เร็ว ประมาณ 10 วัน (62) แต่พบอัตราการปนเปื้อนจากเชื้อประจำถิ่นสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงยังต้องอาศัยเครื่องอัตโนมัติ ซึ่งมีราคาแพง จึงยังเป็นข้อจำกัดสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก

5.4. การทดสอบทางอณูชีววิทยา (Molecular examination)

ในปัจจุบันการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ถือว่ามีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค เนื่องมาจากให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจได้โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจหรือโคโลนีของเชื้อที่เจริญเติบโตแล้ว การวินิจฉัยวัณโรคทางอณูชีววิทยาส่วนใหญ่ อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย ที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ หรือมีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* อาทิเช่น ยีน 16S rRNA เป็นองค์ประกอบของ 30S small unit ของ Prokaryotic ribosomes มีความยาวประมาณ 1,500 bp ถูกถอดรหัสมาจาก 16S rDNA และเป็นยีนที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย เนื่องจากมีจำนวน DNA copies มากภายในจีโนม ความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน 16S rRNA ที่สามารถตรวจพบได้ เท่ากับ 10 fg/μl เมื่อใช้เทคนิค Real-time RT-PCR ในการตรวจ ดังนั้นยีน 16S rRNA จึงเป็นเป้าหมายที่มีความไวและความจำเพาะสูง การศึกษาที่ผ่านมาได้ใช้การตรวจหายีน 16S rRNA เพื่อจำแนกเชื้อในกลุ่ม Nontuberculous mycobacteria (NTM) ได้แก่ *M. avium*, *M. gastri* และ *M. nonchromogenicum* (63) ยีน 23S rDNA สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ได้อย่างรวดเร็ว ทั้งในระดับจีโนมและสปิชีส์ แต่มีข้อจำกัดคือ สามารถพบได้ในเชื้อ *Mycobacterium* สายพันธุ์อื่น รวมทั้งในกลุ่มของ NTM (26) ยีน *rpoB* เป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยา Rifampicin ซึ่งเป็นหนึ่งในยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยวัณโรค จึงมีการนำยีนดังกล่าวมาใช้ในการจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Rifampicin ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวินิจฉัยเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ แต่ในการใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยยีน *rpoB* จำเป็นต้องทำ

ควบคู่กับยีนอื่น ๆ เช่น 16S rRNA, 23S rDNA, IS1081 และ IS6110 เป็นต้น (28, 64) ยีน *gyrB* เป็นยีนที่มีขนาดความยาวประมาณ 700 bp มีจำนวน 5 copies ในจีโนม และถอดรหัสเป็นโปรตีน GyrB ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์ DNA gyrase แม้ว่าจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์จำเพาะสูงในสายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* แต่ยังสามารถพบได้ในเชื้อ *M. bovis*, *M. africanum* และ *M. microti* (65) การใช้ยีน *gyrB* ในการจำแนก *M. tuberculosis* มีข้อได้เปรียบมากกว่ายีน 16S rRNA เพราะยีน *gyrB* มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบเดียว ในขณะที่ยีน 16S rRNA มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ (66, 67)

กลุ่ม Insert sequence (IS) มีลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ ภายในจีโนม ซึ่งมีขนาดสั้นและมีการอนุรักษ์สูง Insert sequence ที่สำคัญและนิยมนำมาใช้จำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ได้แก่ IS1081, IS6100 และ IS6110 โดย IS1081 พบได้ในทุกสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่ม MTBC มีขนาดความยาว 1,324 bp มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ กัน ซึ่งถูกล้อมรอบด้วย Inverted repeat ของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 15 เบส และมีตำแหน่ง Open reading frame (ORF) ขนาดใหญ่ ภายในจีโนมพบ IS1081 ซ้ำกันเป็นชุด จำนวน 5-8 copies และมีความเสถียรสูงมากในเชื้อกลุ่ม MTBC ดังนั้นจึงมีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันต่ำ (27, 32) อย่างไรก็ตาม IS1081 มีความไว (99%) และความจำเพาะ (100%) สูง เมื่อนำมาใช้วินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* จากงานวิจัยที่ผ่านมา (23) ดังนั้นจึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ใช้ IS1081 ในการวินิจฉัยวัณโรค สำหรับ IS6100 เริ่มมีการนำมาใช้ตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* เมื่อ 10 ปีที่ผ่านมา แต่เนื่องจากมีความไวในการตรวจพบอยู่ระหว่าง 11-81% ซึ่งมีความไวต่ำกว่า IS6110 จึงไม่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อ (68, 69) ในขณะที่ IS6110 มีขนาดความยาว 1,360 bp จัดอยู่ใน IS3 family โดยมี ORF สองชนิด คือ *orfA* และ *orfB* พบได้เฉพาะในกลุ่มเชื้อ MTBC เท่านั้น (30) เนื่องจากมีบริเวณอนุรักษ์สูง จึงทำให้มีความจำเพาะสูง หากปรากฏอยู่ในจีโนม พบว่ามีจำนวน copies สูงถึง 25 copies แต่อย่างไรก็ตาม ในบางสายพันธุ์ อาจพบได้เพียง 1 copies หรือไม่พบ IS6110 (70, 71) จึงทำให้เกิดผลลบปลอมได้ในบางการทดสอบที่ใช้ IS6110 เพียง IS เดียวสำหรับวินิจฉัยจำแนก *M. tuberculosis* (71) IS6110 มีความไวสูงอยู่ระหว่าง 87.5-97.5% (23, 31, 72) นอกจากนี้ IS6110 ยังถูกนำไปประยุกต์ใช้กับเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เพื่อศึกษาความหลากหลายของ *Mycobacterium ssp.* (30) และถูกนำไปใช้เป็นยีนเป้าหมายสำหรับการวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ของเทคนิค TB-LAMP และ Xpert®MTB/RIF (73, 74)

ตัวอย่างของเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่องค์การอนามัยโลก แนะนำสำหรับการวินิจฉัยวัณโรค ได้แก่

5.4.1. Xpert[®] MTB/RIF

เป็นเทคนิคการวินิจฉัยวัณโรคประเภท Automated molecular test ที่อาศัยหลักการของปฏิกิริยา Nested real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เทคนิค Xpert[®] MTB/RIF ถูกพัฒนาโดยห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ David Alland มหาวิทยาลัย Medicine and Dentistry of New Jersey (UMDNJ), สหรัฐอเมริกา ร่วมกับบริษัท Cepheid จำกัด, สหรัฐอเมริกา และ บริษัท Foundation for Innovative New Diagnostic จำกัด, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ในปี ค.ศ. 2010 WHO ได้แนะนำเทคนิค Xpert[®] MTB/RIF สำหรับตรวจวินิจฉัยวัณโรค (34) โดยสามารถตรวจวินิจฉัยได้ทั้งวัณโรคและวัณโรคดื้อยา Rifampicin ได้พร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ยีน *rpoB* ที่จำเพาะต่อเชื้อ MTBC และใช้โพรบ (probe) จำนวน 5 โพรบ ซึ่งถูกติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ที่ให้สัญญาณสีแตกต่างกันในการตรวจหาตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีน *rpoB* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin (75) ขั้นตอนของทำงานประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ 1) การเตรียมสิ่งส่งตรวจ 2) การสกัดสารพันธุกรรม 3) การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR และ 4) การตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยโพรบ A, B, C, D และ E ซึ่งจำเพาะกับการกลายพันธุ์ในตำแหน่งต่างๆ บนยีน *rpoB* ถ้าหากพบตำแหน่งใดที่เกิดการกลายพันธุ์ โพรบ ณ ตำแหน่งนั้น จะไม่สามารถจับบนสายดีเอ็นเอได้ และไม่มีการเปล่งสัญญาณออกมา จึงทำให้ทราบตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ (75) เทคนิค Xpert[®] MTB/RIF มีความไวเท่ากับ 72.5% และความจำเพาะเท่ากับ 99% เมื่อวินิจฉัยสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่ให้ผลย้อมสีทึบกรดเป็นลบแต่เพาะเชื้อขึ้น (73) อย่างไรก็ตามเทคนิค Xpert[®] MTB/RIF มีข้อจำกัดในเรื่องของความไวในการตรวจเชื้อ MTBC ที่สามารถตรวจหาปริมาณเชื้อน้อยที่สุดได้เท่ากับ 131 cfu/ml หรือเทียบเท่ากับเชื้อจำนวน 10,000 cfu/ml เมื่อทดสอบด้วยการย้อมสีทึบกรดและตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เวลาทดสอบค่อนข้างนานประมาณ 2 ชั่วโมง ในปี ค.ศ. 2014 ได้มีการพัฒนาและปรับปรุงเทคนิค Xpert[®] MTB/RIF รูปแบบใหม่ ซึ่งเรียกว่า Xpert[®] MTB/RIF Ultra เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการวินิจฉัยวัณโรคให้สูงขึ้นจากเทคนิคเดิม โดยเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัย MTBC ด้วยการเพิ่มเป้าหมายที่มีคุณสมบัติเป็น Multiple-copy ของตัวเชื้อ ได้แก่ IS1081 และ IS6110 ทำให้สามารถเพิ่มความไวใน

การตรวจวินิจฉัยได้มากขึ้นถึง 10 เท่า และสามารถตรวจหาเชื้อในสิ่งส่งตรวจได้น้อยที่สุด เท่ากับ 16 cfu/ml นอกจากนี้เทคนิค Xpert® MTB/RIF Ultra ยังเพิ่มความแม่นยำในการตรวจหาการดื้อยา Rifampicin โดยการออกแบบโพรบใหม่จำนวน 4 โพรบ ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และใช้การวิเคราะห์ Melting curve หรือ Melting temperature เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ Wild type หรือแหล่งอ้างอิง โดยแสดงผลเป็นแบบ Semi-quantitative และยังมีระยะเวลาในขั้นตอนตรวจวินิจฉัยน้อยกว่า 80 นาที (76-78) เทคนิค Xpert® MTB/RIF Ultra มีค่าความไวเท่ากับ 87.2% และความจำเพาะเท่ากับ 96.5% ในการวินิจฉัยวัณโรค และมีความไวเท่ากับ 95.1% และความจำเพาะเท่ากับ 98.9% ในการวินิจฉัยการดื้อยา Rifampicin (79) แม้ว่าเทคนิค Xpert® MTB/RIF และ เทคนิค Xpert® MTB/RIF Ultra มีความไวและความจำเพาะสูง และให้ผลการวินิจฉัยวัณโรคและการดื้อยา Rifampicin ได้ ภายในระยะเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง แต่ยังคงจำกัดอยู่ในเฉพาะโรงพยาบาลหรือห้องตรวจปฏิบัติการที่มีความพร้อม เนื่องจากน้ำยามีราคาแพง เครื่องมือต้องการบำรุงรักษาอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีค่าใช้จ่ายของการทดสอบค่อนข้างสูง (10, 12, 14, 54, 61)

5.4.2. Tuberculosis-Loop-mediated isothermal amplification; TB-LAMP

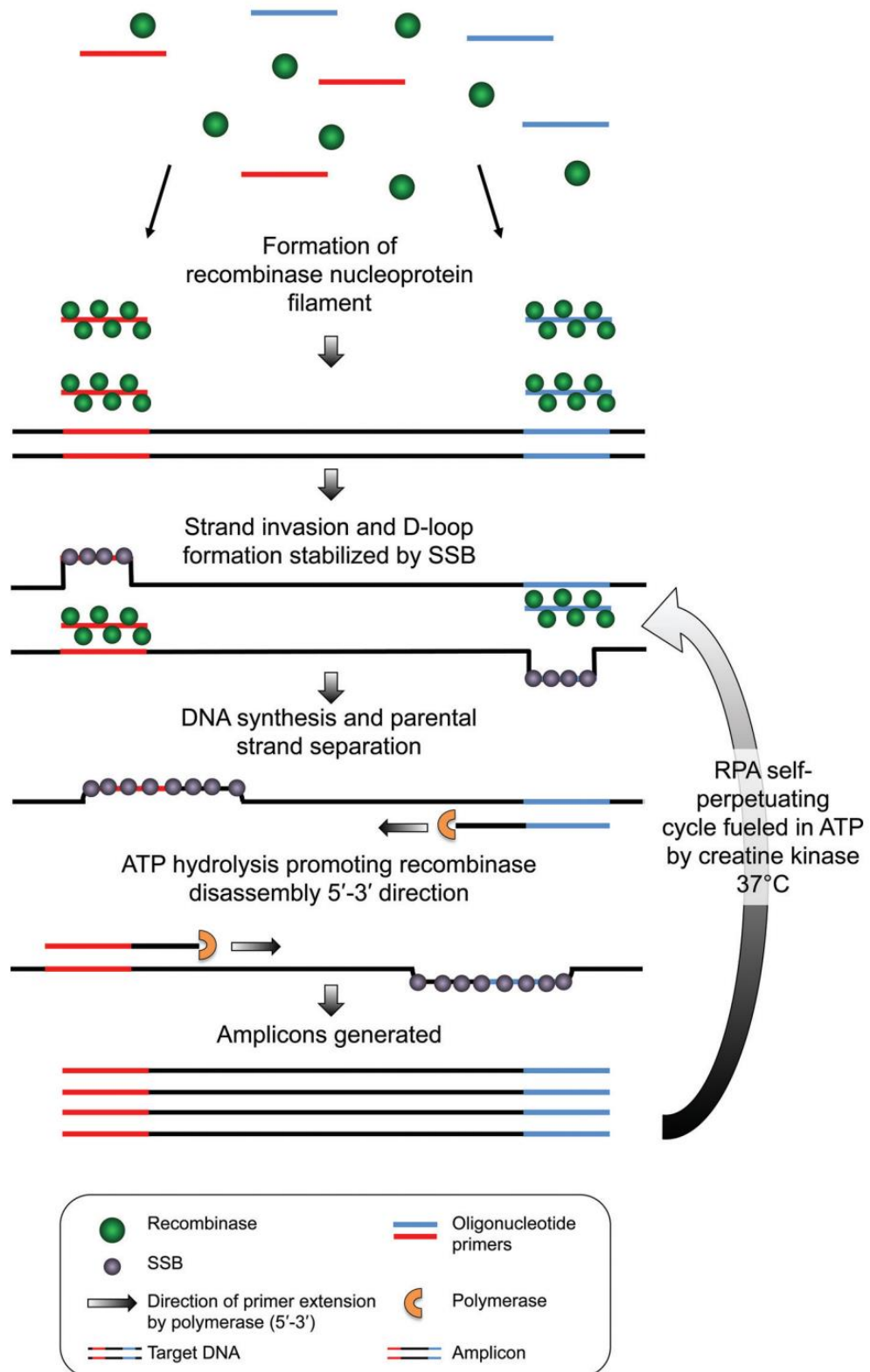
ในปี ค.ศ. 2000 นักวิจัยชาวญี่ปุ่น Notomi และคณะ (16) ได้พัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ถึง 10^9 เท่า ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะอุณหภูมิเดียวคงที่ (ระหว่าง 60-65 องศาเซลเซียส) โดยใช้ไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา 4 หรือ 6 ชุด ที่จำเพาะต่อตำแหน่งบนดีเอ็นเอ ได้แก่ Outer primers (F3 และ B3) Inner primers FIP (F1c และ F2) และ Inner primers BIP (B1c และ B2) ปฏิกิริยาของ LAMP ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ Bst DNA polymerase (16, 80) หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 2003 Iwamoto และคณะ (15) ได้นำเทคนิค LAMP มาประยุกต์ใช้กับการตรวจหาเชื้อ MTBC จากสิ่งส่งตรวจเสมหะโดยตรง ด้วยตรวจหายีนเป้าหมาย คือ ยีน *gyrB* และยีน 16S rRNA และติดตามผลผลิตหลังปฏิกิริยาด้วยการใช้สารฟลูออเรสเซนต์ (SYBR® Green I) พบว่ามีความไวในการตรวจหาเชื้อน้อยที่สุด เท่ากับ 5 copies หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาขึ้นเป็นชุดตรวจ TB-LAMP (Loopamp™ MTBC Detection Kit, บริษัท Eiken chemical จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น) ต่อมาในปี ค.ศ. 2016 WHO ได้ประกาศแนะนำให้ใช้ TB-LAMP ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ ทดแทนวิธีการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (74) ซึ่ง TB-LAMP ใช้ไพรเมอร์เพียง 4 คู่ ที่จำเพาะกับ 6 ตำแหน่งบน

ยีน *gyrB* และ *IS6110* และทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการแยกดีเอ็นเอ สายคู่ออกจากกัน ด้านปลาย 5' ของแต่ละสาย Complementary ไพรเมอร์ FIP และ BIP เข้าจับ ตำแหน่งจำเพาะ เกิดเป็น Loop ที่ปลายทั้ง 2 ด้าน ไพรเมอร์ออกแบบมาให้จำเพาะหลายตำแหน่ง ทำให้การสังเคราะห์ได้ผลผลิตออกมาหลายขนาดและเพิ่มความเร็วในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม การตรวจสอบผลผลิตหลังปฏิกิริยาจากเปลี่ยนสีไปของผลผลิตภายในหลอดปฏิกิริยาภายใต้แสง อัลตราไวโอเล็ต ข้อดีของ TB-LAMP คือ สามารถตรวจสอบเชื้อ MTBC อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความซับซ้อนและมีข้อกำหนดด้านความปลอดภัยทางชีวภาพที่ คล้ายคลึงกับการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (78, 81, 82) เมื่อทดสอบประเมินประสิทธิภาพของ เทคนิค TB-LAMP เปรียบเทียบกับเทคนิคเพาะเลี้ยงด้วย MGIT 960 พบว่ามีความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 99% และ 100% ตามลำดับ (83) ในขณะที่เมื่อประเมินประสิทธิภาพระหว่างเทคนิค TB-LAMP และ เทคนิค Xpert[®] MTB/RIF ในการวินิจฉัยสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ให้ผลบวกด้วยการย้อมสีทึบ กรด พบว่า TB-LAMP มีความไว 97.9% และความจำเพาะ 98.7% ในขณะที่เทคนิค Xpert[®] MTB/RIF มีความไว 99.0% และความจำเพาะ 97.2% (84) ในส่วนของ WHO ที่ได้ทำการทดสอบ ความแม่นยำของเทคนิค TB-LAMP และเทคนิค Xpert[®] MTB/RIF โดยเปรียบเทียบกับผลจากเทคนิค เพาะเลี้ยงที่ให้ผลบวก พบว่าเทคนิค TB-LAMP มีความไว 74.1–78% และความจำเพาะ 98.2-98.9% ในขณะที่เทคนิค Xpert[®] MTB/RIF มีความไว 80.4–84% และความจำเพาะ 97.2-98.2% (74) ดังนั้น เทคนิคดังกล่าวทั้งสอง จึงนับได้ว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน แม้ว่าเทคนิค Xpert[®] MTB/RIF จะมีความไวกว่าเพียงเล็กน้อย ในขณะที่เทคนิค TB-LAMP มีความจำเพาะที่ดีกว่าเทคนิค Xpert[®] MTB/RIF

6. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Recombinase polymerase amplification

เทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) เป็นหนึ่งเทคนิคของ Isothermal amplification ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Nucleic acid amplification; NAA) ภายใต้อุณหภูมิ เดียวคงที่ ซึ่งถูกคิดค้นโดย Piepenburg และคณะ (85) ในปี ค.ศ. 2006 โดยการใช้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ รวมทั้ง Recombination และการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ปัจจุบันมีการจำหน่าย ภายใต้ชื่อน้ำยาที่ชื่อว่า TwistAmp[®] โดยบริษัท TwistDx จำกัด, สหราชอาณาจักร

หลักการการทำงานของปฏิกิริยา RPA เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ 2 ชนิดและโปรตีน 1 ชนิด ที่ทำงานร่วมกัน ได้แก่ เอนไซม์ Recombinase เอนไซม์ Strand-displacing DNA polymerase และโปรตีน Single-stranded DNA-binding protein (SSB) เมื่อเริ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ Recombinases เข้าไปจับกับ Oligonucleotide primers กลายเป็นโมเลกุลเชิงซ้อน (Recombinase-nucleoprotein filament) จากนั้นเคลื่อนที่เข้าไปแทรกที่ตำแหน่งที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Homologous กับไพรเมอร์อย่างจำเพาะบนดีเอ็นเอสายคู่ (Double strand DNA) ทำให้เกิดการแยกสายดีเอ็นเอ โปรตีน SSB เข้าไปเกาะบนสายดีเอ็นเอเส้นหนึ่ง (Displaced strand) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า D-loop เพื่อป้องกันไม่ให้ไพรเมอร์หลุดออกจากสายดีเอ็นเอและกลับมาจับกันเหมือนเดิม ทำให้ Displaced DNA strand มีความเสถียรต่อการทำปฏิกิริยาต่อไป ต่อมาเอนไซม์ Recombinases จะหลุดออกจาก Oligonucleotide primers เมื่อเกิด ATP hydrolysis จากนั้นเอนไซม์ Strand-displacing DNA polymerase เข้ามาจับที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ จึงเริ่มการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ จนได้ดีเอ็นเอต้นแบบของปฏิกิริยารอบถัดไป และจะดำเนินซ้ำไปเรื่อย ๆ จนกว่าองค์ประกอบภายในปฏิกิริยาจะหมดลง จึงสิ้นสุดปฏิกิริยา (20, 21) แสดงดังในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา RPA (20)

6.1. ปัจจัยที่มีผลต่อการดำเนินปฏิกิริยา RPA

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในดำเนินปฏิกิริยา RPA ที่สำคัญ ประกอบไปด้วย ดังนี้

1) การออกแบบไพรเมอร์: ความยาวของลำดับเบสที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RPA ควรอยู่ในช่วง 30 – 35 bp (86) แต่ไม่ควรให้มีความยาวลำดับเบสมากกว่า 45 bp เนื่องจากอาจทำให้เพิ่มการเกิด Primer dimer สูงขึ้น (86) และสามารถเกิดเป็น Secondary structures ได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสามารถนำไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีขนาด 18-26 bp มาใช้ในปฏิกิริยา RPA ได้สำเร็จ (86-88) นอกจากนี้ปริมาณเบส Guanine-Cytosine (%GC) ควรหลีกเลี่ยงที่น้อยกว่า 30% อาจส่งผลให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นไปได้ยาก เนื่องจากไพรเมอร์จับได้ไม่แน่นกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว (70) และปริมาณเบส Guanine-Cytosine ที่มากกว่า 70% ซึ่งอาจกระตุ้นให้ไพรเมอร์ทำปฏิกิริยากันเอง เกิดเป็น Secondary structures หรือโครงสร้าง Hairpins (21) และอาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Recombinase (72) การออกแบบไพรเมอร์ควรออกแบบให้เพิ่มปริมาณผลผลิตขนาดสูงสุดไม่เกิน 1.5 kb (14) อย่างไรก็ตามขนาดของผลผลิตที่เหมาะสมควรมีขนาดประมาณ 100 – 200 bp (85) กระบวนการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยา RPA เหมือนกับเทคนิค PCR กล่าวคือ ควรเลือกตำแหน่งเป้าหมายที่จำเพาะ และออกแบบไพรเมอร์ตามตำแหน่งเป้าหมายที่เลือกไว้ และการทดลองเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยา

2) อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา: ปฏิกิริยา RPA ใช้อุณหภูมิเดียวคงที่ อีกทั้งไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิอย่างเข้มงวด แม้ว่าปฏิกิริยาสามารถดำเนินการได้ตั้งแต่ 22-42 องศาเซลเซียส (21) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการศึกษาที่ผ่านมาอยู่ในช่วงระหว่าง 37-42 องศาเซลเซียส ในขณะที่มีการศึกษาพบว่าอุณหภูมิสูงสุดที่ใช้ทำปฏิกิริยาอาจสูงได้ถึง 45 องศาเซลเซียส (89)

3) ความหนืดของน้ำยา RPA: ลักษณะของน้ำยา RPA มีความหนืดและเหนียว จากการมีโมเลกุลอัดแน่นภายในน้ำยา (Crowding agent) เนื่องจากการทำปฏิกิริยา RPA มีการป้องกันไม่ให้เอนไซม์ Recombinase-primer แยกออกจากกันในขณะที่โปรตีน SSB เข้ามาทำงาน ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม อย่างไรก็ตามในการทำปฏิกิริยาที่มีจำนวน DNA copies เป้าหมายระดับต่ำ การอัดแน่นของโมเลกุลต่าง ๆ ในน้ำยา อาจขัดขวางการแพร่กระจายของสารละลายในขณะที่ผสมน้ำยาเข้าด้วยกัน และทำให้เพิ่มระยะเวลาของปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เพื่อลดผลกระทบนี้ ควรเพิ่มขึ้นตอนการผสมหลังจากดำเนินปฏิกิริยาไปแล้ว 5 นาที เพื่อเพิ่มโอกาสให้องค์ประกอบภายในน้ำยาต่าง ๆ เจอดีเอ็นเอเป้าหมาย หรือลดปริมาตรของ

ปฏิกิริยารวมเหลือ 5 μ l จาก 50 μ l เพราะเป็นการเพิ่มความเข้มข้นดีเอ็นเอต่อสารละลาย RPA ซึ่งสามารถลดผลกระทบจากการอัดแน่นของโมเลกุลดังกล่าวได้ (24)

4) ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา: การกำหนดระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาหรือบ่มขึ้นอยู่กับจำนวนเริ่มต้นของ DNA copies โดยระยะเวลาที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 10-20 นาที แต่ไม่แนะนำให้ใช้เวลานาน เนื่องจากเอนไซม์ Recombinase ใช้ ATP ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งอาจหมดได้ภายใน 25 นาที (86)

5) ชนิดของตัวอย่าง: ปฏิกิริยา RPA สามารถเพิ่มปริมาณได้ทั้ง ดีเอ็นเอสายคู่ (Double-stranded DNA), ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Single-stranded DNA), Methylated DNA (90) และ Complementary DNA (cDNA) จากการทำปฏิกิริยา Reverse transcription ของอาร์เอ็นเอ (RNA) ที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้แก่ แบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัว เชื้อรา สัตว์ และพืช นอกจากนี้ยังสามารถใช้ได้กับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งของเหลวในร่างกาย (Body fluids) เช่น ปัสสาวะ, เสมหะ, น้ำล้างจากระบบทางเดินหายใจ, เลือด เป็นต้น และตัวอย่างขึ้นเนื่องจากอวัยวะในร่างกาย เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์จากสัตว์และพืช (ไข่, กุ้ง, ข้าว, นม, ผลไม้) (21)

6.2. ข้อได้เปรียบของปฏิกิริยา RPA ที่มีต่อเทคนิค Isothermal amplification ชนิดอื่น

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ หรือ Isothermal amplification มีหลายเทคนิค อาทิเช่น LAMP ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ อาศัยไพรเมอร์ 4-6 ชุด ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมาย 6-8 ตำแหน่ง ภายใต้อุณหภูมิคงที่ โดยใช้เอนไซม์ Bst DNA polymerase สังเคราะห์สายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์เข้าจับตำแหน่งจำเพาะ เกิดเป็นเป็น Loop ทั้ง 2 ข้างของสายดีเอ็นเอต้นแบบ กลายเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบวงกลม (Cycle amplification), Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอ ที่อาศัย 3 เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ เอนไซม์ T7 RNA polymerase, Reverse transcriptase และ RNase H โดยเริ่มปฏิกิริยาจากไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะต่อ T7 promoter จับบนสายอาร์เอ็นเอต้นแบบ เอนไซม์ Reverse transcriptase ทำการสร้างสาย cDNA ขึ้นมา และเอนไซม์ RNase H จะย่อยสายอาร์เอ็นเอต้นแบบสุดท้ายเอนไซม์ T7 RNA polymerase จับบนสาย cDNA แล้วสังเคราะห์อาร์เอ็นเอสายใหม่ (91), Strand displacement amplification (SDA) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยออกแบบไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด (S1, S2 และ B1, B2) ที่มีความจำเพาะคน

ละตำแหน่งในดีเอ็นเอเป้าหมาย ไพรเมอร์ S1, S2 มีลำดับเบสสำหรับไว้ให้เอนไซม์ Nicking endonuclease ส่วนไพรเมอร์ B1, B2 จะจับตำแหน่งเหนือกว่าไพรเมอร์ S1, S2 คือบริเวณตอนต้นของตำแหน่งเป้าหมาย จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีตำแหน่ง Nicking site ที่เอนไซม์ Nicking endonuclease เข้ามาตัด ทำให้เอนไซม์ DNA polymerase เข้ามาสังเคราะห์ตำแหน่งที่ถูกตัด เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไปเรื่อย ๆ จนสิ้นสุดปฏิกิริยา โดยผลผลิตดีเอ็นเอสายคู่มีตำแหน่ง Nicking site (92), Rolling circle amplification (RCA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่เป็นลักษณะวงกลม (Circular) ทำปฏิกิริยาโดยอาศัยไพรเมอร์จำเพาะจับบนตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ และทำการสังเคราะห์สายใหม่ด้วยเอนไซม์ Polymerase (93) และ Helicase-dependent amplification (HDA) เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ ที่ใช้เอนไซม์ Helicase ทำการแยกสายดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โปรตีน SSB จับกับสายดีเอ็นเอ เพื่อป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกกัน กลับมาจับกันอีกครั้ง และเอนไซม์ DNA polymerase ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณ (94)

อย่างไรก็ตาม เทคนิค RPA มีจุดเด่นซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเทคนิค Isothermal amplification ชนิดอื่น หลายประการ ได้แก่ ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์ทำได้ง่ายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายใช้เพียงไพรเมอร์ 1 คู่ เหมือนปฏิกิริยา PCR ทั่วไป จึงสามารถทำการตรวจแบบ Multiplex ได้ การทดสอบมีขั้นตอนที่ง่ายไม่ซับซ้อน มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้แม้มีสารตั้งต้น เช่น ดีเอ็นเอปริมาณเพียง 1 copy ปฏิกิริยา RPA ใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ตั้งแต่ภายใน 5 นาที แต่ระยะเวลาโดยทั่วไปสำหรับการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ 25-42 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วงประมาณ 37-42 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิดังกล่าวให้คงที่ได้ง่าย โดยใช้เครื่องบ่มเชื้อ (Incubator) เครื่องทำความร้อน (Heater) หรือแม้กระทั่งการใช้ความร้อนจากร่างกาย (86) ความคงตัวของน้ำยา RPA ที่ผู้ผลิตจำหน่ายอยู่ในรูปของผงแห้ง (Lyophilized) ซึ่งง่ายต่อการใช้งานและเก็บรักษาเก็บไว้ที่อุณหภูมิทั่วไปได้นานถึง 3 สัปดาห์ (24) จึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้นอกพื้นที่ที่ไม่มีการรองรับการเก็บรักษาในระบบความเย็น ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้เทคนิค RPA ได้รับความนิยมสูงขึ้นเป็นอย่างมาก และสามารถนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก หรือห้องปฏิบัติการภาคสนาม หรือชุดตรวจ ณ จุดทดสอบ เนื่องจากไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือ

วิทยาศาสตร์ที่จำเพาะหรือเครื่อง Thermal cycle ในการดำเนินปฏิกิริยา (86) ดังแสดงรายละเอียดเปรียบเทียบกับเทคนิค Isothermal amplification ชนิดต่าง ๆ ตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบเทคนิค Isothermal amplification ชนิดต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก (95))

รายละเอียด	LAMP	NASBA	SDA	RCA	HDA	RPA
ชนิดเป้าหมาย	DNA	RNA	DNA	RNA/ DNA	DNA	RNA/ DNA
จำนวนไพรเมอร์ (เส้น)	4-6	2	4	1	2	2
Initial heating	✓	-	✓	✓	-	-
อุณหภูมิที่ดำเนินปฏิกิริยา (องศาเซลเซียส)	60-65	41	30-55	30-65	65	37-42
ระยะเวลา (นาที)	60	60-180	60-120	60-240	30-120	20-40
ปริมาณน้อยที่สุดที่ ตรวจสอบได้ (copies)	~5	1	10	10	1	1
การทำปฏิกิริยาแบบ Multiplex	-	✓	-	✓	✓	✓
น้ำยาอยู่ในรูปผงแห้ง	-	✓	-	-	-	✓

6.3. การประยุกต์ใช้เทคนิค RPA ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ

เทคนิค RPA ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อมากมาย ทั้งที่พบในคนและสัตว์ ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Euler และคณะ (95) ได้นำเทคนิค Real-time RPA ตรวจหาเชื้อ *Francisella tularensis* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคไข้กระต่าย (Rabbit fever) จากพลาสติกดีเอ็นเอที่ถูกลดจากเนื้อเยื่อกระต่ายที่ติดเชื้อ เปรียบเทียบกับเทคนิค Real-time PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *tul4* ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ *F. tularensis* ร่วมกับใช้ Exo probe ทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะ 42 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และตรวจสอบการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่อง

ESEQuant Tube Scanner พบว่า ความไวในการตรวจสอบของเทคนิค Real-time RPA เท่ากับ 10^2 - 10^1 โมเลกุล ในขณะที่ Real-time PCR เท่ากับ 10^2 โมเลกุล นอกจากนี้เทคนิค Real-time RPA ยังสามารถตรวจพบเชื้อเพิ่มเติมได้อีก 4 สายพันธุ์ นอกเหนือในกลุ่ม *F. tularensis* subsp ได้แก่ *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* และ *F. tularensis* subsp. *novicida* ใช้ระยะเวลาในการทดสอบน้อยกว่าเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเทคนิค Real-time RPA เมื่อพัฒนาพร้อมกับอุปกรณ์อ่านผลแบบพกพา สามารถนำไปตรวจวินิจฉัยเชื้อ *F. tularensis* ภาคสนามได้

การศึกษาของ Lai และ Lau (96) ได้ศึกษาวิธีที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Plasmodium knowlesi* ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุการเกิดโรคมาลาเรียได้อย่างรวดเร็วและเหมาะสมกับพื้นที่ชุมชน โดยทำเทคนิค RPA มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อร่วมกับการอ่านผลด้วยวิธี SYBR® Green I ที่สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่า ด้วยการทำปฏิกิริยาต่อยีน 18S rRNA ภายใต้สภาวะ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และมีการผสมสารละลายในปฏิกิริยาอีกครั้งหลังดำเนินการปฏิกิริยาไปแล้ว 4 นาที เมื่อตรวจสอบผลผลิตหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยสี 375X SYBR® Green I เปรียบเทียบกับวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่า มีความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 100% สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอน้อยที่สุด เท่ากับ 1 copy อีกทั้งยังได้มีการทดลองลดปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเพื่อวิเคราะห์ถึงสาเหตุของ Crowding agent ในสภาวะที่มีปริมาณดีเอ็นเอระดับต่ำ พบว่า เมื่อเตรียมให้ปฏิกิริยามีปริมาตรรวม เท่ากับ 6.25 μ l และไม่ได้มีการผสมสารละลายอีกครั้งภายหลังดำเนินการปฏิกิริยา ให้ผลการทดสอบ เท่ากับปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μ l และมีการผสมสารละลายอีกครั้งภายหลังปฏิกิริยาดำเนินการไปแล้ว 4 นาที ดังนั้นการใช้ปริมาตรรวมน้อยในการทำปฏิกิริยาช่วยประหยัดการใช้น้ำยาและลดค่าใช้จ่ายในพื้นที่ขาดแคลนได้ และยังสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณระดับต่ำได้

การศึกษาของ Sun และคณะ (97) ใช้เทคนิค Reverse transcription-RPA ร่วมกับ Lateral flow dipsticks (RT-RPA-LFD) ในการพัฒนาการตรวจหา ยีน matrix protein, H1 และ H3 สำหรับเชื้อ Influenza A virus สายพันธุ์ H1 และ H3 เปรียบเทียบกับเทคนิค Real-time RT-PCR ได้ออกแบบไพรเมอร์และ nfo probe เพื่อใช้กับ LFD ในการตรวจสอบผลผลิต โดย Forward primer ติดฉลากที่ด้านปลาย 5' ด้วยโมเลกุล Biotin และ Reverse primer ติดฉลากที่ด้านปลาย 5' ด้วยโมเลกุล FITC ทำปฏิกิริยา RT-RPA ภายใต้สภาวะ 39 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และตรวจสอบผลผลิตด้วย LFD พบว่าความไวในการตรวจหา ยีน matrix protein, H1 และ H3 มีค่าเท่ากับ 75%,

93.3% และ 71% ตามลำดับ ความจำเพาะ เท่ากับ 100% และความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ตรวจหาทั้ง 3 ยีน คือ 123.6, 677.1 และ 112.2 copies/ปฏิกิริยา ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อประเมินประสิทธิภาพเทคนิค RT-RPA-LFD เปรียบเทียบกับเทคนิค Real-time RT-PCR พบว่าทั้งสองเทคนิค มีความสอดคล้องกันในระดับสูงมาก ทั้งนี้เทคนิค RT-RPA-LFD มีความไวน้อยกว่า Real-time RT-PCR แต่เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและเชื่อถือได้ในการตรวจหาเชื้อ Influenza A virus สายพันธุ์ H1 และ H3 ในพื้นที่ทรัพยากรจำกัด

RPA ยังถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค การศึกษาของ Ma และคณะ (98) ทำการตรวจหาเชื้อ MTBC ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ Lateral Flow (LF-RPA) และใช้เทคนิค Real-time RPA ในการทดสอบความเข้มข้นน้อยที่สุดในการตรวจสอบ โดยใช้ไพรเมอร์ต่อ IS1081 ที่มีความไวและจำเพาะต่อเชื้อ MTBC สูง ซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบทั้ง 2 เทคนิค โดยเทคนิค LF-RPA ออกแบบ Reverse primer ติดฉลากที่ด้านปลาย 5' ด้วยโมเลกุล Biotin และ nfo probe ติดฉลากที่ด้านปลาย 5' ด้วยโมเลกุล FITC ตามคำแนะนำสำหรับการใช้ชุดน้ำยา TwistAmp[®] nfo kit (บริษัท TwistDx จำกัด, สหราชอาณาจักร) ในขณะที่เทคนิค Real-time RPA ใช้ Exo probe ภายหลังทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ร่วมกับการผสมสารละลายอีกครั้งหลังจากดำเนินการไปแล้ว 4 นาที พบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 97.98% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐาน ผลการทดสอบความเข้มข้นน้อยที่สุดที่เทคนิค LF-RPA ตรวจพบได้ เท่ากับ 25 fg หรือ 5 copies/ปฏิกิริยา และเทคนิค Real-time RPA ได้เท่ากับ 25 fg เช่นกัน เทคนิค LF-RPA ให้ผลความไวเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time RPA และสามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิ 25-42 องศาเซลเซียส จึงไม่ต้องจำเป็นต้องใช้เครื่องทำความร้อน และใช้ระยะเวลาไม่น้อยกว่า 20 นาที

การศึกษาของ Singpanomchai และคณะ (23) ได้นำเทคนิค RPA ตรวจวิเคราะห์หา IS1081 และ IS6110 เพื่อวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* และตรวจสอบผลผลิตด้วยการอ่านผลด้วยตาเปล่าภายหลังการเติมสี SYBR[®] Green I ทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที พบว่าสามารถวินิจฉัยเชื้อได้ โดยมีความไวในการตรวจหา IS1081 เท่ากับ 99.32% และ IS6110 เท่ากับ 97.95% ในขณะที่ทั้งสอง IS มีความจำเพาะเท่ากับ 100% เมื่อเทียบกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis และเทคนิค RPA ยังมีความสามารถในการตรวจหา IS1081

และ IS6110 ที่น้อยที่สุด เท่ากับ 0.05 และ 0.5 ng ตามลำดับ จากผลการศึกษาเทคนิค RPA ในการวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ยังพบว่ามีความจำเพาะสูง เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ดังนั้นเทคนิค RPA สามารถใช้เป็นทางเลือกของเทคนิคทางอณูชีววิทยาในพื้นที่สถานพยาบาลระดับชุมชน สำหรับตรวจคัดกรองวัณโรคได้

การศึกษาของ Boyle และคณะ (31) พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค Real-time RPA โดยออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อ IS1081 และ IS6110 และใช้ Exo probe ทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะ 39 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในเครื่อง Twista® (บริษัท Qiagen จำกัด , สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) ที่มีการวัดการเปล่งแสงของสีฟลูออเรสเซนซ์ทุก 20 วินาที พบว่า การตรวจสอบ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค Real-time RPA เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐาน มีค่าความไวเท่ากับ 91.4% และ 87.5% ตามลำดับ และค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 95.4% ตามลำดับ ในขณะที่ผลการทดสอบความเข้มข้นน้อยที่สุดในการตรวจหา IS1081 เท่ากับ 20 fg และ IS6110 เท่ากับ 6.25 fg

6.4.ปฏิกิริยา Multiplex-RPA (M-RPA)

ปฏิกิริยา Multiplex-RPA หรือ M-RPA เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหลายเป้าหมายในปฏิกิริยาเดียวโดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ต่อเป้าหมาย 1 ตำแหน่ง ภายใต้อุณหภูมิคงที่ด้วยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ Recombinase เอนไซม์ Strand-displacing DNA polymerase และโปรตีน SSB ดังนั้นปฏิกิริยาหลักสำคัญของปฏิกิริยา M-RPA คือ 1) ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในการทำปฏิกิริยา ต้องมีความจำเพาะต่อแต่ละเป้าหมาย โดยอาศัยหลักการออกแบบไพรเมอร์เช่นเดียวปฏิกิริยา RPA ที่กล่าวมาข้างต้น (86) 2) อัตราส่วนความเข้มข้นของไพรเมอร์ต้องมีความเหมาะสม เนื่องจากอัตราการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไพรเมอร์แต่ละคู่ใน M-RPA อาจแตกต่างกันแม้จะอยู่ภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ดีกว่าไพรเมอร์คู่อื่น ๆ จะเกิดผลผลิตเป้าหมายได้ในปริมาณที่มากกว่า และอาจขัดขวางการจับตำแหน่งเป้าหมายของไพรเมอร์ที่เสียเปรียบในปฏิกิริยา เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละเป้าหมายอาจมีปริมาณมาก-น้อยต่างกันในด้านเบสสารพันธุกรรม และ/หรือประสิทธิภาพการทำงานของไพรเมอร์บางคู่ต่ำกว่าไพรเมอร์คู่อื่น ทำให้ผลผลิตหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาได้ปริมาณน้อยหรือน้อยกว่าเกณฑ์ที่สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นต้องมีการปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ให้มีโอกาสจับตำแหน่งเป้าหมายได้มากกว่าเดิมหรือออกแบบไพรเมอร์

ให้ทำงานได้รวดเร็วกว่าไพรเมอร์คู่ที่ทำงานได้ดีกว่าก่อนน้ำยาภายในปฏิกิริยา M-RPA ทำงานหมด ซึ่งการปรับความเหมาะสมนี้จะช่วยป้องกันการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอย่างรวดเร็วสำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่มีมาก (Abundant target sequence) ความยืดหยุ่นในการปรับสภาวะต่าง ๆ นี้มีประโยชน์มากเมื่อต้องการตรวจหาตัวอย่างเป้าหมายที่หายากหรือตรวจพบได้ยากในกลุ่มเป้าหมายอื่นที่มีอยู่จำนวนมาก (99) ปฏิกิริยา M-RPA สามารถตรวจสอบผลผลิตระหว่างดำเนินปฏิกิริยา (Real-time detection) หรือเทคนิคการตรวจสอบเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด (End-point detection) ได้ เช่นเดียวกับปฏิกิริยา RPA ทั่วไป ตัวอย่างการศึกษาที่ใช้เทคนิค Multiplex-RPA ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ได้แก่ การศึกษาของ Kersting และคณะ (100) ได้นำเทคนิค Multiplex-RPA ตรวจหาเชื้อก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์พร้อมกัน ได้แก่ *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella enterica* และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ร่วมกับ Microarray แบบ On-chip RPA ที่มีการพัน Amino-modified oligonucleotide probe ลงไปบน Chip ในการทำปฏิกิริยา Multiplex-RPA ใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ประกอบไปด้วย ไพรเมอร์ยีน *mecA* ไพรเมอร์ยีน *invA* และไพรเมอร์ยีน *fit* ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ MRSA, *S. enterica* และ *N. gonorrhoeae* ตามลำดับ โดย Reverse primer แต่ละเส้นถูกติดฉลากด้วยโมเลกุล Cy5 และมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของ Forward primer ดังนั้นในปฏิกิริยาจะมีสถานะเป็น Asymmetric primer และทำปฏิกิริยาบน On-chip RPA ภายใต้สภาวะ 38 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที พบว่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ตรวจได้ของเชื้อ MRSA และเชื้อ *S. enterica* เท่ากับ 10 โคโลนี ในขณะที่เชื้อ *N. gonorrhoeae* มีค่าเท่ากับ 100 โคโลนี ทั้งนี้สภาวะของ Asymmetric primer ช่วยเพิ่มการทำปฏิกิริยาและเพิ่มสัญญาณการตรวจวัด โดยเฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณน้อย

การศึกษาของ Ma และคณะ (101) ทำการตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Salmonella Enteritidis* จากอาหารทะเล ด้วยวิธี Multiplex-RPA ร่วมกับ Lateral flow dipstick (LFD) โดยการใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ที่ถูกติดฉลาก Forward primer ของยีน *nuc* เป็นโมเลกุล Biotin Forward primer ของยีน *toxR* เป็นโมเลกุล FAM และ Forward primer ของยีน *fimY* เป็นโมเลกุล Cy5 สำหรับ Reverse primer ของทุกยีนถูกติดฉลากด้วยโมเลกุล Digoxin ทำปฏิกิริยา Multiplex-RPA ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที และตรวจสอบผลผลิตด้วย LFD ซึ่งแสดงผลเพียงเชิงคุณภาพ แต่เมื่อนำ LFD มาวัดความเข้มของแถบ Test line ที่

ปรากฏขึ้นด้วยเครื่องอ่านแถบ จึงสามารถบอกผลในเชิงปริมาณได้เพิ่มเติม ทำให้ลดความผิดพลาดจากการอ่านผลที่เกิดจากผู้อ่านได้

การศึกษาของ Kim และคณะ (89) ใช้เทคนิค Multiplex real time-RPA ในการพัฒนาตรวจหาเชื้อ *Campylobacter coli* และ *Campylobacter jejuni* ในไข่ไก่ เนื้อไก่สด และอาหารไก่เปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วย *Campylobacter* selective charcoal cefoperazone deoxycholate agar (CCDA) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ยีน *ceuE* และไพรเมอร์ยีน *hipO* และ Exo probe จำนวน 2 เส้น โดยตรวจวัดผลผลิตที่เกิดขึ้นจากสฟลูออเรสเซนต์ ภายหลังทำปฏิกิริยา Multiplex real time-RPA ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที พบว่าเทคนิคดังกล่าวมีความไวของการตรวจสอบยีนทั้งสองจากอาหารไก่ เท่ากับ 1 cfu/ml ขณะที่จากไข่ไก่ และเนื้อไก่สด เท่ากับ 10^3 cfu/ml และมีความจำเพาะกับเชื้อ *C. coli* และ *C. jejuni* เท่านั้น ผลการเปรียบเทียบกับวิธี CCDA พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า Multiplex real time-RPA ให้ผลที่มีความน่าเชื่อถือเทียบเท่ากับการเพาะเลี้ยงที่เป็นวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตามเทคนิค Multiplex real time-RPA ใช้ระยะเวลาทดสอบเพียง 20 นาที ซึ่งมีความรวดเร็วกว่าวิธี CCDA ที่ใช้เวลาถึง 3 วัน

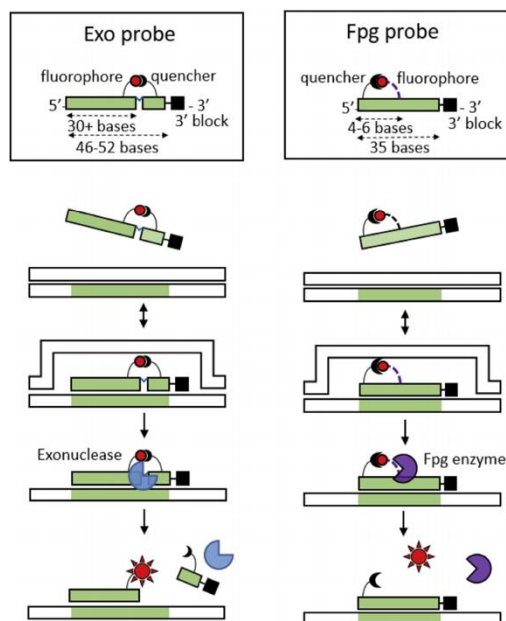
7. การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA

ผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA มีคุณสมบัติเป็นดีเอ็นเอสายคู่ เหมือนกับผลผลิตที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา PCR ซึ่งต้องมาตรวจสอบด้วยขั้นตอนต่อไป เพื่อยืนยันผลผลิตที่เกิดขึ้น การตรวจสอบผลผลิต RPA สามารถใช้เทคนิคการตรวจสอบขณะที่ดำเนินปฏิกิริยา (Real-time detection) หรือเทคนิคการตรวจสอบเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด (End-point detection) ซึ่งมีรายละเอียดด้านล่าง

7.1. การตรวจสอบผลผลิต RPA ขณะที่ดำเนินปฏิกิริยา

การตรวจสอบผลผลิต RPA ขณะที่ปฏิกิริยายังดำเนินอยู่ ส่วนใหญ่อาศัย Fluorescent probes ร่วมกับเครื่องวัด Fluorimeter เพื่อตรวจสอบแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ถูกปล่อยสัญญาณออกมา ภายหลังที่เริ่มเกิดผลผลิต จึงสามารถติดตามผลผลิตที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาได้ในทันที โดยไม่ต้องรอให้ปฏิกิริยาเสร็จสิ้น โพรบที่ใช้มักมีความจำเพาะต่อผลผลิตที่เป็นเป้าหมาย ซึ่งเรียกว่า Exo probe และ

Fpg probe ในขณะที่โพรบทั่วไปที่ใช้กับเทคนิค PCR เช่น *Taq-Man* probe ไม่สามารถนำมาใช้ร่วมกับเทคนิค RPA ได้ เนื่องจากการทำงานเอนไซม์ Exonuclease ของ *Taq* polymerase จะกำจัด Displaced strand ระหว่างกระบวนการ Strand displacement จึงเกิดการยับยั้งการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอในปฏิกิริยา RPA ทั้งนี้ Exo probe เป็น Oligonucleotide ที่จำเพาะต่อผลผลิตที่เป็นเป้าหมาย ส่วนด้านปลาย 3' ถูกบล็อกไว้ เพื่อป้องกันการสังเคราะห์โพรบ บนโพรบมีการติดฉลากด้วยโมเลกุล dT-Fluorophore และ dT-Quencher อยู่ห่างประมาณ 2-4 นิวคลีโอไทด์ มีตำแหน่ง Tetrahydrofuran residue (THF) เรียกว่า dSpacer อยู่ระหว่างโมเลกุลทั้งคู่ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เอนไซม์ Exonuclease III ตัดให้โมเลกุล Fluorophore และ Quencher แยกออกจากกัน ทำให้โมเลกุล Fluorophore เกิดการปล่อยสัญญาณโดยการเปล่งแสงออกมา จึงสามารถวัดปริมาณแสงที่เกิดขึ้นได้ สำหรับ Fpg probe มีลักษณะคล้ายกับ Exo probe แตกต่างกันที่โมเลกุล Fluorophore และ Quencher ถูกติดฉลากห่างประมาณ 4-6 นิวคลีโอไทด์ โดยโมเลกุล Quencher ถูกติดฉลากด้าน 5' ของโพรบ และโมเลกุล Fluorophore ถูกเชื่อมที่ตำแหน่ง Abasic nucleotide โดยทั้ง 2 โมเลกุลจะผูกติดกันอยู่ในรูป dR-linker เมื่อโพรบจับตำแหน่งบนดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างจำเพาะ เอนไซม์ Formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) จะตัดตำแหน่ง dR ทำให้โมเลกุล Quencher แยกออก เกิดการปล่อยสัญญาณของโมเลกุล Fluorophore โดยการเปล่งแสงออกมา แสดงรายละเอียดในรูปที่ 2.4 การทำงานของ Exo probe มีความไวมากกว่า Fpg probe (31) แต่เอนไซม์ Exonuclease ของ Exo probe จะย่อยสายดีเอ็นเอ จึงไม่เหมาะสมที่นำผลผลิตหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยามาตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis (20)



รูปที่ 2.4 หลักการทำงานของ Exo probe และ Fpg probe ในการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (21)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องวัด Fluorimeter ที่ใช้ตรวจวัดปริมาณแสงของโมเลกุล Fluorophore ที่ปล่อยออกมา อาทิเช่น เครื่อง ESEQuant Tube Scanner (บริษัท Qiagen จำกัด, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) เครื่อง Genie[®] III (บริษัท OptiGene จำกัด, สหราชอาณาจักร) และเครื่อง Twista[®] (บริษัท Qiagen จำกัด, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) โดยเครื่องทั้งหมดเหล่านี้สามารถใช้ได้ทั้งงานด้านห้องปฏิบัติการและการตรวจวินิจฉัยจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย (102, 103)

ในการศึกษาของ Wahed และคณะ (102) ได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออก ด้วยวิธี Real-time RPA ร่วมกับการใช้ Exo probe ในการตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา และอ่านผลด้วยเครื่อง Twista[®] พบว่าสามารถตรวจวินิจฉัยได้ภายในระยะเวลา 20 นาที และมีความไวถึง 98% และความจำเพาะถึง 100% และความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ตรวจสอบได้เท่ากับ 10-100 RNA copies

เทคนิคการตรวจสอบผลผลิต RPA ขณะดำเนินการปฏิกิริยา มีข้อดีในการตรวจสอบผลผลิตได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องรอหลังสิ้นสุดปฏิกิริยา แต่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องตรวจวัดปริมาณแสงของโมเลกุล Fluorophore ที่ส่งสัญญาณการเปล่งแสงอย่างจำเพาะ จึงทำให้วิธีการตรวจผลผลิตวิธีนี้มีราคาค่อนข้างสูง และไม่ค่อยเหมาะสมที่นำไปใช้ภาคสนามหรือหน่วยตรวจชุมชน

7.2. การตรวจสอบผลผลิต RPA เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา

เป็นการตรวจวัดผลผลิตภายหลังจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้เสร็จสิ้นลงอย่างสมบูรณ์ เทคนิคที่ใช้ตรวจสอบผลผลิต RPA เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ที่นิยมใช้กันในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

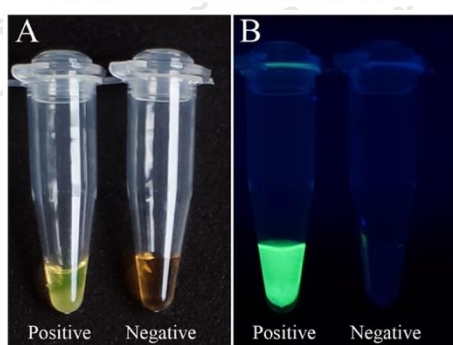
7.2.1. เทคนิค Agarose gel electrophoresis

เป็นเทคนิคมาตรฐานที่ใช้ตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาเพิ่มสารพันธุกรรมและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยการแยกดีเอ็นเอหรือวิเคราะห์ขนาดและคุณภาพของดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้าผ่านตัวกลาง Agarose gel ซึ่งมีลักษณะเนื้อเจลมีรูพรุนขนาดเล็กที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้ สามารถแยกขนาดของดีเอ็นเอตั้งแต่ 100 bp จนถึง 25,000 bp โดยโครงสร้างส่วนใหญ่ของดีเอ็นเอมีหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ ทำให้ภายในดีเอ็นเอมีประจุเป็นลบ ดังนั้นการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจึงเคลื่อนที่จากประจุลบไปยังประจุบวกภายใต้สนามไฟฟ้า ซึ่งความเร็วและระยะทางในการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ส่วนดีเอ็นเอที่รูปร่างเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อน (Supercoiled) เคลื่อนที่ได้เร็วกว่ารูปแบบดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง (Linear) และแบบวงแหวน (Circle) นอกจากนี้ความเข้มข้นของ Agarose gel ยังมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ถ้าความเข้มข้นของ Agarose gel สูง ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ช้า แต่สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้ดี ภายหลังจากแยกบนสนามไฟฟ้าเสร็จสิ้น ทำการย้อมดีเอ็นเอที่อยู่ในแผ่นเจลด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ เช่น Ethidium bromide, SYBR safe และ SYBR® Green I เป็นต้น และส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) (104-106) ความไวในการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาเพิ่มสารพันธุกรรมนั้น ขึ้นอยู่กับประเภทชนิดของสีย้อมดีเอ็นเอ ซึ่ง Ethidium bromide มีความรวดเร็ว ความไว และความน่าเชื่อถือสูงในการตรวจสอบผลผลิตสารพันธุกรรม สามารถตรวจสอบได้น้อยที่สุด คือ 5 ng (107) ด้วยวิธีการแช่ Agarose gel หลังจากสิ้นสุดภายใต้สนามไฟฟ้า ในสารละลาย Ethidium bromide ตามระยะเวลาที่เหมาะสม แต่ Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นจึงมีข้อระวังในการใช้งานและต้องใส่ใจในพื้นที่จำเพาะเพื่อป้องกันการปนเปื้อน ส่วนสีในกลุ่ม SYBR สามารถใช้ย้อมดีเอ็นเอได้ก่อนหรือหลังการตรวจสอบผลผลิต และมีความไวใกล้เคียงกับ Ethidium bromide คือ 1-5 ng อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาให้ SYBR สามารถตรวจสอบผลผลิตได้น้อยที่สุดถึง 60 pg (108) สำหรับการตรวจสอบผลผลิต RPA เทคนิค Agarose gel electrophoresis ยังคงเป็นวิธีพื้นฐาน

ในการตรวจสอบผลผลิต แต่จำเป็นต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ก่อนตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้น ทำให้เพิ่มระยะเวลาในการอ่านผลเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่น ๆ

7.2.2. การตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR® Green I

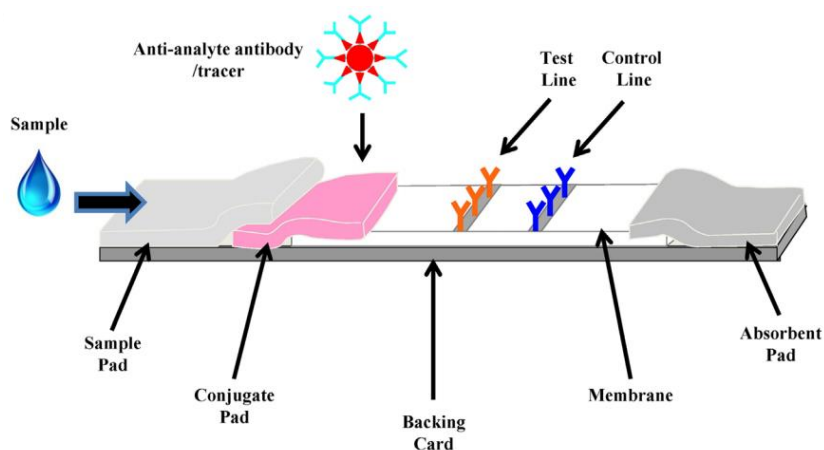
เป็นวิธีการตรวจวัดสายดีเอ็นเอโดยใช้สารฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายคู่ได้ ไม่มีการจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว สี SYBR® Green I มีคุณสมบัติเป็นสีย้อมชนิด Asymmetric monomethine cyanine ซึ่งจับกับบริเวณ Minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่แบบไม่จำเพาะ เมื่อจับแล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสี จะมีค่าดูดกลืนแสงสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่นสูงสุด 497 nm ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$) และเปล่งแสงออกมาที่ความยาวคลื่นสูงสุด 520 nm ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$) ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเป็นสีเขียว ถ้าไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายมองเห็นเป็นสีส้ม (รูปที่ 2.5) ความเข้มของสี SYBR® Green I แปรผันตรงกับปริมาณของดีเอ็นเอ ข้อดีของสี SYBR® Green I คือ มีความปลอดภัย ไม่มีความเป็นพิษเช่นเดียวกับ Ethidium bromide ใช้งานง่าย ราคาไม่แพง (109) ข้อจำกัดสำหรับการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีนี้ คือ SYBR® Green I สามารถจับได้กับดีเอ็นเอสายคู่ทุกชนิด ดังนั้นจึงมีจับกับผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ หรือการเกิดการจับกับ Primer dimer ในปฏิกิริยา ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ นอกจากนี้การใช้สี SYBR® Green I สำหรับปฏิกิริยา Multiplex ไม่เหมาะสมที่นำมาใช้งาน เนื่องจากไม่สามารถอ่านผลที่เกิดขึ้นได้ว่าเป็นผลผลิตจากเป้าหมายใด (108)



รูปที่ 2.5 การอ่านผลจากการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยสี SYBR® Green I (A; เมื่ออ่านผลด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ B; เมื่ออ่านผลด้วยภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต) (110)

7.2.3. การตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นตรวจ Lateral flow

เทคนิค Lateral flow (LF) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยสารหรือโมเลกุลทางชีวภาพชนิดหนึ่ง ซึ่งอาศัยอุปกรณ์ที่ใช้งานง่าย สะดวก และรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการของสารละลายของเหลวที่เคลื่อนที่ไปบนแผ่นตรวจ (Chromatography) ที่มีโมเลกุลสำหรับจับสารที่ต้องการตรวจวัดเคลื่อนที่ไปบนแผ่นตรวจ LF ประกอบด้วย 4 ส่วนหลัก (รูปที่ 2.6) ได้แก่ 1) Sample application pad หรือ Sample pad มักทำมาจากเซลลูโลสหรือใยแก้ว ทำหน้าที่ดูดซับสารละลายตัวอย่างในช่วงเริ่มต้นของการทดสอบ และขนส่งตัวอย่างหรือองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในตัวอย่างที่ต้องทดสอบไปยังส่วนอื่นบนแถบตรวจ 2) Conjugate pad เป็นตำแหน่งที่มีการเคลื่อนอนุภาคที่ทำให้เกิดสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าในเวลาอ่านผล อนุภาคที่อยู่บน Conjugate pad มักถูกผูกติดไว้กับแอนติบอดีที่เหมาะสม และถูกปล่อยออกไปทันทีเมื่อสัมผัสกับตัวอย่างที่เป็นของเหลวที่มีโมเลกุลที่จำเพาะกับแอนติบอดี เช่น แอนติเจนหรือสารที่ต้องการตรวจสอบ ซึ่งจะเคลื่อนที่ไปบนแถบตรวจเพื่อไปในส่วนถัดไป ตัวอย่างของอนุภาคที่ทำให้เกิดสี เช่น gold particle, Latex particle หรือ Fluorescent particle (111) อย่างไรก็ตาม การพัฒนาแถบตรวจส่วนใหญ่มักนิยมใช้ Gold particle เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้กระบวนการทำให้เกิดสี อนุภาคมีความเสถียร และสามารถกระเจิงแสงได้ดี ทำให้มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าได้ (111) 3) แผ่นเมมเบรน (Membrane) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่มีผลต่อความไวของแถบตรวจ ชนิดของเมมเบรนที่มักนิยมใช้ ได้แก่ Nitrocellulose membrane เนื่องจากมีขนาดของรูภายในเมมเบรนระหว่าง 3-20 μm ซึ่งมีขนาดใหญ่ ส่งผลให้สารเคลื่อนที่ได้ดีและรวดเร็ว นอกจากนี้ Nitrocellulose membrane มีคุณสมบัติในการดูดซับโปรตีนได้สูง ถึงแม้เมมเบรนเป็ยกด้วยสารละลายก็จะไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการดูดซับ (112) บนเมมเบรนมีบริเวณแถบ Test line และ Control line ที่มีการเคลือบแอนติบอดีหรือแอนติเจน เพื่อทำหน้าที่จับตัวอย่างแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่จำเพาะที่เคลื่อนที่ผ่าน ตามลำดับ และ 4) Absorbent pad หรือ Wicking pad ทำหน้าที่ดูดซับสารตัวอย่างส่วนเกินที่ไหลผ่าน โดยการไหลของสิ่งตัวอย่างตลอดแถบตรวจนั้นเกิดขึ้นได้จากแรง Capillary ในวัสดุของแถบตรวจ (111)

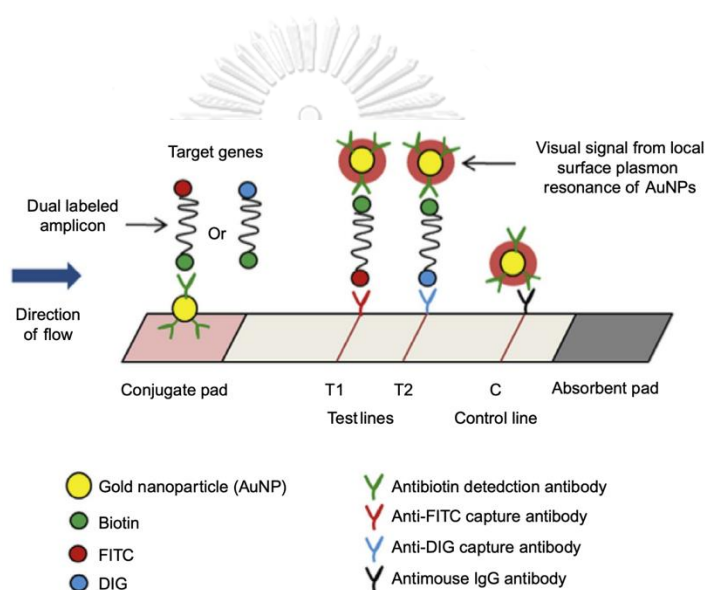


รูปที่ 2.6 โครงสร้างพื้นฐานและส่วนประกอบของ Lateral flow (LF) (35)

ในการพัฒนาแถบตรวจสำหรับตรวจผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Nucleic acid lateral flow immunoassay, NALF) อาศัยหลักการออกแบบแถบตรวจเช่นเดียวกับ LF ที่กล่าวมาข้างต้น อย่างไรก็ตามผลผลิตสารพันธุกรรมไม่สามารถถูกแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนแผ่นตรวจจับได้โดยตรง จึงต้องมีการติดโมเลกุลของสารบางประเภทไว้ที่ผลผลิตสารพันธุกรรม โดยอาศัยการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในเพิ่มสารพันธุกรรม ให้มีการติดฉลาก (Tag) ไว้ปลายด้าน 5' ของทั้ง Forward primer และ Reverse primer เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ผลผลิตสารพันธุกรรมดีเอ็นเอสายคู่ที่มีฉลากติดอยู่ ตัวอย่างโมเลกุลที่นิยมนำใช้ในการติดฉลาก ได้แก่ โมเลกุลของสีฟลูออเรสเซนต์ เช่น FITC, FAM, Cy5 และ Alexafluor488 และโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น Biotin, Digoxigenin (DIG) และ Dinitrophenyl (DNP) เป็นต้น (21, 35, 113) ทั้งนี้การตรวจสอบผลผลิตสารพันธุกรรมไม่ได้ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของไพรเมอร์ แต่อาศัยความจำเพาะระหว่างฉลากที่ถูกติด และแอนติบอดีที่ถูกเคลือบไว้บนเมมเบรนที่ต้องมีความจำเพาะต่อฉลากที่เลือกใช้งาน เช่น Anti-FAM, Anti-biotin และ Anti-digoxigenin โดย NALF สามารถตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาเพิ่มสารพันธุกรรมได้หลากหลายเทคนิค ได้แก่ เทคนิค PCR, เทคนิค Ligase chain reaction (LCR), เทคนิค Isothermal amplification (LAMP, RCA และ RPA) (113)

การทำงานของแถบตรวจ NALF เริ่มจากเมื่อสารละลายตัวอย่างที่มีผลผลิตจากที่มีฉลากติดอยู่ที่ปลายด้าน 5' และ 3' สัมผัสกับ Sample pad ตัวอย่างจะแพร่ผ่านไปยังตำแหน่ง Conjugate pad และจับอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีที่มี Gold particle ผูกติดเอาไว้ ผ่านฉลากด้านใดด้านหนึ่ง กลายเป็นสารเชิงซ้อน (Target-antibody-gold particle) จากนั้นสารเชิงซ้อนนี้ แพร่ผ่าน

ไปยัง Test line ซึ่งฉลากอีกด้านที่ยังไม่ถูกจับ จะจับกับแอนติบอดีที่ถูกเคลือบไว้อย่างจำเพาะ ส่งผลให้ Gold particle ถูกจับไว้ที่ Test line ทำให้มองเห็นเป็นแถบสีทึบ โดยความเข้มของแถบสีจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปริมาณตัวอย่างที่ทดสอบ ส่วนแอนติบอดีที่ผูก Gold particle ที่ไม่ได้จับกับสารละลายตัวอย่าง จะแพร่ผ่าน Test line ไปยังตำแหน่งแถบ Control line ที่มีแอนติบอดีคนละชนิดกับ Test line ถูกจับเอาไว้ เกิดเป็นแถบสีทึบขึ้นมา ซึ่ง Control line ต้องเกิดแถบสีทุกครั้งเพื่อตรวจสอบว่ามีการแพร่หรือการเคลื่อนที่ของสารละลายตัวอย่าง จนมาสิ้นสุดที่ตำแหน่ง Absorbent pad จะทำหน้าที่ดูดซับสารตัวอย่างไว้ (111) รูปที่ 2.7 แสดงหลักการทำงานของแถบตรวจ NALF



รูปที่ 2.7 การทำงานของแถบตรวจ NALF (114)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้อดีของการตรวจสอบผลผลิตสารพันธุกรรมด้วย NALF ได้แก่ มีความรวดเร็วในการอ่านผล มีขั้นตอนการทดสอบที่ไม่ยุ่งยาก สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า และไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะ จึงมีต้นทุนการดำเนินงานต่ำ ไม่ต้องอาศัยความชำนาญในการทดสอบ ซึ่งมีความเหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยภาคสนาม หรือในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมืออย่างจำกัด นอกจากนี้แถบตรวจสามารถถูกออกแบบมีความจำเพาะและความไวสูงได้ อีกทั้งมีความคงตัวนานระหว่างการเก็บรักษา ใช้ตัวอย่างทดสอบปริมาณน้อย จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานได้หลากหลายและสามารถพัฒนาเป็นเครื่องมือทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วย ได้ (115-118)

การศึกษาที่ผ่านมาของ He และคณะ (119) ได้พัฒนาการตรวจหา *Nosema bombycis* ในไข่ของหนอนไหมด้วยเทคนิค PCR-NALF โดยใช้ไพรเมอร์ยีน *LSU rDNA* ที่จำเพาะต่อ *N. bombycis* ได้ออกแบบด้านปลาย 5' ของ Forward primer ให้ติดโมเลกุล Biotin และ Reverse primer ให้ติดโมเลกุล FAM ภายหลังเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค NALF เปรียบเทียบกับ Agarose gel electrophoresis พบว่าเทคนิค PCR-NALF มีความไวมากกว่า PCR-AGE ถึง 100 เท่า และความเข้มข้นดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่ตรวจสอบได้ เท่ากับ 1 pg/ μ l การศึกษาของ El-Tholoth และคณะ (120) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจในไก่ คือ Newcastle disease virus (NDV) ด้วยไพรเมอร์ยีน matrix protein ที่ติดโมเลกุล Biotin และ FAM และ Infectious bronchitis virus (IBV) ด้วยไพรเมอร์ยีน nucleoprotein ที่ติดโมเลกุล Biotin และ DIG โดยใช้เทคนิค RPA-NALF ภายใต้อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 40 และ 20 นาที ตามลำดับ ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่ตรวจสอบได้ เท่ากับ 10 copies และเมื่อเปรียบเทียบ RPA-NALF กับ Quantitative RT-PCR พบว่าตรวจสอบได้ผลบวกกับเชื้อ NDV เท่ากับ 75% และ 66.7% ตามลำดับ และได้ผลบวกกับเชื้อ IBV เท่ากับ 16.7% และ 25% ทั้งนี้ ทั้ง 2 เทคนิคมีความสอดคล้องกันในระดับดี โดยมีค่าสถิติ Kappa ของ NDV และ IBV เท่ากับ 0.792 และ 0.750 ตามลำดับ

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์

1.1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค

Polymerase Chain Reaction

ได้แก่ ชุดน้ำยาเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase กับ Standard *Taq* buffer (บริษัท New England BioLabs จำกัด สหรัฐอเมริกา) ชุดน้ำยา Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) (บริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา) โพรเมอร์สังเคราะห์จากบริษัท Bionics จำกัด ประเทศเกาหลีใต้, น้ำ Molecular Biology Grade (บริษัท Hyclone Laboratories จำกัด สหรัฐอเมริกา) หลอด PCR ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (บริษัท Wuxi NEST Biotechnology จำกัด สาธารณรัฐประชาชนจีน)

1.2. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค

Recombinase polymerase amplification

ได้แก่ ชุดน้ำยา RPA TwistAmp[®] Basic (บริษัท TwistDx จำกัด สหราชอาณาจักร) โพรเมอร์สังเคราะห์จากบริษัท Bionics จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ น้ำ Molecular Biology Grade (บริษัท Hyclone Laboratories จำกัด สหรัฐอเมริกา) ชุดน้ำยาสำหรับทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ FavorPrep Gel/PCR purification (บริษัท Favorgen Biotech Corporation จำกัด ประเทศไต้หวัน) หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (บริษัท Wuxi NEST Biotechnology จำกัด สาธารณรัฐประชาชนจีน)

1.3. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip

ได้แก่ แถบตรวจเปล่าที่เป็น Nitrocellulose membrane และยังไม่ได้พันสาร ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ไอเมด ลาบอราทอรี จำกัด ประเทศไทย Mouse monoclonal anti-biotin (MAB) conjugated 40nm colloidal gold nanoparticles (บริษัท BBI Solutions OEM จำกัด สหราชอาณาจักร) Goat polyclonal anti-FITC (บริษัท Abcam จำกัด, สหราชอาณาจักร) Goat

polyclonal anti-mouse IgG (บริษัท Arista Biologicals จำกัด สหรัฐอเมริกา) สารละลาย 10X-Phosphate-buffered saline (10X-PBS) (บริษัท แอปสลาเจน (Apsalagen) จำกัด ประเทศไทย) น้ำ Molecular Biology Grade (บริษัท Hyclone Laboratories จำกัด สหรัฐอเมริกา) ชุดน้ำยาสำหรับทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ FavorPrep Gel/PCR purification (บริษัท Favorgen Biotech Corporation จำกัด ประเทศไทย) หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (บริษัท Wuxi NEST Biotechnology จำกัด สาธารณรัฐประชาชนจีน)

1.4. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis

ได้แก่ สาร Agarose (บริษัท Serva จำกัด ประเทศเยอรมนี) น้ำยา UltraPower™ DNA/RNA safe dye (บริษัท Gellex International จำกัด ประเทศญี่ปุ่น) น้ำยา 6X Loading dye (บริษัท Biotechrabbit จำกัด ประเทศเยอรมนี) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (บริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา) สาร Tris base (บริษัท Amresco จำกัด สหรัฐอเมริกา) สาร Acetic acid (บริษัท Merck จำกัด ประเทศเยอรมนี) สาร Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด สหรัฐอเมริกา)

1.5. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วย

ได้แก่ ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจ MagDEA® Dx reagents (บริษัท Precision system science จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น) ชุดน้ำยา Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (บริษัท Seegene จำกัด ประเทศเกาหลีใต้)

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer-บริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo cycler -บริษัท SensoQuest สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (Dry Bath Incubator-บริษัท Hangzhou Allsheng Instruments จำกัด สาธารณรัฐประชาชนจีน) เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Gel Doc™ XR ChemiDoc™ XRS-บริษัท Bio-Rad Laboratories จำกัด

สหรัฐอเมริกา) ชุดเครื่องแยกวิเคราะห์สารพันธุกรรมในแนวนอน (Gel electrophoresis-บริษัท Labnet International จำกัด สหรัฐอเมริกา) เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex-บริษัท Scientific Industries จำกัด สหรัฐอเมริกา) เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างความเร็วสูง (High Speed Microcentrifuge-บริษัท Eppendorf International จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) และเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (Spectrafuge™ Mini Laboratory Centrifuge-บริษัท Labnet International จำกัด สหรัฐอเมริกา) เครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติ (Auto pipette-บริษัท Labnet International จำกัด สหรัฐอเมริกา และบริษัท Gilson จำกัด สหรัฐอเมริกา) เครื่องสกัดอัตโนมัติ magLEAD (บริษัท Precision system science จำกัด ประเทศไทย) เครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 Dx System (บริษัท Bio-Rad Laboratories จำกัด สหรัฐอเมริกา)

3. การออกแบบงานวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้ได้แบ่งการทดสอบออกเป็นทั้งหมด 6 ส่วน ได้แก่

3.1.การพัฒนาเทคนิค Multiplex-recombinase polymerase amplification

เพื่อพัฒนาเทคนิค M-RPA ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่สามารถเพิ่มสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิเดียวครั้งที่ด้วยเทคนิค RPA โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา M-RPA ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ ระยะเวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

3.2.การพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip

เพื่อพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่สำหรับการตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า โดยการออกแบบชนิดของแถบตรวจ ชนิดและประเภทของแอนติบอดี เพื่อให้แถบตรวจที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากงานวิจัยนี้

3.3.การพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip ร่วมกับผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค M-RPA

เพื่อพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip ที่ออกแบบให้สามารถตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค M-RPA ให้มีความเหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรค โดยการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการทดสอบของแถบตรวจ MTB Strip ซึ่งได้แก่ อัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ความเข้มข้นของแอนติบอดี และระยะเวลาในการทดสอบ เพื่อส่งผลิตแถบตรวจ MTB Strip ในระดับอุตสาหกรรม

3.4.การประเมินประสิทธิภาพเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip และคุณภาพของแถบตรวจ MTB Strip

เพื่อประเมินประสิทธิภาพเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip และคุณภาพของแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งมีการทดสอบหาความเข้มข้นน้อยที่สุด (LOD) การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (Cross reactivity) ต่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ การทดสอบความคงตัวของผลที่ปรากฏอยู่บนแถบตรวจ MTB Strip และ การทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ MTB Strip เพื่อให้ทราบประสิทธิภาพและคุณภาพของแถบตรวจ MTB Strip ก่อนนำไปทำการตรวจวินิจฉัยวัณโรคต่อไป

3.5.การวินิจฉัยวัณโรคด้วยแถบตรวจ MTB Strip

เพื่อวินิจฉัยวัณโรคด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากโคลนนิ่งของเชื้อ ซึ่งเป็นสายพันธุ์คลินิกที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT 64 (SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid test (สำหรับเชื้อกลุ่ม MTBC) และเทคนิค Sanger DNA Sequencing บริเวณยีน 16S rRNA (สำหรับเชื้อกลุ่ม Nontuberculous mycobacteria, NTM) ในขณะที่การวินิจฉัยวัณโรคจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ เปรียบเทียบกับเทคนิคการย้อมสีทึบกรด และ Real-time PCR

3.6.การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของแถบตรวจ MTB Strip ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค

นำผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ และจากสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip คำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ

(Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value; PPV) ค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value; NPV) และค่าความสอดคล้องด้วยสถิติ Kappa (**K**)

4. วิธีการทดลอง

4.1. การคำนวณหาจำนวนกลุ่มตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างเสมอทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ คำนวณจากค่าประมาณความชุกของวัณโรคในประเทศไทยที่ได้จากการศึกษาของ Jittimanee และคณะ ปี พ.ศ. 2552 (121) ร่วมกับสูตรคำนวณของ Buderer และคณะ (122) มีรายละเอียดดังนี้

สูตรคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับทดสอบความไว

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \times SN(1-SN)}{W^2 \times P}$$

สูตรคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับทดสอบความจำเพาะ

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \times SP(1-SP)}{W^2 \times P}$$

โดย n = จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

$Z_{\alpha/2}$ = ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนดที่ 95 % หรือระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่าเท่ากับ 1.96 (85)

W = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (0.05)

SN = ค่าความไวของวิธีมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยวัณโรค (การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960) เท่ากับ 95.5% (123)

SP = ค่าความจำเพาะของวิธีมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยวัณโรค (การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 เท่ากับ 99.6%) (123)

P = ค่าประมาณความชุกของวัณโรคในประเทศไทย เท่ากับ 17%

แทนค่าจากสูตรขนาดตัวอย่างสำหรับทดสอบความไว

$$n = \frac{(1.96)^2 \times 0.955(1-0.955)}{(0.05)^2 \times 0.17} = 389 \text{ ตัวอย่าง}$$

สูตรขนาดตัวอย่างสำหรับทดสอบความจำเพาะ

$$n = \frac{(1.96)^2 \times 0.996(1-0.996)}{(0.05)^2 \times 0.17} = 36 \text{ ตัวอย่าง}$$

จากผลการคำนวณตัวอย่างด้วยสูตรข้างต้น ได้ขนาดตัวอย่างเสมอสำหรับทดสอบความไว จำนวนเท่ากับ 389 ตัวอย่าง และความจำเพาะ จำนวนเท่ากับ 36 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากระยะเวลาการทำวิจัยและสถานการณ์การระบาดของโรคโควิด-19 ในช่วงปี พ.ศ. 2563-2564 ซึ่งส่งผลต่อการเก็บตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามการคำนวณข้างต้น ทำให้การเก็บตัวอย่างเสมอที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เท่ากับ 131 ตัวอย่าง

4.2. การพิจารณาขอจริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร เลขที่รับรองโครงการ COA. MURA2021/40 และจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลเลิดสิน กรุงเทพมหานคร เลขที่รับรองโครงการ LH-641041-095

4.3. ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้การศึกษานี้ เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอ ซึ่งแบ่งเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv สำหรับใช้ในการพัฒนาเทคนิค M-RPA และแถบตรวจ MTB Strip และใช้เป็นตัวควบคุมบวกในขั้นตอนการวินิจฉัยวัณโรค ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

2. ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อกลุ่ม *Mycobacterium* ที่ถูกเพาะเลี้ยงขึ้นมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งชนิดแข็งหรือเหลว รวม 130 ตัวอย่าง เพื่อใช้ในการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอที่สกัดมาจากโคลนนิ่งของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 100 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับการยืนยันว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม MTBC ด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT 64 SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid test (บริษัท Alere จำกัด สหรัฐอเมริกา) และโคลนนิ่งของเชื้อ Nontuberculous mycobacteria (NTM) จำนวน 30 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับการยืนยันเชื้อด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing บริเวณยีน 16S rRNA เชื้อทั้งหมดเพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกันและทำการวินิจฉัยยืนยันเชื้อ โดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดถูกนำมากำหนดรหัสใหม่ เพื่อไม่ให้เกิดการสับสนข้อมูลกลับถึงผู้ป่วยได้

3. ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วยที่ถูกส่งมาเพื่อวินิจฉัยวัณโรค จำนวน 131 ตัวอย่าง ซึ่งได้มาจากผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกันและผ่านการทดสอบการย้อมสีทึบกรด โดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร จำนวน 125 ตัวอย่าง และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลเลิดสิน กรุงเทพมหานคร จำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะทั้งหมดถูกนำมากำหนดรหัสใหม่ เพื่อไม่ให้เกิดการสับสนข้อมูลกลับถึงผู้ป่วยได้

4.4. การสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv และโคลนนิ่งเชื้อ MTBC และ NTM ที่ถูกเพาะเลี้ยงขึ้นมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการต้มโดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร โดยการเขี่ยโคลนนิ่งของเชื้อมา 1 ลูบ ผสมกับสารละลาย Lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1% SDS) ปริมาตร 400 μ l ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม

ดีเอ็นเอที่สกัดจากเสมหะ ถูกนำมาสกัดด้วยน้ำยา MagDEA[®] Dx reagents ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต โดยใช้เครื่องสกัดอัตโนมัติ magLEAD นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้น

และความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งหมดข้างต้นที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4.5.การออกแบบไพรเมอร์

การศึกษานี้ใช้ไพรเมอร์สำหรับทำปฏิกิริยา Recombinase polymerase amplification (RPA) ที่จำเพาะต่อ IS1081 และ IS6110 ซึ่งมีความไวและจำเพาะสูงต่อเชื้อ MTBC โดยอ้างอิงมาจากการศึกษาก่อนหน้าของ Singpanomchai และคณะ (23) ที่พัฒนาเทคนิค Allele specific-recombinase polymerase amplification (AS-RPA) เพื่อวินิจฉัยวัณโรค โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv (Accession no. NC_000962) เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ ได้ออกแบบ Reverse primer ของ IS6110 ขึ้นมาใหม่ เพื่อให้มีความเหมาะสมกับการศึกษามากขึ้น ด้วยโปรแกรม Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา RPA มีความยาวอยู่ในช่วง 29-32 เบส และถูกออกแบบให้ผลผลิตปฏิกิริยาขนาดอยู่ในช่วงระหว่าง 173 bp ถึง 250 bp และให้มีการติดฉลาก (Tag) เพื่อสามารถนำไปใช้ร่วมกับอุปกรณ์แถบตรวจวัด โดยที่ด้านปลาย 5' ของ Forward primer ถูกติดด้วยโมเลกุลของ Biotin ในขณะที่ด้านปลาย 5' ของ Reverse primer ถูกติดด้วยสารเรืองแสงชนิด Carboxyfluorescein (FAM) รายละเอียดของไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาด ของ ผลผลิต	ที่มา
RPA-IS1081F	Biotin-CCTCTTTCATCTTATCGACGCCGAGCAGC	173 bp	(23)
RPA-IS1081R	FAM-CTGATTGGACCGCTCATCGCTGCGTTCGC		
RPA-IS6110F	Biotin-TCAGTGAGGTCGCCGTCTACTTGGTGTTG	250 bp	ดัดแปลง จาก (23)
RPA-IS6110R	FAM-CTGATGATCGGCGATGAACCGGGTAATTAGCG		

4.6. การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ IS6110 สำหรับปฏิกิริยา RPA ด้วย

เทคนิค PCR

เนื่องจากไพรเมอร์ IS6110 ได้รับการออกแบบขึ้นมาใหม่ในการศึกษาครั้งนี้ จึงต้องมีการนำมาประเมินประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมก่อนนำมาใช้ในการศึกษา

4.6.1. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม IS6110 ด้วยเทคนิค PCR

ไพรเมอร์ของ IS6110 ที่ถูกออกแบบขึ้นมาใหม่ ถูกนำมาประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นด้วยการนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อ

M. tuberculosis สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ภายในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 μ l ประกอบด้วย 10X Taq buffer ปริมาตร 5 μ l, 10 mM Deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ปริมาตร 1 μ l, 10 μ M Forward primer และ Reverse primer ปริมาตรอย่างละ 1 μ l, 1U Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.25 μ l ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 5 ng/ μ l และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 19.875 μ l ทำปฏิกิริยา PCR ที่สภาวะอุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที โดยใช้ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา PCR ด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 1 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส บันทึกภาพที่เกิดขึ้น

4.6.2. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตปฏิกิริยา PCR

นำผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากข้อ 4.6.1 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing เพื่อยืนยันผลการตัดแปลงไพรเมอร์ IS6110 จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* เตรียมผลผลิตปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 35 μ l มีความเข้มข้นดีเอ็นเอไม่น้อยกว่า 50 ng/ μ l พร้อมกับไพรเมอร์ IS6110 โดยส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Bioneer sequencing service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับมา

เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv (Accession no. NC_000962) ด้วยซอฟต์แวร์ออนไลน์ Clustal Omega (EMBL-EBI) <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

4.7. การพัฒนาเทคนิค Multiplex-recombinase polymerase amplification

การพัฒนาเทคนิค M-RPA เพื่อตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วย IS1081 และ IS6110 ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีการติดฉลากที่ด้านปลาย 5' ในตารางที่ 3.1 การพัฒนาเทคนิคใช้ชุดน้ำยา RPA (TwistAmp® Basic kit) โดยภายใน 1 หลอดปฏิกิริยา M-RPA ปริมาตร 50 µl ประกอบด้วย Rehydration buffer 29.5 µl, 10 µM Forward primer และ Reverse primer ของแต่ละ IS ปริมาตรอย่างละ 2.4 µl, น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 7.4 µl, ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ความเข้มข้น 20 ng/µl ปริมาตร 1 µl และ 280 mM Magnesium oxaloacetate (MgOAc) ปริมาตร 2.5 µl ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา นำผลผลิตปฏิกิริยา RPA ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา Gel/PCR purification (FAVORGEN) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต และตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 1 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส บันทึกภาพที่เกิดขึ้น

ในการศึกษานี้ได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา M-RPA ด้วยไพรเมอร์ของ IS1081 และ IS6110 ดังต่อไปนี้

4.7.1. การทดสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำการเจือจางดีเอ็นเอต้นแบบให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 5 10 15 และ 20 ng/µl นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา M-RPA ซึ่งมีปริมาตรรวม 50 µl ตามปฏิกิริยาข้อ 4.7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา Gel/PCR purification และนำมาตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% เลือกความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจนที่สุดมาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.7.2. การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทดสอบปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.7.1 โดยใน 1 ปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรรวม 50 μ l ตามปฏิกิริยาข้างต้น โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ Forward primer และ Reverse primer เป็น 0.12 0.24 และ 0.48 μ M บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที นำผลผลิต M-RPA ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR purification และนำมาตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% เลือกความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ที่น้อยที่สุดที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดมาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.7.3. การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทดสอบปฏิกิริยา M-RPA โดยใน 1 ปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรรวม 50 μ l ตามปฏิกิริยาข้างต้น โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบและ Forward primer และ Reverse primer ที่ความเข้มข้นที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.7.1 และ 4.7.2 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 10 15 และ 20 นาที นำผลผลิต M-RPA ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR purification และนำมาตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% เลือกระยะเวลาที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดมาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.7.4. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทดสอบปฏิกิริยา M-RPA โดยใน 1 ปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรรวม 50 μ l ตามปฏิกิริยาข้างต้น ดีเอ็นเอต้นแบบและ Forward primer และ Reverse primer ที่ความเข้มข้นที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.7.1 และ 4.7.2 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 35 37 39 41 และ 43 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 9.9.3 นำผลผลิต M-RPA ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR purification และนำมาตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% เลือกอุณหภูมิที่ดีที่สุดที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุด

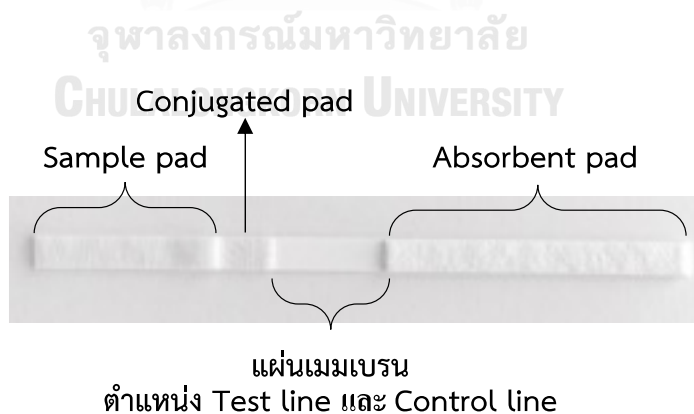
จากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา M-RPA ของ IS1081 และ IS6110 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ในปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ ระยะเวลาที่บ่ม และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ตามข้อ 4.7.1 - 4.7.4 นำผลสภาวะสุดท้ายที่เหมาะสมมาใช้ในการพัฒนาแผ่นตรวจขั้นต่อไป

4.8. การออกแบบแถบตรวจ MTB strip เพื่อตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา M-RPA

4.8.1. โครงสร้างของแถบตรวจ MTB strip

การพัฒนาแถบตรวจสำหรับตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างไพรเมอร์ที่ติดฉลากที่จำเพาะต่อ IS1081 และ IS6110 โดยใช้แถบตรวจ Nitrocellulose เปล่าที่ไม่ได้พันสาร ขนาด 4 x 80 x 0.15 mm (กว้างxยาวxหนา) ในการพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์แถบตรวจจากบริษัท ไอเมต ลาบอราทอรี จำกัด ดังแสดงในรูปที่ 3.1 โครงสร้างของแถบตรวจประกอบไปด้วย

1. แผ่นพลาสติกฐานรอง (Card)
2. แผ่นเมมเบรน (Membrane) เป็นบริเวณที่เคลือบแอนติบอดีสำหรับตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา ได้แก่ Test line และ Control line จำนวนอย่างละ 1 แถบ เป็นบริเวณแสดงปฏิกิริยาของการตรวจสอบผลผลิต M-RPA
3. Sample pad เป็นบริเวณที่ใช้ในดูดซับผลผลิตปฏิกิริยา M-RPA
4. Conjugated pad เป็นบริเวณที่ผลผลิต M-RPA จับกับโมเลกุลของสีที่ใช้บ่งชี้ผลของปฏิกิริยา
5. Absorbent pad เป็นบริเวณส่วนที่ดูดซับของเหลวส่วนเกินที่ไหลผ่านแถบตรวจ



รูปที่ 3.1 โครงสร้างของแถบตรวจเปล่าที่ไม่ได้พันสารที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และได้รับความอนุเคราะห์แถบตรวจจากบริษัท ไอเมต ลาบอราทอรี จำกัด

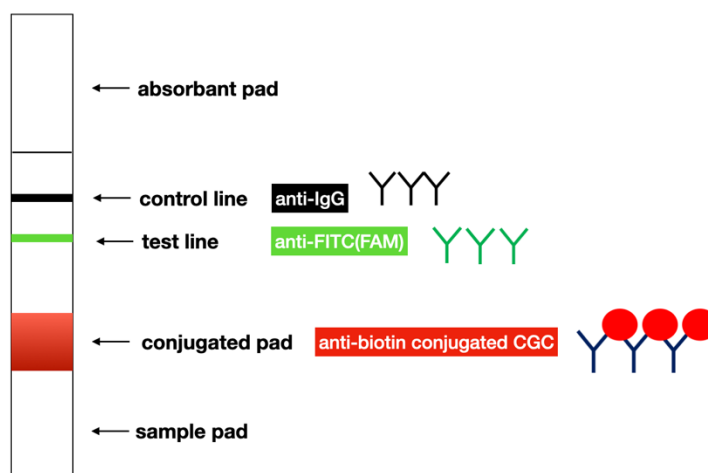
ในการตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา M-RPA ของ IS1081 และ IS6110 ด้วยแถบตรวจ ใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้มีการติดฉลากที่ปลายด้าน 5' ของไพรเมอร์แต่ละเส้นของแต่ละ IS ตามรายละเอียดในตารางที่ 3.1

ด้านปลาย 5' ของ Forward primer ที่จำเพาะต่อทั้ง IS1081 และ IS6110 ถูกติดด้วยโมเลกุลของ Biotin ในขณะที่ด้านปลาย 5' ของ Reverse primer ที่จำเพาะต่อทั้ง IS1081 และ IS6110 ถูกติดด้วยโมเลกุลของ FAM ดังนั้นผลผลิต M-RPA ที่เกิดจากไพรเมอร์ของทั้งสอง IS จะมีโมเลกุลของทั้ง Biotin และ FAM ติดอยู่เหมือนกัน ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบและเลือกใช้แอนติบอดีเพื่อตรวจจับโมเลกุลดังกล่าวบนแถบตรวจ MTB Strip ดังนี้ (รูปที่ 3.2)

- Anti-biotin gold conjugate 40nm colloidal gold nanoparticles ถูกเคลือบไว้บริเวณ Conjugated pad เป็นแอนติบอดีที่จับโมเลกุล Biotin ที่ติดอยู่ปลายด้านหนึ่งของผลผลิต M-RPA ซึ่งโมเลกุล Gold ที่ติดอยู่บนแอนติบอดี เป็นตัวทำให้เกิดแถบสีแดง เมื่อปรากฏอยู่บริเวณตำแหน่ง Test line และ Control line

- Anti-FITC (Goat polyclonal anti-FITC (Abcam[®]) ถูกเคลือบไว้บริเวณ Test line เป็นแอนติบอดีที่สามารถจับได้กับทั้งโมเลกุลของ FAM และ FITC เนื่องจากโมเลกุลทั้งสอง มีโครงสร้างที่เหมือนกันและสามารถใช้แทนกันได้ โดย Anti-FITC จะจับกับโมเลกุลของ FAM ที่ติดอยู่ปลายอีกด้านหนึ่งของผลผลิต M-RPA

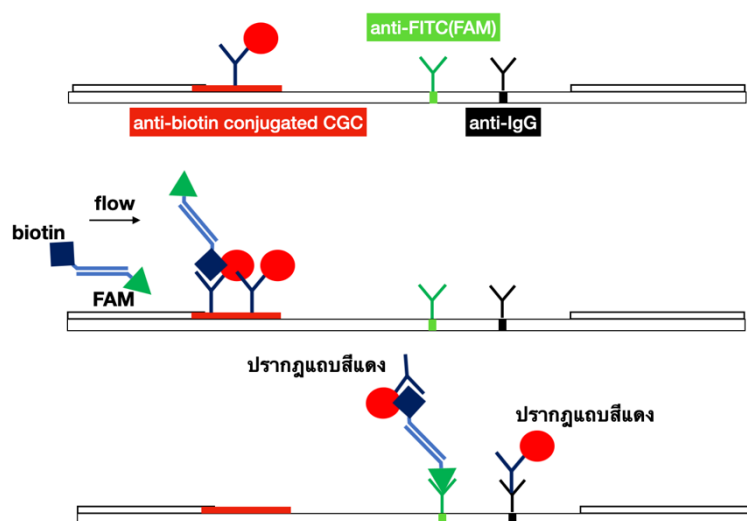
- Anti-IgG (Goat polyclonal anti-mouse IgG (Arista Biologicals) ถูกเคลือบไว้บริเวณ Control line เป็นแอนติบอดีที่จับโมเลกุลของ Anti-biotin gold conjugate



รูปที่ 3.2 ตัวอย่างจำลองตำแหน่งของสารต่าง ๆ บนแถบตรวจ MTB Strip สำหรับวินิจฉัยวัณโรค

4.8.2. หลักการทำงานของแถบตรวจ MTB Strip

การทำงานของแถบตรวจภายหลังจากเคลือบแอนติบอดีและสารต่าง ๆ เมื่อทดสอบกับผลผลิต M-RPA ที่เป็นดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลากด้วยโมเลกุล Biotin และ FAM ไว้ที่ปลายสายแต่ละด้าน ผลผลิต M-RPA จะไหลไปตามแถบตรวจจนมาถึงตำแหน่ง Conjugated pad ที่มีการเคลือบ Anti-biotin gold conjugate ไว้ เกิดการจับกันระหว่างโมเลกุล Biotin บนสายดีเอ็นเอกับ Anti-biotin gold conjugate กลายเป็น Biotin/Anti-biotin gold conjugate complex จากนั้นทั้ง Biotin/Anti-biotin gold conjugate complex และ Anti-biotin gold conjugate ที่ไม่ได้ถูกจับ จะเคลื่อนที่ไปตามเมมเบรน จนถึงตำแหน่ง Test line ที่มีการเคลือบ Anti-FITC ไว้ ซึ่งจะจับกับโมเลกุล FAM ที่อยู่อีกปลายด้านหนึ่งของสายดีเอ็นเอที่มีการจับกับ Anti-biotin gold conjugate ไว้ก่อน ทำให้เกิดแถบสีแดงจาก Gold particle ในขณะที่ Anti-biotin gold conjugate ที่ไม่ได้ถูกจับ จะเคลื่อนเลยไปยังตำแหน่ง Control line ที่มี Anti-IgG เคลือบไว้ ซึ่งจะจับกับ Anti-biotin gold conjugate จะปรากฏแถบสีแดงขึ้นมา (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 ตัวอย่างจำลองการเกิดปฏิกิริยาระหว่างผลผลิตปฏิกิริยา M-RPA กับแถบตรวจ

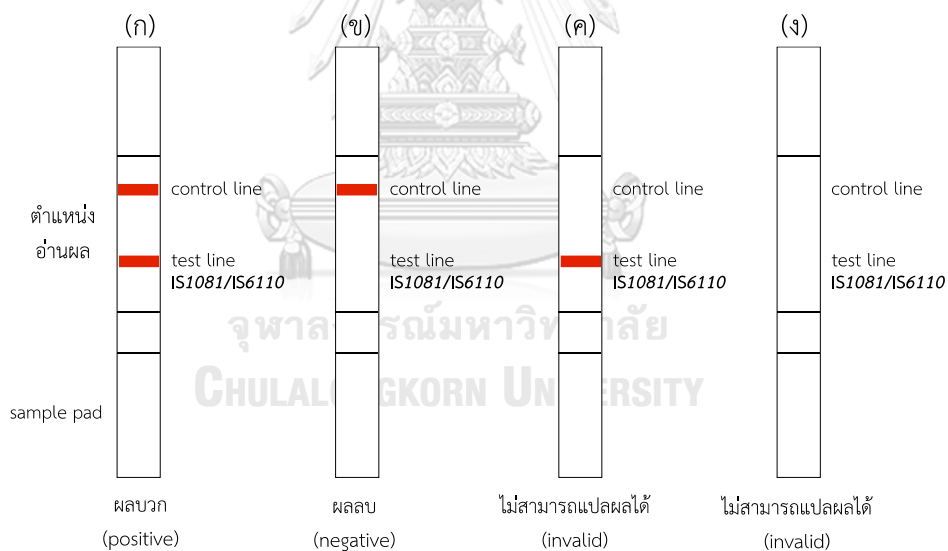
การออกแบบแถบตรวจในการศึกษานี้ มีตำแหน่ง Test line เพียงแถบเดียว และเป็นตำแหน่งที่ถูกเคลือบด้วย Anti-FITC ซึ่งจับกับโมเลกุลของ FAM ที่อยู่ในผลผลิต M-RPA ของทั้ง IS1081 และ IS6110 ดังนั้นการตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นดังกล่าว อาศัยตำแหน่งเดียวกัน สาเหตุที่ไม่แยกการตรวจสอบผลผลิตของ IS ทั้งสองชนิดนี้ ออกเป็นสองแถบอิสระจากกัน เนื่องมาจากทั้ง IS1081 และ IS6110 เป็น Element จำเพาะสูง นิยมใช้ในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อ MTBC ในเทคนิคทางอณูชีววิทยา การตรวจพบ IS ใด IS หนึ่ง จึงสามารถยืนยันการวินิจฉัยเชื้อ MTBC ได้ ประกอบกับเมื่อพิจารณาถึงต้นทุนในการผลิตแถบตรวจ เพื่อนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นจึงออกแบบให้แถบตรวจมีแถบ Test line เพียงแค่แถบเดียว และสามารถใช้ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ได้ทั้งของ IS1081 และ/หรือ IS6110

4.8.3. การอ่านผลของแถบตรวจ MTB Strip

การอ่านผลของแถบตรวจหลังจากตรวจสอบผลผลิต M-RPA บริเวณตำแหน่ง Control line หากปรากฏแถบสีแดง หมายถึง สามารถอ่านและแปลผลแถบตรวจได้ เนื่องมาจาก Anti-biotin gold conjugate ที่ถูกเคลือบไว้บริเวณ Conjugated pad เคลื่อนที่ไปจับกับ Anti-IgG ที่ตำแหน่ง Control line หากไม่ปรากฏแถบสีแดง หมายถึง ไม่สามารถอ่านและแปลผลแถบตรวจได้ เนื่องมาจากไม่มี Anti-biotin gold conjugate ที่ถูกเคลือบไว้บริเวณ Conjugated pad เคลื่อนที่ไป

จับกับ Anti-IgG ที่ตำแหน่ง Control line ทั้งนี้อาจเกิดจาก Anti-IgG ที่ถูกเคลือบไว้เสื่อมประสิทธิภาพ ในการจับกับแอนติเจนเป้าหมาย ปริมาณ Anti-biotin gold conjugate เหลือไม่เพียงพอที่จะ เคลื่อนที่มาจับกับ Anti-IgG บริเวณ Control line เนื่องจากเกิด Biotin/Anti-biotin gold conjugate complex ที่จับกันจนหมด และอาจเกิดจาก Anti-biotin gold conjugate ที่ถูกเคลือบไว้ มีลักษณะ แห้งติดกับ Conjugated pad จนไม่สามารถเคลื่อนที่ไปจับกับ Anti-IgG ที่ตำแหน่ง Control line หลังจากทดสอบตัวอย่าง เป็นต้น

ในขณะที่ตำแหน่ง Test line หากปรากฏแถบสีแดง หมายถึง ตรวจพบเชื้อ MTBC เนื่องจากมีผลผลิต M-RPA ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ/หรือ IS6110 และถูก Anti-FITC ที่อยู่ตำแหน่ง Test line จับเอาไว้ หากไม่ปรากฏแถบสีแดง หมายถึง ตรวจ ไม่พบเชื้อ MTBC เนื่องจากไม่มีผลผลิต M-RPA ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของทั้ง IS1081 และ IS6110 จึงไม่ถูก Anti-FITC ที่อยู่ตำแหน่ง Test line จับ (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.4 การอ่านผลการทดสอบของแถบตรวจ MTB Strip ภายหลังจากตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่จำเพาะต่อ IS1081 และ IS6110 ของเชื้อ MTBC สำหรับการวินิจฉัยวัณโรค (ก) ตรวจพบเชื้อ MTBC ที่มี IS1081 และ/หรือ IS6110 ปรากฏแถบสีแดงขึ้นครบทุกตำแหน่ง (ข) ตรวจไม่พบเชื้อ MTBC ที่มี IS1081 และ/หรือ IS6110 ปรากฏแถบสีแดงขึ้นเฉพาะตำแหน่ง Control line (ค) และ (ง) ไม่สามารถอ่านผลได้ เนื่องจากไม่ปรากฏแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Control line

4.9. การพัฒนาสถานะแถบตรวจ MTB Strip เพื่อตรวจสอบผลผลิต M-RPA

ขั้นตอนพัฒนาสถานะแถบตรวจ MTB Strip เพื่อใช้ในการตรวจสอบผลผลิต RPA ใช้การหยดสารต่าง ๆ ลงบนแถบตรวจเปล่า เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิด โดยมีสารต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นตั้งต้น ขั้นตอนการเตรียมและการทดสอบกับผลผลิต M-RPA ดังนี้ หยด Anti-biotin gold conjugate ความเข้มข้น OD10 ที่ตำแหน่ง Conjugated pad ปริมาตร 3 μl หยด Anti-FITC ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 1 μl ที่ตำแหน่ง Test line และ หยด Anti-IgG ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 1 μl ที่ตำแหน่ง Control line บ่มให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแถบตรวจ มาจุ่มลงในสารละลายผลผลิต M-RPA ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้นบนแถบตรวจ

ในการพัฒนาสถานะแถบตรวจ MTB Strip ได้มีการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกับสายละลายในส่วนประกอบของปฏิกิริยา M-RPA และทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip ดังนี้

4.9.1. การทดสอบการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross-reaction) กับสารละลายในส่วนประกอบของปฏิกิริยา M-RPA

นำแถบตรวจจากข้อ 4.9 มาทดสอบกับสารละลายที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยา RPA เพื่อทดสอบว่าองค์ประกอบต่าง ๆ ในปฏิกิริยา M-RPA สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติบอดีอยู่บนแถบตรวจหรือไม่ ซึ่งอาจส่งผลบวกปลอมในการอ่านผล องค์ประกอบต่าง ๆ ในปฏิกิริยา M-RPA ที่ถูกนำมาทดสอบ มีรายละเอียดดังนี้

- ไพรเมอร์ IS1081 และ IS6110 ที่ผสมในน้ำกลั่นบริสุทธ์ปราศจากเชื้อ ปริมาตรรวม 50 μl
- Rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μl ที่ผสมในน้ำกลั่นบริสุทธ์ปราศจากเชื้อ ปริมาตรรวม 50 μl
- Lyophilized pellet ของน้ำยา RPA (TwistAmp[®] Basic kit) ที่ผสมในน้ำกลั่นบริสุทธ์ปราศจากเชื้อ ปริมาตรรวม 50 μl
- Lyophilized pellet ของน้ำยา RPA (TwistAmp[®] Basic kit) ที่ผสมด้วย Rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μl และน้ำกลั่นบริสุทธ์ปราศจากเชื้อ ปริมาตรรวม 50 μl

- Lyophilized pellet ของน้ำยา RPA (TwistAmp® Basic kit) ที่ผสมด้วย Rehydration buffer ปริมาตร 29.5 μl MgOAc ปริมาตร 2.5 μl และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ ปริมาตรรวม 50 μl

นำสารละลายแต่ละหลอดบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำแถบตรวจ MTB Strip จากข้อ 4.9 มาจุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้น หากพบจุดสีแดงบนแถบตรวจที่ตำแหน่ง Test line และ Control line เมื่อทดสอบกับองค์ประกอบต่าง ๆ ของน้ำยาปฏิกิริยา M-RPA ข้างต้น ถือว่าไม่สามารถใช้แถบตรวจได้ เนื่องจากอาจส่งผลให้แถบตรวจเกิดปฏิกิริยาให้ผลบวกปลอมกับองค์ประกอบดังกล่าว และจำเป็นต้องมีการปรับสภาวะของแถบตรวจเพื่อไม่ให้เกิดผลบวกปลอมในทางตรงกันข้ามหากไม่พบจุดสีแดงบนแถบตรวจที่ตำแหน่ง Test line แต่ยังคงพบจุดสีแดงที่ตำแหน่ง Control line เมื่อทดสอบกับองค์ประกอบต่าง ๆ ของน้ำยาปฏิกิริยา M-RPA ข้างต้น ถือว่าสามารถใช้แถบตรวจไปพัฒนาต่อในขั้นต่อไปได้

4.9.2. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip

ทำปฏิกิริยา M-RPA ด้วยไพรเมอร์ IS1081 และ IS6110 โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ดำเนินปฏิกิริยา M-RPA ภายใต้สภาวะที่ได้จากการศึกษาในข้อ 4.7 หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยา ทำการแบ่งผลผลิต M-RPA ออกเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่หนึ่ง ผลผลิต M-RPA ปริมาตร 10 μl นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำผลผลิต M-RPA ที่บริสุทธิ์แล้ว ปริมาตร 5 μl ตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 1 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส บันทึกภาพที่เกิดขึ้น

ส่วนที่สอง นำผลผลิต M-RPA ปริมาตร 30 μl ผสมกับสารละลาย Phosphate - buffered saline (PBS) ปริมาตร 120 μl ปริมาตรรวมเท่ากับ 150 μl จากนั้นนำแถบตรวจ MTB

Strip มาจุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่า โดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้น

นำผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA ด้วยแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับวิธี Agarose gel electrophoresis เพื่อหาสถานะที่เหมาะสม ได้แก่ อัตราส่วนการเจือจางผลผลิต M-RPA ความเข้มข้นแอนติบอดี ระยะเวลาในการตรวจสอบผลผลิต การประเมินสถานะของการพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip พิจารณาจากการพบจุดสีแดงบนแถบตรวจที่ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับวิธี Agarose gel electrophoresis ซึ่งต้องพบจุดสีแดงบนแถบตรวจที่ตำแหน่ง Test line และ Control line อย่างชัดเจน และสอดคล้องกับการพบแถบตีเอ็นเอของผลผลิตใน Agarose gel electrophoresis เมื่อทดสอบกับตัวควบคุมบวก และพบเฉพาะจุดสีแดงบนแถบตรวจเฉพาะที่ตำแหน่ง Control line ซึ่งสอดคล้องกับการไม่พบแถบตีเอ็นเอของผลผลิตใน Agarose gel electrophoresis เมื่อทดสอบกับตัวควบคุมลบ รายละเอียดการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาแถบตรวจ มีดังนี้

4.9.2.1. การทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip

เตรียมแถบตรวจโดยใช้ความเข้มข้นของ Anti-FITC และ Anti-IgG ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 1 μ l ที่ตำแหน่ง Test line และ Control line ตามลำดับ และ Anti-biotin gold conjugate ความเข้มข้น OD10 ปริมาตร 3 μ l ที่ตำแหน่ง Conjugated pad เตรียมผลผลิต M-RPA ที่ถูกเจือจางด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วน 1:3 1:6 และ 1:10 (ผลผลิต M-RPA:PBS) โดยให้มีปริมาตรรวมของแต่ละอัตราส่วนเท่ากับ 150 μ l นำแถบตรวจ MTB Strip มาจุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้น เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis เลือกอัตรส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ที่สามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงบนแถบตรวจชัดเมื่อมองด้วยตาเปล่า และไม่เกิดผลบวกหรือลบปลอมบนแถบตรวจ มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.9.2.2. การทดสอบหาความเข้มข้นของ Anti-FITC และ Anti-IgG ที่เหมาะสม สำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip

ทำการเจือจาง Anti-FITC และ Anti-IgG ให้มีความเข้มข้น 1 0.8 0.6 0.4 และ 0.2 mg/ml ปริมาตร 1 μ l ที่ตำแหน่ง Test line และ Control line ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นของ anti-biotin gold conjugate ความเข้มข้น OD10 ปริมาตร 3 μ l ที่ตำแหน่ง Conjugated pad เตรียมผลผลิต M-RPA ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วนที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.9.2.1 นำแถบตรวจ MTB Strip มาจุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้น เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นของ Anti-FITC และ Anti-IgG ที่น้อยที่สุด ที่สามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงบนแถบตรวจชัดเมื่อมองด้วยตาเปล่า และไม่เกิดผลบวกหรือลบปลอมบนแถบตรวจ มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.9.2.3. การทดสอบหาความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate ที่เหมาะสม สำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip

ทำการเจือจาง Anti-biotin gold conjugate ให้มีความเข้มข้น OD10 OD8 OD6 OD4 และ OD2 ปริมาตร 3 μ l ที่ตำแหน่ง Conjugated pad โดยใช้ความเข้มข้นของ Anti-FITC และ Anti-IgG ที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.9.2.2 ปริมาตร 1 μ l ที่ตำแหน่ง Test line และ Control line ตามลำดับ เตรียมผลผลิต M-RPA ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วนที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.9.2.1 นำแถบตรวจ MTB Strip มาจุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้น เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate ที่น้อยที่สุด ที่สามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงบนแถบตรวจชัดเมื่อมองด้วยตาเปล่า และไม่เกิดผลบวกหรือลบปลอมบนแถบตรวจ มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.9.2.4. การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจสอบต่อผลผลิต M-RPA สำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip

เตรียมแถบตรวจ MTB Strip โดยใช้ความเข้มข้นของ Anti-FITC และ Anti-IgG ที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.9.2.2 ปริมาตร 1 μ l ที่ตำแหน่ง Test line และ Control line

ตามลำดับ และ Anti-biotin gold conjugate ที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.9.2.3 ปริมาตร 3 μl ที่ตำแหน่ง Conjugated pad เตรียมผลผลิต M-RPA ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วนที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.9.2.1 นำแถบตรวจ MTB Strip มาจุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 5 10 15 20 25 และ 30 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้น เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis เลือกระยะเวลาที่สั้นที่สุด ที่สามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงบนแถบตรวจชัดเมื่อมองด้วยตาเปล่า และไม่เกิดผลบวกหรือลบปลอมบนแถบตรวจ มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.9.2.5. การผลิตแถบตรวจ MTB Strip ด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม

เมื่อได้สถานะของแถบตรวจ MTB Strip ที่เหมาะสมในข้อ 4.9.2.1 ถึงข้อ 4.9.2.4 นำสถานะที่พัฒนาขึ้นได้ ไปผลิตแถบตรวจ MTB Strip ด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม โดยออกแบบให้แถบตรวจมีขนาดความกว้างเท่ากับ 4 mm และมีโครงสร้างตามรายละเอียดในข้อ 4.8.1 และรูปที่ 3.1 การผลิตในขั้นตอนนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ไอเมด ลาบอราทอรี จำกัด จังหวัดระยอง ประเทศไทย

4.10. การทดสอบหาความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) ของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

นำแถบตรวจ MTB Strip ที่ผลิตได้มาทดสอบหาค่า LOD โดยทำการเจือจางดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ ATCC H37Rv ให้เป็น 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 และ 0.00001 ng/ μl และใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทำปฏิกิริยา M-RPA ภายใต้สถานะที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.7 นำผลผลิต M-RPA มาตรวจสอบด้วยแถบตรวจที่ผลิตขึ้น และอ่านผลด้วยตาเปล่าตามสถานะที่ได้จากการทดสอบ 4.9 โดยสังเกตแถบสีแดงที่ปรากฏขึ้นบนแถบตรวจ เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis

4.11. การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

นำแถบตรวจที่ผลิตได้มาทดสอบหาปฏิกิริยาข้าม โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่สามารถก่อโรคทางเดินหายใจ ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* *Haemophilus influenzae* *Klebsiella pneumoniae* *Moraxella catarrhalis* *Pseudomonas aeruginosa* *Streptococcus pneumoniae* *Streptococcus pyogenes* เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ในกลุ่ม MTBC

ได้แก่ *Mycobacterium bovis* และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Mycobacterium* อื่น ๆ ได้แก่ *Mycobacterium avium* *Mycobacterium intracellulare* *Mycobacterium gordonae* และ *Mycobacterium kansasii* จำนวนทดสอบทั้งหมด 12 สายพันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทำปฏิกิริยา M-RPA ภายใต้สภาวะที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.7 นำผลผลิต M-RPA มาตรวจสอบด้วยแถบตรวจที่ผลิตขึ้น และอ่านผลด้วยตาเปล่าตามสภาวะที่ได้จากการทดสอบ 4.9 โดยสังเกตแถบสีแดงที่ปรากฏขึ้นบนแถบตรวจ เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis

4.12. การทดสอบความคงตัวของผลที่ปรากฏอยู่บนแถบตรวจ MTB Strip

ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทำปฏิกิริยา M-RPA ภายใต้สภาวะที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.7 นำผลผลิต M-RPA มาตรวจสอบด้วยแถบตรวจที่ผลิตขึ้น และอ่านผลด้วยตาเปล่าตามสภาวะที่ได้จากการทดสอบ 4.9 จากนั้นเก็บ แถบตรวจไว้ในที่ที่บ่มแสง ภายใต้อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 1 6 12 24 ชั่วโมง 1 2 3 สัปดาห์ และ 1 3 เดือน บันทึกผลการอ่านผล เพื่อเปรียบเทียบความคงตัวของผลที่ปรากฏอยู่บนแถบตรวจ เมื่อถูกเก็บไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

4.13. การทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ MTB Strip

เพื่อเป็นการประเมินอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจที่ถูกผลิตขึ้น เมื่อถูกจัดเก็บในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ นำแถบตรวจที่ผลิตขึ้นและยังบรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์ ซึ่งเก็บรักษา ดังต่อไปนี้ 1) อายุการเก็บรักษาที่ 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2) อายุการเก็บรักษาที่ 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส 3) อายุการเก็บรักษาที่ 1 1.5 2 และ 3 ปี โดยนำแถบตรวจเก็บรักษาในสภาวะตึงเครียด (Stress test) ซึ่งเป็นสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงประมาณ 70 องศาเซลเซียส ภายใต้ความชื้น 20% เป็นระยะเวลา 24 36 48 และ 168 ชั่วโมง เพื่อเป็นการเร่งให้แถบตรวจเสื่อมสภาพเร็วขึ้น โดยมีอายุเทียบเคียงกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในระยะยาว เท่ากับ 1 1.5 2 และ 3 ปี ตามลำดับ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3.2 (124)

หลังครบกำหนดการเก็บรักษาที่ระยะเวลาและสภาวะข้างต้น ทำปฏิกิริยา M-RPA ภายใต้สภาวะที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.7 ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ นำผลผลิต M-RPA มาตรวจสอบด้วยแถบตรวจ และอ่านผลด้วยตาเปล่าตามสภาวะที่ได้จากการทดสอบ 4.9 โดยสังเกตแถบสีแดงที่ปรากฏขึ้นบนแถบตรวจ การศึกษานี้ได้กำหนดระดับการมองความเข้มของแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line และ Control line ดังนี้ ไม่เห็นแถบสีแดง มองเห็นความเข้มของแถบสีแดงจาง มองเห็นความเข้มของแถบสีแดงชัดเจน ทำการทดสอบในขั้นตอนนี้ซ้ำสองครั้งในแต่ละการทดลอง และทำสองการทดลองภายใต้ช่วงระยะเวลาที่ต่างกัน

ตารางที่ 3.2 สภาวะตั้งครีดยที่ใช้ในการทดสอบอายุการเก็บรักษาแถบตรวจ MTB Strip (124)

อุณหภูมิและความชื้น	ระยะเวลา	เทียบเคียงอายุการเก็บรักษา ในระยะยาวเท่ากับ
อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และระดับความชื้นที่ 20%	24 ชั่วโมง	1 ปี
	36 ชั่วโมง	1.5 ปี
	48 ชั่วโมง	2 ปี
	168 ชั่วโมง	3 ปี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.14. การวินิจฉัยกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนิจของเชื้อ MTBC และ NTM ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนิจของเชื้อ MTBC จำนวน 100 ตัวอย่าง และโคลนิจของเชื้อ NTM จำนวน 30 ตัวอย่าง มาใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้น ทำปฏิกิริยา M-RPA ภายใต้สภาวะที่ได้จากการทดสอบข้อ 4.7 ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ นำผลผลิต M-RPA มาตรวจสอบด้วยแถบตรวจ MTB Strip และอ่านผลด้วยตาเปล่าตามสภาวะที่ได้จากการทดสอบ 4.9 โดยสังเกตแถบสีแดงที่ปรากฏขึ้นบนแถบตรวจ เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis นำผลการวินิจฉัยเชื้อด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip เปรียบเทียบกับการวินิจฉัย

ยืนยันเชื้อด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT 64 (สำหรับดีเอ็นเอของ MTBC) และเทคนิค Sanger DNA Sequencing (สำหรับดีเอ็นเอ NTM) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้น

4.15. การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจ เหมาะสมด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วยมีคุณภาพแตกต่างกัน จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่จากโคลนีย์ของเชื้อ เนื่องจากดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยสามารถพบ การปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากแหล่งอื่น เช่น ดีเอ็นเอจากเชื้อประจำถิ่น หรือดีเอ็นเอจากร่างกายผู้ป่วย ส่งผลให้ขัดขวางหรือรบกวนการทำปฏิกิริยา M-RPA ได้ (125) ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการทดสอบหา สถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา M-RPA ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่ง ส่งตรวจเสมหะ รวมไปถึงสถานะที่เหมาะสมของการตรวจสอบผลผลิตบนแถบตรวจ MTB Strip สำหรับการตรวจวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ โดยการใช้ไพรเมอร์ IS1081 และ IS6110 จาก ตารางที่ 3.1 ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุม บวก และใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ร่วมกับดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะของ ผู้ป่วยที่ผ่านการทดสอบการย้อมสีทึบกรดได้ผลเป็นบวกระดับ Scanty, 1+, 2+ และ 3+ (ซึ่งใน การศึกษานี้เรียกว่า AFB scanty DNA, AFB 1+ DNA, AFB 2+ DNA และ , AFB 3+ DNA ตามลำดับ) และดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วยที่ไม่ได้ถูกส่งมารับการวินิจฉัยวัณโรค ซึ่งมีผลการทดสอบ การย้อมสีทึบกรดเป็นลบและไม่พบดีเอ็นเอของ MTBC หรือ NTM เมื่อถูกยืนยันด้วยเครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 Dx System และเรียกว่า AFB 0 DNA เป็นตัวควบคุมลบอีกชนิดในปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยา M-RPA และนำผลผลิต M-RPA มาตรวจสอบด้วยแถบตรวจ MTB Strip และอ่านผลด้วย ตาเปล่า โดยสังเกตแถบสีแดงที่ปรากฏขึ้นบนแถบตรวจ เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis

4.15.1. การทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ที่ เหมาะสมสำหรับแถบตรวจ MTB Strip

นำตัวอย่างดีเอ็นเอข้างต้นปริมาณ 1 μ l มาทำปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้สถานะจาก ข้อ 4.7 ที่พัฒนาขึ้นเมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนีย์ นำผลผลิต M-RPA เจือจางด้วย สารละลาย PBS (ผลผลิต M-RPA:PBS) ในอัตราส่วน 1:3 (40 μ l: 80 μ l) 1:5 (30 μ l: 120 μ l) และ

1:10 (15 μ l: 135 μ l) นำแถบตรวจ MTB Strip มาจุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้น เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis เลือกอัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ที่สามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงบนแถบตรวจชัดเจนที่สุดเมื่อมองด้วยตาเปล่า มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.15.2. การทดสอบหาปริมาณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยา M-RPA ภายใต้สภาวะที่ได้จากการทดสอบจากข้อ 4.7 โดยใช้ปริมาณของตัวอย่างดีเอ็นเอข้างต้นในการทดสอบเท่ากับ 1 2 5 และ 10 μ l นำผลผลิต M-RPA เจือจางด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วนที่เหมาะสมจากการทดสอบข้อ 4.15.1 และตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้น เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis เลือกปริมาณของดีเอ็นเอที่สามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงบนแถบตรวจชัดเจนที่สุดเมื่อมองด้วยตาเปล่า มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.15.3. การทดสอบหาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์สำหรับ IS1081 ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้ปริมาณของดีเอ็นเอที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจนที่สุดจากข้อ 4.15.2 โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 Forward primer และ Reverse primer เท่ากับ 0.24 μ M ส่วนไพรเมอร์ IS6110 ใช้ความเข้มข้นสุดท้าย Forward primer และ Reverse primer เท่ากับ 0.12 μ M ทำปฏิกิริยา M-RPA ภายใต้สภาวะที่ได้จากการทดสอบจากข้อ 4.7 นำผลผลิต M-RPA เจือจางด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วนที่เหมาะสมจากการทดสอบข้อ 4.15.1 และตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้น เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 ที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงบนแถบตรวจชัดเจนที่สุดเมื่อมองด้วยตาเปล่า มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.15.4. การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้ปริมาณของดีเอ็นเอที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.15.2 โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 ที่ความเข้มข้นที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.15.3 และความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS6110 เท่ากับ 0.12 μM ทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ได้จากการทดสอบจากข้อ 4.7 ในระยะเวลา 15 20 25 และ 30 นาที นำผลผลิต M-RPA เจือจางด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วนที่เหมาะสมจากการทดสอบข้อ 4.15.1 และตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้น เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis เลือกระยะเวลาที่สามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงบนแถบตรวจชัดเจนที่สุดเมื่อมองด้วยตาเปล่า มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.15.5. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้ปริมาณของดีเอ็นเอที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.15.2 โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 ที่ความเข้มข้นที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.15.3 และความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS6110 เท่ากับ 0.12 μM ทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ได้จากการทดสอบจากข้อ 4.7 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 39 และ 41 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.15.4 นำผลผลิต M-RPA เจือจางด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วนที่เหมาะสมจากการทดสอบข้อ 4.15.1 และตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตจุดสีแดงที่ปรากฏขึ้น เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis เลือกอุณหภูมิที่สามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงบนแถบตรวจชัดเจนที่สุดเมื่อมองด้วยตาเปล่า

ภายหลังทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจ เสมหะด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ในปัจจัยต่าง ๆ ข้างต้น ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ปริมาณของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 ระยะเวลาที่บ่ม และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ตามข้อ 4.15.1 – 4.15.5 นำผลสภาวะสุดท้ายที่เหมาะสมไปวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจเสมหะในขั้นต่อไป

4.16. การวินิจฉัยวัณโรคจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วย ปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วยที่ถูกส่งมาเพื่อวินิจฉัยวัณโรค และผ่านการย้อมสีทึบกรด จำนวนทั้งหมด 131 ตัวอย่าง ดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกถูกนำไป ทดสอบทางอณูชีววิทยาด้วยเครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 Dx System (บริษัท Bio-Rad Laboratories จำกัด, สหรัฐอเมริกา) โดยใช้น้ำยา Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (บริษัท Seegene จำกัด, ประเทศเกาหลีใต้) เพื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อ MTBC และ NTM โดยได้รับความอนุเคราะห์ในการทดสอบจากห้องปฏิบัติการ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

ดีเอ็นเอส่วนที่สอง นำมาทำปฏิกิริยา M-RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วย MTB Strip โดยใช้สภาวะในข้อ 4.15 ข้างต้น โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อและดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วยที่ไม่ได้ถูกส่งมารับการวินิจฉัยวัณโรค ซึ่งมีผลการทดสอบการย้อมสีทึบกรดเป็นลบและไม่พบดีเอ็นเอของ MTBC หรือ NTM เมื่อถูกยืนยันด้วยเครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 Dx System เป็นตัวควบคุมลบ

4.17. การคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของแถบตรวจ MTB strip

นำผลการวินิจฉัยเชื้อ MTBC ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip เปรียบเทียบกับวิธีการวินิจฉัยเชื้อด้วยการตรวจหาผลผลิต M-RPA ด้วย Agarose gel electrophoresis การย้อมสีทึบกรด และเทคนิค Real-time PCR เพื่อคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังแสดงในตารางที่ 3.3 – 3.5

ตารางที่ 3.3 ความสัมพันธ์ของการวินิจฉัยเชื้อ MTBC ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

	ตรวจพบสารพันธุกรรม MTBC ด้วย M-RPA ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis	ตรวจไม่พบสารพันธุกรรม MTBC ด้วย M-RPA ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis
ตรวจพบสารพันธุกรรม MTBC ด้วย M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ตรวจไม่พบสารพันธุกรรม MTBC ด้วย M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ตารางที่ 3.4 ความสัมพันธ์ของการวินิจฉัยเชื้อ MTBC ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับ การวินิจฉัยด้วยการย้อมสีทึนกรด

	ตรวจพบ AFB ด้วยการย้อมสีทึนกรด	ตรวจไม่พบ AFB ด้วยการย้อมสีทึนกรด
ตรวจพบสารพันธุกรรม MTBC ด้วย M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ตรวจไม่พบสารพันธุกรรม MTBC ด้วย M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ตารางที่ 3.5 ความสัมพันธ์ของการวินิจฉัยเชื้อ MTBC ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีการวินิจฉัยด้วยเทคนิค Real-time PCR

	ตรวจพบสารพันธุกรรม MTBC ด้วยเทคนิค Real-time PCR	ตรวจไม่พบสารพันธุกรรม MTBC ด้วยเทคนิค Real-time PCR
ตรวจพบสารพันธุกรรม MTBC ด้วย M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ตรวจไม่พบสารพันธุกรรม MTBC ด้วย M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

จากตารางด้านบน นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{ความไวของการทดสอบ} = a/(a+c)$$

$$\text{ความจำเพาะของการทดสอบ} = d/(b+d)$$

$$\text{ค่าทำนายผลบวก} = a/(a+b)$$

$$\text{ค่าทำนายผลลบ} = d/(c+d)$$

4.18. การคำนวณค่าความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยสถิติ Kappa coefficient

ค่าสถิติ Kappa coefficient (Cohen's Kappa Coefficient : **K**) เป็นค่าสถิติที่ใช้ทดสอบความสอดคล้อง (Consistency) กันของข้อมูล 2 กลุ่ม คือ ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MTBC ด้วยแถบตรวจ MTB Strip เปรียบเทียบกับวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ วิธีการวินิจฉัยเชื้อด้วยการตรวจหาผลผลิต M-RPA ด้วย Agarose gel electrophoresis การย้อมสีทึบกรด และเทคนิค Real-time PCR แสดงในตารางที่ 3.6 และทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม Graphpad

ตารางที่ 3.6 การวิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MTBC จากวิธีต่าง ๆ ด้วยค่าสถิติ Kappa

M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB strip	การตรวจวินิจฉัยวิธีที่ 2		รวม
	ผลบวก	ผลลบ	
ผลบวก	a	b	a+b
ผลลบ	c	d	c+d
รวม	a+c	b+d	a+b+c+d (N)

สูตรคำนวณค่าสถิติ Kappa coefficient (126)

$$K = \frac{(P_o - P_e)}{1 - P_e}$$

โดย P_o = สัดส่วนความสอดคล้องที่พบหรือสังเกตได้

$$= \left[\frac{a+d}{N} \right]$$

P_e = สัดส่วนความสอดคล้องที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

$$= \left[\frac{\frac{(a+b) \times (a+c)}{N} + \frac{(c+d) \times (b+d)}{N}}{N} \right]$$

ผลจากการคำนวณจะมีค่าสถิติ Kappa coefficient ตามแนวทางของ Landis และ Kochb (127) ระหว่าง 0 ถึง 1 นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับความสอดคล้องกัน ตามตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 เกณฑ์พิจารณาความสอดคล้องกันของสถิติ Kappa

ค่าสถิติ Kappa	ระดับความสอดคล้องกันระหว่างวิธีการตรวจวินิจฉัย ร่วมกับแถบตรวจ MTB strip เปรียบเทียบกับวิธีต่าง ๆ	M-RPA
0.81-1.00	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก (Almost perfect)	
0.61-0.80	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดี (Substantial)	
0.41-0.60	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ปานกลาง (Moderate)	
0.21-0.40	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์พอใช้ (Fair)	
0.00-0.20	มีความสอดคล้องกันเล็กน้อย (Slight)	
น้อยกว่า 0.00	ไม่มีความสอดคล้องกัน (Poor)	

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างดีเอ็นเอในการศึกษาครั้งนี้ ประกอบไปด้วย คือ 1) ดีเอ็นเอที่สกัดจากโคลนนิ่งของเชื้อ จำนวน 130 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อ MTBC ที่ถูกตรวจวินิจฉัยยืนยันด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT 64 จำนวน 100 ตัวอย่าง และเชื้อ NTM ที่ถูกวินิจฉัยยืนยันด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing จำนวน 30 ตัวอย่าง และ 2) ดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วย จำนวน 131 ตัวอย่าง ซึ่งผ่านการทดสอบย้อมสีทึบกรดและให้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดตัวอย่างดีเอ็นเอ	จำนวน
ดีเอ็นเอที่สกัดจากโคลนนิ่งของเชื้อ	130
MTBC	100
NTM	30
ดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ	131
ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นบวก (AFB+)	
Scanty	11
1+	31
2+	16
3+	20
ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ (AFB-)	53

หมายเหตุ : Scanty หมายถึง พบ AFB จำนวน 1 – 9 AFB ต่อ 100 oil power field (OPF)

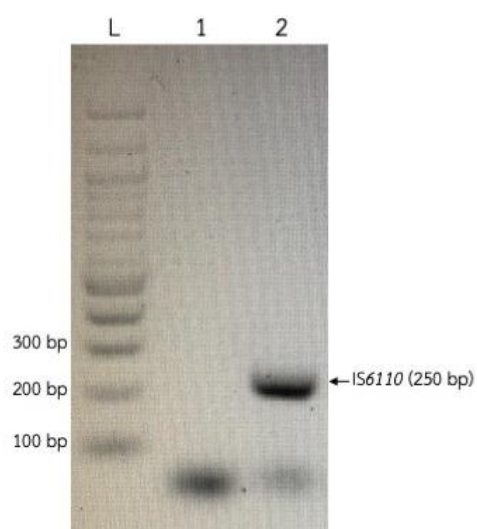
1+ หมายถึง พบ AFB จำนวน 10 – 99 AFB ต่อ 100 OPF

2+ หมายถึง พบ AFB จำนวน 1– 10 AFB ต่อ 50 OPF

3+ หมายถึง พบ AFB จำนวนมากกว่า 10 AFB ต่อ 20 OPF

2. ผลการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์สำหรับ IS6110 ในปฏิกิริยา RPA ด้วยเทคนิค PCR

ผลการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ IS6110 ที่ออกแบบขึ้นในการศึกษานี้ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ โดยพบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ขนาด 250 bp ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS6110 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบในการศึกษานี้ และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 4.1 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบผลผลิตของ IS6110 ทำปฏิกิริยาเท่ากับ 250 bp

ภายหลังจากนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ข้างต้น ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลการวิเคราะห์ที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv (Accession no. NC_000962) เฉพาะส่วนที่แสดงออกของ IS6110 ด้วยวิธี Alignment sequencing พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตที่เกิดจากไพรเมอร์ IS6110 ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ IS6110 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ดังแสดงในรูปที่ 4.2

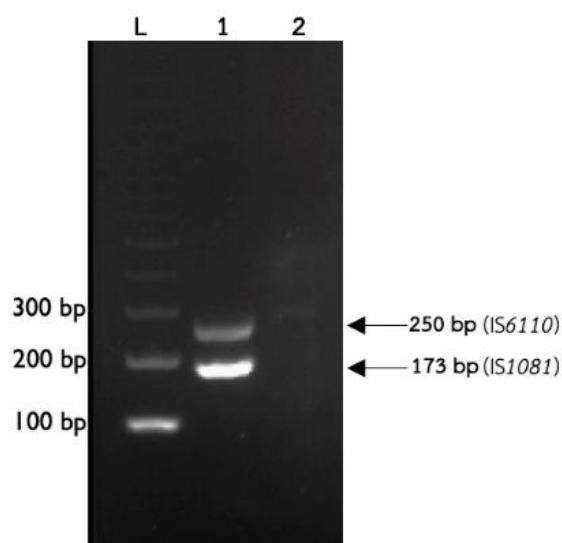
PCR-IS6110_se	1	-----CTT-----TTCGCGGAGACGGTGCCT	21
IS6110	1	TCAGTGAGGTCGCCGCTACTTGGTGTGGCTGCGCGGAGACGGTGCCT	50
PCR-IS6110_se	22	-AGTGGGTGCGCCAGGCGCAGGTCGATGCCGGCGCACGGCCCGGGACCAC	70
IS6110	51	AAGTGGGTGCGCCAGGCGCAGGTCGATGCCGGCGCACGGCCCGGGACCAC	100
PCR-IS6110_se	71	GACCGAAGAATCCGCTGAGCTGAAGCGCTTGCGGCGGGACAACGCCGAAT	120
IS6110	101	GACCGAAGAATCCGCTGAGCTGAAGCGCTTGCGGCGGGACAACGCCGAAT	150
PCR-IS6110_se	121	TGCGAAGGGCGAACGCGATTTTAAAGACCGCGTCGGCTTTCTTCGCGGCC	170
IS6110	151	TGCGAAGGGCGAACGCGATTTTAAAGACCGCGTCGGCTTTCTTCGCGGCC	200
PCR-IS6110_se	171	GAGCTCGACCGGCCAGCAGCCTAATTACCGGTTTCATCGCCGATCATCAG	220
IS6110	201	GAGCTCGACCGGCCAGCAGCCTAATTACCGGTTTCATCGCCGATCATCAG	250
PCR-IS6110_se	221	----AC-----	222
IS6110	251	GGCCACCGCGAGGGCCCCGATGGTTTGGCGTGGGGTGTGAGTCGACTG	300
PCR-IS6110_se	223	-----	222
IS6110	301	CACACAGCTGACCGAGCTGGGTGTGCCGATCGCCCCATCGACCTACTACG	350
PCR-IS6110_se	223	-----	222
IS6110	351	ACCACATCAACCGGGAGCCAGCCGCCGCGAGCTGCGCGATGGCGAACTC	400
PCR-IS6110_se	223	----- 222	
IS6110	401	AAGGAGCACATCAGCCGCTCCA 423	

รูปที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างผลผลิต PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ IS6110 กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ IS6110 ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv (Accession no. NC_000962)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลการพัฒนาเทคนิค Multiplex-recombinase polymerase amplification

ภายหลังจากนำไพรเมอร์ IS1081 และ IS6110 ที่ถูกติดฉลากด้านปลาย 5' ด้วย -FAM ที่ Forward primer และ -Biotin ที่ Reverse primer ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ในบทวิธีดำเนินการวิจัย มาทำปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมผลบวก และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ ดำเนินปฏิกิริยา M-RPA ตามรายละเอียดข้อ 4.7 ในบทวิธีดำเนินการวิจัย พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ โดยพบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% ขนาด 173 และ 250 bp ตามลำดับ ดังแสดงในรูป 4.3



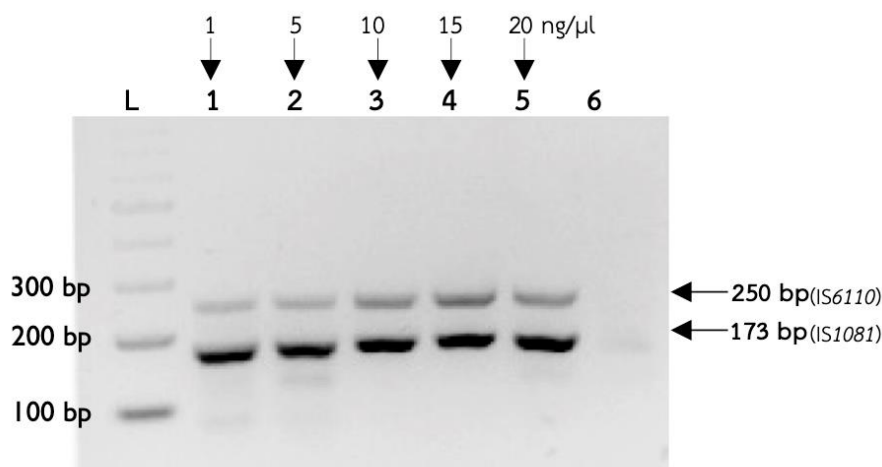
รูปที่ 4.3 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%

จากรูปที่ 4.3 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp แถวที่ 2 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิตของทั้งสอง IS

ภายหลังทำการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา M-RPA ได้ผลการทดสอบดังนี้

3.1. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ภายหลังดำเนินการปฏิกิริยา M-RPA ตามข้อ 4.7 ในบทวิธีดำเนินการวิจัย โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 5 10 15 และ 20 ng/ μ l และใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% พบว่าดีเอ็นเอทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ สามารถใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ จึงได้เลือกความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ยังคงให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจน คือ 1 ng/ μ l สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป (รูปที่ 4.4)



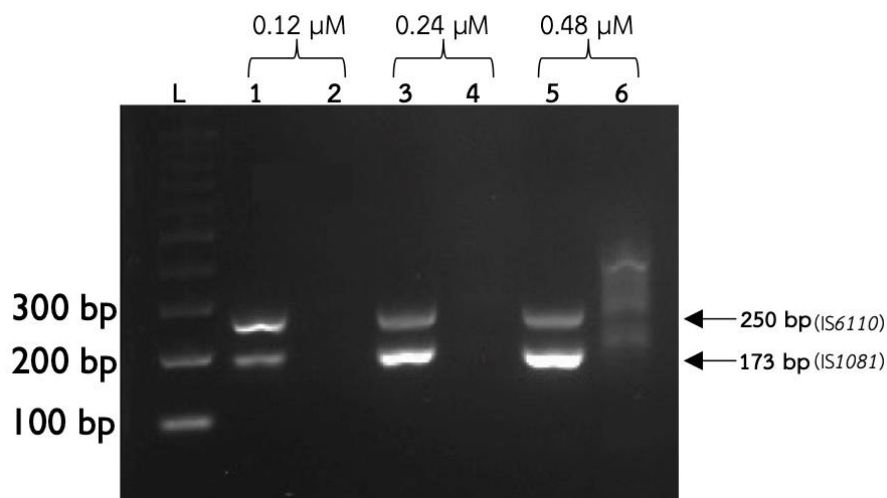
รูปที่ 4.4 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเท่ากับ 1 5 10 15 และ 20 ng/μl และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%

จากรูปที่ 4.4 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1-5 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ความเข้มข้น 1 5 10 15 และ 20 ng/μl ตามลำดับ ซึ่งพบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp แถวที่ 6 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิตของทั้งสอง IS

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2. การทดสอบหาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรมเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ภายหลังดำเนินการปฏิกิริยา M-RPA ตามข้อ 4.7 ในบทวิธีดำเนินการวิจัย โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 ng/μl และใช้ไพรมเมอร์ IS1081 และ IS6110 ที่ความเข้มข้น 0.12 0.24 และ 0.48 μM และใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% พบว่าความเข้มข้นของไพรมเมอร์ทุกความเข้มข้น สามารถใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ จึงได้เลือกความเข้มข้นของไพรมเมอร์น้อยที่สุดที่ยังคงให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจนและไม่เกิด Smear band ในตัวควบคุมลบ คือ 0.12 μM สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป (รูปที่ 4.5)

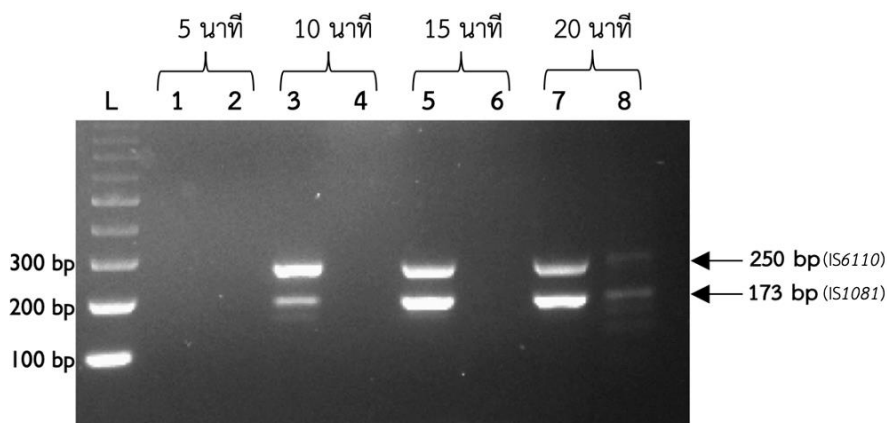


รูปที่ 4.5 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA โดยใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.12 0.24 และ 0.48 μM และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%

จากรูปที่ 4.5 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 3 และ 5 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ที่ใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ 0.12 0.24 และ 0.48 μM ตามลำดับ ซึ่งพบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp แถวที่ 2 4 และ 6 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ที่ใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ 0.12 0.24 และ 0.48 μM ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิตของทั้งสอง IS ในแถวที่ 2 และ 4 ในขณะที่แถวที่ 6 พบ Smear band

3.3. การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ภายหลังดำเนินปฏิกิริยา M-RPA ตามข้อ 4.7 ในบทวิธีดำเนินการวิจัย โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 ng/ μl และใช้ไพรเมอร์ IS1081 และ IS6110 ที่ความเข้มข้น 0.12 μM และใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ บ่มที่ระยะเวลา 5 10 15 และ 20 นาที ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% พบว่าที่ระยะเวลาของการบ่ม 10 15 และ 20 นาที สามารถใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ จึงได้เลือกระยะเวลาที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจนและไม่เกิดผลบวกปลอมในตัวควบคุมลบ คือ 15 นาที สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป (รูปที่ 4.6)



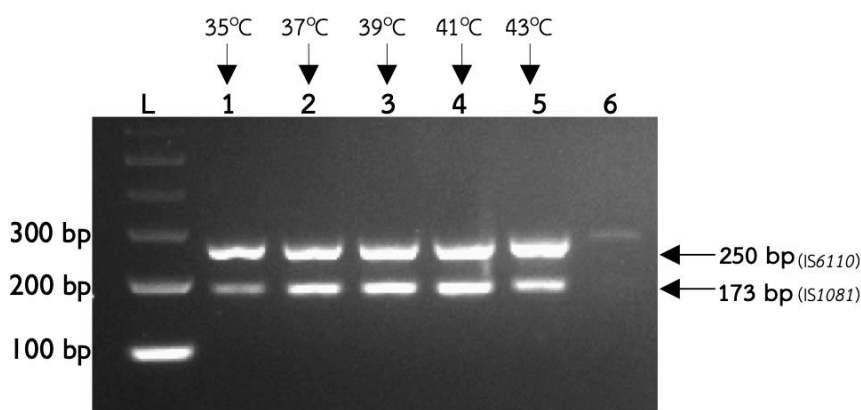
รูปที่ 4.6 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA โดยใช้ระยะเวลาบ่มที่ 5 10 15 และ 20 นาที และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%

จากรูปที่ 4.6 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 3 5 และ 7 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 5 10 15 และ 20 นาที ตามลำดับ ซึ่งแถวที่ 1 ไม่พบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 ในขณะที่ 3 5 และ 7 พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp แถวที่ 2 4 6 และ 8 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 5 10 15 และ 20 นาที ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิตของทั้งสอง IS ในแถวที่ 2 4 และ 6 ในขณะที่แถวที่ 8 พบแถบผลผลิตของ IS1081 แถบผลผลิตของ IS6110 ซึ่งเป็นผลบวกปลอม

3.4. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ภายหลังดำเนินการปฏิกิริยา M-RPA ตามข้อ 4.7 ในบทวิธีดำเนินการวิจัย โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 ng/ μ l และใช้ไพรเมอร์ IS1081 และ IS6110 ที่ความเข้มข้น 0.12 μ M และใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ บ่มที่ระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 35 37 39 41 และ 43 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% พบว่าทุกอุณหภูมิที่ทำการบ่มสามารถใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ จึงได้เลือกอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการ

ทดสอบขั้นต่อไป เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจน ไม่พบ Primer-dimer และไม่เกิดผลบวกปลอมในตัวควบคุมลบ ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA โดยใช้ อุณหภูมิ 35 37 39 41 และ 43 องศาเซลเซียส และตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%

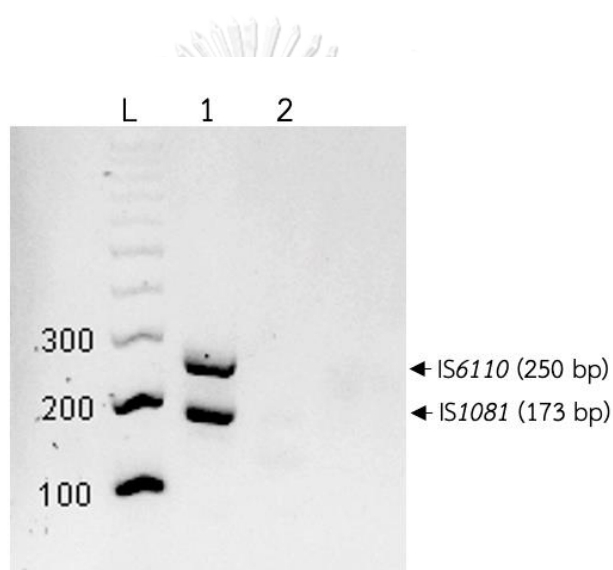
จากรูปที่ 4.7 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1-5 คือ ดีเอ็นเอของ เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ที่ป้อนที่อุณหภูมิ 35 37 39 41 และ 43 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งพบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และ แถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp และแถวที่ 6 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุม ลบ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิตของทั้งสอง IS

3.5. สรุปสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค M-RPA ที่พัฒนาขึ้น

จากการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา M-RPA ทั้งหมดข้างต้น ได้ผล สรุปสถานะที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ดังที่แสดงใน ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.8 ซึ่งถูกนำไปใช้เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค M-RPA เพื่อ พัฒนาร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 4.2 สรุปสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค M-RPA ที่พัฒนาขึ้น

เทคนิค M-RPA	สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา
ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ	1 ng/ μ l
ความเข้มข้นของไพรเมอร์	0.12 μ M
ระยะเวลา	15 นาที
อุณหภูมิ	37 องศาเซลเซียส

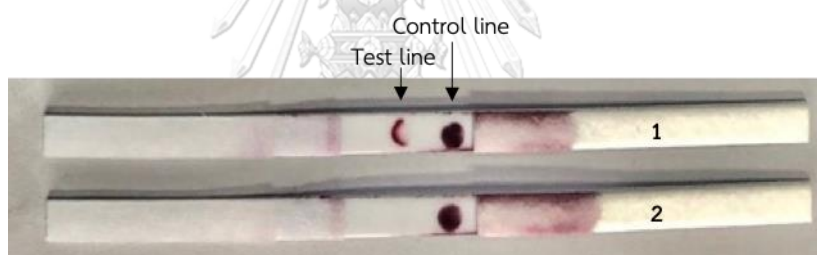


รูปที่ 4.8 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA ในสภาวะที่เหมาะสม และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%

จากรูปที่ 4.8 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp แถวที่ 2 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิตของทั้งสอง IS

4. ผลการพัฒนาสถานะแถบตรวจ MTB Strip เพื่อตรวจสอบผลผลิต M-RPA

ภายหลังออกแบบโครงสร้างของแถบตรวจเปล่า และเลือกแอนติบอดีสำหรับตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา M-RPA ที่เกิดจากไพรเมอร์ IS1081 และ IS6110 ที่ถูกติดฉลากด้านปลาย 5' ด้วย -FAM ที่ Forward primer และ -Biotin ที่ Reverse primer ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ในบทวิธีดำเนินการวิจัย โดยเริ่มใช้ความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate เท่ากับ OD10 ที่ตำแหน่ง Conjugated pad ความเข้มข้นของ Anti-FITC เท่ากับ 1 mg/ml ที่ตำแหน่ง Test line และความเข้มข้นของ Anti-IgG เท่ากับ 1 mg/ml ที่ตำแหน่ง Control line บ่มให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังจุ่มแถบตรวจ MTB Strip ลงในสารละลายผลผลิต M-RPA ที่ได้จากการหาสถานะที่เหมาะสมข้างต้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่า พบจุดสีแดงที่ตำแหน่ง Control line ของทั้งตัวควบคุมบวกและควบคุมลบ ในขณะที่พบเพียงจุดสีแดงที่ตำแหน่ง Test line เฉพาะในตัวควบคุมบวก ดังแสดงในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ผลการตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค M-RPA ด้วยแถบตรวจ MTB Strip ที่อยู่ในขั้นตอนการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสม

จากรูปที่ 4.9 แถบตรวจ 1 คือ ผลผลิต M-RPA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก พบจุดสีแดงที่ตำแหน่ง Test line และ Control line หมายถึง ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ MTBC แถบตรวจ 2 คือ ผลผลิต M-RPA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของน้ำกลั่นบริสุทธ์ปราศจากเชื้อ ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลลบ พบจุดสีแดงเฉพาะที่ตำแหน่ง Control line หมายถึง ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ MTBC

4.1. ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารละลายในส่วนประกอบของปฏิกิริยา M-RPA

ภายหลังจากนำแถบตรวจ MTB Strip ที่หยดสารและแอนติบอดีข้างต้น มาทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกับสายละลายที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยา M-RPA ที่ไม่มีการเติมดีเอ็นดีเอ็นต้นแบบพบว่า สารที่เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ ได้แก่ ไพรเมอร์ IS1081 และ IS6110, Lyophilized pellet และ Rehydration buffer ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามไปจับกับแอนติบอดีที่อยู่บนแถบตรวจ MTB Strip โดยไม่พบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line ยกเว้นเมื่อมี MgOAc ผสมอยู่ในปฏิกิริยา สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามไปจับกับแอนติบอดีที่อยู่บนแถบตรวจ MTB Strip ได้ และพบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line และ Control line ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารละลายที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยา M-RPA กับแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้น

สารละลายที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยา M-RPA (ปริมาตรรวม 50 µl)	ผลการทดสอบ
ไพรเมอร์ IS1081 และ IS6110 + H ₂ O	ไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม
Rehydration buffer + H ₂ O	ไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม
Lyophilized pellet + H ₂ O	ไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม
Lyophilized pellet + Rehydration buffer + H ₂ O	ไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม
Lyophilized pellet + Rehydration buffer + MgOAc + H ₂ O	เกิดปฏิกิริยาข้าม

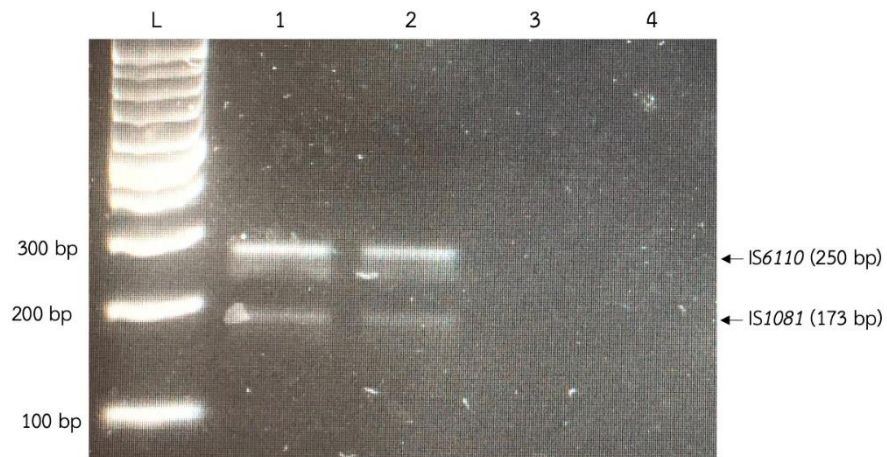
จากผลการทดสอบข้างต้น แสดงให้เห็นว่า MgOAc มีส่วนทำให้เกิดปฏิกิริยาข้าม ซึ่งส่งผลให้เกิดผลบวกปลอมได้ อย่างไรก็ตามในปฏิกิริยา RPA จำเป็นต้องอาศัย MgOAc เป็นสารกระตุ้นในการเริ่มต้นปฏิกิริยา จึงไม่สามารถหลีกเลี่ยงการผสม MgOAc ลงในหลอดปฏิกิริยา RPA ได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการลดการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารละลายที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยา M-RPA จึงทำการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของแถบตรวจในการตรวจสอบผลผลิต M-RPA ในขั้นตอนต่อไป

4.2. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip

นำผลผลิต M-RPA ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ภายใต้สภาวะปฏิกิริยา M-RPA ที่เหมาะสมข้างต้น มาใช้เป็นตัวควบคุมการพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมของแถบตรวจ MTB Strip โดยแต่ละขั้นเปรียบเทียบผลการอ่านแถบตรวจควบคู่กับผลจากเทคนิค Agarose gel electrophoresis ดังนี้

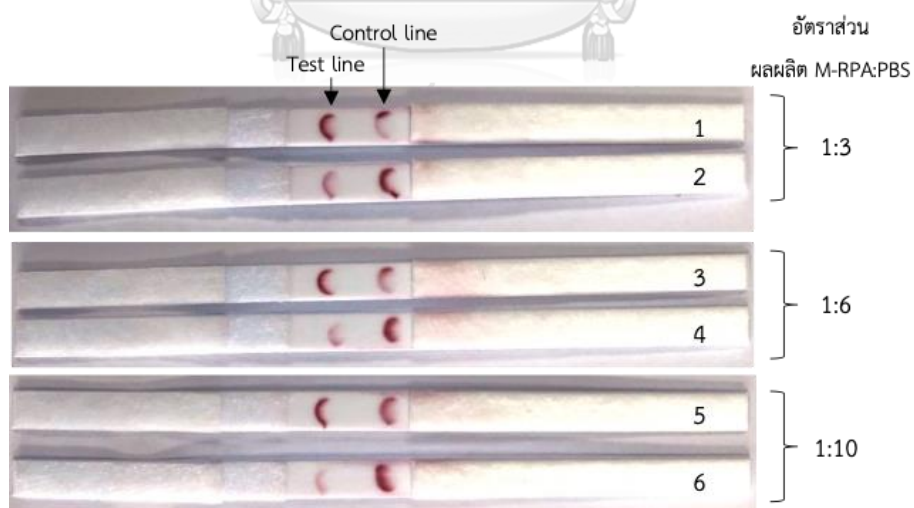
4.2.1. ผลการทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ที่เหมาะสมสำหรับแถบตรวจ MTB Strip

ภายหลังกนำผลผลิต M-RPA ที่ผ่านการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% และพบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 (รูปที่ 4.10) มาเจือจางกับสารละลาย PBS ให้มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:3 1:6 และ 1:10 (M-RPA:PBS) ในปริมาตรรวม 150 μ l เมื่อจุ่มแถบตรวจ MTB Strip ในสารละลาย ระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่าในทุกอัตราส่วน สามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงปรากฏขึ้นชัดเจนเท่ากันทั้งตำแหน่ง Test line และ Control line ในตัวควบคุมบวก ในขณะที่สังเกตเห็นจุดแดงที่เข้มแตกต่างกันบนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมลบ กล่าวคือ ที่อัตราส่วน 1:3 มีจุดแดงเข้มที่สุด รองลงมาคือ อัตราส่วน 1:6 และ 1:10 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนการเจือจางเท่ากับ 1:10 ซึ่งเห็นจุดแดงชัดเจนบนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมบวก และเห็นจุดแดงจางที่สุดบนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมลบ (รูป 4.11) สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



รูปที่ 4.10 ผลการตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยเทคนิค M-RPA ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%

จากรูปที่ 4.10 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 และ 2 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp แถวที่ 3 และ 4 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิตของทั้งสอง IS

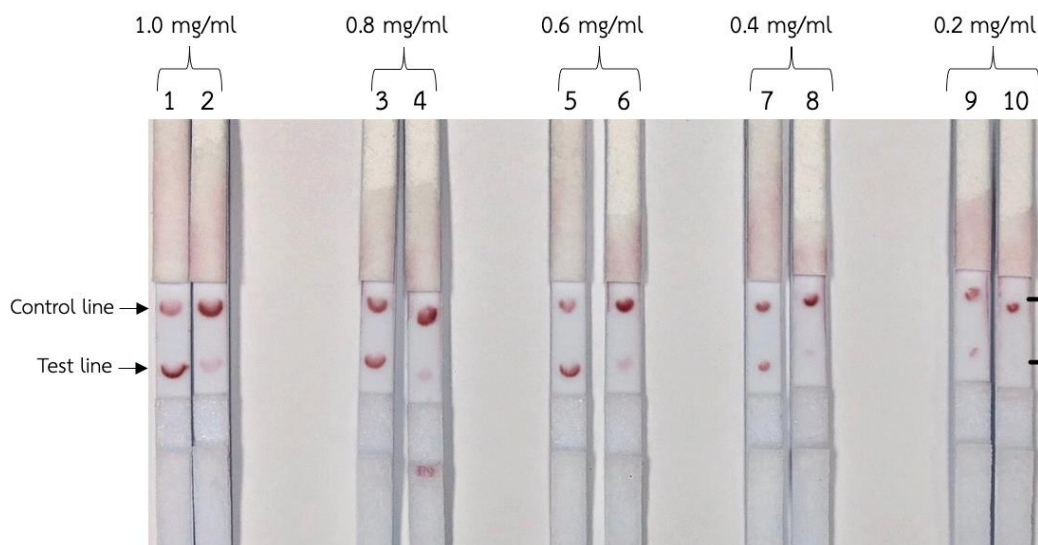


รูปที่ 4.11 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้อัตราส่วนถูกเจือจางผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS เท่ากับ 1:3 1:6 และ 1:10 (M-RPA:PBS)

จากรูป 4.11 แถบตรวจ 1-6 ทดสอบของอัตราส่วนเจือจางเท่ากับ 1:3 1:6 และ 1:10 ตามลำดับ สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบจุดสีแดง แถบตรวจ 1 3 และ 5 ซึ่งเป็นผลการทดสอบของอัตราส่วนเจือจางเท่ากับ 1:3 1:6 และ 1:10 ตามลำดับ ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ให้การอ่านผลเป็นผลบวก เนื่องจากพบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่ แถบตรวจ 2 4 และ 6 ซึ่งเป็นผลการทดสอบของอัตราส่วนเจือจางเท่ากับ 1:3 1:6 และ 1:10 ตามลำดับ ของน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ ซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ ให้การอ่านผลเป็นผลบวกปลอม เนื่องจากพบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line

4.2.2. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ Anti-FITC และ Anti-IgG ที่เหมาะสม

ภายหลังเตรียมแถบตรวจให้มีความเข้มข้นของ Anti-FITC ที่ตำแหน่ง Test line และ Anti-IgG ที่ตำแหน่ง Control line เท่ากับ 1 0.8 0.6 0.4 และ 0.2 mg/ml นำผลผลิต M-RPA ที่ผ่านการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% และพบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 (รูปที่ 4.10) มาเจือจางกับสารละลาย PBS ให้มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:10 ในปริมาตรรวม 150 μ l เมื่อจุ่มแถบตรวจ MTB Strip ในสารละลาย ระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Anti-IgG ทุกความเข้มข้นสามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงปรากฏขึ้นชัดเจนเท่ากันที่ Control line ในขณะที่ Anti-FITC ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml สังเกตเห็นจุดแดงที่เข้มชัดที่สุด บนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมบวก รองลงมาคือ ความเข้มข้น 0.8 0.6 และ 0.4 mg/ml ตามลำดับ และความเข้มข้น 0.2 mg/ml พบจุดแดงลักษณะจาง อย่างไม่รู้ก็ตามพบว่า Anti-FITC ที่ความเข้มข้น 1 0.8 0.6 และ 0.4 mg/ml พบจุดแดงลักษณะจาง บนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมลบ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ Anti-IgG และ Anti-FITC เท่ากับ 0.4 mg/ml ซึ่งเห็นจุดแดงชัดเจนบนตำแหน่ง Control line ของทั้งตัวควบคุมบวกและลบ ในขณะที่เห็นจุดแดงชัดเจนบนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมบวก และเห็นจุดแดงค่อนข้างจางบนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมลบ (รูป 4.12) สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



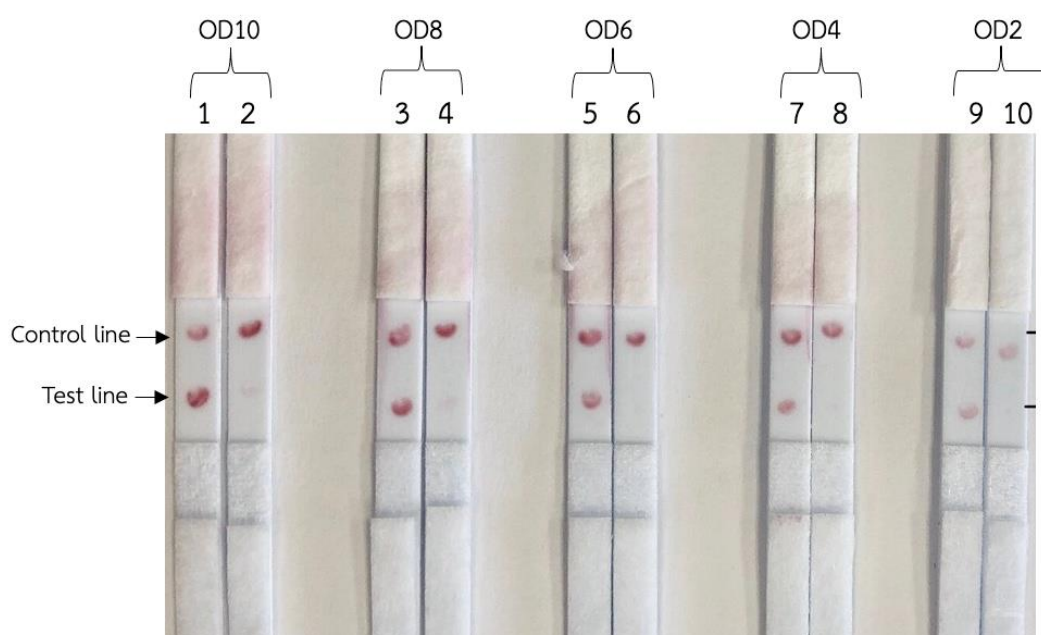
รูปที่ 4.12 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้ความเข้มข้นของ Anti-FITC และ Anti-IgG ที่ตำแหน่ง Test line และ Control line ตามลำดับ เท่ากับ 1 0.8 0.6 0.4 และ 0.2 mg/ml

จากรูป 4.12 แถบตรวจ 1-10 ซึ่งมี Anti-IgG ความเข้มข้น 1 0.8 0.6 0.4 และ 0.2 mg/ml ตามลำดับ สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบจุดสีแดง แถบตรวจ 1 3 5 7 และ 9 ซึ่งเป็นผลการทดสอบของ Anti-FITC ความเข้มข้น 1 0.8 0.6 0.4 และ 0.2 mg/ml ตามลำดับ ของตัวควบคุมบวก ให้การอ่านผลเป็นผลบวก เนื่องจากพบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 2 4 6 และ 8 ซึ่งเป็นผลการทดสอบของ Anti-FITC ความเข้มข้น 1 0.8 0.6 และ 0.4 mg/ml ตามลำดับ ของตัวควบคุมลบ ให้การอ่านผลเป็นผลบวกปลอม เนื่องจากพบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 10 เป็นผลการทดสอบของ Anti-FITC ความเข้มข้น 0.2 mg/ml ของตัวควบคุมลบ ให้การอ่านผลเป็นผลลบ เนื่องจากไม่พบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line

4.2.3. การทดสอบหาความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate ที่เหมาะสม

ภายหลังเตรียมแถบตรวจให้มีความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate เท่ากับ OD10 OD8 OD6 OD4 และ OD2 โดยใช้ความเข้มข้นของ Anti-FITC ที่ตำแหน่ง Test line และ Anti-IgG ที่ตำแหน่ง Control line เท่ากับ 0.4 mg/ml นำผลผลิต M-RPA ที่ผ่านการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% และพบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110

(รูปที่ 4.10) มาเจือจางกับสารละลาย PBS ให้มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:10 ในปริมาตรรวม 150 μ l เมื่อจุ่มแถบตรวจ MTB Strip ในสารละลาย ระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Anti-biotin gold conjugate ทุกความเข้มข้นสามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงปรากฏขึ้นที่ตำแหน่ง Control line โดยที่ OD10 สังเกตเห็นจุดแดงเข้มที่สุด ที่ OD8 OD6 และ OD4 สังเกตเห็นจุดแดงมีความเข้มรองลงมาเท่ากัน และ ที่ OD2 สังเกตเห็นจุดแดงลักษณะจาง ในขณะที่บนตำแหน่ง Test line พบว่า Anti-biotin gold conjugate ที่ OD10 สังเกตเห็นจุดแดงที่เข้มชัดที่สุด บนแถบตรวจของตัวควบคุมบวก รองลงมาคือ ที่ OD8 OD6 OD4 และ OD2 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า Anti-biotin gold conjugate ที่ OD10 และ OD8 พบจุดแดงลักษณะจางบนแถบตรวจของตัวควบคุมลบ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate เท่ากับ OD4 ซึ่งเห็นจุดแดงชัดเจนบนตำแหน่ง Control line ของทั้งตัวควบคุมบวกและลบ ในขณะที่เห็นจุดแดงชัดเจนบนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมบวก และไม่เห็นจุดแดงบนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมลบ (รูป 4.13) สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

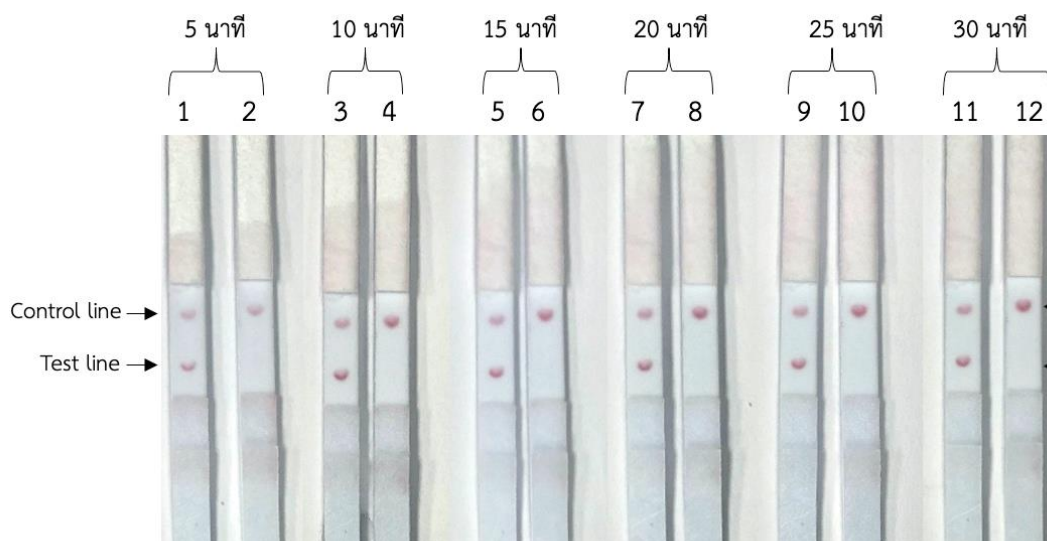


รูปที่ 4.13 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้ความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate เท่ากับ OD10 OD8 OD6 OD4 และ OD2

จากรูปที่ 4.13 แถบตรวจ 1-10 ซึ่งมี Anti-biotin gold conjugate ความเข้มข้น OD10 OD8 OD6 OD4 และ OD2 ตามลำดับ สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบจุดสีแดง แถบตรวจ 1 3 5 7 และ 9 ซึ่งเป็นผลการทดสอบของ Anti-biotin gold conjugate ความเข้มข้น OD10 OD8 OD6 OD4 และ OD2 ตามลำดับ ของตัวควบคุมบวก ให้การอ่านผลเป็นผลบวก เนื่องจากพบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 2 และ 4 ซึ่งเป็นผลการทดสอบของ Anti-biotin gold conjugate ความเข้มข้น OD10 และ OD8 ตามลำดับ ของตัวควบคุมลบ ให้การอ่านผลเป็นผลบวกปลอม เนื่องจากพบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 6 8 และ 10 เป็นผลการทดสอบของ Anti-biotin gold conjugate ความเข้มข้น OD6 OD4 และ OD2 ตามลำดับ ของตัวควบคุมลบ ให้การอ่านผลเป็นผลลบ เนื่องจากไม่พบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line

4.2.4. ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจสอบต่อผลผลิต M-RPA

ภายหลังเตรียมแถบตรวจให้มีความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate เท่ากับ OD4 ความเข้มข้นของ Anti-FITC ที่ตำแหน่ง Test line และ Anti-IgG ที่ตำแหน่ง Control line เท่ากับ 0.4 mg/ml นำผลผลิต M-RPA ที่ผ่านการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% และพบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 (รูปที่ 4.10) มาเจือจางกับสารละลาย PBS ให้มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:10 ในปริมาตรรวม 150 μ l เมื่อจุ่มแถบตรวจ MTB Strip ในสารละลาย เป็นระยะเวลา 5 10 15 20 25 และ 30 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่าทุกระยะเวลาของการจุ่มทดสอบสามารถสังเกตเห็นจุดสีแดงปรากฏขึ้นชัดเจนเท่ากันที่ตำแหน่ง Control line ของทั้งตัวควบคุมบวกและลบ และตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมบวก ยกเว้นที่เวลา 5 นาที ซึ่งพบจุดแดงลักษณะจาง ในขณะที่บนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมลบ ไม่พบจุดแดงภายในระยะเวลาของการทดสอบทั้งหมด ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาของการจุ่มทดสอบเท่ากับ 15 นาที ซึ่งเห็นจุดแดงชัดเจนบนตำแหน่ง Control line ของทั้งตัวควบคุมบวกและลบ ในขณะที่เห็นจุดแดงชัดเจนบนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมบวก และไม่เห็นจุดแดงบนตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมลบ (รูป 4.14) สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



รูปที่ 4.14 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้ระยะเวลาของการจุ่มทดสอบเท่ากับ 5 10 15 20 25 และ 30 นาที

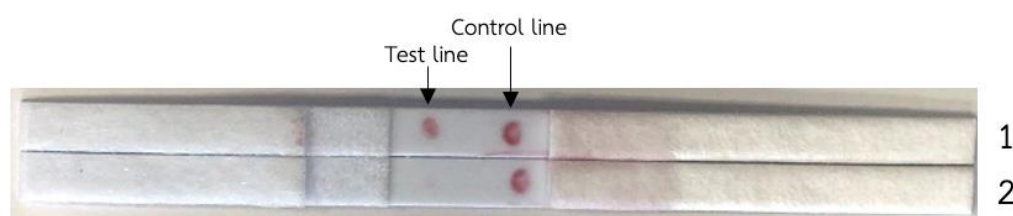
จากรูปที่ 4.14 แถบตรวจ 1-12 ซึ่งใช้ระยะเวลาของการจุ่มทดสอบเท่ากับ 5 10 15 20 25 และ 30 นาที ตามลำดับ สามารถอ่านผลได้จากตำแหน่ง Control line พบจุดสีแดง แถบตรวจ 1 3 5 7 9 และ 11 ซึ่งใช้ระยะเวลาของการจุ่มทดสอบเท่ากับ 5 10 15 20 25 และ 30 นาที ตามลำดับ ของตัวควบคุมบวก ให้การอ่านผลเป็นผลบวก เนื่องจากพบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 2 4 6 8 10 และ 12 ซึ่งใช้ระยะเวลาของการจุ่มทดสอบเท่ากับ 5 10 15 20 25 และ 30 นาที ตามลำดับ ของตัวควบคุมลบ ให้การอ่านผลเป็นผลลบ เนื่องจากไม่พบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line

4.2.5. สรุปสถานะที่เหมาะสมของแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้น

จากการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของแถบตรวจ MTB Strip ทั้งหมดข้างต้น ได้ผลสรุปสถานะของแถบตรวจที่ใช้ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ของเชื้อ MTBC ดังที่แสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.4 และมีผลการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 4.15 ซึ่งถูกนำไปใช้เป็นตัวแบบในการผลิตแถบตรวจ MTB Strip ด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม และในการทดสอบในลำดับต่อไป

ตารางที่ 4.4 สรุปสภาวะที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้น

แถบตรวจ MTB Strip	สภาวะที่เหมาะสม
อัตราส่วนเจือจางระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS	1:10
ความเข้มข้นของ Anti-FITC และ Anti-IgG	0.4 mg/ml
ความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate	OD4
ระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจสอบต่อผลผลิต M-RPA	15 นาที



รูปที่ 4.15 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ในสภาวะที่เหมาะสมที่พัฒนาขึ้น

จากรูปที่ 4.15 แถบตรวจ 1 และ 2 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate เท่ากับ OD4 ความเข้มข้นของ Anti-FITC ที่ตำแหน่ง Test line และ Anti-IgG ที่ตำแหน่ง Control line เท่ากับ 0.4 mg/ml สามารถตรวจสอบผลผลิต M-RPA ภายหลังเจือจางด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วน 1:10 และใช้ระยะเวลาของการจุ่มทดสอบเท่ากับ 15 นาที สามารถอ่านผลได้ เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบจุดสีแดง แถบตรวจ 1 เป็นตัวควบคุมบวก ให้การอ่านผลเป็นผลบวกเนื่องจากพบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 2 เป็นตัวควบคุมลบ ให้การอ่านผลเป็นผลลบเนื่องจากไม่พบจุดแดงที่ตำแหน่ง Test line

4.2.6. ผลการผลิตแถบตรวจ MTB Strip ด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม

ภายหลังจากนำสภาวะที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip จากตาราง 4.4 ข้างต้น ไปผลิตแถบตรวจ MTB Strip ด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ไอเมด ลาบอราทอรี จำกัด จังหวัดระยอง ประเทศไทย ได้แถบตรวจ MTB Strip ขนาดกว้าง

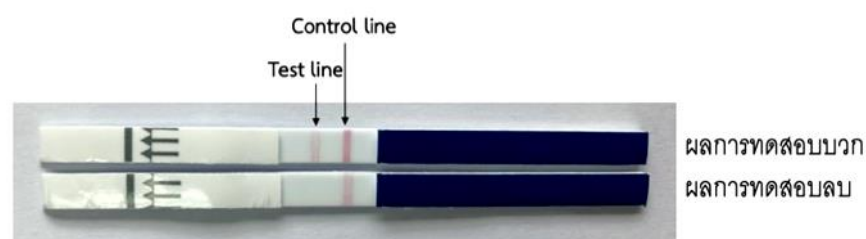
เท่ากับ 4 mm และยาวเท่ากับ 80 mm ซึ่งถูกบรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์แยกพร้อมถุงดูดความชื้น ดังแสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 แถบตรวจและบรรจุภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม

4.2.7. ผลการทดสอบเบื้องต้นของแถบตรวจ MTB Strip ที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม

นำผลผลิต M-RPA ที่ผ่านการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% และพบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 (รูปที่ 4.10) มาเจือจางกับสารละลาย PBS ให้มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:10 ในปริมาตรรวม 150 μ l เมื่อจุ่มแถบตรวจ MTB Strip ที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม ในสารละลายเป็นระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่าแถบตรวจ MTB Strip สามารถตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 เชื้อ *M. tuberculosis* ได้อย่างถูกต้อง (รูป 4.17) จึงถูกนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

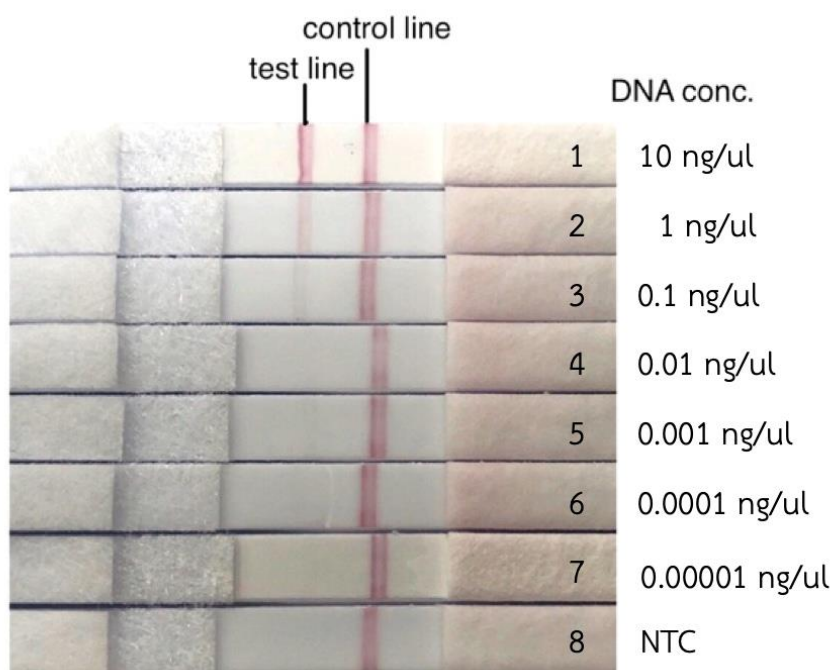


รูปที่ 4.17 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA บนแถบตรวจ MTB Strip ที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม

จากรูปที่ 4.17 แสดงแถบตรวจที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม แถบที่ให้ผลการทดสอบบวก ได้ถูกทำการทดสอบกับผลผลิต M-RPA โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv และพบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Control line และ Test line ในขณะที่แถบที่ให้ผลการทดสอบลบ ได้ถูกทำการทดสอบกับผลผลิต M-RPA โดยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ และพบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Control line เพียงตำแหน่งเดียว

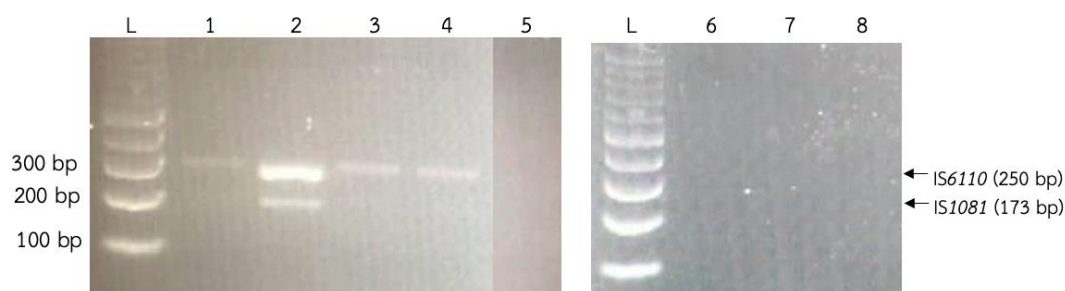
5. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) ของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

เมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ ATCC H37Rv ที่ความเข้มข้น 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 และ 0.00001 ng/ μ l และทดสอบกับเทคนิค M-RPA ผลการทดสอบพบว่าเมื่อตรวจสอบด้วยแถบตรวจ MTB Strip มีค่า LOD เท่ากับ 0.1 ng/ μ l (รูปที่ 4.18) ในขณะที่เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% มีค่า LOD เท่ากับ 0.01 ng/ μ l (รูปที่ 4.19)



รูปที่ 4.18 ผลการทดสอบหาค่า LOD ของเทคนิค M-RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip

จากรูปที่ 4.18 แถบตรวจ 1-7 คือ ดีเอ็นดีแบบความเข้มข้นเท่ากับ 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 และ 0.00001 ng/μl สามารถอ่านผลได้จากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง แถบตรวจ 1 2 และ 3 ให้การอ่านผลเป็นผลบวก เนื่องจากพบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 4 5 6 7 และ 8 ให้การอ่านผลเป็นผลลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line

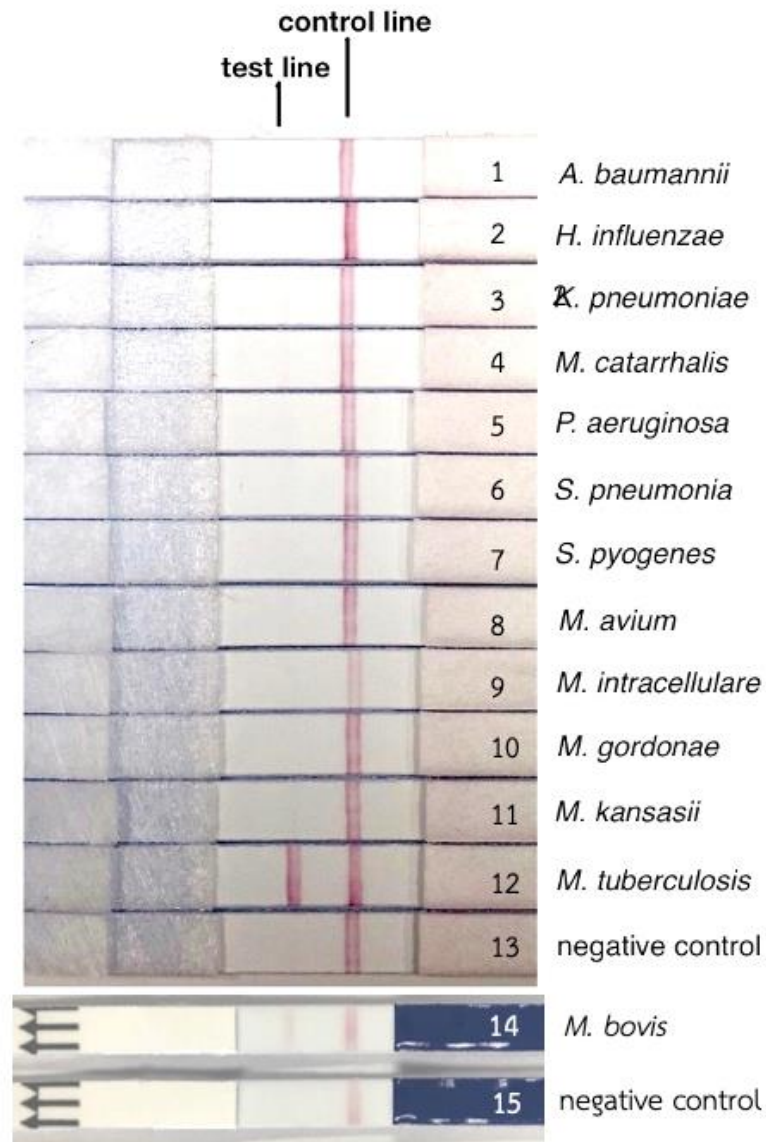


รูปที่ 4.19 ผลการทดสอบหาค่า LOD ของเทคนิค M-RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 2.5%

จากรูปที่ 4.19 แถว L คือ ดีเอ็นดีมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1-4 และ 6-8 คือ ดีเอ็นดีของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ความเข้มข้น 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 และ 0.00001 ng/μl ตามลำดับ ซึ่งพบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp ในแถวที่ 1-2 และพบแถบผลผลิตเฉพาะของ IS6110 เท่ากับ 250 bp ในแถวที่ 3-4 แถวที่ 5 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิตของทั้งสอง IS

6. ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

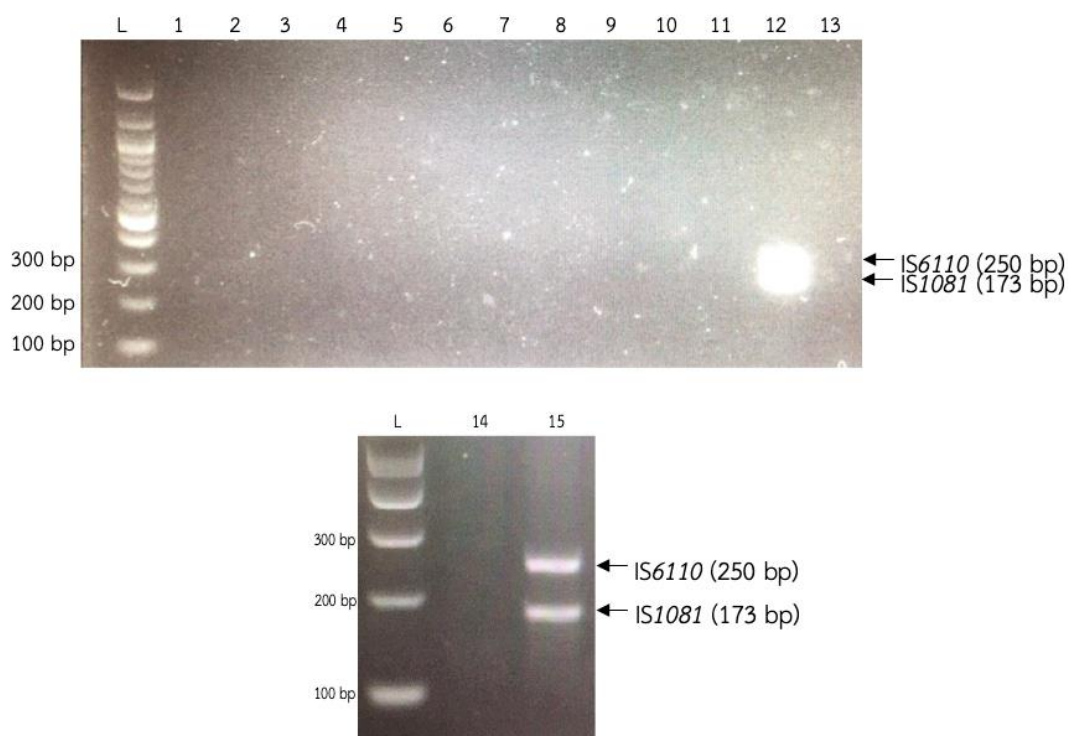
เมื่อนำเทคนิค M-RPA มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมกับดีเอ็นดีของเชื้อ *A. baumannii*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. kansasii* และ *M. bovis* ภายหลังจากตรวจสอบผลผลิตด้วย แถบตรวจ MTB Strip และวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ ยกเว้นเชื้อ *M. bovis* ซึ่งเป็นเชื้อสมาชิกในกลุ่ม MTBC เช่นเดียวกับ *M. tuberculosis* ดังแสดงในรูปที่ 4.20 และ 4.21 ตามลำดับ



รูปที่ 4.20 ผลการทดสอบหาปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นของเทคนิค M-RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip

จากรูปที่ 4.20 แถบตรวจ 1-12 และ 14 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *A. baumannii*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก และ *M. bovis* ตามลำดับ และแถบตรวจ 13 และ 15 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ สามารถอ่านผลของแถบตรวจทุกแถบได้เนื่องจาก

ตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง แถบตรวจ 12 และ 14 ให้การอ่านผลเป็นผลบวก เนื่องจากพบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจอื่น ๆ ให้การอ่านผลเป็นผลลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line

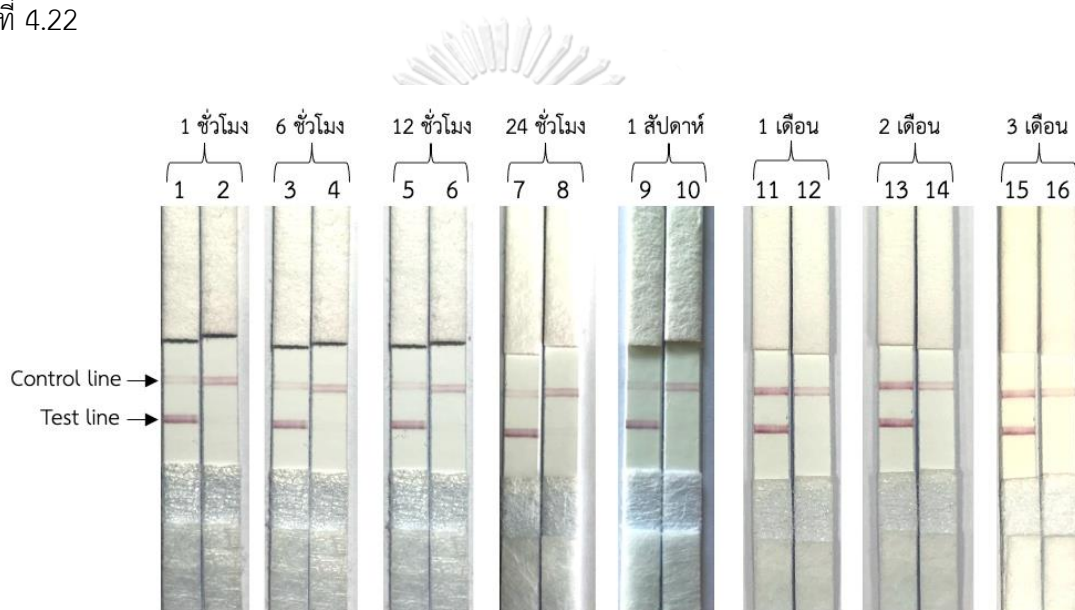


รูปที่ 4.21 ผลการทดสอบหาปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นของเทคนิค M-RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%

จากรูปที่ 4.21 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1-12 และ 15 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *A. baumannii*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก และ *M. bovis* ตามลำดับ และแถบตรวจ 13 และ 14 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp ในแถวที่ 12 และ 15 ในขณะที่แถบอื่น ๆ ไม่พบแถบผลผลิตของทั้งสอง IS

7. ผลการทดสอบความคงตัวของผลที่ปรากฏอยู่บนแถบตรวจ MTB Strip

เมื่อนำแถบตรวจ MTB Strip จุ่มเพื่อตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่เกิดจากเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ และทำการอ่านผลในระยะเวลา 1 6 12 24 ชั่วโมง 1 2 3 สัปดาห์ และ 1 3 เดือน เพื่อทดสอบความคงตัวของผลที่ปรากฏอยู่บนแถบตรวจ พบว่าความคงตัวของแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line และ Control line บนแถบตรวจ MTB Strip สามารถอยู่ได้นานถึง 3 เดือน ซึ่งยังคงอ่านผลได้อย่างชัดเจน และไม่พบผลบวกปลอมเกิดขึ้นในตัวควบคุมลบ ดังแสดงในรูปแบบที่ 4.22



รูปที่ 4.22 ผลการทดสอบความคงตัวของผลที่ปรากฏอยู่บนแถบตรวจ MTB Strip หลังจากตรวจสอบผลผลิต M-RPA และถูกจัดเก็บเป็นระยะเวลาต่าง ๆ

จากรูปที่ 4.22 แถบตรวจ 1-16 ซึ่งถูกเก็บในที่ที่บดแสงภายใต้อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 1 6 12 24 ชั่วโมง 1 2 3 สัปดาห์ และ 1 3 เดือน ตามลำดับ สามารถอ่านผลทุกแถบได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง แถบตรวจ 1 3 5 7 9 11 13 และ 15 เป็นผลการทดสอบของตัวควบคุมบวก ให้การอ่านผลเป็นผลบวก เนื่องจากพบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 2 4 6 8 10 12 และ 14 เป็นผลการทดสอบของตัวควบคุมลบ ให้การอ่านผลเป็นผลลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line

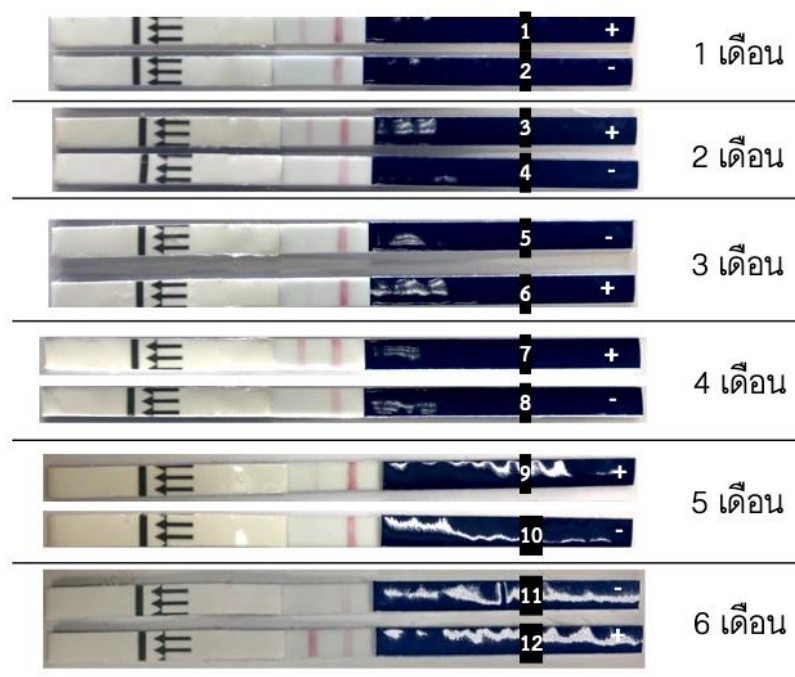
8. การทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ MTB Strip

ภายหลังจากนำผลผลิต M-RPA ที่ผ่านการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% และพบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 (รูปที่ 4.10) มาใช้ทดสอบแถบตรวจ MTB Strip ที่จัดเก็บในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าแถบตรวจมีอายุการเก็บรักษาสูงสุด คือ 6 เดือน ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) ที่อายุการเก็บรักษาที่ 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถตรวจสอบและอ่านผลที่ปรากฏเป็นแถบสีแดงชัดเจนที่ตำแหน่ง Test line และ Control line เมื่อเก็บรักษาถึงเดือนที่ 6 (รูปที่ 4.23)

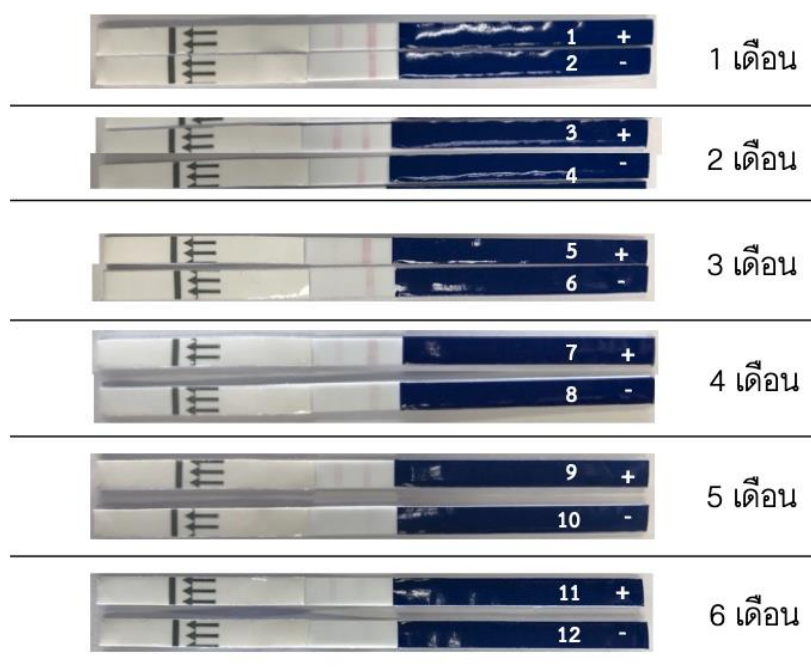
2) ที่อายุการเก็บรักษาที่ 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส สามารถตรวจสอบและอ่านผลที่ปรากฏเป็นแถบสีแดงชัดเจนที่ตำแหน่ง Test line และ Control line เมื่อเก็บรักษาถึงเดือนที่ 2 และแถบสีแดงของตำแหน่งทั้งสองเริ่มจางลง เมื่อเก็บรักษาในเดือนที่ 4-6 (รูปที่ 4.24)

3) ที่อายุการเก็บรักษาจำลองที่ 1 1.5 2 และ 3 ปี ไม่สามารถอ่านผลได้เนื่องจากไม่พบ แถบสีแดงที่ตำแหน่ง Control line ของแถบตรวจที่ถูกเก็บรักษาในแต่ละช่วงเวลา และพบเพียงแถบสีแดงจางในตำแหน่ง Test line เมื่อเก็บรักษาในปีที่ 1 (รูปที่ 4.25)



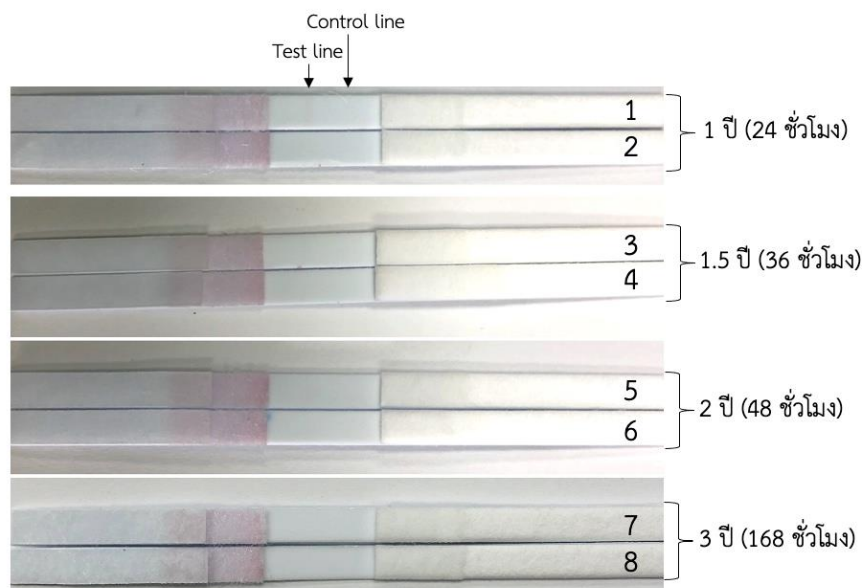
รูปที่ 4.23 ผลการทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ MTB Strip ที่ถูกจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ก่อนนำไปใช้ตรวจสอบผลผลิต M-RPA

จากรูปที่ 4.23 แถบตรวจ 1-12 ซึ่งถูกจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ตามลำดับ สามารถอ่านผลทุกแถบได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง แถบตรวจ 1 3 5 7 9 และ 12 เป็นผลการทดสอบของตัวควบคุมบวก ให้การอ่านผลเป็นผลบวก เนื่องจากพบแถบสีแดงจาง ๆ ที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 2 4 6 8 10 และ 11 เป็นผลการทดสอบของตัวควบคุมลบ ให้การอ่านผลเป็นผลลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line



รูปที่ 4.24 ผลการทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ MTB Strip ที่ถูกจัดเก็บที่อุณหภูมิห้อง ไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ก่อนนำไปใช้ตรวจสอบผลผลิต M-RPA

จากรูปที่ 4.24 แถบตรวจ 1-12 ซึ่งถูกจัดเก็บที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ตามลำดับ สามารถอ่านผลทุกแถบได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง แถบตรวจ 1 3 5 7 9 และ 11 เป็นผลการทดสอบของตัวควบคุมบวก ให้การอ่านผลเป็นผลบวก เนื่องจากพบแถบสีแดงจาง ๆ ที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 2 4 6 8 10 และ 12 เป็นผลการทดสอบของตัวควบคุมลบ ให้การอ่านผลเป็นผลลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line



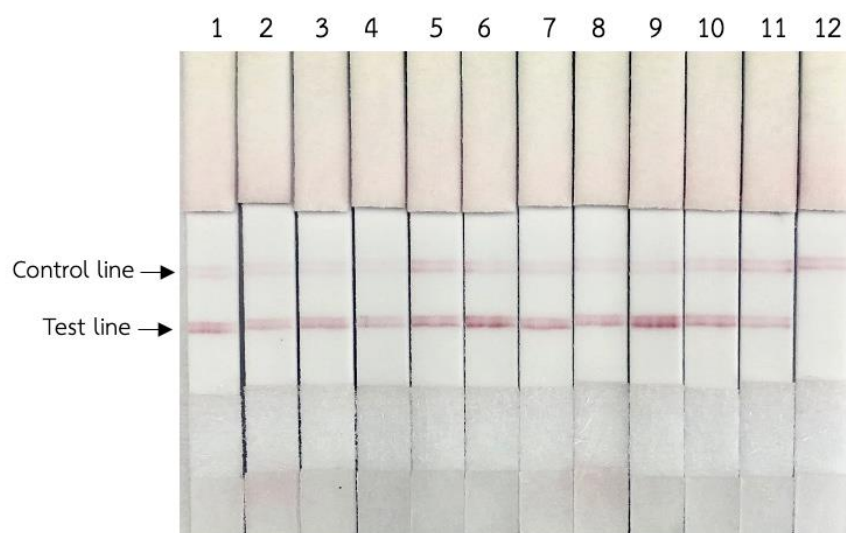
รูปที่ 4.25 ผลการทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ MTB Strip ที่ถูกเก็บรักษาในสภาวะตั้ง
เครียด เพื่อจำลองการจัดเก็บที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 1 1.5 2 และ 3 ปี ก่อนนำไปใช้ตรวจสอบ
ผลผลิต M-RPA

จากรูปที่ 4.25 แถบตรวจ 1-8 ซึ่งถูกจำลองการจัดเก็บที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 1 1.5 2 และ
3 ปี ตามลำดับ ไม่สามารถอ่านผลทุกแถบได้เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Control line แม้ว่า
แถบตรวจ 1 พบแถบสีแดงจางที่ตำแหน่ง Test line ซึ่งเป็นผลการทดสอบของตัวควบคุมบวก ในขณะที่
แถบตรวจ 3 5 และ 7 ซึ่งเป็นผลการทดสอบของตัวควบคุมบวก และแถบตรวจ 2 4 6 และ 8 ซึ่งเป็น
ผลการทดสอบของตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบสีแดง

9. ผลการวินิจฉัยกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ MTBC และ NTM ด้วย ปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

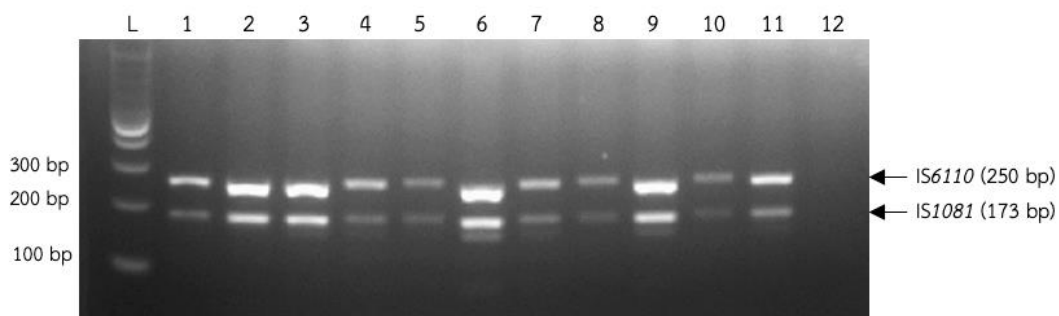
เมื่อนำเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip มาวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก
โคลนของเชื้อ MTBC จำนวน 100 ตัวอย่าง และโคลนของเชื้อ NTM จำนวน 30 ตัวอย่าง และทำ
การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้น โดยเปรียบเทียบผลการตรวจสอบผลผลิตกับวิธี Agarose gel
electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% และเปรียบเทียบการวินิจฉัยจำแนกเชื้อกับด้วยชุดตรวจ
แอนติเจน MPT 64 และเทคนิค Sanger DNA Sequencing รูปที่ 4.26 - 4.29 แสดงผลของการเพิ่ม

ปริมาณสารพันธุกรรมของ MTBC และ NTM โดยเทคนิค M-RPA ที่ถูกตรวจสอบผลผลิตโดย MTB Strip และวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5 % พบว่าสามารถจำแนกเชื้อ MTBC และอ่านผลได้อย่างชัดเจน



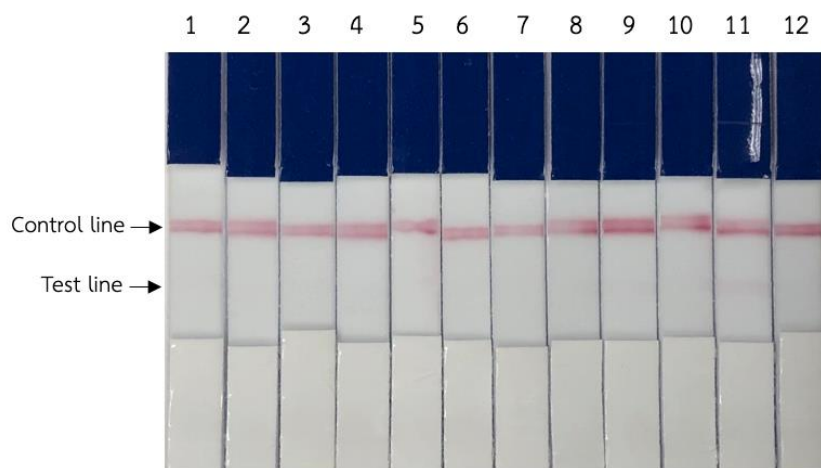
รูปที่ 4.26 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ MTBC ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

จากรูปที่ 4.26 แถบตรวจ 1-10 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ MTBC ให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวก เนื่องจากมีการปรากฏแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line และ Control line แถบตรวจ 11 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวก เนื่องจากมีการปรากฏแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line และ Control line และแถบตรวจ 12 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ ให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบ เนื่องจากไม่มีการปรากฏแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line



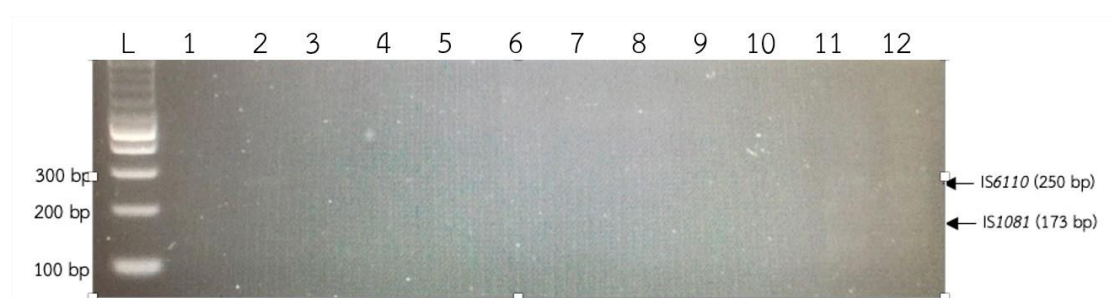
รูปที่ 4.27 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ MTBC ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%

จากรูปที่ 4.27 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1-10 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ MTBC พบแถบผลผลิต พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp แถวที่ 11 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp และแถวที่ 12 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ ซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิตของทั้งสอง IS



รูปที่ 4.28 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ NTM ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

จากรูปที่ 4.28 แถบตรวจ 1-10 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ ให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบ เนื่องจากไม่มีการปรากฏแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 11 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวก เนื่องจากมีการปรากฏแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line และ Control line และแถบตรวจ 12 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบ เนื่องจากไม่มีการปรากฏแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line



รูปที่ 4.29 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ NTM ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5

จากรูปที่ 4.29 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ ซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp และแถวที่ 3-12 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ NTM ไม่พบแถบผลผลิตของทั้งสอง IS

เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip สามารถตรวจพบ MTBC ได้ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง (100%) ซึ่งให้ผลตรงกับการวินิจฉัยเชื้อด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT 64 ในขณะที่ให้ผลการตรวจที่เป็นลบ (ตรวจไม่พบ MTBC) กับเชื้ออีก 30 ตัวอย่างที่ถูกยืนยันว่าเป็น NTM ด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing เมื่อตรวจสอบผลผลิต M-RPA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% สามารถตรวจพบ MTBC ได้ทั้งหมด 97 จาก 100 ตัวอย่าง (97%) และให้ผลการตรวจที่เป็นลบ (ตรวจไม่พบ MTBC) จำนวน 33 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบผลการวินิจฉัย MTBC กับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%

ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA	ตรวจพบ MTBC	ตรวจไม่พบ MTBC	รวม
แถบตรวจ MTB Strip	100	30	130
วิธี Agarose gel electrophoresis	97	33	130

10. ผลการวินิจฉัยวัณโรคจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

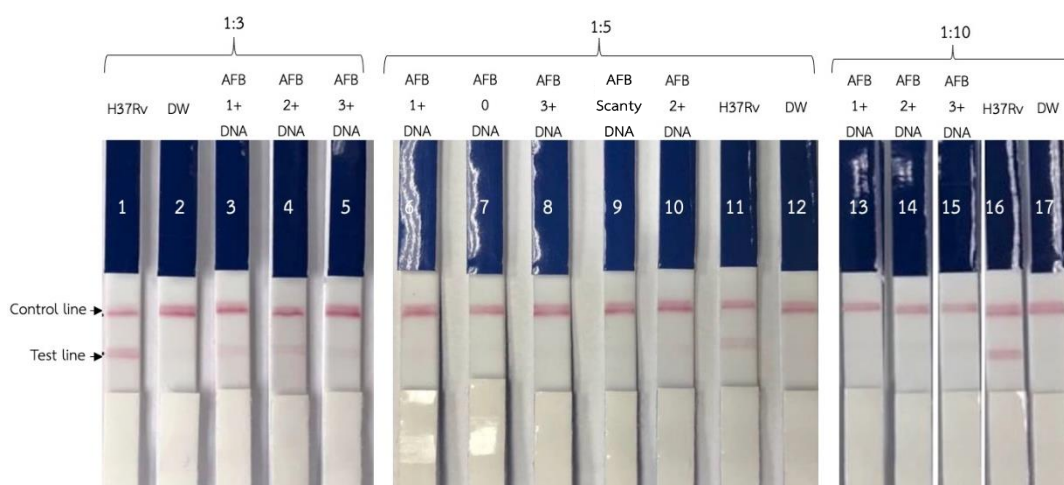
ก่อนการวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ก่อนนำสภาวะดังกล่าวไปใช้กับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจ ซึ่งมีคุณภาพและปัจจัยรบกวนจากสิ่งส่งตรวจแตกต่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลน ซึ่งในขั้นตอนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม และขั้นตอนการวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจ ได้ใช้ตัวควบคุมซึ่งประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ร่วมกับดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วยที่ผ่านการทดสอบการย้อมสีทึบกรดได้ผลเป็นบวกระดับ Scanty, 1+, 2+ และ 3+ (ซึ่งในการศึกษานี้ เรียกว่า AFB scanty DNA, AFB 1+ DNA, , AFB 2+ DNA และ , AFB 3+ DNA ตามลำดับ) เป็นตัวควบคุมบวกของระดับต่าง ๆ และดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วยที่ไม่ได้ถูกส่งมารับการวินิจฉัยวัณโรค ซึ่งมีผลการทดสอบการย้อมสีทึบกรดเป็นลบและไม่พบดีเอ็นเอของ MTBC หรือ NTM เมื่อถูกยืนยันด้วยเครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 Dx System และเรียกว่า AFB 0 DNA เป็นตัวควบคุมลบอีกประเภท

10.1. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะ ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะ มีรายละเอียดดังนี้

10.1.1. ผลการทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ที่เหมาะสมสำหรับแถบตรวจ MTB Strip

ภายหลังทำปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอข้างต้นปริมาตร 1 μ l มาทำปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้สภาวะจากข้อ 4.7 ในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย นำผลผลิต M-RPA มาเจือจางกับสารละลาย PBS ให้มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:3 1:5 และ 1:10 (M-RPA:PBS) ในปริมาตรรวม 150 μ l เมื่อจุ่มแถบตรวจ MTB Strip ในสารละลาย ระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่าในทุกอัตราส่วน สามารถสังเกตเห็นแถบสีแดงปรากฏขึ้นชัดเจนที่ตำแหน่ง Control line ในขณะที่สังเกตเห็นแถบสีแดงจางในปรากฏขึ้นที่ตำแหน่ง Test line ทั้งของตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบ โดยที่อัตราส่วน 1:3 มีแถบสีแดงชัดเจนที่สุด ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนการเจือจางเท่ากับ 1:3 (รูป 4.30) สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



รูปที่ 4.30 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะบนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้อัตราส่วนถูกเจือจางผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS เท่ากับ 1:3 1:5 และ 1:10 (M-RPA:PBS)

จากรูปที่ 4.30 แถบตรวจ 1-5 ทดสอบของอัตราส่วนเจือจางเท่ากับ 1:3 สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 1 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 2 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ ให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 3-5 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่ง

ตรวจเสมหะที่ให้ผลการย้อมสีทึบทรดเป็น 1+ 2+ และ 3+ ตามลำดับ ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line

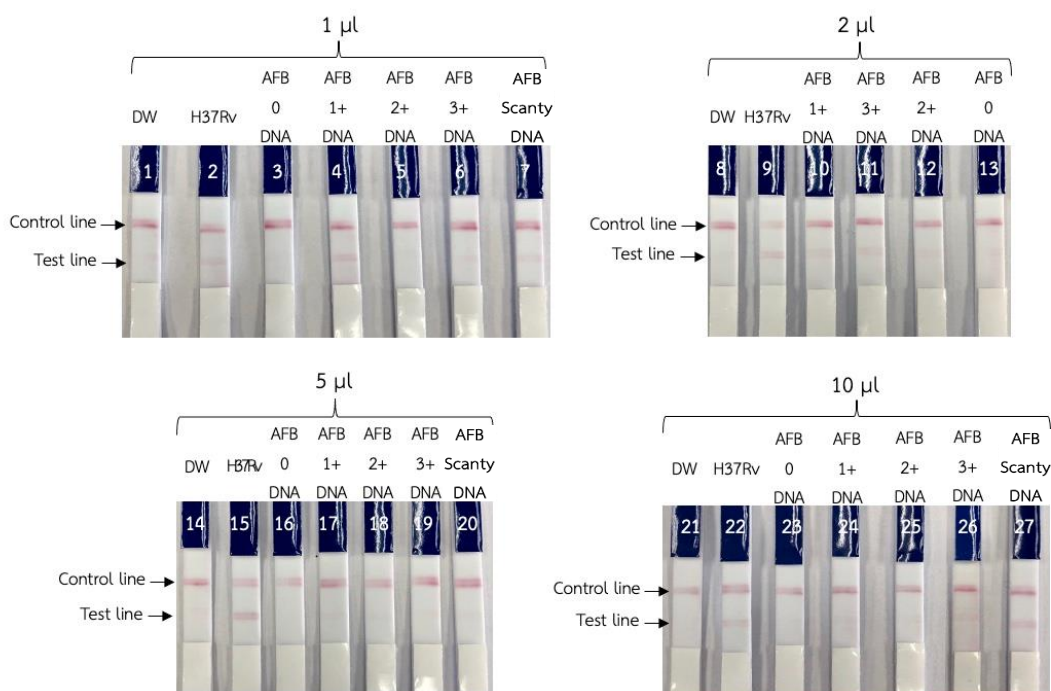
แถบตรวจ 6-12 คือ ทดสอบของอัตราส่วนเจือจางเท่ากับ 1:5 สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 6 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ให้ผลการย้อมสีทึบทรดเป็น 1+ แถบตรวจ 7 คือ ดีเอ็นเอดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ให้ผลการย้อมสีทึบทรดเป็นลบ แถบตรวจ 8 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ให้ผลการย้อมสีทึบทรดเป็น 3+ แถบตรวจ 9 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ให้ผลการย้อมสีทึบทรดเป็น Scanty และแถบตรวจ 12 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทั้งหมดให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 10 และ 11 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ให้ผลการย้อมสีทึบทรดเป็น 2+ และดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ตามลำดับ ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 13-17 ทดสอบของอัตราส่วนเจือจางเท่ากับ 1:10 สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 13-15 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ให้ผลการย้อมสีทึบทรดเป็น 1+, 2+ และ 3+ ตามลำดับ และแถบตรวจ 17 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทั้งหมดให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 16 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line

10.1.2. การทดสอบปริมาณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ภายหลังดำเนินปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้ดีเอ็นเอของตัวอย่างควบคุมข้างต้นที่ปริมาณเท่ากับ 1 2 5 และ 10 μ l ตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip โดยเจือจางผลผลิตกับ PBS ในอัตราส่วน 1:3 จุ่มแถบตรวจ 15 นาทีและอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่าดีเอ็นเอทุกปริมาณสามารถสังเกตเห็นแถบสีแดงปรากฏขึ้นชัดเจนที่ตำแหน่ง Control line ในขณะที่สังเกตเห็นแถบสีแดงจางในปรากฏขึ้นที่ตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมบวกแต่ละประเภท และไม่เห็นแถบสีแดงในปรากฏขึ้นที่ตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมลบทุกประเภท (รูป 4.31) ในขณะที่เมื่อทำการตรวจสอบผลผลิต M-RPA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% พบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 (รูปที่ 4.32) ดังนั้นจึงเลือกปริมาณดีเอ็นเอที่ 5 μ l ซึ่ง

สามารถเห็นผลการทดสอบบวก และเกิดผลบวกปลอมน้อยที่สุด และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



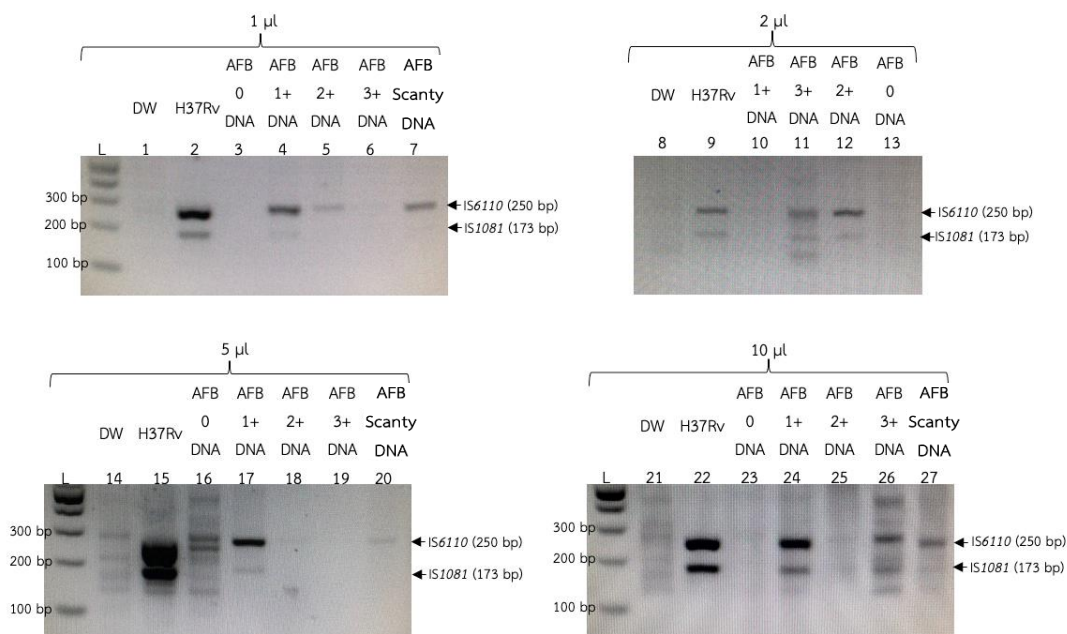
รูปที่ 4.31 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะบนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณเท่ากับ 1 2 5 และ 10 µl

จากรูปที่ 4.31 แถบตรวจ 1-7 ทดสอบกับดีเอ็นเอปริมาณเท่ากับ 1 µl สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 1 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แถบตรวจ 3 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ และแถบตรวจ 5 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ ทั้งหมดให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 2 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบตรวจ 4 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ แถบตรวจ 6 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ และแถบตรวจ 7 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น Scanty ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงจางในตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 8-13 คือ ทดสอบกับดีเอ็นเอปริมาณเท่ากับ 2 μ l สามารถอ่านผลได้ เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 8 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถบตรวจ 13 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ ทั้งหมดให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 9 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบตรวจ 10 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ แถบตรวจ 11 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ และแถบตรวจ 12 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงจางในตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 14-20 คือ ทดสอบกับดีเอ็นเอปริมาณเท่ากับ 5 μ l สามารถอ่านผลได้ เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 14 คือ น้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถบตรวจ 16 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ ทั้งหมดให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 15 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบตรวจ 17-20 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+, 2+, 3+ และ Scanty ตามลำดับ ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 21-27 คือ ทดสอบกับดีเอ็นเอปริมาณเท่ากับ 10 μ l สามารถอ่านผลได้ เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 21 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แถบตรวจ 23 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ แถบตรวจ 24 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ และแถบตรวจ 25 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ ทั้งหมดให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 22 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบตรวจ 26 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ และแถบตรวจ 27 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น Scanty ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line



รูปที่ 4.32 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณเท่ากับ 1 2 5 และ 10 µl

จากรูปที่ 4.32 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1-7 ทดสอบกับดีเอ็นเอปริมาณเท่ากับ 1 µl โดยแถวที่ 1 คือ น้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แถวที่ 3 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมอที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ และแถวที่ 6 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมอที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 ในขณะที่แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และแถวที่ 4 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมอที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp สำหรับแถวที่ 5 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมอที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ และแถวที่ 7 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมอให้ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น Scanty พบแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp เท่านั้น

แถวที่ 8-13 คือ ทดสอบกับดีเอ็นเอปริมาณเท่ากับ 2 µl โดยแถวที่ 8 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แถวที่ 10 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมอที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ และแถวที่ 13 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมอที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ ไม่พบแถบ

ผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 ในขณะที่แฉวที่ 9 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แฉวที่ 11 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ และแฉวที่ 12 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp

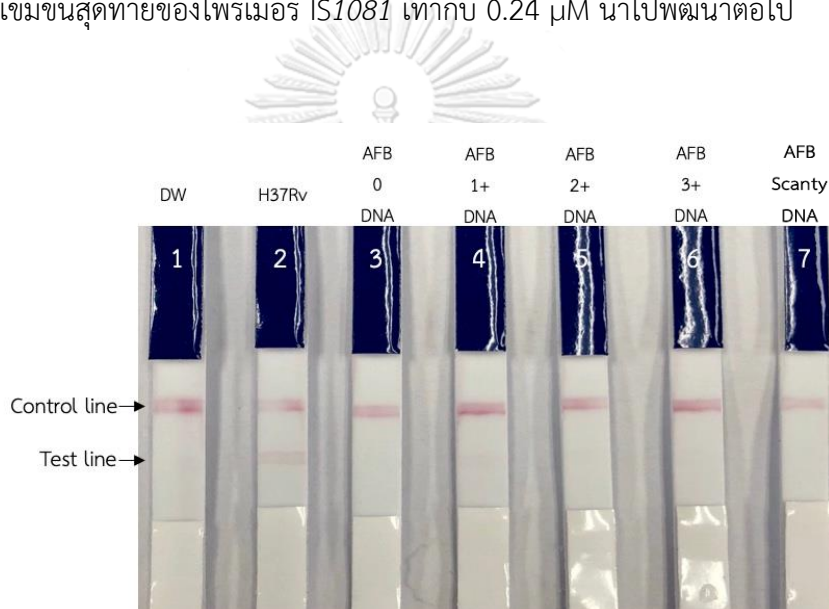
แฉวที่ 14-20 คือ ทดสอบกับดีเอ็นเอปริมาตรเท่ากับ 5 μ l โดยแฉวที่ 14 คือ น้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแฉวที่ 16 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 และมีแถบผลผลิตไม่จำเพาะเกิดขึ้น แฉวที่ 19 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS ทั้งสอง ในขณะที่แฉวที่ 15 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แฉวที่ 17 ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp แฉวที่ 18 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ และแฉวที่ 20 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น Scanty พบแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp เท่านั้น

แฉวที่ 21-27 คือ ทดสอบกับดีเอ็นเอปริมาตรเท่ากับ 10 μ l โดยแฉวที่ 21 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแฉวที่ 23 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 และมีแถบผลผลิตไม่จำเพาะเกิดขึ้น ในแฉวที่ 21 ในขณะที่แฉวที่ 22 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แฉวที่ 24 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ แฉวที่ 25 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ แฉวที่ 26 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ และแฉวที่ 27 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น Scanty พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp และมีแถบผลผลิตไม่จำเพาะเกิดขึ้นในแฉวที่ 26

10.1.3. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ในการทำปฏิกิริยา M-RPA เบื้องต้นกับตัวอย่างดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ ที่ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis มีแถบผลผลิตของ IS1081 จางมากกว่าแถบ

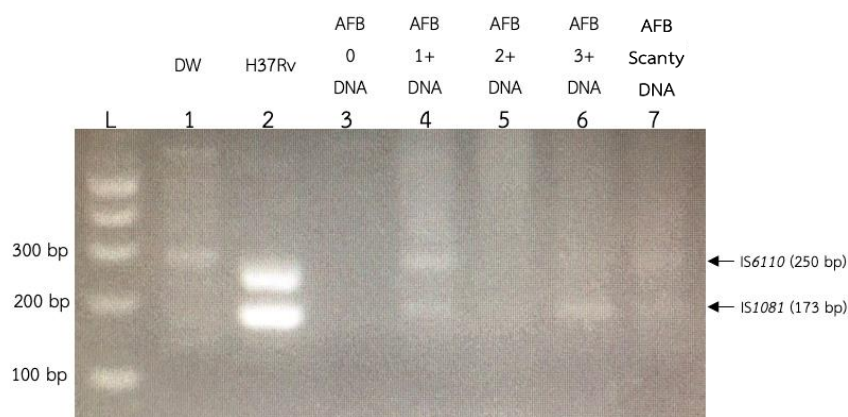
ผลผลิต IS6110 จึงมีหากการสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์ IS1081 โดยการเพิ่มความเข้มข้นสุดท้าย Forward primer และ Reverse primer เป็น 1 เท่า ซึ่งเท่ากับ 0.24 μ M ดำเนินปฏิกิริยา M-RPA ตามผลสภาวะที่พัฒนา และตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาและถูกผลิตขึ้น ระยะเวลา 15 นาที และทำการอ่านผลด้วยตาเปล่า เปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิต M-RPA กับวิธี Agarose gel electrophoresis ให้มีผลสอดคล้องกัน ผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 เท่ากับ 0.24 μ M พบแถบสีแดงบนแถบตรวจ MTB Strip ดังแสดงในรูปที่ 4.33 และแถบผลผลิตใน Agarose gel มีแถบผลผลิตที่เข้มในตำแหน่ง IS1081 ดังแสดงในรูปที่ 4.34 ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 เท่ากับ 0.24 μ M นำไปพัฒนาต่อไป



รูปที่ 4.33 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะบนแถบตรวจ MTB Strip ที่ใช้เข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 เท่ากับ 0.24 μ M

จากรูปที่ 4.33 แถบตรวจ 1-7 ซึ่งตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่ใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ IS1081 เท่ากับ 0.24 μ M สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 1 คือ น้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แถบตรวจ 3 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ และแถบตรวจ 7 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น Scanty ให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 2 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line สำหรับแถบตรวจ 4 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่ง

ส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ แถบตรวจ 5 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ และแถบตรวจ 6 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงจางในตำแหน่ง Test line



รูปที่ 4.34 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% ที่ใช้เข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 เท่ากับ 0.24 μ M

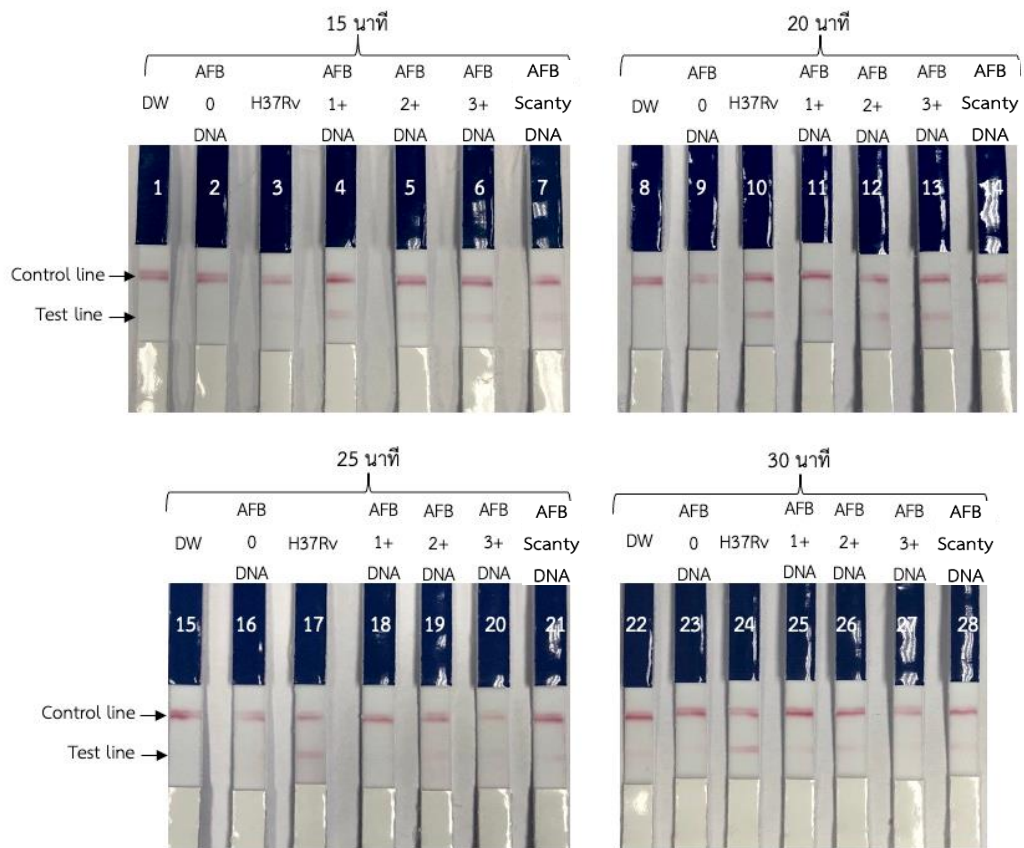
จากรูปที่ 4.34 L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp ความเข้มข้นไพรเมอร์ IS1081 เท่ากับ 0.24 μ M โดยแถวที่ 1 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แถวที่ 3 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ และแถวที่ 5 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 และมีแถบผลผลิตไม่จำเพาะเกิดขึ้น แถวที่ 1 พบแถบผลผลิตที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น ในขณะที่แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถวที่ 4 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ แถวที่ 6 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ และแถวที่ 7 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น Scanty พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp

10.1.4. ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ภายหลังดำเนินปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้ดีเอ็นเอของตัวอย่างควบคุมข้างต้นที่ ปริมาตรเท่ากับ 5 μ l ใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 เท่ากับ 0.24 μ M และไพรเมอร์

IS6110 เท่ากับ $0.12 \mu\text{M}$ บ่มที่ระยะเวลา 15 20 25 และ 30 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip โดยเจือจางผลผลิตกับ PBS ในอัตราส่วน 1:3 จุ่มแถบตรวจ 15 นาทีและอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่าทุกระยะเวลาบ่มสามารถสังเกตเห็นแถบสีแดงปรากฏขึ้นชัดเจนที่ตำแหน่ง Control line ในขณะที่สังเกตเห็นแถบสีแดงในปรากฏการณ์ที่ตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมบวกทุกประเภท และไม่เห็นแถบสีแดงในปรากฏการณ์ที่ตำแหน่ง Test line ของตัวควบคุมลบทุกประเภท (รูป 4.35) ในขณะที่เมื่อทำการตรวจสอบผลผลิต M-RPA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% พบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 (รูป 4.36) ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาบ่มที่ 25 นาที ซึ่งสามารถเห็นผลการทดสอบบวก และเกิดผลบวกปลอมน้อยที่สุด และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป





รูปที่ 4.35 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะบนแถบตรวจ MTB Strip ที่ระยะเวลาบ่ม 15 20 25 และ 30 นาที

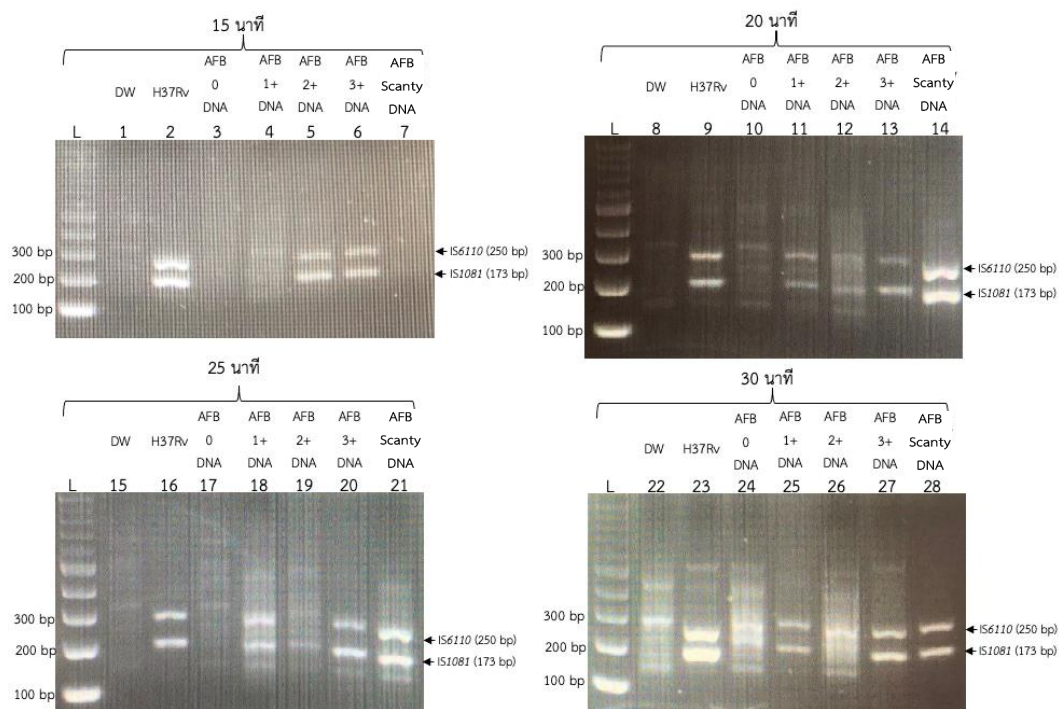
จากรูปที่ 4.35 แถบตรวจ 1-7 ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 15 นาที สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 1 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถบตรวจ 2 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึนกรดเป็นลบ ให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 3 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบตรวจ 4-7 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึนกรดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับทั้งหมดให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 8-14 คือ ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 20 นาที สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 8 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถบตรวจ 9 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึน

กรดเป็นลบ ให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 10 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบตรวจ 11-14 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับ ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 15-21 คือ ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 25 นาที สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 15 คือ น้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถบตรวจ 16 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ ให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 17 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบตรวจ 18-21 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับ ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 22-28 คือ ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 30 นาที สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 22 คือ น้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถบตรวจ 23 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ ให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 24 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบตรวจ 25-28 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับ ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line



รูปที่ 4.36 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% ที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 15 20 25 และ 30 นาที

จากรูปที่ 4.36 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1-7 ทดสอบระยะเวลาบ่ม 15 นาที โดยแถวที่ 1 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แถวที่ 3 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบเป็นลบ และแถวที่ 7 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบเป็น Scanty ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 และมีแถบผลผลิตไม่จำเพาะเกิดขึ้นในแถวที่ 1 แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถวที่ 5 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบเป็น 2+ และแถวที่ 6 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบเป็น 3+ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp ในขณะที่แถวที่ 4 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบเป็น 1+ พบแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp เท่านั้น

แถวที่ 8-14 คือ ทดสอบระยะเวลาบ่ม 20 นาที โดยแถวที่ 8 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถวที่ 10 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบ

กรดเป็นลบ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 และมีแถบผลผลิตไม่จำเพาะเกิดขึ้นในทั้งสอง แถว ในขณะที่แถวที่ 9 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็น ตัวควบคุมบวก แถวที่ 11 12 13 และ 4 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึนกรดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิต ของ IS6110 เท่ากับ 250 bp

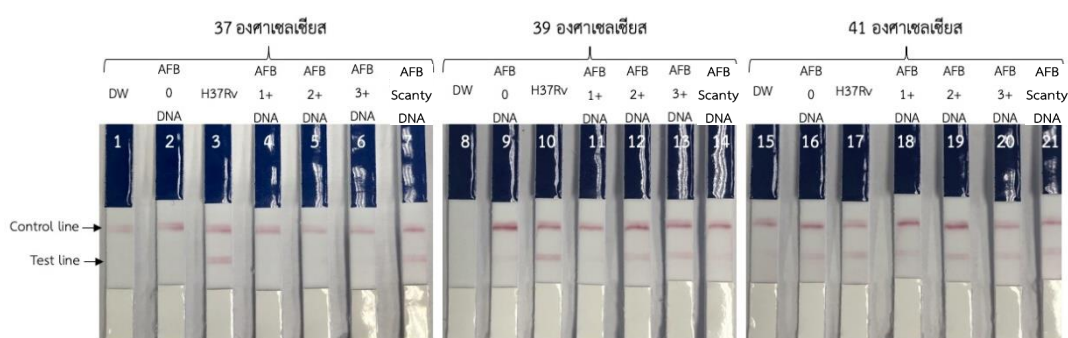
แถวที่ 15-21 คือ ทดสอบระยะเวลาบ่ม 25 นาที โดยแถวที่ 15 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถวที่ 17 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึน กรดเป็นลบ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 และมีแถบผลผลิตไม่จำเพาะเกิดขึ้นในทั้งสอง แถว ในขณะที่แถวที่ 16 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็น ตัวควบคุมบวก แถวที่ 18-21 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึนกรดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp

แถวที่ 22-28 คือ ทดสอบระยะเวลาบ่ม 30 นาที โดยแถวที่ 22 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถวที่ 24 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึน กรดเป็นลบ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 และมีแถบผลผลิตไม่จำเพาะเกิดขึ้นจำนวน มากในทั้งสองแถว ในขณะที่แถวที่ 23 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถวที่ 25-28 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึนกรดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิต ของ IS6110 เท่ากับ 250 bp

10.1.5. ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ภายหลังดำเนินปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้ดีเอ็นเอของตัวอย่างควบคุมข้างต้นที่ ปริมาตรเท่ากับ 10 μ l ใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081 เท่ากับ 0.24 μ M และไพรเมอร์ IS6110 เท่ากับ 0.12 μ M บ่มที่ระยะเวลา 25 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 39 และ 41 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip โดยเจือจางผลผลิตกับ PBS ในอัตราส่วน 1:3 จุ่มแถบ ตรวจ 15 นาทีและอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่าทุกระยะเวลาบ่มสามารถสังเกตเห็นแถบสีแดงปรากฏขึ้น ชัดเจนที่ตำแหน่ง Control line ในขณะที่สังเกตเห็นแถบสีแดงในปรากฏขึ้นที่ตำแหน่ง Test line ของ

ตัวควบคุมบวกทุกประเภท และในตัวควบคุมลบบางประเภทที่อุณหภูมิ 39 และ 41 องศาเซลเซียส (รูป 4.37) ในขณะที่เมื่อทำการตรวจสอบผลผลิต M-RPA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% พบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 (รูป 4.38) ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเห็นผลการทดสอบบวกและไม่เกิดผลบวกปลอม และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



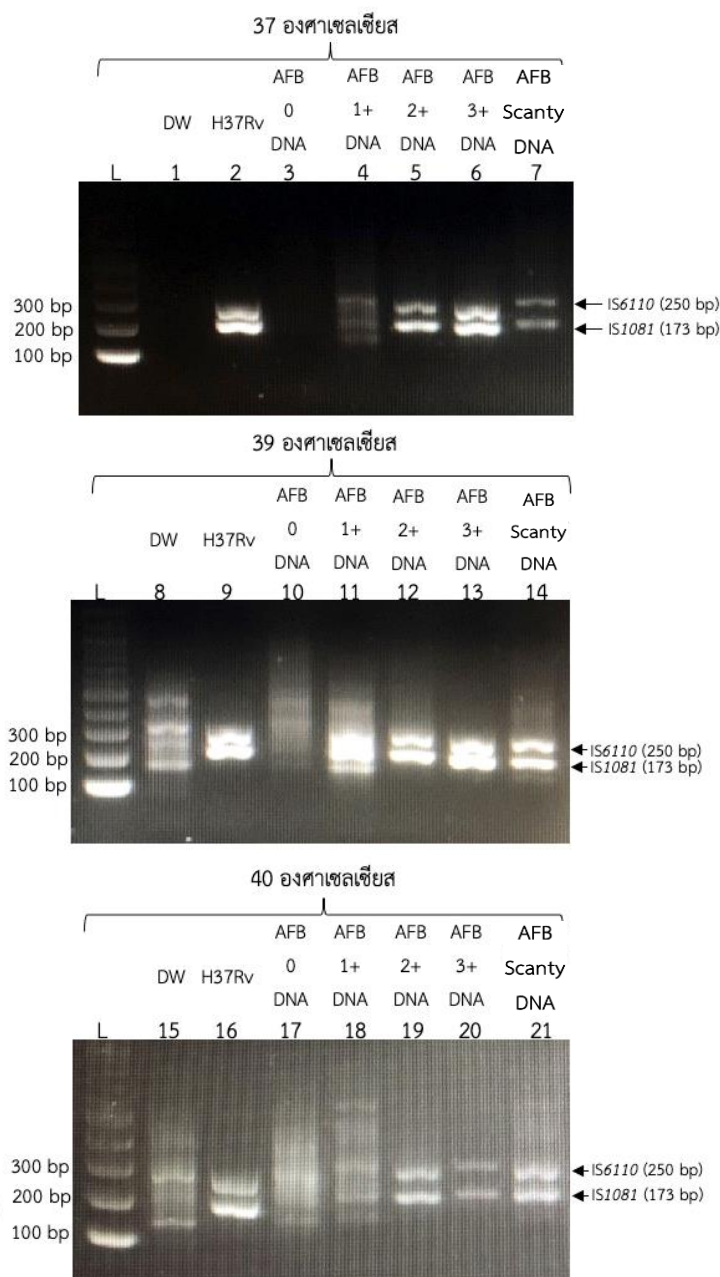
รูปที่ 4.37 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะบนแถบตรวจ MTB Strip ที่อุณหภูมิ 37 39 และ 41 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 4.37 แถบตรวจ 1-7 ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 1 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แถบตรวจ 2 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ และแถบตรวจ 4 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ ทั้งหมดให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 3 คือ เอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบตรวจ 5 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ แถบตรวจ 6 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ และแถบตรวจ 7 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น Scanty ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 8-14 คือ ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 8 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์

ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ไม่สามารถแปลผลการตรวจสอบได้ เนื่องจากไม่ปรากฏแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Control line ในขณะที่แถบตรวจ 9 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะให้ผลการย้อมสีทึบทรดเป็นลบ ให้ผลเป็นบวกปลอม เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line แถบตรวจ 10 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบตรวจ 11-14 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบทรดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับ ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 15-21 คือ ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง โดยแถบตรวจ 15 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถบตรวจ 16 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะให้ผลการย้อมสีทึบทรดเป็นลบ ให้ผลเป็นบวกปลอม เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line ในขณะที่แถบตรวจ 17 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบตรวจ 18-21 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบทรดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับ ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก เนื่องจากมีพบแถบสีแดงในตำแหน่ง Test line



รูปที่ 4.38 ผลการตรวจสอบผลผลิต M-RPA จากการวินิจฉัยดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% ที่อุณหภูมิ 37 39 และ 41 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 4.38 L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1-7 ทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แถวที่ 1 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถวที่ 3 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทากรดเป็นลบ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 ในขณะที่แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัว

ควบคุมบวก แถวที่ 4 5 6 และ 7 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทนครดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp

แถวที่ 8-14 คือ ทดสอบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส แถวที่ 8 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถวที่ 10 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทนครดเป็นลบ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 และมีแถบผลผลิตไม่จำเพาะเกิดขึ้นในทั้งสองแถว ในขณะที่แถวที่ 9 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถวที่ 11 12 13 และ 14 คือ เอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทนครดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp

แถวที่ 15-21 คือ ทดสอบที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส แถวที่ 15 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และแถวที่ 17 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทนครดเป็นลบ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 และมีแถบผลผลิตไม่จำเพาะเกิดขึ้นจำนวนมากในทั้งสองแถว ในขณะที่แถวที่ 16 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถวที่ 18 19 20 และ 21 คือ เอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทนครดเป็น 1+ 2+ 3+ และ Scanty ตามลำดับ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp และมีแถบผลผลิตไม่จำเพาะเกิดขึ้นในแถวที่ 18

10.1.6. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

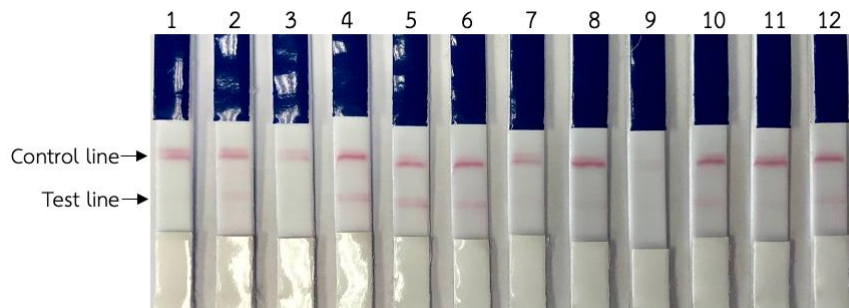
จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะทั้งหมดข้างต้น ได้ผลสรุปของสภาวะการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ของเชื้อ MTBC และ อัตราส่วนการเจือจางระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ดังที่แสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.6 ซึ่งถูกนำไปใช้ในการทดสอบในลำดับต่อไป

ตารางที่ 4.6 สรุปสถานะที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะ

การวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดสิ่งส่งตรวจเสมหะ	สถานะที่เหมาะสม
อัตราส่วนระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS	1:3
ปริมาตรของดีเอ็นเอต้นแบบ	5 μ l
ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ IS1081	0.24 μ M
ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา M-RPA	25 นาที
อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา M-RPA	37 องศาเซลเซียส

10.2. การวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip

เมื่อนำเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip มาวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะ จำนวน 131 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผ่านการวินิจฉัยด้วยเทคนิคการย้อมสีทึบกรด แบ่งเป็นผลการย้อมสีทึบกรดให้ผลบวกรวม 78 ตัวอย่าง (ระดับ 3+ 20 ตัวอย่าง ระดับ 2+ 16 ตัวอย่าง ระดับ 1+ 31 ตัวอย่าง และระดับ Scanty 11 ตัวอย่าง) และผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบรวม 53 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบผลการตรวจสอบผลผลิตกับวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% และเปรียบเทียบการวินิจฉัยจำแนกเชื้อด้วยการย้อมสีทึบกรดกับเทคนิค Real-time PCR โดยใช้น้ำยา Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection รูปที่ 4.39-4.40 แสดงผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค M-RPA ที่ถูกตรวจสอบผลผลิตโดย MTB Strip และวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5 % พบว่าสามารถจำแนกเชื้อ MTBC และอ่านผลได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 4.39 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip

จากรูปที่ 4.39 สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตำแหน่ง Control line พบแถบสีแดง แถบตรวจ 1 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 2 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากพบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line

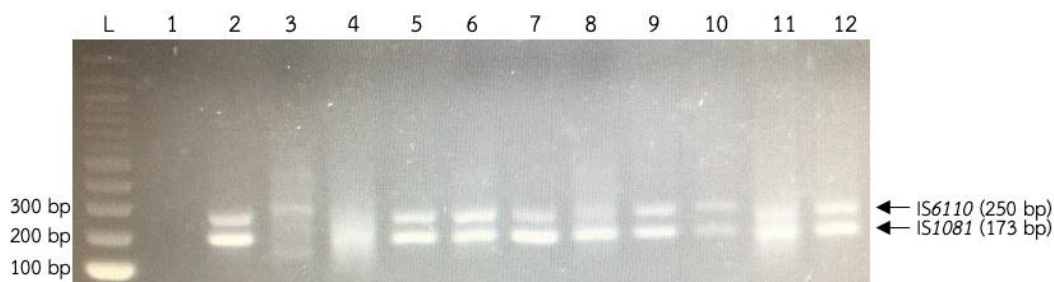
แถบตรวจ 3 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ เป็นตัวควบคุมลบ ให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่พบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 4 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น Scanty ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากพบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 5 7 9 10 และ 11 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากพบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 6 และ 8 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากพบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line

แถบตรวจ 12 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากพบแถบสีแดงที่ตำแหน่ง Test line



รูปที่ 4.40 ผลการวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5%

จากรูปที่ 4.40 แถว L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp

แถวที่ 1 คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110

แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp

แถวที่ 3 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบ ที่เป็นตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 และพบแถบผลผลิตที่ไม่จำเพาะ

แถวที่ 4 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น Scanty พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp มีลักษณะจาง

แถวที่ 5 7 9 10 และ 11 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 3+ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp

แถวที่ 6 และ 8 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 2+ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp

แถวที่ 12 คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผลการย้อมสีทึบกรดเป็น 1+ พบแถบผลผลิตของ IS1081 เท่ากับ 173 bp และแถบผลผลิตของ IS6110 เท่ากับ 250 bp

เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip สามารถวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะ โดยตรวจพบ MTBC จำนวน 79 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบ MTBC จำนวน 52 ตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบผลวินิจฉัยกับการตรวจสอบผลผลิต M-RPA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% การย้อมสีทึบกรดและเทคนิค Real-time PCR ได้รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.7



ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบผลการวินิจฉัย MTBC จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะ จำนวน 131 ตัวอย่าง ของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip กับการตรวจสอบผลผลิต ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis วิธีการย้อมสีทึบกรด และเทคนิค Real-time PCR

	เทคนิค Agarose gel electrophoresis			ความไว (%)	ความจำเพาะ (%)	ค่าทำนายผลบวก (%)	ค่าทำนายผลลบ (%)	ค่าความสอดคล้อง (κ)
	ผลบวก	ผลลบ	รวม					
เทคนิค M-RPA ร่วมกับ								
แถบตรวจ MTB Strip								
ผลบวก	60	19	79	96.77	72.46	75.95	96.15	0.683
ผลลบ	2	50	52					
รวม	62	69	131					
การย้อมสีทึบกรด								
	ผลบวก	ผลลบ	รวม					
เทคนิค M-RPA ร่วมกับ								
แถบตรวจ MTB Strip								
ผลบวก	71	8	79	91.03	84.91	89.87	86.54	0.762
ผลลบ	7	45	52					
รวม	78	53	131					
เทคนิค Real-time PCR								
	ผลบวก	ผลลบ	รวม					
เทคนิค M-RPA ร่วมกับ								
แถบตรวจ MTB Strip								
ผลบวก	76	3 ^ก	79	100.0	94.55	96.20	100.0	0.953
ผลลบ	0	52	52					
รวม	76	55	131					

หมายเหตุ ก คือ ดีเอ็นเอที่เป็น NTM จำนวน 1 ตัวอย่าง จาก 3 ตัวอย่าง ซึ่งถูกยืนยันด้วย Real-time PCR

จากตาราง 4.11 ผลวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2.5% พบผลไม่สัมพันธ์กันจำนวน 21 ตัวอย่าง ส่งผลให้มีค่าความ

ไวเท่ากับ 96.77% (95% CI: 88.83-99.61%) ค่าจำเพาะเท่ากับ 72.46% (95% CI: 60.38-82.54%) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 75.95% (95% CI: 68.23-82.28%) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 96.15% (95% CI: 86.39-98.99%) และค่าความสอดคล้องที่คำนวณด้วยสถิติ Kappa (**K**) เท่ากับ 0.683 (95% CI: 0.563-0.803) ซึ่งแสดงว่าเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip มีความสอดคล้องกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis อยู่ในเกณฑ์ดี (ค่าอยู่ระหว่าง 0.61-0.80)

เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการย้อมสีทึบกรด พบผลไม่สัมพันธ์กันจำนวน 15 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 91.03% (95% CI: 82.38-96.32%) ค่าจำเพาะเท่ากับ 84.91% (95% CI: 72.41-93.25%) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 89.87% (95% CI: 82.36-94.40%) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 86.54% (95% CI: 75.86-92.93%) และค่าความสอดคล้องที่คำนวณด้วยสถิติ Kappa (**K**) เท่ากับ 0.762 (95% CI: 0.648-0.875) ซึ่งแสดงว่าเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip มีความสอดคล้องกับวิธีการย้อมสีทึบกรดอยู่ในเกณฑ์ดี (ค่าอยู่ระหว่าง 0.61-0.80)

เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจพบ MTBC จำนวน 79 จาก 76 (103.95%) ตัวอย่างที่พบ MTBC ด้วยเทคนิค Real-time PCR และตรวจไม่พบ MTBC จำนวน 52 จาก 55 (94.55%) ตัวอย่างที่ไม่พบ MTBC ด้วยเทคนิค Real-time PCR และคำนวณหา ค่าความไวเท่ากับ 100.0% (95% CI: 95.26-100.0%) ค่าจำเพาะเท่ากับ 94.55% (95% CI: 84.88-98.86%) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 96.20% (95% CI: 89.40-98.70%) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100.00% (95% CI: -%) และค่าความสอดคล้องที่คำนวณด้วยสถิติ Kappa (**K**) เท่ากับ 0.953 (95% CI: 0.900-1.000) ซึ่งแสดงว่าเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip มีความสอดคล้องกับเทคนิค Real-time PCR อยู่ในเกณฑ์ดีมาก (ค่าอยู่ระหว่าง 0.81-1.00)

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลการวินิจฉัย MTBC จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip กับผลการย้อมสีทึบกรดที่ระดับต่าง ๆ ได้รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบผลการวินิจฉัย MTBC จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะ จำนวน 131 ตัวอย่าง ของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip และผลการย้อมสีทึบกรดที่ระดับต่าง ๆ

	ผลการย้อมสีทึบกรด (AFB 3+)			ความไว (%)	ความจำเพาะ (%)	ค่าทำนายผลบวก (%)	ค่าทำนายผลลบ (%)
	ผลบวก	ผลลบ	รวม				
เทคนิค M-RPA ร่วมกับ							
แถบตรวจ MTB Strip							
ผลบวก	19	0	19	95.0	-*	100.0	-*
ผลลบ	1 ^ก	0	1				
รวม	20	0	20				
ผลการย้อมสีทึบกรด (AFB 2+)							
	ผลบวก	ผลลบ	รวม				
เทคนิค M-RPA ร่วมกับ							
แถบตรวจ MTB Strip							
ผลบวก	15	0	15	93.75	-*	100.0	-*
ผลลบ	1 ^ข	0	1				
รวม	16	0	16				
ผลการย้อมสีทึบกรด (AFB 1+)							
	ผลบวก	ผลลบ	รวม				
เทคนิค M-RPA ร่วมกับ							
แถบตรวจ MTB Strip							
ผลบวก	29	0	29	93.55	-*	100.0	-*
ผลลบ	2 ^ค	0	2				
รวม	31	0	31				

	ผลการย้อมสีทึบ (Scanty)			ความไว (%)	ความจำเพาะ (%)	ค่าทำนายผลบวก (%)	ค่าทำนายผลลบ (%)
	ผลบวก	ผลลบ	รวม				
เทคนิค M-RPA ร่วมกับ							
แถบตรวจ MTB Strip							
ผลบวก	8	0	8	72.73	*	100.0	*
ผลลบ	3 ^ก	0	3				
รวม	11	0	11				
ผลการย้อมสีทึบ (AFB 0)							
	ผลบวก	ผลลบ	รวม				
เทคนิค M-RPA ร่วมกับ							
แถบตรวจ MTB Strip							
ผลบวก	0	8	8	*	84.91	*	100.0
ผลลบ	0	45 ^ข	45				
รวม	0	53	53				

หมายเหตุ ก คือ ดีเอ็นเอที่เป็น NTM จำนวน 1 ตัวอย่างซึ่งถูกยืนยันด้วย Real-time PCR

ข คือ ดีเอ็นเอที่เป็น NTM จำนวน 1 ตัวอย่างซึ่งถูกยืนยันด้วย Real-time PCR

ค คือ ดีเอ็นเอที่เป็น NTM จำนวน 2 ตัวอย่างซึ่งถูกยืนยันด้วย Real-time PCR

ง คือ ดีเอ็นเอที่เป็น NTM จำนวน 3 ตัวอย่างซึ่งถูกยืนยันด้วย Real-time PCR

จ คือ ดีเอ็นเอที่เป็น NTM จำนวน 2 ตัวอย่าง จาก 45 ตัวอย่าง ซึ่งถูกยืนยันด้วย Real-time PCR

* คือ ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 4.8 ผลวินิจฉัยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip เมื่อเปรียบเทียบกับผลการย้อมสีทึบที่ตรวจพบ MTBC ที่ระดับ AFB 3+ จำนวน 19 (95.0%) ตัวอย่าง มีค่าความไวเท่ากับ 95.0% และค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100.0% ที่ระดับ AFB 2+ จำนวน 15 (93.75%) ตัวอย่าง ค่าความไวเท่ากับ 93.75% และค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100.0% ที่ระดับ AFB 1+ จำนวน 29 (93.55%) ตัวอย่าง ค่าความไวเท่ากับ 93.55% และค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100.0% ที่ระดับ Scanty จำนวน 8 (72.73%) ตัวอย่าง ค่าความไวเท่ากับ 72.73% และค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100.0% และที่ระดับ AFB 0 จำนวน 8 (15.09%) ตัวอย่าง ในขณะที่ตรวจไม่พบ MTBC ระดับ AFB 3+, 2+ จำนวน 1 (5.0%, 6.25% ตามลำดับ) ตัวอย่าง ระดับ AFB 1+ จำนวน 2 (6.45%) ตัวอย่าง ระดับ Scanty จำนวน 3 (27.27%) ตัวอย่าง และระดับ AFB 0 จำนวน 45 (84.91%) ค่าความจำเพาะเท่ากับ 84.91% และค่าทำนายผล

ลบเท่ากับ 100.0% ซึ่งในบรรดาตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเสมหะที่ผลการย้อมสีทนครดเป็นบวก ระดับ 3+ 2+ 1+ และ Scanty (หมายถึงพบแบคทีเรียติดสีทนครดในเสมหะดังกล่าว) แต่เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ให้ผลตรวจเป็นลบ (ตรวจไม่พบ MTBC) มีจำนวนรวมทั้งสิ้น 52 ตัวอย่าง โดยพบว่าเป็นดีเอ็นเอของ NTM จำนวน 9 ตัวอย่าง ซึ่งถูกยืนยันด้วยเทคนิค Real-time PCR ดังนั้นจึงไม่สามารถถูกตรวจพบด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip แม้ว่าผลการย้อมสีทนครดเป็นบวก



บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

วัณโรคเป็นโรคติดต่อทางเดินหายใจชนิดเรื้อรังที่สำคัญของโลกและของประเทศไทย และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตจากโรคติดต่อที่สูงเป็นอันดับสองของโลกรองจากโรคเอดส์ โดยส่วนใหญ่พบการแพร่ระบาดของวัณโรคในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา เช่น ประเทศแถบภูมิภาคเอเชียและแอฟริกา การเกิดวัณโรคมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis complex* โดยมีเชื้อ *M. tuberculosis* เป็นสาเหตุหลักที่พบมากที่สุด (1, 3) การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการที่ถูกต้องและรวดเร็ว จึงมีความสำคัญในการวินิจฉัยผู้ติดเชื้อ เพื่อให้การรักษาได้อย่างถูกต้อง ซึ่งส่งผลต่อการลดการแพร่ระบาดของโรคได้ ปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามาใช้ในการวินิจฉัยวัณโรค แต่ยังมีข้อจำกัดสำหรับโรงพยาบาลขนาดเล็ก หรือโรงพยาบาลที่อยู่ห่างไกล เนื่องจากจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะซึ่งมีราคาสูง และการบำรุงรักษาอย่างต่อเนื่อง

การศึกษานี้ได้พัฒนาเทคนิคสำหรับการตรวจทางห้องปฏิบัติเพื่อวินิจฉัยวัณโรค ภายใต้แนวความคิดของการทดสอบที่ใช้เวลาสั้น มีความไวและความจำเพาะสูง ไม่ใช่เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่จำเพาะและมีราคาแพง เทคนิคที่พัฒนาขึ้นอาศัยปฏิกิริยา M-RPA ที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ IS1081 และ IS6110 ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยเทคนิคที่อาศัยหลักการของ Nucleic acid lateral flow (NALF) ทำให้สามารถอ่านผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS ทั้งสองได้ด้วยตาเปล่า IS1081 และ IS6110 เป็น IS ที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้การวินิจฉัยเชื้อ MTBC โดยทั้งสอง IS ต่างมีความไวและความจำเพาะสูงที่ใกล้เคียงกัน และมีการนำ IS ทั้งคู่มาใช้ร่วมกันในเทคนิค Xpert® MTB/RIF Ultra และ LAMP (74, 78) รวมทั้งในชุดน้ำยาสำหรับเทคนิค Real-time PCR เพื่อเพิ่มความรวดเร็วและความแม่นยำในการตรวจหาเชื้อ MTBC (128-130) ทั้ง IS1081 และ IS6110 ต่างมีคุณสมบัติเป็น Insertion sequence (IS) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น มีจำนวนซ้ำ ๆ หลาย Copy ภายในจีโนม และมีความอนุรักษ์สูง IS ถูกค้นพบครั้งแรกในเชื้อ *Escherichia coli* ที่บริเวณ *gal operon* ซึ่งเป็นยีนทำหน้าที่เกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของน้ำตาล Galactose โดย IS ยังมีคุณสมบัติเป็น Mobile genetic element ที่สามารถเคลื่อนย้ายตำแหน่งภายในโครโมโซมเดียวกัน หรือเคลื่อนย้ายจากโครโมโซมหนึ่งไปยังโครโมโซมอื่นที่ต่างกันได้ และสามารถถ่ายโอนจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่ง

ไปยังอีกสายพันธุ์ได้ (131, 132) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานการถ่ายโอน IS หรือแลกเปลี่ยนทาง พันธุกรรมระหว่างเชื้อในกลุ่ม *Mycobacteria* กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ (133-135) แสดงให้เห็นว่ากลุ่ม IS ยังคงมีความจำเพาะสูงมาก สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้หรือจำแนกเชื้อ MTBC ที่มี ประสิทธิภาพได้เป็นอย่างดี ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อในกลุ่ม *Mycobacteria* รวมทั้งแบคทีเรียสาย พันธุ์อื่น ๆ (31, 133) และยังพบว่ากลุ่ม IS มีความจำเพาะมากกว่ายีนอนุรักษ์อื่นของเชื้อ MTBC เช่น *mbp64 mtp40 hsp65kd* และ 23S rDNA (27, 136)

ดีเอ็นเอที่ใช้ในพัฒนาเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip แบ่งเป็น 2 ประเภท ตาม แหล่งที่มาของเชื้อที่ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ MTBC และ NTM ซึ่งมีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นสูง ถูกใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค M-RPA ร่วมกับ แถบตรวจ MTB Strip ในระยะแรก เพื่อทดสอบความสามารถในการจำแนกเชื้อ MTBC ออกจาก NTM เมื่อเทคนิคที่พัฒนาขึ้นผ่านการประเมินในระยะแรกแล้ว จำเป็นต้องนำมาประเมินกับดีเอ็นเอที่ สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจ เพื่อทดสอบความสามารถในการวินิจฉัยวัณโรคกับสิ่งส่งตรวจโดยตรง ทั้งนี้ดี เอ็นเอที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจ อาจมีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นไม่สูงเท่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลน ของเชื้อ และอาจมีการปนเปื้อนของสารต่าง ๆ ที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจที่สามารถส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยา การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ (125) สิ่งส่งตรวจที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีประเภทเดียวคือ เสมหะ ซึ่งเป็นสิ่งส่งตรวจหลักที่ใช้ในงานประจำของการวินิจฉัยวัณโรค อย่างไรก็ตามในการประเมิน คุณภาพของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ในอนาคต ควรเพิ่มการทดสอบกับสิ่งส่ง ตรวจที่มีความหลากหลาย เช่น น้ำล้างปอด น้ำล้างกระเพาะอาหาร อุจจาระ และปัสสาวะ (54, 137) เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ครอบคลุมมากขึ้น

การศึกษาก่อนหน้าของ Singpanomchai และคณะ (23) พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นซึ่ง จำเพาะต่อ IS1081 และ IS6110 มีความไวและความจำเพาะสูงถึง 100% เมื่อใช้ในปฏิกิริยา RPA แบบ Singleplex และตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ในขณะที่หากใช้การตรวจสอบ ผลผลิตด้วยสี SYBR[®] Green I พบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 99.32% และ 100% ตามลำดับสำหรับ IS1081 และเท่ากับ 97.95% และ 100% ตามลำดับสำหรับ IS6110 ดังนั้นการ พัฒนาเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ในครั้งนี้จึงได้อาศัยไพรเมอร์จากการศึกษาของ Singpanomchai และคณะ (23) ที่ผ่านมา โดยได้ใช้ไพรเมอร์ทั้งสองคู่ทำปฏิกิริยาร่วมกันแบบ Multiplex และได้ดัดแปลงส่วนของ Reverse primer ของ IS6110 ให้มีความเหมาะสมกับการ

ปฏิกิริยา RPA มากขึ้น (22) นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ยังได้มีการดัดแปลงให้มีฉลากโมเลกุลของ - FAM ติดไว้ที่ด้านปลาย 5' ของ Forward primer และโมเลกุลของ -Biotin ติดไว้ที่ด้านปลาย 5' ของ Reverse primer เพื่อใช้ในการตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในขั้นตอนของเทคนิค NALF เช่นเดียวกับการศึกษาพัฒนา NALF อื่น หรือการผลิตชุดน้ำยา TwistAmp® exo ที่มีการติดฉลากที่ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์และโพรบ (22) การติดฉลากที่ปลายของไพรเมอร์ทั้งคู่ ไม่ส่งผลกระทบต่อ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในการศึกษาครั้งนี้ สังเกตได้จากในการศึกษานำร่องที่ใช้ไพรเมอร์ติด ฉลาก และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาทั้ง PCR และ RPA พบว่ายังสามารถตรวจสอบ ผลผลิตได้ใน Agarose gel electrophoresis

การพัฒนาเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ได้เริ่มจากทดสอบหาสภาวะที่ เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยปฏิกิริยา M-RPA โดยใช้ดี เอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อเป็นตัวอย่างเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมระหว่างขั้นตอนการพัฒนา จากนั้นนำ ผลผลิตที่เกิดขึ้นไปพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip เมื่อได้สภาวะของแถบตรวจจึงนำไปผลิตโดย เครื่องจักรอุตสาหกรรม และนำมาใช้ตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมอ โดยมีการ ปรับสภาวะเฉพาะของปฏิกิริยา M-RPA และขั้นตอนการตรวจสอบผลผลิตให้เหมาะสมกับประเภท ของดีเอ็นเอที่มาจากสิ่งส่งตรวจอีกครั้งก่อนการทดสอบ การศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตควรมีการพัฒนา แถบตรวจโดยใช้ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา M-RPA ที่ทดสอบกับดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ซึ่ง อาจใช้องค์ประกอบของแถบตรวจ ทั้งความเข้มข้นของ Anti-biotin gold conjugate ความเข้มข้น ของ Anti-FITC และความเข้มข้นของ Anti-IgG รวมไปถึงชนิดของแผ่นเมมเบรนที่แตกต่างไปจาก การศึกษาครั้งนี้ เพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา M-RPA ของดี เอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนนิ่ง ใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งต้นเท่ากับ 1 ng/ μ l สามารถทำปฏิกิริยาด้วยความ เข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อทั้ง IS1081 และ IS6110 เท่ากับ 0.12 μ M ทั้งสอง IS ซึ่งแม้ จะน้อยกว่าช่วงความเข้มข้นไพรเมอร์ตามคู่มือน้ำยา TwistAmp® แนะนำ โดยความเข้มข้นของไพร เมอร์แต่ละเส้นควรเท่ากับ 0.15 – 0.6 μ M และผลรวมความเข้มข้นไพรเมอร์ทั้งหมดในปฏิกิริยา ควร เท่ากับ 0.75 – 2.0 μ M (H) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของไพรเมอร์สุดท้ายที่เท่ากับ 0.12 μ M สามารถ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นอัตราความ

เข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดสอบ ซึ่งถือเป็นหลักการที่สำคัญของปฏิกิริยา M-RPA (99) หากใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ที่ไม่เหมาะสม อาจส่งผลให้เกิด Primer dimer หรือผลผลิตที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นภายในปฏิกิริยาได้ (138) นอกจากนี้การใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้นที่ลดลงยังช่วยลดต้นทุนการทดสอบ เนื่องจากไพรเมอร์ที่มีการติดฉลากมีราคาสูงกว่าไพรเมอร์ปกติทั่วไป

ผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา M-RPA สามารถพบได้ตั้งแต่ระยะเวลา 10 นาทีของการทำปฏิกิริยา ในขณะที่ระยะ 15 นาที พบแถบผลผลิตทั้งสองที่ชัดเจนมากขึ้นเท่ากันทั้งสองแถบ อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่เหมาะสมตามคำแนะนำของคู่มือนี้ยาวเท่ากับ 20 นาที (22) ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวพบแถบผลผลิตปลอมในการศึกษาครั้งนี้ การศึกษาที่ผ่านมามีการทำปฏิกิริยา M-RPA ทั้งที่ระยะเวลาน้อยกว่าและมากกว่า 20 นาที การศึกษาของ Zhai และคณะ พัฒนาเทคนิค M-RPA สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* และ *Chlamydia trachomatis* ในหญิงตั้งครรภ์ ร่วมกับอุปกรณ์ Lateral flow assay detection (LFD) พบว่า M-RPA-LFD ทำปฏิกิริยาได้ดีภายใต้อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที โดยมีความไวในการตรวจ *N. gonorrhoeae* และ *C. trachomatis* เท่ากับ 85.62% และ 90.90% ตามลำดับ และความจำเพาะเท่ากับ 100.00% (139) ในขณะที่การศึกษาของของ Kanokudom และคณะ พัฒนาเทคนิค M-RPA ร่วมกับ Lateral flow strip ชนิด Single-stranded tag hybridization chromatographic printed-array strip (STH-PAS) สำหรับการตรวจหา Extended spectrum β -lactamase ของ *Escherichia coli* ที่แยกได้จากเนื้อสดและลำไส้ของหมู ด้วยยีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} ทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที พบมีความไวและความจำเพาะในการตรวจสอบยีน bla_{CTX-M} , bla_{OXA} และ bla_{SHV} เท่ากับ 99.2% และ 100.0% 100.0% และ 100.0% และ 100.0% และ 100.0% ตามลำดับ (140) นอกจากนี้อุณหภูมิที่ใช้ในการดำเนินปฏิกิริยา M-RPA จากการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งอยู่ในช่วงอุณหภูมิแนะนำตามคู่มือนี้คือ 37 – 42 องศาเซลเซียส (22) และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเครื่องมือทำอุณหภูมิพื้นฐานทั่วไปที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการได้

การออกแบบแถบตรวจ MTB Strip ได้อาศัยหลักการของเทคนิค NALF ในการตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างไพรเมอร์ที่ติดฉลากของ IS1081 และ IS6110 การศึกษานี้ใช้แผ่นเมมเบรนและผลิต MTB Strip ในเชิงอุตสาหกรรม โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ไอเมต ลาบอราทอรี จำกัด แผ่น

เมมเบรนที่ได้รับความนิยมเคราะห์เป็นชนิด Nitrocellulose ซึ่งมีรูภายในเมมเบรนขนาดตั้งแต่ 8 - 20 μm ทำให้สารเชิงซ้อนที่มีอนุภาคของสี (Target-antibody-gold particle) ที่จับกับสารวิเคราะห์ ในที่นี้คือผลผลิตจากปฏิกิริยา M-RPA ที่มีผลติดอยู่ ไหลผ่านไปตามแถบตรวจได้เป็นอย่างดี เทคนิค NALF เป็นเทคนิคที่มีราคาถูก มีความคงทน อ่านผลได้ง่ายอย่างรวดเร็วด้วยตาเปล่า จึงเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการพัฒนาแถบตรวจ Lateral flow assay (LFA) (112, 141, 142) อนุภาคที่ทำให้เกิดสีคือ Colloidal gold anti-biotin ซึ่งให้สีที่ปรากฏเป็นสีแดงทับทิม ถูกเคลือบไว้ที่ตำแหน่ง Conjugated pad เพื่อรอจับอย่างจำเพาะกับโมเลกุล Biotin โมเลกุลของ Colloidal gold ที่ใช้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 40 nm ซึ่งเป็นขนาดที่นิยมนำไปใช้งานวิจัยและใช้ในการผลิตแถบตรวจ LFA ที่จำหน่ายแพร่หลายทั่วไป (142-144) ขนาดโมเลกุลของ Colloidal gold ที่มีขนาดใหญ่กว่า 40 nm อาจช่วยเพิ่มความไวในการจับกับสารวิเคราะห์ เนื่องจากขนาดพื้นที่บนผิวของ Colloidal gold เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้แอนติบอดีที่ใช้จับกับสารวิเคราะห์จับได้จำนวนมากขึ้นเช่นกัน แต่ในทางตรงกันข้ามความเร็วในการไหลของ Colloidal gold กับสารวิเคราะห์จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก (น้อยกว่า 40 nm) จึงทำให้เพิ่มช่วงระยะเวลาในการอ่านผลที่นานขึ้น อีกทั้งอาจเกิดสารเชิงซ้อนที่มีขนาดใหญ่และอุดตันภายในรูของแผ่นเมมเบรนได้ (144-147) ในขณะที่ Colloidal gold ที่มีขนาดเล็ก จะมีความเสถียรของสีที่เกิดขึ้นค่อนข้างน้อย (144, 145)

แอนติบอดีสำหรับตรวจจับสารวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ คือ Polyclonal anti-FITC ที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับทั้งโมเลกุลของ FITC หรือ FAM ถูกเคลือบไว้ที่ตำแหน่ง Test line และแอนติบอดีสำหรับตรวจจับสารเชิงซ้อนที่มีอนุภาคของสี คือ Polyclonal anti-IgG ซึ่งรอจับกับโมเลกุลของ IgG Antibody ถูกเคลือบไว้ที่ตำแหน่ง Control line ในขณะที่ใช้ Monoclonal anti-biotin เพื่อจับกับ Colloidal gold ณ ตำแหน่ง Conjugated pad การพัฒนาแถบตรวจในศึกษาที่ผ่านมาใช้แอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนแถบตรวจหลายชนิด เช่น แอนติบอดีที่ใช้ตำแหน่ง Conjugated pad นิยมใช้แอนติบอดีชนิด Monoclonal antibody เนื่องจากมีความจำเพาะสูงต่อแอนติเจนหรือสารวิเคราะห์ จึงมีโอกาสน้อยที่จะจับกับ Anti-conjugate colloidal gold ที่มี Epitope หลายชนิดอยู่ด้วยกัน ในขณะที่บนตำแหน่ง Test line และ Control line นิยมใช้แอนติบอดีชนิด Polyclonal antibody เนื่องจากเพิ่มความไวในการจับกับสารวิเคราะห์ เพราะมี Epitope หลายชนิดที่จับกับสารวิเคราะห์ได้ ซึ่งเหมาะสมกับสารวิเคราะห์ที่มีปริมาณน้อยหรือตรวจจับได้ยาก (148) นอกจากนี้

Polyclonal antibody ยังมีราคาถูกทำให้ช่วยลดต้นทุนการผลิตในเชิงพาณิชย์ ในขณะที่ยังมีประสิทธิภาพของการตรวจวัดอยู่ในระดับที่ดีถึงดีมากในหลายการศึกษา (148, 149)

การศึกษาค้นคว้านี้ได้พัฒนาแถบตรวจสำหรับตรวจสอบผลผลิต M-RPA ที่เป็นสารพันธุกรรม ซึ่งไม่สามารถถูกแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนแถบตรวจจับได้โดยตรง จึงต้องทำการติดฉลากให้กับผลผลิต M-RPA ทางอ้อม ผ่านขั้นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย Forward primer ที่มีโมเลกุลของ -FAM ติดไว้ที่ด้านปลาย 5' และ Reverse primer ที่มีโมเลกุลของ -Biotin ติดไว้ที่ด้านปลาย 5' ทำให้ผลผลิต M-RPA มีทั้ง FAM และ Biotin จับอยู่ และถูกจับด้วย Colloidal gold anti-biotin ทำให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีอนุภาคของสีที่สามารถไปจับกับ Anti-FITC ที่ตำแหน่ง Test line และมองเห็นแถบสีแดงทับทิมที่ตำแหน่งดังกล่าวได้ การติดฉลากของผลผลิตสารพันธุกรรมนิยมใช้สารประเภทต่าง ๆ เช่น สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น Biotin, Digoxigenin (DIG) และ Dinitrophenyl (DNP) รวมไปถึงโมเลกุลของสีฟลูออเรสเซนต์ เช่น FITC, FAM, Cy5 และ Alexafluor488 (21, 35, 113) โดยมีสีฟลูออเรสเซนต์ FITC/FAM เป็นโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้ในการพัฒนาแถบตรวจที่อาศัยหลักการของ NALF นอกจากนี้ยังได้มีการนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้หรือโพรบอย่างกว้างขวาง โดยสีฟลูออเรสเซนต์ FITC/FAM สามารถเชื่อมต่อกับ Nucleoside triphosphate ที่อยู่บนสายคู่หรือสายเดี่ยวของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ดี (150) จึงมักถูกนำมาใช้ติดฉลากบน Oligonucleotides ทำให้มีความคงตัว มีการส่งสัญญาณที่ดี และมีความไวสูง (151) อีกทั้งการติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ FITC/FAM บนโพรเมอร์ และแอนติบอดี มีจำหน่ายทั่วไปอย่างแพร่หลายและมีราคาถูกกว่าโมเลกุลของสีฟลูออเรสเซนต์ชนิดอื่น (152, 153)

ในระยะแรกของการพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip เพื่อตรวจสอบผลผลิต M-RPA ได้มีการนำสารละลายต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของน้ำยาในปฏิกิริยา RPA มาทำการทดสอบปฏิกิริยาข้ามเพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบในน้ำยาสามารถจับกับแอนติบอดีทั้ง Anti-FITC และ Anti-IgG บนแถบตรวจได้หรือไม่ หากจับได้แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยาข้ามซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่พึงประสงค์เนื่องจากอาจส่งผลบวกปลอมได้ จากการศึกษาพบว่า MgOAc ที่ผสมอยู่ในปฏิกิริยาสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ Anti-FITC ทำให้เกิดผลบวกปลอมที่ตำแหน่ง Test line ได้ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจาก MgOAc ภายในปฏิกิริยาที่ทดสอบไม่เกิดการจับหรือกระตุ้นให้เอนไซม์ภายในปฏิกิริยาทำงาน เนื่องจากไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบเติมลงในปฏิกิริยาทดสอบ ทำให้ MgOAc เป็นอิสระ จึงอาจไปจับหรือกระตุ้น Mouse anti-biotin gold conjugate ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขณะที่สารละลายทดสอบไหลผ่าน

ตำแหน่ง Conjugated pad แล้วส่งผลให้เกิดการจับแบบไม่จำเพาะกับ Goat anti-FITC ที่อยู่ตำแหน่ง Test line และทำให้เห็นปฏิกิริยาข้ามระหว่างองค์ประกอบของน้ำยาปฏิกิริยา RPA และ Anti-FITC (154) นอกจากนี้ MgOAc อาจส่งผลให้สารละลายมีค่า pH ที่ไม่เหมาะสม ซึ่งส่งผลต่อ Binding affinity ระหว่างแอนติบอดี-แอนติเจนได้ เนื่องจากการจับกันระหว่างแอนติบอดี-แอนติเจน เกิดขึ้นได้ดีในสภาวะค่า pH ระหว่าง 6.0 – 8.0 หากสารละลายมีค่า pH ที่รุนแรง คือ ต่ำกว่า 5.0 หรือสูงกว่า 9.5 แอนติบอดีอาจได้รับผลกระทบและทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป รวมไปถึงค่า Salt stringency หรือ Ion stringency ที่เปลี่ยนไปภายหลังมีการผสม MgOAc ลงในสารละลาย ซึ่งอาจส่งผลต่อ Binding affinity ระหว่างแอนติบอดี-แอนติเจนได้เช่นเดียวกัน (155, 156) ทั้งนี้ชนิดของแอนติบอดีที่ถูกเคลือบที่ตำแหน่ง Test line เป็น Polyclonal anti-FITC ซึ่งนิยมใช้กับตำแหน่ง Test line ของแถบตรวจ LFA ทั่วไป เนื่องจากมี Affinity สูง และสามารถจับกับแอนติเจนได้หลาย Epitope ช่วยเพิ่มโอกาสในการจับสารวิเคราะห์ที่ไหลผ่าน และเพิ่มความไวในการตรวจสอบเมื่อเทียบกับชนิด Monoclonal antibody ดังที่อธิบายข้างต้น (148) อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิต Polyclonal antibody ไม่สามารถควบคุมชนิด Epitope อีกทั้งบนโมเลกุลของแอนติบอดีมีชนิดของ Epitope ที่หลากหลาย ทำให้มีโอกาสเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่น ๆ นอกจากสารวิเคราะห์ที่ต้องการตรวจจับ (148, 149) ดังนั้นเพื่อเป็นการลดโอกาสการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่าง MgOAc และ Polyclonal anti-FITC ที่ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจ MTB Strip จึงได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของแถบตรวจที่สามารถตรวจสอบผลผลิต M-RPA และพบว่าการใช้ความเข้มข้นของ Anti-FITC ที่ตำแหน่ง Test line และ Anti-IgG ที่ตำแหน่ง Control line เท่ากับ 0.4 mg/ml ใช้ Anti-biotin gold conjugate เท่ากับ OD4 ที่ Conjugated pad ร่วมกับอัตราส่วนเจือจางระหว่างผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS เท่ากับ 1:10 ในปริมาตรรวม 150 μ l และใช้ระยะจุ่มแถบตรวจในการอ่านผล 15 นาที ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างสารที่เป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยา M-RPA ทำให้สามารถอ่านผลได้ถูกต้องทั้งในตัวอย่างบวกและลบ โดยไม่เกิดผลบวกหรือผลลบปลอมทั้งตำแหน่ง Control line และ Test line จึงได้นำสภาวะดังกล่าวเข้าสู่กระบวนการผลิตด้วยเครื่องจักรอุตสาหกรรม เพื่อผลิตแถบตรวจที่พร้อมใช้งานและคุณภาพเท่ากันทุกอัน และถูกบรรจุอยู่ในซองที่บับแสงที่มีสารดูดความชื้นอยู่ภายใน

ในการพัฒนาแถบตรวจ MTB Strip ได้มีการทดสอบหาความเข้มข้นดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบ ผลผลิตจากปฏิกิริยา M-RPA ได้ หรือ Limit of detection (LOD) และพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.1 ng/ μ l ซึ่งสูงกว่าการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ที่มีค่า

เท่ากับ 0.01 ng/ μ l ทั้งนี้อาจเกิดจากวิธี Agarose gel electrophoresis ที่ใช้ในการศึกษานี้ ใช้สีย้อมสารพันธุกรรมด้วย Ultrapower DNA/RNA safe dye ซึ่งสามารถตรวจสอบผลผลิตที่มีปริมาณน้อยได้ถึง 20 pg (157) อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Kamphoe และคณะ ที่ใช้ปฏิกิริยา PCR ร่วมกับ Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay ตรวจหายีน *rpoB* และ *katG* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยาของวัณโรค พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 0.1 ng (158) ซึ่งเท่ากับ LOD ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา M-RPA ที่ถูกพัฒนาขึ้น สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับปฏิกิริยา PCR ส่งผลให้สามารถตรวจสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดได้ผลไม่แตกต่างกันเมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค NALF การศึกษาของ Jiang และคณะ ได้พัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในหอยนางรมดิบด้วย IMS (Immunomagnetic separation)-RPA-LF โดยทำปฏิกิริยา RPA ด้วยน้ำยา TwistAmp nfo kit และใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบ เท่ากับ 0.48 μ M ภายใต้สภาวะ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วย LF (HybriDetect LF strip) นาน 5 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 0.01 ng ซึ่งต่ำกว่าค่า LOD ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ 10 เท่า ดังนั้นจะเห็นว่าเมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วยความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ที่สูง อาจส่งผลให้ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ระดับความเข้มข้นต่ำลงได้มากขึ้น (39) จึงควรมีการศึกษาทดลองใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ในปฏิกิริยา M-RPA ที่สูงขึ้น เพื่อปรับปรุงค่า LOD ของแถบตรวจ MTB Strip ในอนาคต

ปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip มีความจำเพาะสูงในการวินิจฉัย MTBC โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียที่มักพบการก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ และเชื้อในกลุ่ม NTM ที่ทำมาทดสอบ อย่างไรก็ตามพบว่าปฏิกิริยา M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ *M. bovis* ได้ ซึ่งเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม MTBC เช่นเดียวกับ *M. tuberculosis* (7) เชื้อ *M. bovis* เป็นสาเหตุของวัณโรคที่พบในวัว แต่อาจก่อให้เกิดวัณโรคในคนได้ซึ่งพบอุบัติการณ์ต่ำเพียง 1.4% จากจำนวน 10 ล้านประชากรของผู้ป่วยวัณโรคทั่วโลก (159, 160) และมักเกิดวัณโรคชนิดนอกปอด ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *M. bovis* มีอาการ การดำเนินของโรค และพยาธิสภาพคล้ายกับการติดเชื้อ *M. tuberculosis* ในขณะที่การรักษาการติดเชื้อ *M. bovis* ใช้เพียงยา Rifampicin ยา Isoniazid และยา Ethambutol เนื่องจากเชื้อ *M. bovis* ตื้อต่อยา Pyrazinamide โดยกำเนิด (161) เชื้อ *M. bovis* มีลำดับเบส โครงสร้าง และกระบวนการเมตาบอลิซึมที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *M. tuberculosis* (162) การจำแนกเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกันจำเป็นต้องอาศัยคุณสมบัติทางจุลชีววิทยา เช่น การอัตรา

เจริญเติบโต ลักษณะทางพีโนไทป์ และปฏิกิริยาทางชีวเคมี (163) หรืออาศัยการจำแนกด้วยการหาลำดับเบสของยีนต่าง ๆ เช่น *pncA gyrB oxyR katG* และ *hupB* (164-167) อย่างไรก็ตาม IS1081 และ IS6110 ต่างเป็น IS ที่มีบริเวณอนุรักษ์สูงและพบได้ในเชื้อทุกสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม MTBC (27, 71) จึงสามารถตรวจพบได้ในเชื้อ *M. bovis* จากการศึกษาครั้งนี้ การทดสอบวินิจฉัยวัณโรคที่ใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน ทั้งที่อาศัยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะ เช่น MPT64 Ag (168) หรือการตรวจหาสารพันธุกรรมที่จำเพาะ เช่น IS1081 และ IS6110 ในการทดสอบด้วย Xpert® MTB/RIF Ultra และ LAMP (74, 78) ต่างวินิจฉัยจำแนกเชื้อเป็นกลุ่ม MTBC เท่านั้น และไม่มีการจำแนกเชื้อถึงระดับสายพันธุ์แต่อย่างใด

ระยะเวลาความคงตัวของผลที่ปรากฏอยู่บนแถบตรวจ MTB Strip ได้ถูกทำการศึกษา เพื่อเป็นข้อมูลว่าหากใช้แถบตรวจ MTB Strip ตรวจวัดผลผลิตจากปฏิกิริยา M-RPA ที่เกิดขึ้น ผลดังกล่าวจะยังคงปรากฏอยู่นานเท่าใด ซึ่งอาจมีประโยชน์ในกรณีต้องการทวนสอบผลย้อนหลัง และจากการศึกษาพบว่าผลที่ปรากฏอยู่ทั้งในตำแหน่ง Control line และ Test line บนแถบตรวจ MTB Strip มีความคงตัวสูง สามารถอ่านผลได้ตามปกติโดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลา 3 เดือน หลังจากทำการทดสอบ ความคงตัวของสีแดงบนแถบตรวจเกิดจากสีของอนุภาค Colloidal gold หรือ Gold nanoparticle ที่เชื่อมต่อกับ Anti-biotin โดย Colloidal gold มีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงได้อย่างดีมาก จึงมีความเสถียรสูงส่งผลให้การปล่อยแสงออกมาได้ดีและคงทนได้นาน (169) อีกทั้ง Colloidal gold มีความเสถียรสูงมากทั้งในรูปแบบของเหลวและแบบที่แห้งแล้ว (111) อย่างไรก็ตามหากต้องการทราบความคงตัวของผลในระยะยาวกว่านี้ ควรทำการทดสอบเพิ่มเติมในอนาคต

คุณภาพของแถบตรวจยังขึ้นอยู่กับอายุการเก็บรักษา แถบตรวจสำเร็จรูปที่อาศัยหลักการ LFA ส่วนใหญ่มีอายุการเก็บรักษา 1-2 ปี ที่อุณหภูมิห้อง (142) แถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้มีอายุการเก็บรักษาได้สูงสุด 6 เดือน โดยหากเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะสามารถมองเห็นความเข้มของแถบสีได้ชัดเจนกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง Bever และคณะ ได้พัฒนา Lateral flow immunoassay (LFIA) ตรวจหา Lethal amatoxins ในเห็ด ภายหลังจากทดสอบอายุการเก็บรักษาของแถบตรวจ พบว่าสามารถเก็บได้ถึง 1 – 1.5 ปี (170) ปัจจัยที่ส่งผลต่ออายุการเก็บรักษาแถบตรวจในการศึกษาครั้งนี้ อาจมาจากการละลายสารละลายหลายครั้ง (Multiple-freeze thaw cycle) ในขั้นตอนการขนส่งสารไปยังโรงงานผลิตและในระหว่าง

กระบวนการผลิต ซึ่งมีส่วนให้ประสิทธิภาพของ Anti-FITC เสื่อมลง หรือส่งสัญญาณอ่อนลงได้ (171, 172) จึงไม่สามารถจับกับผลผลิตได้ดีดังเดิม นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการผลิต LFA ในส่วนของ Conjugated pad มีบทบาทหลักในการจับอนุภาคของตัวตรวจจับหรืออนุภาคที่ทำให้เกิดสีและคงสภาพการทำงานไว้จนกว่าจะทำการทดสอบ (111, 170) โดยประสิทธิภาพของ Conjugated pad อาจขึ้นอยู่กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยซูโครสหรือสารลดแรงตึงผิว และกระบวนการทำให้แถบตรวจแห้งหลังจากการพันแอนติบอดี (111, 149, 170) สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีน้ำตาลจะช่วยให้โครงสร้างของอนุภาคของตัวตรวจจับเสถียรในสถานะที่แห้ง และกลับมาละลายอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ Conjugated pad มีของเหลวไหลผ่าน (111, 170) ในขณะที่กระบวนการทำให้แห้งที่เหมาะสมควรอยู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง ที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์น้อยกว่า 15% (141, 169) ดังนั้นเพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพของแถบตรวจในอนาคต จึงควรมีการควบคุมกระบวนการผลิตดังที่อธิบายข้างต้นอย่างเคร่งครัด การเก็บรักษาแถบตรวจทั่วไปควรอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 18 – 25 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์ที่น้อยกว่า 20% (149, 173) แม้ว่าแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้นถูกบรรจุภายในซองอลูมิเนียมทึบแสงที่มีสารดูดความชื้นอยู่ภายใน ซึ่งช่วยลดความชื้นได้เพียง 35-40% แต่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ย 30 องศาเซลเซียสขึ้นไป และมีความชื้นสัมพัทธ์ ณ ช่วงเวลานั้น เท่ากับ 69 – 73% (174) จึงทำให้แถบตรวจเสื่อมสภาพลงได้อย่างรวดเร็ว การศึกษาก่อนหน้าของ Hu และคณะ ได้ทดสอบความเสถียรของแถบตรวจ Colloidal gold immunochromatographic strip ที่พัฒนาขึ้น สำหรับตรวจหาเชื้อ Subgroup A avian leukosis virus (ALV-A) โดยแถบตรวจถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 25 และ 37 องศาเซลเซียส และพบว่าแถบตรวจมีความเสถียรสามารถนำมาทดสอบได้แม้มีอายุการเก็บรักษาเท่ากับ 180 60 และ 15 วัน ตามลำดับ (175) ดังนั้นแถบตรวจ Colloidal gold ที่ถูกจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงมีความเสถียรที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ และอาจมีสาเหตุมาจากการลดความสามารถในการจับของแอนติบอดีลงได้ (176)

การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของเทคนิค M-RPA ที่ใช้ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ในการวินิจฉัยวัณโรค ทดสอบโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ MTBC และ NTM พบว่าการวินิจฉัยมีประสิทธิภาพสูง โดยสามารถวินิจฉัยดีเอ็นเอของ MTBC ได้ผลบวกถูกต้องทุกตัวอย่าง (100%) ในขณะที่เมื่อวินิจฉัยดีเอ็นเอของเชื้อ NTM ให้ผลเป็นลบถูกต้องทุกตัวอย่าง (100%) ซึ่งสอดคล้องกับผลวินิจฉัยยืนยันเชื้อ MTBC ที่ได้จากชุดตรวจแอนติเจน MPT 64 และเชื้อ NTM ที่ได้จากเทคนิค

Sanger DNA Sequencing ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip มีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยเชื้อ MTBC สูง ในขณะที่การศึกษาของ Singpanomchai และคณะ ซึ่งได้ทำปฏิกิริยา RPA แบบ Singleplex ตรวจหา IS1081 และ IS6110 ของเชื้อ MTBC และตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าภายหลังเติมสี SYBR® Green I พบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 99.32% และ 100.00% ตามลำดับ ในการตรวจหา IS1081 ขณะที่มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 97.95% และ 100.00% ตามลำดับ ในการตรวจหา IS6110 (23) เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip อาศัยการทำปฏิกิริยาด้วยวิธี M-RPA ที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ IS1081 หรือ IS6110 ร่วมกันในหลอดปฏิกิริยา และผลผลิตถูกติดฉลากที่เหมือนกัน ทำให้ผลผลิตจับบนแถบตรวจที่ตำแหน่งเดียวกัน ในที่นี้คือตำแหน่ง Test line ซึ่งอาจช่วยเพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อ MTBC มากยิ่งขึ้น เนื่องจากภายในจีโนมของเชื้อกลุ่ม MTBC สามารถพบ IS1081 เพียง 5 – 8 copies (27, 32) ขณะที่ IS6110 พบเฉลี่ย 10 - 16 copies (177) และในขณะที่บางสายพันธุ์อาจพบได้เพียง 1 copy หรือไม่พบ IS6110 (70, 71) ดังนั้นหากเชื้อ MTBC บางสายพันธุ์มีเพียง IS1081 ชนิดเดียว จึงยังสามารถให้ผลบวกได้เมื่อถูกตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค M-RPA ที่ใช้ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ในขณะที่หากเป็นการวินิจฉัยโดยแยกปฏิกิริยา RPA ต่อ IS แต่ละชนิด จะไม่สามารถตรวจพบผลบวกจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS6110 หรือในบางกรณีอาจไม่พบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 ได้เนื่องจากมีจำนวน Copy ที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งสามารถให้ผลลบปลอมในการทดสอบ และอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ความไวในการตรวจหาเชื้อด้วยปฏิกิริยา Single-RPA ลดลง

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา มีการศึกษาพัฒนาชุดตรวจเพื่อวินิจฉัยวัณโรคที่อาศัยหลักการทางอณูชีววิทยาจำนวนมาก ซึ่งจำเป็นต้องทดสอบประเมินประสิทธิภาพกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง เนื่องจากดีเอ็นเอดังกล่าวอาจมีการปนเปื้อนดีเอ็นเอจากแหล่งอื่น เช่น ดีเอ็นเอจากเชื้อประจำถิ่น หรือดีเอ็นเอจากร่างกายผู้ป่วย และสารชีวโมเลกุลบางอย่างในสิ่งส่งตรวจที่อาจส่งผลขัดขวางหรือรบกวนปฏิกิริยาได้ (125) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 และ IS6110 ด้วยปฏิกิริยา M-RPA ที่ใช้กับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมอ ร่วมกับการปรับขั้นตอนการตรวจสอบผลผลิตด้วยแถบตรวจ MTB Strip ให้เหมาะสมกับประเภทของดีเอ็นเอที่มาจากสิ่งส่งตรวจ ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกับสภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนีย์ ทั้งในส่วนที่ดีเอ็นเอตั้งต้นที่ไม่สามารถกำหนดเป็นความเข้มข้นได้ในดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจ แต่กำหนดเป็นปริมาตรที่เหมาะสมแทน (ในที่นี้เท่ากับ 5

μl) ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา M-RPA กับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจ ใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า โดย ไพรเมอร์ IS1081 และ IS6110 ใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.24 และ 0.12 μM ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่ IS1081 มีจำนวน Copy ภายในจีโนมน้อยกว่า IS6110 (27, 32) ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ IS1081 เกิดได้ช้าและมีปริมาณผลผลิตที่น้อยกว่า จึงจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์เพื่อให้ได้ปริมาณของผลผลิตทั้งสอง IS ใกล้เคียงกัน ระยะเวลาการบ่มของปฏิกิริยา M-RPA กับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจใช้เวลา 25 นาที ซึ่งนานกว่าการทำปฏิกิริยาที่ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากโคลนีย์ ทั้งนี้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (24, 85) ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจเสมออาจมีการปนเปื้อนดีเอ็นเอจากแหล่งอื่นรวมด้วย ทำให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายลดลง จึงใช้ระยะเวลามากกว่าในการทำปฏิกิริยา และสุดท้ายอัตราส่วนเจือจางระหว่างผลผลิต M-RPA ที่เกิดจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจกับสารละลาย PBS ใช้เพียง 1:3 ซึ่งทำให้ผลผลิตยังคงมีความเข้มข้นสูงในสารละลาย PBS และช่วยเพิ่มโอกาสในการตรวจพบผลผลิตบนแถบตรวจ MTB Strip ในกรณีที่มีดีเอ็นเอของเชื้อ MTBC ปริมาณน้อย อย่างไรก็ตามปฏิกิริยา M-RPA ที่เกิดขึ้นจากดีเอ็นเอทั้งที่สกัดได้จากโคลนีย์และสิ่งส่งตรวจ สามารถเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเท่ากัน

เมื่อนำเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ทำการวินิจฉัยวัณโรคจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมอจำนวน 131 ตัวอย่าง พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบอยู่ในเกณฑ์ดีมาก โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip มีความไวเท่ากับ 96.77% ค่าจำเพาะเท่ากับ 72.46% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 75.95% ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 96.15% และมีความสอดคล้องกันของสองเทคนิคอยู่ในเกณฑ์ดี (K เท่ากับ 0.683) ทั้งนี้พบว่าการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ไม่สามารถตรวจสอบพบผลผลิต M-RPA ได้จำนวน 14 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกเมื่อยืนยันด้วยเทคนิค Real-time PCR ทั้งนี้อาจเกิดจากขั้นตอนก่อนการทดสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ต้องนำผลผลิต M-RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา จึงอาจส่งผลให้สูญเสียปริมาณผลผลิตไปบางส่วนหรือได้ปริมาณน้อยลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

เมื่อเปรียบเทียบกับ การย้อมสีทึบกรด พบว่าเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip มีความไวเท่ากับ 91.03% ความจำเพาะเท่ากับ 84.91% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 89.87% ค่าทำนาย

ผลลบเท่ากับ 86.54% และมีความสอดคล้องกันของสองเทคนิคอยู่ในเกณฑ์ดี (K เท่ากับ 0.762) เป็นที่น่าสังเกตว่ามีตัวอย่างจำนวน 7 จาก 78 ตัวอย่าง ที่ย้อมติดสีทึบกรด แต่ให้ผลลบเมื่อทดสอบกับเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ซึ่งอาจเกิดจากเทคนิคการย้อมสีทึบกรดสามารถย้อมติดสีเชื้อในกลุ่ม *Mycobacteria* ทุกสายพันธุ์ ทั้งเชื้อ MTBC และเชื้อ NTM หรือเชื้อ *Mycobacteria* ทั้งที่ยังมีชีวิตและตายแล้วได้ จึงให้ผลเป็นบวกแบบไม่จำเพาะ (58, 178) ในขณะที่มีตัวอย่าง 8 จาก 53 ตัวอย่าง ที่ย้อมไม่ติดสีทึบกรด แต่ให้ผลบวกกับเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ทั้งนี้เป็นเพราะการย้อมสีทึบกรดเป็นเทคนิคที่มีความไวค่อนข้างต่ำ กล่าวคือต้องมีแบคทีเรียติดสีทึบกรดจำนวนมากกว่า 5,000 CFU/ml (61) ในสิ่งส่งตรวจ จึงจะพบการย้อมติดสีทึบกรดเป็นบวก เช่นในการศึกษาครั้งนี้ ตัวอย่างจำนวน 8 ตัวอย่างแม้จะให้ผลเป็นลบในการย้อมสีทึบกรด แต่ทั้ง 8 ตัวอย่างสามารถตรวจพบเชื้อ MTBC ได้เมื่อใช้เทคนิค Real-time PCR ซึ่งมีความไวสูงกว่า ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงส่งผลต่อความไวกับความจำเพาะของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้นเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการย้อมสีทึบกรด สอดคล้องกับการศึกษาของ Boyle และคณะ ที่พัฒนาวิธีการวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจด้วยเทคนิค Real-time RPA โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ IS1081 และ IS6110 และใช้ Exo probe ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเสมหะและน้ำล้างปอด เมื่อทำการเปรียบเทียบกับผลการย้อมสีทึบกรดพบว่า Real-time RPA มีความไวและความจำเพาะในการตรวจหา IS1081 เท่ากับ 86.10% และ 88.60% ตามลำดับ สำหรับตรวจหา IS6110 มีความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 70.80% และ 88.00% ตามลำดับ (31) ความไวของเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip แปรผันตรงกับระดับของผลการย้อมสีทึบกรดที่เป็นบวก โดยที่ระดับ 3+ พบความไวมากที่สุดเท่ากับ 95.00% รองลงมาคือที่ระดับ 2+ 1+ และ Scanty พบความไวเท่ากับ 93.75% 93.55% และ 72.73% ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากปริมาณของแบคทีเรียติดสีทึบกรดที่แตกต่างกันในสิ่งส่งตรวจ ส่งผลให้มีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นของปฏิกิริยา M-RPA ที่แตกต่างกันและมีผลต่อความไวในการตรวจวิเคราะห์

เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Real-time PCR พบว่าเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip มีความไวเท่ากับ 100.0% ความจำเพาะเท่ากับ 94.55% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 96.20% ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100.00% และมีความสอดคล้องกันของสองเทคนิคอยู่ในเกณฑ์ดีมาก (K เท่ากับ 0.953) ค่าความไวและความจำเพาะที่เกิดขึ้น ใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Ma และคณะ ที่พัฒนาเทคนิค RPA ร่วมกับ Lateral Flow (LF-RPA) ในการตรวจหาเชื้อ MTBC ด้วย IS1081 ภายใต

สถานะที่ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์เท่ากับ $0.48 \mu\text{M}$ บ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดย Reverse primer ติดฉลากที่ด้านปลาย 5' ด้วยโมเลกุล Biotin และ Nfo probe ติดฉลากที่ด้านปลาย 5' ด้วยโมเลกุล FITC และตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วย LF พบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100.00% และ 97.98% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (98) เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่าง 3 ตัวอย่างให้ผลบวกปลอม กล่าวคือถูกตรวจพบว่าเป็นเชื้อ MTBC เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip แต่ตรวจไม่พบว่าเป็นเชื้อ MTBC ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดย 1 ใน 3 ตัวอย่างนี้ถูกตรวจพบว่าเป็นเชื้อ NTM และ 2 ใน 3 ตัวอย่างนี้ตรวจไม่พบว่าเป็นทั้งเชื้อ MTBC และ NTM ด้วยเทคนิค Real-time PCR

กรณีของดีเอ็นเอ 1 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมกับเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ซึ่งมีผลตรวจพบว่าเป็นเชื้อ NTM จากเทคนิค Real-time PCR อาจเกิดจากปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบไม่จำเพาะในดีเอ็นเอตัวอย่าง หรือเกิดจากการจับของผลผลิตที่ไม่จำเพาะบริเวณ Test line รวมไปถึงอาจเกิดจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอของเชื้อ MTBC ระหว่างกระบวนการทำปฏิกิริยา M-RPA ในขณะที่กรณีของดีเอ็นเอ 2 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมกับเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ซึ่งมีผลตรวจเป็นลบกับทั้งเชื้อ MTBC และ NTM จากเทคนิค Real-time PCR อาจเกิดจากชุดน้ำยา Anyplex™ MTB/NTM real time detection อาศัยการตรวจหา IS6110 และ *mbp64* สำหรับตรวจเชื้อ MTBC และยีน 16S rRNA สำหรับตรวจเชื้อ NTM (130) โดยยีน *mbp64* มีค่าความไวและความจำเพาะต่ำกว่า IS6110 (179) และ IS6110 อาจถูกพบเพียง 1 copy หรือตรวจไม่พบ IS6110 ในเชื้อ MTBC บางสายพันธุ์ (70, 71) ด้วยเหตุผลข้างต้นอาจส่งผลให้ทั้ง IS6110 และ *mbp64* ตรวจไม่พบในดีเอ็นเอของเชื้อ MTBC ในทั้ง 2 ตัวอย่าง ในขณะที่เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip อาศัยการตรวจหาทั้ง IS1081 และ IS6110 โดยที่ IS1081 มีความไวและความจำเพาะสูงกว่า IS6110 (23, 27, 180) จึงทำให้เกิดผลบวกของการวินิจฉัย อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยนี้ไม่ได้ทำการเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐาน ดังนั้นควรมีการทดสอบเพิ่มเติมในการวินิจฉัยวัณโรคโดยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip และเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลยืนยันประสิทธิภาพของเทคนิคที่พัฒนาที่มีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

กระบวนการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีความสำคัญ และส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม การศึกษานำร่องของการศึกษาครั้งนี้ ได้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเสมหะโดยการต้มร่วมกับ Lysis buffer พบว่าได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำ มีผลให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตัวอย่างที่มีเชื้อจำนวนน้อย เช่น กลุ่มตัวอย่างที่มีผลการย้อมสีทึบกรดเป็นระดับ Scanty หรือ 1+ ได้ผลเป็นลบ จึงได้เปลี่ยนกระบวนการสกัดดีเอ็นเอเป็นการใช้เครื่องสกัดอัตโนมัติ และได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นและคุณภาพสูงขึ้น ส่งผลให้ปฏิกิริยา M-RPA มีประสิทธิภาพที่ดีตามมา อย่างไรก็ตามการใช้เครื่องสกัดอัตโนมัติยังคงจำกัดอยู่ในโรงพยาบาลขนาดใหญ่และมีน้ำยาที่ราคาแพง ดังนั้นหากต้องการพัฒนาเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ให้สามารถนำไปใช้งานได้จริง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรงพยาบาลขนาดเล็กที่มีข้อจำกัดทางด้านเครื่องมือห้องปฏิบัติการ ควรมีการพัฒนาชุดสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเครื่องสกัดอัตโนมัติ อีกทั้งควรมีขั้นตอนการสกัดไม่ซับซ้อน ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะ และราคาไม่แพง เพื่อนำไปใช้งานควบคู่กับเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ในอนาคต

แถบตรวจ MTB Strip ที่ถูกพัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้และใช้ร่วมกับปฏิกิริยา M-RPA สำหรับการวินิจฉัยวัณโรค พบว่ามีประสิทธิภาพดีในการวินิจฉัยเมื่อเปรียบเทียบกับทั้งการย้อมสีทึบกรดและเทคนิค Real-time PCR อีกทั้งใช้เวลาทดสอบที่สั้น ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน และอ่านผลได้ง่าย อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ยังพบข้อจำกัดบางประการของปฏิกิริยา M-RPA และแถบตรวจ MTB Strip เช่น การสกัดดีเอ็นเอที่ต้องใช้เครื่องสกัดอัตโนมัติ ตัวอย่างของสิ่งส่งตรวจที่นำมาทดสอบมีเฉพาะเสมหะ ค่า LOD ที่ค่อนข้างสูง อายุการเก็บรักษาของแถบตรวจที่ค่อนข้างสั้น ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาและพัฒนาเพิ่มเติมในอนาคต ทั้งในส่วนกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ การเลือกใช้สิ่งส่งตรวจที่มีความหลากหลายเพิ่มขึ้น การใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้นสูงขึ้นในปฏิกิริยา M-RPA เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิต และการควบคุมกระบวนการผลิตแถบตรวจโดยเฉพาะอย่างยิ่งการพันแอนติบอดีบนตำแหน่ง Conjugated pad และ Test line ที่ต้องมีการผสมสารละลายที่ช่วยรักษาสภาพแอนติบอดีให้คงทนและมีสภาพพร้อมใช้งานจนถึงวันทำการทดสอบ รวมไปถึงขั้นตอนหลังจากการพันแถบตรวจที่ต้องควบคุมอย่างเคร่งครัดตามที่ได้กล่าวไปข้างต้น

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ได้พัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTN Strip ซึ่งอาศัยหลักการทางอณูชีววิทยาในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา M-RPA ภายใต้อุณหภูมิเดียวครั้งที่ โดยใช้ไพรเมอร์ IS1081 และ IS6110 ที่จำเพาะสูงต่อเชื้อในกลุ่ม MTBC และถูกดัดแปลงให้ถูกติดฉลากด้านปลาย 5' Forward primer ด้วยโมเลกุล FAM และด้านปลาย 5' Reverse primer ด้วยโมเลกุล Biotin ทำให้ได้ผลผลิตขนาด 173 bp และ 250 bp ตามลำดับ ที่มีฉลากโมเลกุล FAM และ Biotin ติดอยู่เหมือนกันในทั้งสองผลผลิต เพื่อให้สามารถถูกตรวจสอบได้ด้วยแถบตรวจ MTB Strip ที่อาศัยหลักการของ NALF โดยใช้แผ่นเมมเบรนที่เป็น Nitrocellulose เคลือบด้วย Anti-Biotin gold conjugate ความเข้มข้น OD4 ที่ตำแหน่ง Conjugated pad ในขณะที่ตรง Anti-FITC ความเข้มข้น 0.4 mg/ml สำหรับการตรวจจับผลผลิตของ IS1081 และ IS6110 ที่ตำแหน่ง Test line และตรง Anti-IgG ความเข้มข้น 0.4 mg/ml ที่ตำแหน่ง Control line

เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTN Strip มีสถานะการทดสอบที่แตกต่างกันระหว่างการทดสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนีส่งตรวจและสิ่งส่งตรวจเสมหะ กล่าวคือ ในการทำปฏิกิริยา M-RPA กับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนีส่งตรวจ ใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 1 ng/ μ l ความเข้มข้นไพรเมอร์ของ IS1081 และ IS6110 เท่ากับ 0.12 และ 0.12 μ M ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที เจือจางผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ในอัตราส่วน 1:10 และอ่านผลด้วยตาเปล่าที่ 15 นาที ในขณะที่การทำปฏิกิริยา M-RPA กับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะ ใช้ดีเอ็นเอปริมาตร 5 μ l ความเข้มข้นไพรเมอร์ของ IS1081 และ IS6110 เท่ากับ 0.24 และ 0.12 μ M ตามลำดับ ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 25 นาที เจือจางผลผลิต M-RPA กับสารละลาย PBS ในอัตราส่วน 1:3 และอ่านผลด้วยตาเปล่าที่ 15 นาที เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTN Strip มีค่า LOD เท่ากับ 0.1 ng/ μ l และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินหายใจทั้ง 11 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้แถบตรวจ MTB Strip ยังมีความคงตัวของผลที่ได้ทดสอบนานมากกว่า 3 เดือน และมีอายุการเก็บรักษาได้นานถึง 6 เดือน

การวินิจฉัยเบื้องต้นกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ พบว่ามีประสิทธิภาพสูง สามารถวินิจฉัยจำแนกเชื้อ MTBC ได้ทั้งหมดทุกตัว และไม่เกิดผลบวกปลอมกับเชื้อ NTM อย่างไรก็ตามเมื่อนำเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTN Strip มาทดสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมอพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยวัณโรค โดยเมื่อเปรียบเทียบกับการย้อมสีทึบกรด มีความไว 91.03% ความจำเพาะ 84.91% ค่าทำนายผลบวก 89.87% ค่าทำนายผลลบ 86.54% และมีค่าความสอดคล้องกันอยู่ในเกณฑ์ดี ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Real-time PCR มีความไว 100.0% ความจำเพาะ 94.55% ค่าทำนายผลบวก 96.20% ค่าทำนายผลลบ 100.0% และมีความสอดคล้องกันอยู่ในเกณฑ์ดีมาก

เทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip ที่พัฒนาขึ้นเพื่อวินิจฉัยวัณโรค เป็นเทคนิคที่มีความไว ความจำเพาะสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเครื่องมือทำอุณหภูมิชนิดอื่นในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่จำเพาะและเครื่องแยกสารพันธุกรรมบนกระแสไฟฟ้า ทำให้มีต้นทุนในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคที่ต่ำกว่าเทคนิคอณูชีววิทยาอื่น ๆ และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลขนาดกลาง-ใหญ่ การทำปฏิกิริยาจนถึงขั้นตอนการอ่านผลใช้ระยะเวลาประมาณ 40 นาที และสามารถอ่านผลได้ทันทีด้วยตาเปล่า อีกทั้งแถบตรวจ MTB Strip สามารถเก็บรักษาไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสูง รวมไปถึงพื้นที่ที่อยู่ห่างไกลความเจริญ เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในโรงพยาบาลขนาดเล็ก แทนการใช้วิธีเบื้องต้นด้วยการย้อมสีทึบกรดที่มีความไวต่ำ ทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากสามารถเข้าถึงการวินิจฉัยวัณโรคได้อย่างครอบคลุมและง่ายขึ้น ส่งผลต่อการพิจารณาให้การรักษาที่เหมาะสมต่อไป อันจะช่วยลดจำนวนผู้ป่วยวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บรรณานุกรม

1. Organization WH. Global tuberculosis report 2018 Geneva2018 [Available from: http://www.who.in/tb/publication/global_report/en/].
2. กนกกร สุนทรขจิต. โรคติดเชื้ออวัยวะ (Opportunistic infections; วัณโรค (Tuberculosis). วารสารวงการแพทย์. 2558(432):1-8.
3. กรมควบคุมโรค. แนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย พ.ศ. 2561. กรุงเทพฯ, ประเทศไทย: สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
4. สำนักวัณโรค. เรียนรู้ เข้าใจ วัณโรค. นนทบุรี, ประเทศไทย: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2559.
5. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2561. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
6. Chang K, Lu W, Wang J, Zhang K, Jia S, Li F, et al. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis. *J Infect.* 2012;64(6):580-8.
7. Garcia-Elorriaga G, Rey-Pineda Gd. Clinical Diagnosis. Practical and Laboratory Diagnosis of Tuberculosis: Springer, Cham; 2015.
8. Mase SR, Ramsay A, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Cunningham J, et al. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11(5):485-95.
9. กรมควบคุมโรค. การคัดกรองเพื่อค้นหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยา. นนทบุรี, ประเทศไทย: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
10. กนกกร สุนทรขจิต. โรคติดเชื้ออวัยวะ (Opportunistic infections; วัณโรค (Tuberculosis). วารสารกรมการแพทย์. 2558(436):1-8.
11. กิตติมา บำรุงพัฒนาศิริ. Laboratory for TB diagnosis. วารสารกรมการแพทย์. 2561(3):15-8.
12. ฝ่ายมัธยมศึกษาที่เรียม, กลุ่มแบบที่เรียมวิทยาทางการแพทย์. วัณโรคและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2561 [24 พฤษภาคม 2563]. Available from: <http://nih.dmsc.moph.go.th/login/showimgdetail.php?id=882>.

13. McNerney R, Cunningham J, Hepple P, Zumla A. New tuberculosis diagnostics and rollout. *Int J Infect Dis.* 2015;32:81-6.
14. Steingart KR, Sohn H, Schiller I, Kloda LA, Boehme CC, Pai M, et al. Xpert(R) MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013(1):CD009593.
15. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol.* 2003;41(6):2616-22.
16. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63.
17. Pandey BD, Poudel A, Yoda T, Tamaru A, Oda N, Fukushima Y, et al. Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt 4):439-43.
18. Kaewphinit T, Arunrut N, Kiatpathomchai W, Santiwatanakul S, Jaratsing P, Chansiri K. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick in clinical samples. *Biomed Res Int.* 2013;2013:926230.
19. อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์. เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). วารสาร โลहितวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต.21(3):201-6.
20. Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Isothermal recombinase polymerase amplification assay applied to the detection of group B streptococci in vaginal/anal samples. *Clin Chem.* 2014;60(4):660-6.
21. Lobato IM, O'Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends in Analyt Chem.* 2018;98:19-35.
22. TwistDx. TwistAmp® DNA Amplification Kits Assay Design Manual Maidenhead, United Kingdom: TwistDx™Limited; 2018 [cited 2020 20 April]. Available from: <https://www.twistdx.co.uk/docs/default-source/RPA-assay-design/twistamp-assay-design-manual-v2-5.pdf?sfvrsn=29>.

23. Singpanomchai N, Akeda Y, Tomono K, Tamaru A, Santanirand P, Ratthawongjirakul P. Naked eye detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by recombinase polymerase amplification-SYBR green I assays. *J Clin Lab Anal.* 2019;33(2):e22655.
24. Lillis L, Siverson J, Lee A, Cantera J, Parker M, Piepenburg O, et al. Factors influencing Recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care. *Mol Cell Probes.* 2016;30(2):74-8.
25. Patel JB, Leonard DG, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I. Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):246-51.
26. Kurabachew M, Sandaa RA, Enger O, Bjorvatn B. Sequence analysis in the 23S rDNA region of *Mycobacterium tuberculosis* and related species. *J Microbiol Methods.* 2003;54(3):373-80.
27. Nghiem MN, Nguyen BV, Nguyen ST, Vo TT, Nong HV. A Simple, Single Triplex PCR of IS6110, IS1081, and 23S Ribosomal DNA Targets, Developed for Rapid Detection and Discrimination of *Mycobacterium* from Clinical Samples. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(5):745-52.
28. Lee H, Bang HE, Bai GH, Cho SN. Novel polymorphic region of the rpoB gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):2213-8.
29. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(3):725-74.
30. McEvoy CR, Falmer AA, Gey van Pittius NC, Victor TC, van Helden PD, Warren RM. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2007;87(5):393-404.
31. Boyle DS, McNerney R, Teng Low H, Leader BT, Perez-Osorio AC, Meyer JC, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* by recombinase polymerase amplification. *PLoS One.* 2014;9(8):e103091.
32. Collins DM, Stephens DM. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1991;67(1):11-5.

33. Huh YJ, Ahn DI, Kim SJ. Limited variation of DNA fingerprints (IS6110 and IS1081) in Korean strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis*. 1995;76(4):324-9.
34. Organization WH. Global tuberculosis report 2010 Geneva2010 [Available from: http://www.who.in/tb/publication/global_report/en/].
35. Bahadır EB, Sezgintürk MK. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *Trends Anal Chem*. 2016;82:286-306.
36. Han S, Zhou T, Yin B, He P. A sensitive and semi-quantitative method for determination of multi-drug residues in animal body fluids using multiplex dipstick immunoassay. *Anal Chim Acta*. 2016;927:64-71.
37. Hu J, Huang R, Sun Y, Wei X, Wang Y, Jiang C, et al. Sensitive and rapid visual detection of *Salmonella typhimurium* in milk based on recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks. *J Microbiol Methods*. 2019;158:25-32.
38. Lalremruata A, Nguyen TT, McCall MBB, Mombo-Ngoma G, Agnandji ST, Adegnikaa AA, et al. Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Assay for Ultrasensitive Detection of Low-Density *Plasmodium falciparum* Infection from Controlled Human Malaria Infection Studies and Naturally Acquired Infections. *J Clin Microbiol*. 2020;58(5).
39. Jiang W, Ren Y, Han X, Xue J, Shan T, Chen Z, et al. Recombinase polymerase amplification-lateral flow (RPA-LF) assay combined with immunomagnetic separation for rapid visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(12):2903-14.
40. Pfyffer GE, Palicova F. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures * In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, D W, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 472-502.
41. Faksri K, Reechaipichitkul W, Pimrin W, Bourpoern J, Prompinij S. Transmission and Risk Factors for Latent Tuberculosis Infections among Index Case-Matched Household Contacts. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2015;46(3):486-95.

42. Koch A, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 2018;26(6):555-6.
43. Todar K. *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* 2020. p. 1-4.
44. Todar K. *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. p. 1-4.
45. Velayati AA, Farnia P. Chapter 1-The Species Concept. In: Velayati AA, Farnia P, editors. *Atlas of Mycobacterium tuberculosis*. 1-16. 1st ed. Boston: Academic Press; 2016.
46. Aryal S. Cultural Characteristics of Mycobacterium tuberculosis 2019 [cited 2020 April 13]. Available from: <https://microbenotes.com/cultural-characteristics-of-mycobacterium-tuberculosis>.
47. Cole ST. Comparative mycobacterial genomics. *Curr Opin Microbiol.* 1998;1(5):567-71.
48. Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. TubercuList--10 years after. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011;91(1):1-7.
49. Lonnroth K, Jaramillo E, Williams BG, Dye C, Raviglione M. Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. *Soc Sci Med.* 2009;68(12):2240-6.
50. Stout JE, Engemann JJ, Hamilton CD. Tuberculosis transmission from a patient with skin lesions and a negative sputum smear. *N Engl J Med.* 2004;350(24):2527-8.
51. Loto OM, Awowole I. Tuberculosis in pregnancy: a review. *J Pregnancy.* 2012;2012:379271.
52. Pillay T, Sturm AW, Khan M, Adhikari M, Moodley J, Connolly C, et al. Vertical transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in KwaZulu Natal: impact of HIV-1 co-infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8(1):59-69.
53. Ottenhoff TH. The knowns and unknowns of the immunopathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16(11):1424-32.
54. เกียรติไชย ฟักศรี. วัณโรคและมัคโคแบคทีเรีย = Tuberculosis and mycobacteria. 1st ed. ขอนแก่น: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2560.

55. Nunes-Alves C, Booty MG, Carpenter SM, Jayaraman P, Rothchild AC, Behar SM. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(4):289-99.
56. Committee ATS. Core TB Laboratory Services for Public Health Laboratories. Maryland: APHL Association of public health laboratories; 2009.
57. Islam MR, Khatun R, Uddin MK, Khan MS, Rahman MT, Ahmed T, et al. Yield of two consecutive sputum specimens for the effective diagnosis of pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2013;8(7):e67678.
58. Van Deun A, Hossain MA, Gumusboga M, Rieder HL. Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12(1):108-10.
59. Fusillo MH, Burns HD. Simultaneous auramine and Kinyoun stain for screening smears for acid-fast bacilli. *Tech Bull Regist Med Technol*. 1968;38(4):103-4.
60. Wright PW, Wallace RJ, Jr., Wright NW, Brown BA, Griffith DE. Sensitivity of fluorochrome microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis* versus nontuberculous mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1998;36(4):1046-9.
61. พูนพิลาศ หงษ์มณี. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis. In: โจรนวุฒนนท์ ม, editor. พยาธิวิทยาคลินิก (Clinical Pathology). กรุงเทพฯ: ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล.
62. Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res*. 2004;120(4):418-28.
63. Choi Y, Hong SR, Jeon BY, Wang HY, Lee GS, Cho SN, et al. Conventional and real-time PCR targeting 16S ribosomal RNA for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2015;19(9):1102-8, i-ii.
64. Case RJ, Boucher Y, Dahllof I, Holmstrom C, Doolittle WF, Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(1):278-88.
65. Mertaniasih N., Wiqoyah N., Kusumaningrum D., Soedarsono S., Perwitasari A., Artama W. Specific *gyrB* Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolated from Sputum of Pulmonary tuberculosis Patients in Indonesia. *Bali Med J*. 2014;3(3):143-53.

66. Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49 Pt 3:1263-73.
67. Kasai H, Watanabe K, Gasteiger E, Bairoch A, Isono K, Yamamoto S, et al. Construction of the *gyrB* Database for the Identification and Classification of Bacteria. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform.* 1998;9:13-21.
68. Cegielski JP, Devlin BH, Morris AJ, Kitinya JN, Pulipaka UP, Lema LE, et al. Comparison of PCR, culture, and histopathology for diagnosis of tuberculous pericarditis. *J Clin Microbiol.* 1997;35(12):3254-7.
69. Kolk AH, Schuitema AR, Kuijper S, van Leeuwen J, Hermans PW, van Embden JD, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J Clin Microbiol.* 1992;30(10):2567-75.
70. Brosch R, Gordon SV, Pym A, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol.* 2000;290(2):143-52.
71. Fomukong NG, Tang TH, al-Maamary S, Ibrahim WA, Ramayah S, Yates M, et al. Insertion sequence typing of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization of a widespread subtype with a single copy of IS6110. *Tuber Lung Dis.* 1994;75(6):435-40.
72. Kabir S, Uddin MKM, Chisti MJ, Fannana T, Haque ME, Uddin MR, et al. Role of PCR method using IS6110 primer in detecting *Mycobacterium tuberculosis* among the clinically diagnosed childhood tuberculosis patients at an urban hospital in Dhaka, Bangladesh. *Int J Infect Dis.* 2018;68:108-14.
73. Organization WH. Xpert MTB/RIF implementation manual. Geneva2014.
74. Organization WH. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance. Geneva2016.
75. Cepheid. Xpert® MTB/RIF Ultra 2017 2017 [15 June 2020]. Available from: <https://www.cepheid.com/en/tests/Critical-Infectious-Diseases/Xpert-MTB-RIF-Ultra>.

76. Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(1):76-84.
77. Perez-Risco D, Rodriguez-Temporal D, Valledor-Sanchez I, Alcaide F. Evaluation of the Xpert MTB/RIF Ultra Assay for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Smear-Negative Extrapulmonary Samples. *J Clin Microbiol*. 2018;56(9).
78. Organization WH. Global tuberculosis report 2017 Geneva2017 [Available from: http://www.who.in/tb/publication/global_report/en/].
79. Zhang M, Xue M, He JQ. Diagnostic accuracy of the new Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis disease: A preliminary systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2020;90:35-45.
80. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*. 2008;3(5):877-82.
81. Eisenach K. Mycobacteriology Laboratory Manual. 1st ed: Global Laboratory Initiative; 2014.
82. Yadav R, Sharma N, Khaneja R, Agarwal P, Kanga A, Behera D, et al. Evaluation of the TB-LAMP assay for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in Northern India. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2017;21(10):1150-3.
83. Bojang AL, Mendy FS, Tientcheu LD, Otu J, Antonio M, Kampmann B, et al. Comparison of TB-LAMP, GeneXpert MTB/RIF and culture for diagnosis of pulmonary tuberculosis in The Gambia. *J Infect*. 2016;72(3):332-7.
84. Pham TH, Peter J, Mello FCQ, Parraga T, Lan NTN, Nabeta P, et al. Performance of the TB-LAMP diagnostic assay in reference laboratories: Results from a multicentre study. *Int J Infect Dis*. 2018;68:44-9.
85. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*. 2006;4(7):e204.
86. Mayboroda O, Katakis I, CK OS. Multiplexed isothermal nucleic acid amplification. *Analyt Biochem*. 2012(545):20-30.

87. Santiago-Felipe S, Tortajada-Genaro LA, Morais S, Puchades R, Maquieira Á. One-pot isothermal DNA amplification – Hybridisation and detection by a disc-based method. *Sens Actuators B Chem.* 2014;204:273-81.
88. Tortajada-Genaro LA, Santiago-Felipe S, Amasia M, Russom A, Maquieira Á. Isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification on microfluidic digital versatile discs (DVDs). *RSC Advances.* 2015;5(38):29987-95.
89. Kim JY, Lee J-L. Development of a multiplex real-time recombinase polymerase amplification (RPA) assay for rapid quantitative detection of *Campylobacter coli* and *jejuni* from eggs and chicken products. *Food Control.* 2017;73:1247-55.
90. Wee EJ, Ngo TH, Trau M. Colorimetric detection of both total genomic and loci-specific DNA methylation from limited DNA inputs. *Clin Epigenetics.* 2015;7:65.
91. Mazumdar R, Chowdhury A, Mannan KSB, Dhaka B. Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)- prospects and applications. *Int J Life Sci Pharma Res.* 2012;2(106-121).
92. Zeng L, Mukama O, Lu X, Cao S, Lin D. Strand Displacement Amplification for Multiplex Detection of Nucleic Acids: IntechOpen; 2018.
93. Deng H, Gao Z. Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques. *Anal Chim Acta.* 2015;853:30-45.
94. Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.* 2004;5(8):795-800.
95. Euler M, Wang Y, Otto P, Tomaso H, Escudero R, Anda P, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2234-8.
96. Lai MY, Lau YL. Detection of *Plasmodium knowlesi* using recombinase polymerase amplification (RPA) combined with SYBR Green I. *Acta Trop.* 2020;208:105511.
97. Sun N, Wang W, Wang J, Yao X, Chen F, Li X, et al. Reverse transcription recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks for detection of influenza A virus and subtyping of H1 and H3. *Mol Cell Probes.* 2018;42:25-31.

98. Ma Q, Liu H, Ye F, Xiang G, Shan W, Xing W. Rapid and visual detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips. *Mol Cell Probes*. 2017;36:43-9.
99. Multiplexing using isothermal Recombinase Polymerase Amplification (RPA). *BioTechniques*. 2017;63(4):191.
100. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Roseneck M. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. *Mikrochim Acta*. 2014;181(13-14):1715-23.
101. Ma B, Li J, Chen K, Yu X, Sun C, Zhang M. Multiplex Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Simultaneous Detection of Three Foodborne Pathogens in Seafood. *Foods*. 2020;9(3).
102. Abd El Wahed A, Weidmann M, Hufert FT. Diagnostics-in-a-Suitcase: Development of a portable and rapid assay for the detection of the emerging avian influenza A (H7N9) virus. *J Clin Virol*. 2015;69:16-21.
103. Mondal D, Ghosh P, Khan MA, Hossain F, Bohlken-Fascher S, Matlashewski G, et al. Mobile suitcase laboratory for rapid detection of *Leishmania donovani* using recombinase polymerase amplification assay. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):281.
104. Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*. 1972;269(2):192-200.
105. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012(62).
106. White HW, Vartak NB, Burland TG, Curtis FP, Kusakawa N. GelStar nucleic acid gel stain: high sensitivity detection in gels. *Biotechniques*. 1999;26(5):984-8.
107. Tweedie JW, Stowell KM. Quantification of DNA by agarose gel electrophoresis and analysis of the topoisomers of plasmid and M13 DNA following treatment with a restriction endonuclease or DNA topoisomerase I. *Biochem Mol Biol Educ*. 2005;33(1):28-33.
108. Marmiroli N, Maestri E. Polymerase chain reaction (PCR). 1 ed. Elsevier Science: Food Toxicants Analysis; 2006.

109. Wei C, Lipton JH, Kamel-Reid S. Monitoring of Minimal Residual Hematologic Disease. In: Tubbs R, Stoler M, editors. *Cell and Tissue Based Molecular Pathology*. 1st ed: Churchill Livingstone; 2008. p. 452.
110. Nie K, Qi SX, Zhang Y, Luo L, Xie Y, Yang MJ, et al. Evaluation of a direct reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method without RNA extraction for the detection of human enterovirus 71 subgenotype C4 in nasopharyngeal swab specimens. *PLoS One*. 2012;7(12):e52486.
111. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem*. 2016;60(1):111-20.
112. Mansfield MA. The Use of Nitrocellulose Membranes in Lateral-Flow Assays. In: Wong RC, Tse HY, editors. *Drugs of Abuse: Body Fluid Testing*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. p. 71-85.
113. DCN Dx. NALF and Beyond: Lateral Flow goes molecular 2019 [updated June 30, 2019; cited 2020 15 June]. Available from: <https://dcndx.com/nalf-lateral-flow-goes-molecular/>.
114. Zheng Z, Cheng Z. Chapter Four - Advances in Molecular Diagnosis of Malaria. In: Makowski GS, editor. *Advances in Clinical Chemistry*. 80: Elsevier; 2017. p. 155-92.
115. Chaivisuthangkura P, Longyant S, Wangman P, Sithigorngul P. Rapid Lateral Flow Immunochromatographic Strip Tests (LFICS): Principle and Modifications. *SWU Sci J*. 2017;2.
116. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem*. 2009;393(2):569-82.
117. Sajid M, Kawde A-N, Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society* 2015(19):689-705.
118. Li Z, Krishnaswamy V, Jiang S, Davis SC, Srinivasan S, Paulsen KD, et al. Rapid magnetic resonance-guided near-infrared mapping to image pulsatile hemoglobin in the breast. *Opt Lett*. 2010;35(23):3964-6.
119. He Z, Ni Q, Song Y, Wang R, Tang Y, Wu Y, et al. Development of a nucleic acid lateral flow strip for rapid, visual detection of *Nosema bombycis* in silkworm eggs. *J Invertebr Pathol*. 2019;164:59-65.

120. El-Tholoth M, Branavan M, Naveenathayalan A, Balachandran W. Recombinase polymerase amplification-nucleic acid lateral flow immunoassays for Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus detection. *Mol Biol Rep.* 2019;46(6):6391-7.
121. Jittimanee S, Vorasingha J, Mad-asin W, Nateniyom S, Rienthong S, Varma JK. Tuberculosis in Thailand: epidemiology and program performance, 2001-2005. *Int J Infect Dis.* 2009;13(4):436-42.
122. Buderer NM. Statistical methodology: I. Incorporating the prevalence of disease into the sample size calculation for sensitivity and specificity. *Acad Emerg Med.* 1996;3(9):895-900.
123. Sorlozano A, Soria I, Roman J, Huertas P, Soto MJ, Piedrola G, et al. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. *J Microbiol Biotechnol.* 2009;19(10):1259-64.
124. คู่มือปฏิบัติงาน (Work Instruction). การทดสอบความเสถียรเร่งความเร็ว (HST)-การทดสอบความเครียด. ระบุของ: บริษัท ไอเมต ลาบอราทอรี จำกัด; 2563.
125. Kumar P. Polymerase Chain Reaction (PCR): Stages, Types, Factors and Other Details [cited 2021 August 19]. Available from: https://www.biologydiscussion.com/biotechnology/polymerase-chain-reaction/polymerasechain-reaction-pcr-stages-types-factors-and-other-details/12389#Sensitivity_of_PCR.
126. Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ Psychol Meas.* 1960;20(1):37-46.
127. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-74.
128. Choe W, Kim E, Park SY, Chae JD. Performance Evaluation of Anyplex plus MTB/NTM and AdvanSure TB/NTM for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria. *Ann Clin Microbiol.* 2015;18(2):44-51.
129. Lim JH, Kim CK, Bae MH. Evaluation of the performance of two real-time PCR assays for detecting *Mycobacterium* species. *J Clin Lab Anal.* 2019;33(1):e22645.

130. Seegene. Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection [cited 2021 August 19]. Available from: https://www.seegene.com/assays/anyplex_mtb_ntm_realtime_detection.
131. Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. Transposable Genetic Elements: Bacterial insertion sequences. An Introduction to Genetic Analysis. 7th ed. New York: W. H. Freeman; 2000.
132. Hallstrom KN, McCormick BA. Chapter 16 - Pathogenicity Islands: Origins, Structure, and Roles in Bacterial Pathogenesis. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. Molecular Medical Microbiology (Second Edition). Boston: Academic Press; 2015. p. 303-14.
133. Coros A, DeConno E, Derbyshire KM. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. *J Bacteriol*. 2008;190(9):3408-10.
134. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2005;1(1):e5.
135. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(18):9869-74.
136. Khosravi AD, Hashemzadeh M, Hashemi Shahraki A, Teimoori A. Differential Identification of *Mycobacterial* Species Using High-Resolution Melting Analysis. *Front Microbiol*. 2017;8:2045.
137. กนกกร สุนทรขจิต. โรคติดเชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic infections; วัณโรค (Tuberculosis). วารสารกรมการแพทย์. 2558(433):1-8.
138. Elfath M, Elnifro A, Robert J. Cooper, Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(4):559–70.
139. Zhai J, Wang L, Qiao X, Zhao J, Wang X, He X. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections in pregnant women by

- multiplex recombinase polymerase amplification. *PLoS One*. 2021;16(5):e0251119.
140. Kanokudom S, Assawakongkarat T, Akeda Y, Ratthawongjirakul P, Chuanchuen R, Chaichanawongsaroj N. Rapid detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from fresh pork meat and pig cecum samples using multiplex recombinase polymerase amplification and lateral flow strip analysis. *PLoS One*. 2021;16(3):e0248536.
 141. Millipore EJEMCB, MA, USA. Rapid lateral flow test strips: considerations for product development. 2013;29:702-7.
 142. O'Farrell B. Evolution in Lateral Flow-Based Immunoassay Systems. In: Wong R, Tse H, editors. *Lateral Flow Immunoassay*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 1-33.
 143. Fan D, Li Y, Gu Z, Huang J, Zhou W, Zhang W, et al. Colloidal Gold Probe-Based Immunochromatographic Strip Assay for the Rapid Detection of Microbial Transglutaminase in Frozen Surimi. *J Chem*. 2016;2016:8592962.
 144. Razo SC, Panferova NA, Panferov VG, Safenkova IV, Drenova NV, Varitsev YA, et al. Enlargement of Gold Nanoparticles for Sensitive Immunochromatographic Diagnostics of Potato Brown Rot. *Sensors (Basel)*. 2019;19(1).
 145. Gong Y, Hu J, Choi JR, You M, Zheng Y, Xu B, et al. Improved LFIs for highly sensitive detection of BNP at point-of-care. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:4455-66.
 146. Kim DS, Kim YT, Hong SB, Kim J, Huh NS, Lee MK, et al. Development of Lateral Flow Assay Based on Size-Controlled Gold Nanoparticles for Detection of Hepatitis B Surface Antigen. *Sensors (Basel)*. 2016;16(12).
 147. Oldenburg SJ. Sensitivity of Lateral Flow Diagnostic Assays with Ultra-Bright Gold Nanoshell Reporters [cited 2021 August 19]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/technical-documents/technical-article/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/ivd-manufacturing/sensitivity-lateral-flow-diagnostic-assays>.
 148. nanoComposix. Antibody Selection and Purification for Lateral Flow Rapid Tests [cited 2021 August 19]. Available from:

- <https://nanocomposix.com/pages/antibody-selection-and-purification-for-lateral-flow-rapid-tests#target>.
149. O'Farrell B. Chapter 2.4 - Lateral Flow Immunoassay Systems: Evolution from the Current State of the Art to the Next Generation of Highly Sensitive, Quantitative Rapid Assays. In: Wild D, editor. *The Immunoassay Handbook* (Fourth Edition). Oxford: Elsevier; 2013. p. 89-107.
 150. nanoComposix. Nitrocellulose Membrane Selection and Striping for Lateral Flow Assays [cited 2021 August 19]. Available from: <https://nanocomposix.com/pages/nitrocellulose-membrane-selection-and-striping-for-lateral-flow-assays#target>.
 151. Sjoback R, Nygren J, Kubista M. Characterization of fluorescein-oligonucleotide conjugates and measurement of local electrostatic potential. *Biopolymers*. 1998;46(7):445-53.
 152. abcam. Primary antibodies [cited 2021 August 21]. Available from: <https://www.abcam.com/products?sortOptions=Relevance&selected.classification=Primary%20antibodies>.
 153. BIONICS. Modified Oligo [cited 2021 August 21]. Available from: <http://www.bionicsro.co.kr/contents/serviceModifiedOligo>.
 154. MBL Life science. Main causes of non-specific reactions [cited 2021 September 6]. Available from: <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/nonspecific-reaction.html>.
 155. Armstrong B. Antigen-antibody reactions. *ISBT Sci Ser*. 2008;3(2):21-32.
 156. merck. An Introduction to Antibodies: Antibody-Antigen Interaction [cited 2021 September 6]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/elisa/antibody-antigen-interaction>.
 157. Gallex. UltraPower DNA/RNA safe dye [cited 2021 August 21]. Available from: http://www.gellex.jp/item/ultrapower_safedye.
 158. Kamphée H, Chaiprasert A, Prammananan T, Wiriyaichaiyorn N, Kanchanatavee A, Dharakul T. Rapid Molecular Detection of Multidrug-Resistant Tuberculosis by PCR-Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137791.

159. Organization WH. Global tuberculosis report 2019 Geneva2019 [cited 2021 August 19]. Available from:
https://www.who.int/tb/publications/global_report/en.
160. Talbot EA. *Mycobacterium bovis* [cited 2021 August 21]. Available from:
<https://www.uptodate.com/contents/mycobacterium-bovis>.
161. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). *Mycobacterium bovis* (Bovine Tuberculosis) in Humans [updated September 1, 2012; cited 2021 August 21]. Available from:
<https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/general/mbovis.htm>.
162. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(13):7877-82.
163. Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):152-7.
164. Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MT, Zanini MS, Salas CE. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Probes*. 2004;18(3):167-70.
165. Chimara E, Ferrazoli L, Leao SC. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(7):745-8.
166. Haas WH, Schilke K, Brand J, Amthor B, Weyer K, Fourie PB, et al. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(7):1601-3.
167. Sreevatsan S, Escalante P, Pan X, Gillies DA, 2nd, Siddiqui S, Khalaf CN, et al. Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol*. 1996;34(8):2007-10.
168. Kumar VG, Urs TA, Ranganath RR. MPT 64 Antigen detection for Rapid confirmation of *M.tuberculosis* isolates. *BMC Res Notes*. 2011;4:79.

169. nanoComposix. Introduction to Lateral Flow Rapid Test Diagnostics [cited 2021 August 2]. Available from: <https://nanocomposix.com/pages/introduction-to-lateral-flow-rapid-test-diagnostics>.
170. Bever CS, Adams CA, Hnasko RM, Cheng LW, Stanker LH. Lateral flow immunoassay (LFIA) for the detection of lethal amatoxins from mushrooms. *PLoS One*. 2020;15(4):e0231781.
171. Biocompare. Western Blot Antibodies: Ready, Set, Reuse [cited 2021 August 21]. Available from: <https://www.biocompare.com/Bench-Tips/135857-Western-Blot-Antibodies-Ready-Set-Reuse/>.
172. Merck. Immunodetection [cited 2021 August 1]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/western-blotting/immunodetection#weak-signal>.
173. Innova Biosciences. Guide to Lateral Flow Immunoassays [cited 2021 August 1]. Available from: https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/download/pdf/IBS_A_guide_to_lateral_flow_immunoassays.pdf.
174. กรมอุตุวิทยา. ความชื้นสัมพัทธ์ [cited 2021 August 2]. Available from: <https://tmd.go.th/info/info.php?FileID=56>.
175. Hu W, Yan Z, Li H, Qiu J, Zhang D, Li P, et al. Development of a new colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detecting subgroup A of avian leukosis virus using colloidal gold nanoparticles. *Biochem Eng J*. 2019;148:16-23.
176. Wang Y, Li Y, Yang R, editors. A sparsity-aware proportionate normalized maximum correntropy criterion algorithm for sparse system identification in non-Gaussian environment. 2017 25th European Signal Processing Conference (EUSIPCO); 2017 28 Aug.-2 Sept. 2017.
177. Flores LL, Pai M, Colford JM, Jr., Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol*. 2005;5:55.
178. Tharinjaroen CS. Tuberculosis diagnosis: From knowledge to innovation in public health. *J Med Sci*. 2016;50(1).

179. Raveendran R, Wattal C. Utility of multiplex real-time PCR in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2016;20(3):235-41.
180. Sharma M, Singh R, Sharma A, Gupta V, Sharma K. IS1081-based Multi-targeted LAMP: An Opportunity to Detect Tubercular Uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2020:1-6.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางแสดงผลการวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ จำนวน 131 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค M-RPA ร่วมกับแถบตรวจ MTB Strip เปรียบเทียบกับการย้อมสีทึบกรด และเทคนิค Real-time PCR

DNA no.	Detection results			
	AFB staining	Real-time PCR		M-RPA/MTB Strip
		Result	Ct	
1	1+	MTB	22.13	+
2	0	0	0	0
3	1+	MTB	27.75	+
4	0	0	0	0
5	3+	MTB	24.01	+
6	2+	NTM	24.84	0
7	2+	MTB	21.59	+
8	2+	MTB	19.41	+
9	3+	MTB	18.76	+
10	2+	MTB	18.01	+
11	2+	MTB	21.02	+
12	3+	MTB	33.50	+
13	Scanty	MTB	22.11	+
14	1+	MTB	19.04	+
15	2+	MTB	20.16	+
16	3+	MTB	22.86	+
17	2+	MTB	27.47	+
18	1+	MTB	20.90	+
19	1+	MTB	28.42	+
20	3+	MTB	20.27	+
21	3+	NTM	28.80	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0

DNA no.	Detection results			
	AFB staining	Real-time PCR		M-RPA/MTB Strip
		Result	Ct	
25	0	0	0	0
26	0	MTB	30.73	+
27	1+	MTB	21.76	+
28	1+	NTM	31.36	0
29	1+	MTB	27.44	+
30	1+	MTB	35.56	+
31	1+	MTB	26.23	+
32	3+	MTB	24.39	+
33	3+	MTB	24.50	+
34	0	MTB	33.22	+
35	Scanty	MTB	28.51	+
36	3+	MTB	29.23	+
37	3+	MTB	13.51	+
38	0	0	0	0
39	0	MTB	35.89	+
40	0	MTB	29.64	+
41	0	0	0	0
42	0	0	0	0
43	0	0	0	0
44	3+	MTB	23.57	+
45	Scanty	MTB	26.75	+
46	3+	MTB	19.75	+
47	2+	MTB	22.81	+
48	3+	MTB	23.18	+
49	2+	MTB	28.40	+
50	3+	MTB	16.05	+
51	3+	MTB	22.33	+

DNA no.	Detection results			
	AFB staining	Real-time PCR		M-RPA/MTB Strip
		Result	Ct	
52	3+	MTB	21.69	+
53	0	0	0	0
54	0	NTM	37.42	0
55	0	NTM	36.46	0
56	0	0	0	0
57	0	0	0	0
58	1+	MTB	24.57	+
59	0	0	0	0
60	0	0	0	0
61	0	0	0	0
62	0	0	0	0
63	0	0	0	0
64	0	0	0	0
65	0	0	0	0
66	-	MTB	30.42	+
67	2+	MTB	20.49	+
68	2+	MTB	24.05	+
69	3+	MTB	16.98	+
70	1+	MTB	23.19	+
71	1+	NTM	31.16	0
72	3+	MTB	16.95	+
73	1+	MTB	24.73	+
74	3+	MTB	20.58	+
75	2+	MTB	21.21	+
76	1+	MTB	24.52	+
77	1+	MTB	24.72	+
78	1+	MTB	24.04	+

DNA no.	Detection results			
	AFB staining	Real-time PCR		M-RPA/MTB Strip
		Result	Ct	
79	2+	MTB	20.04	+
80	2+	MTB	18.24	+
81	1+	MTB	19.36	+
82	2+	MTB	19.05	+
83	0	0	0	0
84	0	0	0	0
85	0	0	0	0
86	0	0	0	0
87	0	0	0	0
88	0	0	0	0
89	0	0	0	0
90	0	0	0	0
91	0	0	0	0
92	1+	MTB	26.78	+
93	1+	MTB	18.37	+
94	1+	MTB	24.52	+
95	2+	MTB	20.75	+
96	1+	MTB	20.93	+
97	1+	MTB	24.34	+
98	Scanty	MTB	29.02	+
99	1+	MTB	21.50	+
100	Scanty	NTM	37.89	0
101	Scanty	MTB	24.06	+
102	1+	MTB	25.14	+
103	1+	MTB	25.12	+
104	1+	MTB	27.48	+
105	1+	MTB	28.66	+

DNA no.	Detection results			
	AFB staining	Real-time PCR		M-RPA/MTB Strip
		Result	Ct	
106	Scanty	MTB	26.78	+
107	Scanty	NTM	32.00	+
108	Scanty	MTB	23.03	+
109	1+	MTB	29.41	+
110	Scanty	NTM	35.55	0
111	0	0	0	0
112	0	0	0	0
113	0	0	0	0
114	0	0	0	+
115	0	0	0	0
116	0	0	0	+
117	0	0	0	0
118	0	0	0	0
119	Scanty	NTM	29.47	0
120	1+	MTB	24.97	+
121	0	0	0	0
122	0	0	0	0
123	0	0	0	0
124	0	0	0	0
125	3+	MTB	27.10	+
126	0	0	0	0
127	0	0	0	0
128	0	0	0	0
129	1+	MTB	25.30	+
130	0	0	0	0
131	0	MTB	25.38	+

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	วิลาณี เดชขจร
วัน เดือน ปี เกิด	13 สิงหาคม 2533
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	77/12 หมู่ 4 คอนโดเดอโซน ซอยแจ้งวัฒนะ 23 ถนนแจ้งวัฒนะ ตำบล คลองเกลือ อำเภอกองเกลือ จังหวัดนนทบุรี 11120



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY