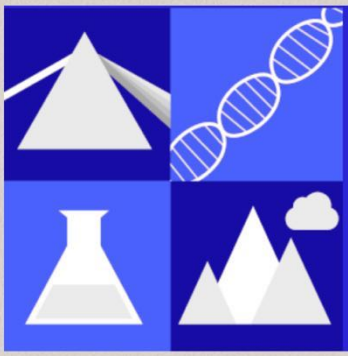
TSJOS.org
Thailand Scholastic Journal of Science

Thailand Scholastic Journal of Science

January – December, 2024
Volume 5, Issue 1



TSJOS.org

Thailand Scholastic Journal of Science

The Thailand Scholastic Journal of Science (TSJOS) is a bilingual, entry-level, reviewed journal dedicated to publishing the original research of Thai secondary school science students.

TSJOS เป็นวารสารสองภาษาที่ได้จัดตั้งขึ้นเพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของนักเรียนไทยระดับมัธยมศึกษา

TSJOS.org
Thailand Scholastic Journal of Science

About

ในโลกนี้การสอนวิทยาศาสตร์ให้นักเรียนระดับมัธยมนั้นไม่ควรเป็นเพียงแค่การสอนเนื้อหาวิทยาศาสตร์เท่านั้น แต่ควรสอน *ให้เป็นนักวิทยาศาสตร์อ* นักเรียนควรได้ทดลองทุกด้านของการเป็นนักวิทยาศาสตร์ ควรได้ทั้งการเรียนรู้ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ที่มีอยู่ในหนังสือเรียน และการเรียนรู้วิธีการสร้างความรู้ใหม่ผ่านการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ จากนั้นก็ต้องมีโอกาสที่จะเผยแพร่ผลงาน ที่องค์กร StudentScientists.org เรามีเป้าหมายในการพัฒนาหลักสูตรวิทยาศาสตร์ที่เปิดโอกาสให้นักเรียนทำการวิจัยและเผยแพร่ผลงาน เราเลยได้จัดตั้งวารสารวิทยาศาสตร์ Thailand Scholastic Journal of Science ไว้

บทความการวิจัยที่ส่งไปยัง TSJOS ได้รับการคัดเลือกจากบรรณาธิการ จากนั้นบรรณาธิการจัดส่งบทความให้ผู้ทรงคุณวุฒิ (Reviewer) พิจารณา หลังจากการทบทวนและการยอมรับบรรณาธิการจะให้คำปรึกษากับผู้เขียนในการทบทวนบทความตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ เมื่อแก้ไขเสร็จแล้วบรรณาธิการจะส่งบทความไปยังผู้ทรงคุณวุฒิเพื่อขออนุมัติขั้นสุดท้าย บทความจะถูกเผยแพร่ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วารสารรับบทความเพื่อตีพิมพ์บทความตามเกณฑ์ที่กำหนดตลอดทั้งปี

วารสารวิทยาศาสตร์ Thaland Scholastic Journal of Science เป็นวารสารออนไลน์ที่ไม่มีค่าใช้จ่ายในการเสนอบทความหรือค่าใช้จ่ายจากผู้เขียน บทความที่ตีพิมพ์ใน TSJOS มีลิขสิทธิ์ภายใต้การอนุญาต Creative Commons ประเภท CC BY ผู้เขียนจะถือลิขสิทธิ์ของบทความที่ตีพิมพ์ในวารสารไว้เป็นของตนเอง

In an ideal world, teaching science to secondary school students means not just teaching students the science content, but also teaching them *how to be scientists*. Students should experience all aspects of being a scientist. They should not only master current scientific knowledge found in text books, they should also learn how to *create new knowledge* through scientific research and then have the opportunity to *publish* their work. At StudentScientists.org, we work towards the development of science curricula that include opportunities for original student research and publishing. As a part of that effort, we have established the Thailand Scholastic Journal of Science.

The Thailand Scholastic Journal of Science is a bilingual, entry-level, peer-reviewed journal publishing papers in Thai and/or English. TSJOS is dedicated to publishing the original research of Thai secondary students in all areas of STEM. Papers submitted to the TSJOS undergo an editorial selection process and are then forwarded to a Reviewer. Following review and acceptance, the editor consults with the author to revise the paper according to the suggestions of the reviewer. Upon revision, the paper is sent to the reviewer for final approval. The TSJOS publishes papers on a rolling basis as they are received throughout the year.

The Thailand Scholastic Journal of Science is an online, Open-Access Journal with no author or submission fees. Papers in the TSJOS are copyrighted under Creative Commons licensing, CC BY. Authors retain the copyright to their papers published in the Journal.

Editorial Staff

Editor-in-Chief: Jonathan Eales, PhD

Editors

- Min Medhisuwakul, PhD
- Orawan Chaowalit, PhD

Editorial Board

- Arjaree Thirach
- Tanawan Leeboonngam
- Ian Jacobs, PhD

.

TSJOS.org
Thailand Scholastic Journal of Science

Aims & Scope

TSJOS เป็นวารสารที่เปิดโอกาสให้นักเรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายได้มีโอกาสตีพิมพ์ผลงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิศวกรรมและคณิตศาสตร์ หรือ สะเต็ม TSJOS ใช้กระบวนการคัดเลือกและแก้ไขอย่างเข้มงวดเพื่อให้แน่ใจว่าเอกสารที่ตีพิมพ์นั้นเป็นงานที่นักเรียนสร้างขึ้นเอง และส่งเสริมให้เกิดองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์แก่มวลมนุษยชาติ

วารสารนี้เผยแร่ผลงานวิจัยในระดับที่ไม่ยากมาก และเป็นงานวิจัยในระดับเริ่มต้นแต่มีความหมายในการเผยแพร่องค์ความรู้ด้านสะเต็ม งานวิจัยที่ทำร่วมกับสถาบันการศึกษาระดับสูงหรืองานที่ทำร่วมกับหน่วยงานวิจัยระดับอุตสาหกรรมอาจจะไม่เหมาะสมกับการตีพิมพ์ผลงานในวารสารนี้

งานวิจัยระดับเริ่มต้นนั้นไม่ได้คาดหวังว่าจะต้องเป็นเรื่องที่เกี่ยวข้องกับงานระดับโลก หากแต่เป็นงานวิจัยเล็ก ๆ ที่มีความหมาย และมีส่วนในการขยายองค์ความรู้ให้กว้างออกไป งานวิจัยที่ตีพิมพ์ใน TSJOS จะต้องแสดงให้เห็นถึงความใหม่ ความถูกต้อง และความมั่นใจในระดับสูงต่อการค้นพบในงานนั้น ๆ นอกจากนั้นจะต้องให้ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยที่อาจมีต่อเนื่องจากผลงานนั้น ๆ ได้

The Thailand Scholastic Journal of Science provides a venue for Thai secondary school students to publish original research conducted as part of their science and STEM studies. The TSJOS employs a rigorous selection, review and revision process to ensure that papers published constitute an original, valid contribution to human knowledge.

The Journal publishes entry-level research that has been conducted by Thai students in the secondary school laboratory. Papers are published in all areas of STEM and the natural sciences on any topic related to a typical secondary science curriculum. Special research conducted by secondary school science students outside their normal courses using university or industry laboratory facilities are not appropriate for publishing in the TSJOS.

Entry-level research is not expected to address cutting-edge topics. Entry-level papers represent a small but meaningful contribution to extending our knowledge of the world. Papers published in the TSJOS must demonstrate originality, validity, and high levels of confidence in the findings, and offer suggestions for continuing research.

Contact

ถ้ามีคำถามหรือคำแนะนำติดต่อได้ที่

If you have any questions or comments regarding the Thailand Scholastic Journal of Science please contact the Editor:

Dr. Jonathan Eales
Editor.TSJOS@gmail.com

The Thailand Scholastic Journal of Science is associated with

Student Scientists Organization
254/153 Ramkamhaeng 112, Sapan Soong
Bangkok, Thailand 10240
www.StudentScientists.org

TSJOS.org
Thailand Scholastic Journal of Science

Thailand Scholastic Journal of Science

Volume 5, Issue 1, January-December, 2024

From the Editors

Papers

1 Deep Learning Models for Phytoplankton Detection for Water Quality Assessment
R. Phanphoowong, J. Amornophatsathein, K. Khaimuk, T. Dumkua, O. Chaowalit
โมเดลเรียนรู้เชิงลึกสำหรับตรวจจับแพลงก์ตอนพืชในแหล่งน้ำเพื่อเป็นต้นแบบในการประเมินคุณภาพน้ำ
ร ผ่านภูวงษ์, จ อมรโอภาสเสถียร, ก ไข่มุกข์, ธ ดำเกาะ, อ เชาวลิต

2 The Development of Lateral Flow Immunoassay for Hepatitis B Detection in Saliva
N. Rongdach, G. Kotluckkom, U. Jeenjenkit, S. Chaiyo
การพัฒนาเซนเซอรชนิดการไหลในแนวระนาบสำหรับการตรวจโรคไวรัสตับอักเสบบีจากน้ำลาย
ณัฐชานนท รองเดช, กริชเพชร โคตรหลักคำ, อุษา จีนเจนกิจ, สุดเขต ไชโย

ISSN ****-****

(cc) BY

Download Issue (PDF)

TSJOS.org
Thailand Scholastic Journal of Science

Thailand Scholastic Journal of Science

Volume 5, Issue 1, January-December, 2024

From the Editor

Dear Readers,

TSJOS continues with our goal of offering a journal for the publication of the original scientific of Thai secondary school students. This year we begin our issue with the publication of two papers written by authors studying at Mahidol Wittayanusorn School (MWIT). We look forward to publishing papers by students from many other schools across Thailand in the future.

We hope you find these papers useful for their findings and also in helping to inspire young Thai students to gain the confidence to conduct research of their own and submit their findings to TSJOS for publication.

Jonathan Eales
Editor-in-Chief, TSJOS

Deep Learning Models for Phytoplankton Detection for Water Quality Assessment

Rawit Phanphoowong[1*], Jirawat Amornophatsathein[1], Kanthorn Khaimuk[1]
Tanyaratana Dumkua[1] & Orawan Chaowalit[2]
[1]*Mahidol Wittayanusorn School, Nakhon Pathom, Thailand*
[2]*Department of Computing, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand*
**Email: rawit.pha_g31@mwit.ac.th*

Abstract

In Thailand, prevalent euglenoid genera like *Euglena, Phacus, Trachelomonas, Lepocinclis,* and *Strombomonas* are typically found in organic-rich water, indicating hypereutrophic and eutrophic conditions. These euglenoids have diverse shapes, making accurate identification challenging. To address this, an object detection application was developed using deep-learning neural network models to reduce identification errors. Photographic datasets collected between June and October 2022, using both microscope and phone cameras in Khlong Mahasawat, Nakhon Pathom, Thailand, covered five Euglenoid genera. These datasets were manually labeled and used to train four deep-learning neural network models: Detectron2, YOLOv5, YOLOv7, and YOLOv8. Precision and recall of the models were improved through image augmentation, mimicking variations in image quality. The model which proved best for phytoplankton identification was YOLOv5l, which yielded precision and recall of 0.839 and 0.873, respectively. This model exhibited high performance in terms of the accuracy, with a low rate of misclassification.

Keywords: Water quality assessment, Euglenoid, Object detection, Deep learning

I. INTRODUCTION

Assessing water quality is important in environmental science research, and is quantified using physical properties such as color and turbidity, chemical properties such as dissolved oxygen (DO), pH, and salinity, and biological properties such as biological oxygen demand (BOD) and biodiversity. In Thailand, rapid urbanization and industrialization have depleted the water quality of the Chao Phraya and Tha Chin rivers, as evidenced through decreased DO levels, elevated ammonia-nitrogen content, and increased BOD (Simachaya, W., 2003). These changes significantly impact water biodiversity. Different water quality impacts the varieties and population density of phytoplankton; thus, the presence of certain species of phytoplankton can be used as an indicator of water quality.

This research utilizes the AARL-PP (Assessment of Water Quality in Standing Water by Using Dominant Phytoplankton) developed by Y. Peerapormpisal (2007) as a method for assessing water quality. AARL-PP offers a chemical-free approach, allowing for long-term water quality assessment. It was developed from a two-part scoring system. First, an index of water quality based on a standard range of water quality tests was defined in six levels, based on research, using a score of 1-10, with lower scores indicating clean water and higher scores indicating polluted water, as shown in Table 1.

Score	Water quality by trophic level	General water quality
1.0 - 2.0	Oligotrophic	Clean
2.1 - 3.5	Oligo-mesotrophic	Clean-moderate
3.6 - 5.5	Mesotrophic	Moderate
5.6 - 7.5	Meso-eutrophic	Moderate-polluted
7.6 - 9.0	Eutrophic	Polluted
9.1 - 10.0	Hypereutrophic	Very polluted

Table 1 Water quality scores defined by trophic level and general water quality

Euglenoid genus	Sources of database	Taxonomic references
Euglena Ehrenberg, 1830	Images of water sample under microscope	M.D. Guiry *in* Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2017)
Phacus Dujardin, 1841		E.A. Molinari Novoa *in* Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2021)
Trachelomonas Ehrenberg, 1834		M.D. Guiry *in* Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2017)
Lepocinclis Perty, 1849	Images of water sample under microscope and from Solito de Solis (2020)	G.M. Guiry *in* Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2022)
Strombomonas Deflandre, 1930		M.D. Guiry *in* Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2018)

Table 2 Sources of database and taxonomic references for each genus of euglenoids

For the second part, the dominant genera of phytoplankton found in the different water quality levels were identified and matched to the rating score. Three to five dominant genera of the phytoplankton were selected in accordance with their respective populations. During the assessment of water quality, phytoplankton was collected, identified and the quantity of each genus was determined. The score of each genus following the water quality in the second part was averaged and compared with the standard score of water quality from the first part. The AARL-PP Score has been tested in 50 water systems in northern Thailand and 20 water systems each in northeastern and southern Thailand, with phytoplankton identification being more than 95% in agreement with physical and chemical water quality.

Five genera of euglenoid were studied: *Euglena, Phacus, Trachelomonas* and *Strombomonas,* with scores in the AARL-PP score, 10, 8, 8, and 8, respectively, and *Lepocinclis*, though it should be noted that its score is yet to be determined within the AARL-PP system. The high scores assigned to these euglenoids suggest their prevalence in hypereutrophic waters, indicative of significant pollution levels.

Euglenoids tend to have a highly variable morphology, which increases the chances of genus misidentification. As each genus of euglenoids represents a different AARL-PP score, genus identification affects the accuracy of score. One proposed solution is to detect the “eye spot”, a plastid-like organelle found in euglenoids. The eye spot is easily identified under a microscope, so accurately identifying the eye spot can be used to aid in the identification of euglenoids. We propose the development of an object detection program, using a deep-learning neural network model, to reduce the identification error and to further develop an accurate AARL-PP score assessment program.

Deep learning models are artificial intelligence algorithms, mimicking human brain neurons, consisting of multiple layers of neural network. The models are trained in object detection and classification using datasets of images. In one training cycle, the deep learning model divides the image into grids, processes each grid with the neuron-like network of the mathematical model, and the result is shown. During each round of training, called an epoch, some parameters in the neural network change and the accuracy of the model improves. What makes each neural network model different is its architecture and size of the model. Models can be evaluated and compared with evaluation metrics such as precision, recall, and F1-score (IBM, 2024)

To create an object detection program, the dataset of images is divided into three parts: a training set, a validation set, and a test set, at an appropriate ratio. In the training set images, the objects of interest are labeled to locate and specify types of objects for the model to learn. The program is trained with the labeled training images, then validated and tested with unlabeled images.

II. METHODS

Data Collection and Image Preparation

Water samples were collected using a 21-micron plankton net at coordinates 13°48'25"N, 100°17'3"E in Khlong Mahasawat canal, Phutthamonthon district, Nakhon Pathom, Thailand, from June to October 2022. Images of euglenoids were captured

under a bright field microscope at 400x magnification, showcasing distinct morphologies of *Euglena* spp., *Phacus* spp., *Trachelomonas* spp., *Lepocinclis* spp., and *Strombomonas* spp. The classification of each genus was based on taxonomic references, including Wongrat *et al.* (2017) and AlgeaBase, a comprehensive global database curated by M.D. & G.M. Guiry, as shown in Table 2. Images from videos by Solito de Solis (2020) were also used. Selected images were required to meet specific criteria: (1) inclusion of at least one genus of euglenoids, (2) presence of other organisms (e.g. different types of algae) or contaminants (e.g. sediment), (3) variation in color, brightness, and aperture, and (4) image resolution was not controlled.

Images were labeled with the respective genera and the position of each euglenoid within the image. Two labeling methods were employed: bounding box and instance segmentation, according to the requirements of the object detection models.

The image dataset was then split into three sets: a 70% training set, a 20% validation set, and a 10% testing set. In total, 284 images of *Euglena* spp., 180 images of *Phacus* spp., 115 images of *Trachelomonas* spp., 187 images of *Lepocinclis* spp., and 102 images of *Strombomonas* spp. were obtained after completing the data collection process.

After completing the image labeling process, the next step involves augmenting the image dataset to simulate factors affecting genus identification, such as brightness and color of light from the microscope, focus and sharpness, position of euglenoid features, and obstructions within the image. Image augmentation techniques included cropping (with adjustments ranging from 0% to 30%), altering hue (ranging from -25% to +25%), applying cutout to portions of the image (with a cutout rate of 20%), inducing blur (ranging from 0 to 2 pixels), and adjusting brightness (ranging from -25% to +25%), as shown in Figure 1. Upon completion of image augmentation, the dataset consisted of a total of 2,055 images.

Model Training

Deep learning network models were developed based on four different neural network models: Detectron2 , YOLOv5 , YOLOv7 , and YOLOv8 , with five sub-models of YOLOv5 tested, including YOLOv5s, YOLOv5n, YOLOv5m, YOLOv5l, and YOLOv5x. The fundamental principle of these deep learning network models is to divide the images in the dataset into multiple cells, process each cell using a mathematical model, display the results, and then iteratively adjust the parameters in the model to improve the results.

The YOLO models are designed with different sizes appropriate for varying dataset sizes, with the size of the model indicated by the letter at the end of the name, such as 's' representing small size (Jocher, 2022) . Currently, development has progressed to version 8, known as YOLOv8 . YOLOv5 , the fifth version, remains the most popular. The Detectron model is a methodical model for high-speed object detection and flexible use (Wu, Y., 2019).

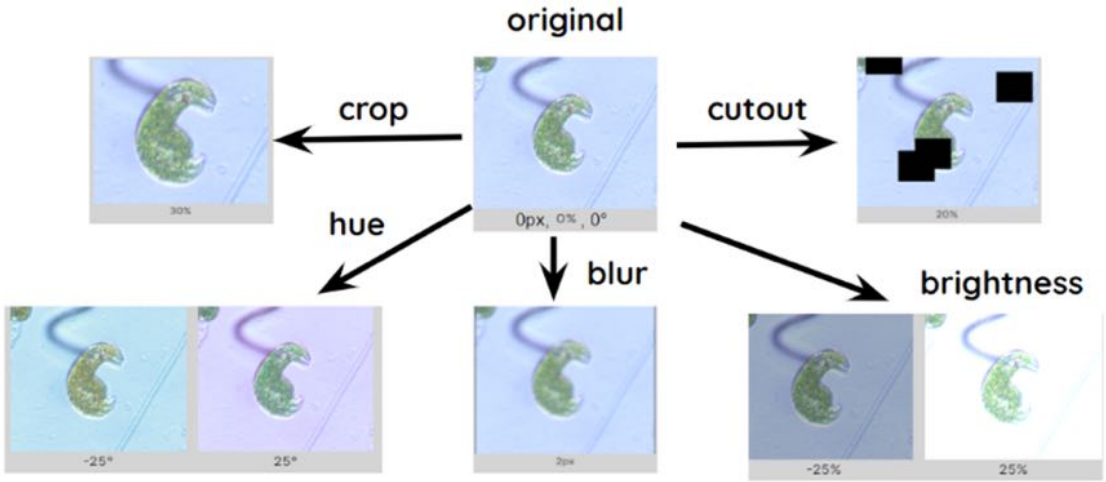


Figure 1 Datasets after image augmentation

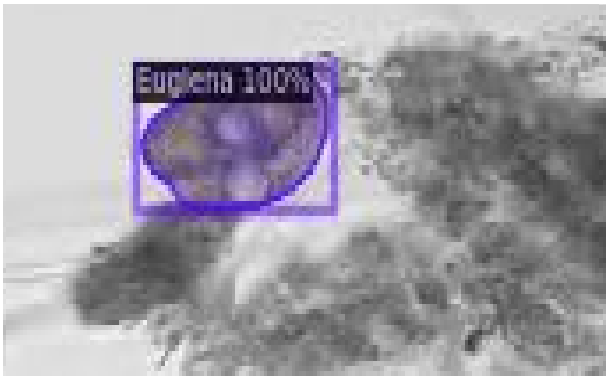


Figure 2 Example of the results from Detectron2

The model training involved 300 epochs, after which the following evaluation metrics were examined: classification accuracy, precision, recall/sensitivity, and F1-score. The F1-score is often used for comparing deep learning models, where models with higher F1-scores have better classification abilities. Each metric is calculated with a formula based on the amount of True Positive (TP), True Negative (TN), False Positive (FP), and False Negative (FN).

The 'accuracy' in classification is calculated based on the proportion of (TP + TN) to (TP + TN + FP + FN), while 'precision' is calculated based on the proportion of (TP) to (TP + FP), recall is calculated based on the proportion of (TP) to (TP + FN), and the F1-score is the harmonic mean of precision and recall. Additionally, the mean Average Precision at k (mAP@k) is evaluated as an appropriate evaluation metric for ranking and sorting tasks, particularly suitable for assessing the quality of water using the AARL-PP score in object detection. Commonly used values for k are from 50 to 95.

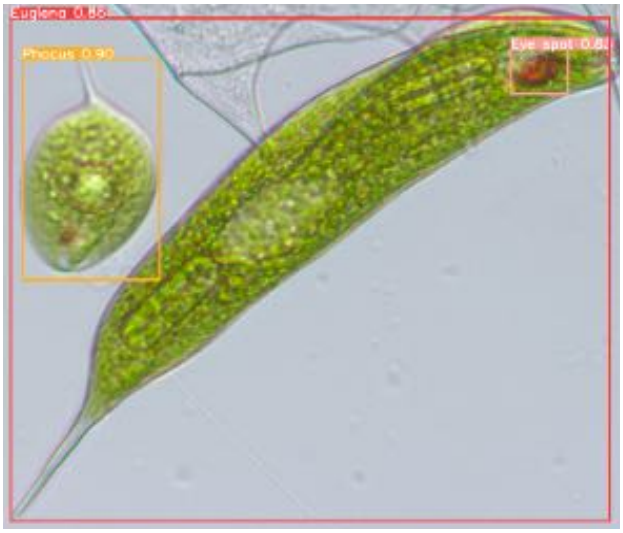


Figure 3 Example of the results from YOLOv5

III. RESULTS AND DISCUSSION

After building the model and conducting image input experiments, it was found that the model could detect images, as shown in Figures 2 and 3. The detected genus of euglenoids is identified along with the confidence level. For example, in Figure 2, *Euglena* sp. Was detected with 100% confidence, and in Figure 3, *Euglena* sp., *Phacus* sp., and an eye spot were detected with confidence levels of 88%, 90%, and 83%, respectively.

After training the models with the obtained images using all 8 deep learning models, the results are presented in Table 3. The best-performing model was found to be YOLOv5l, as it achieved the highest

Model	Precision	Recall	F1-score	mAP@50	mAP@50-95
Detectron2	0.833	0.847	0.840	0.915	0.731
YOLOv5					
YOLOv5s	0.871	0.804	0.836	0.844	0.527
YOLOv5n	0.877	0.750	0.809	0.831	0.532
YOLOv5m	0.841	0.858	0.849	0.868	0.687
YOLOv5l	0.839	0.873	0.856	0.894	0.715
YOLOv5x	0.833	0.847	0.840	0.915	0.731
YOLOv7	0.773	0.789	0.781	0.829	0.584
YOLOv8	0.854	0.833	0.803	0.866	0.567

Figure 3 Results from the training for all the models tested.

Genus	Precision	Recall	F1-score	mAP@50	mAP@50-95
Euglena	0.772	0.881	0.822	0.900	0.763
Phacus	0.972	0.863	0.914	0.938	0.834
Trachelomonas	0.732	0.952	0.827	0.921	0.841
Lepocinclis	0.888	0.855	0.871	0.933	0.804
Strombomonas	0.904	0.947	0.925	0.964	0.757

Table 4 Evaluation metrics of YOLOv5l for each genus of euglenoids

F1-score. The F1 -score represents the harmonic mean of precision and recall, which are two evaluation metrics for the learning performance of efficient models. Considering the harmonic mean of both variables provides a balanced assessment without bias towards any specific variable, ensuring an unbiased evaluation of the model's performance.

Based on the evaluation metrics of the YOLOv5l model, it was able to classify each genus as shown in Table 4. During the training process, there were trends in the changes of evaluation metrics for each epoch, as depicted in Figure 4.

From Figure 4, it can be observed that the values of box loss, objectness loss, and classification loss decrease in each training epoch for both the training dataset (as shown in Figures 4A, 4B, and 4C) and the validation dataset (as shown in Figures 4F, 4G, and 4H). The box loss indicates the model's ability to identify the center position of detected objects and predict bounding boxes around objects. Objectness represents the likelihood of objects being present in the area of interest in the image, while classification loss demonstrates the model's ability to predict object classifications.

Figures 4D, 4E, 4I, and 4J show evaluation metrics such as precision, recall, mAP@50, and mAP@50-95, respectively. The increase in values for these metrics across all four figures indicates an overall improvement in the model's performance with an increasing number of training epochs.

Figure 5 depicts the graph of the relationship between precision and recall. The area under the

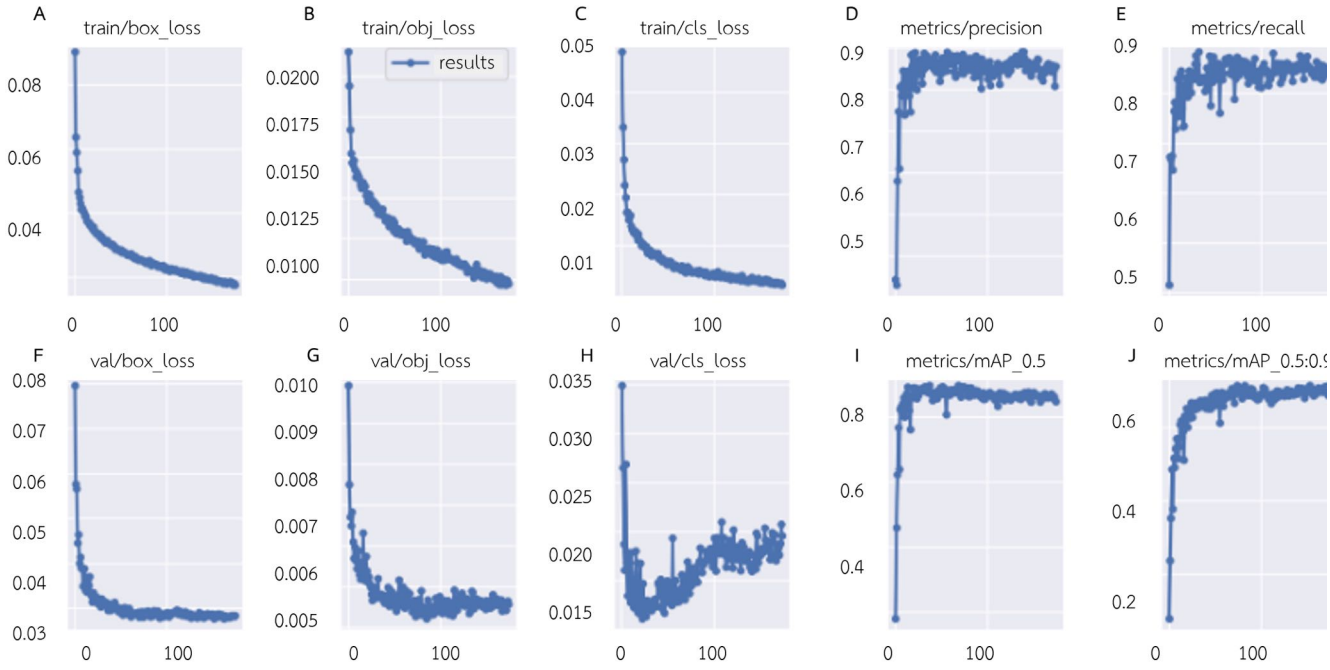


Figure 4 Evaluation metrics graph of YOLOv5l

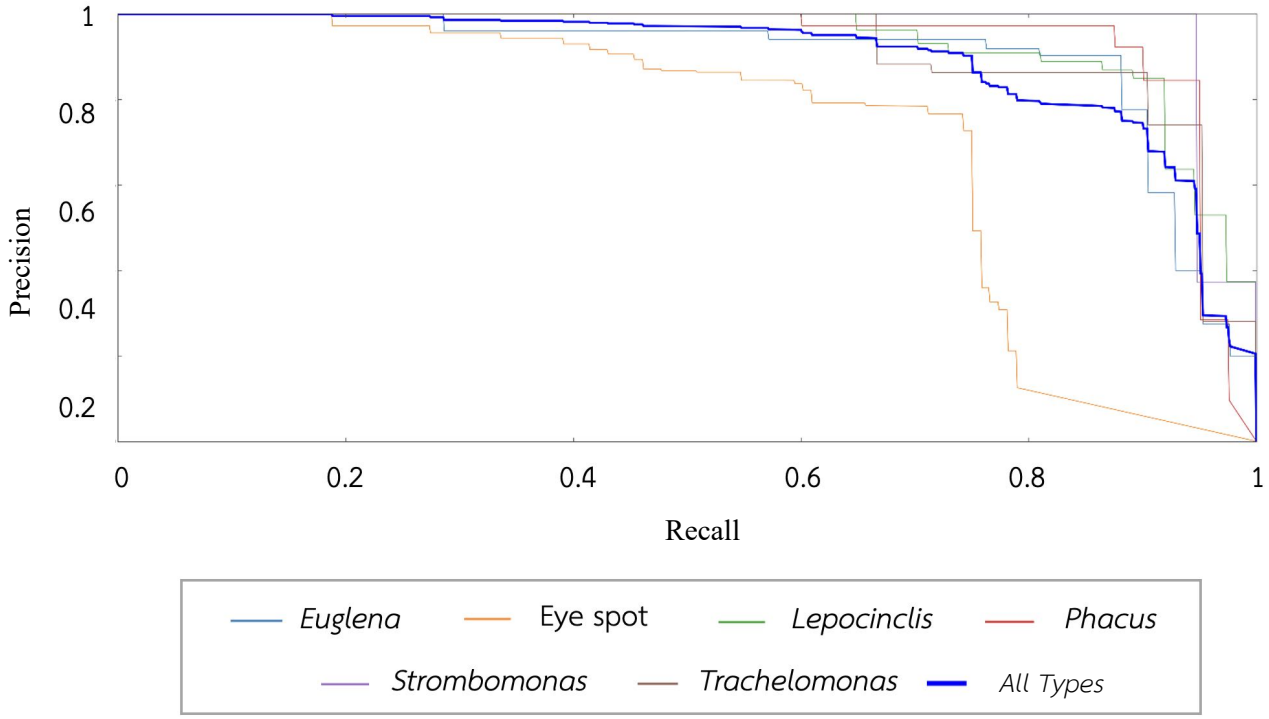


Figure 5 The Precision-Recall curve for the YOLOv5l model for *Euglena*, Eye spot, *Lepocinclis, Phacus, Strombomonas, Trachelomonas*, and *All Types*.

graph indicates that the model exhibits both high precision and high recall, meaning it has a low rate of false positives and false negatives. The interpretation of the area under the graph is similar to that of the F1-score mentioned earlier, as it is a single variable that can be used to compare both accuracy and recall without bias or distortion in assessing the model's performance.

From Figure 5, it can be observed that the model can detect eye spots with low efficiency, while the groups of euglenoids have higher efficiency. Therefore, it is not feasible to rely on an eye spot for identifying the type of euglenoid, as the model's ability to detect euglenoids is better than that of eye spot.

In the confusion matrix shown in Figure 6, it is found that the model correctly identified the species *Lepocinclis* and *Phacus* with accuracies of 84% and 82%, respectively. The most common misclassification was observed for *Lepocinclis*, which was misclassified as *Euglena*, *Phacus*, and *Trachelomonas*, while *Phacus* was misclassified as *Euglena* and *Trachelomonas*, as well as being labeled as the background in the image. The model correctly identified *Euglena* with an accuracy of 88% but misclassified it as *Lepocinclis* and *Trachelomonas*. Conversely, there were two instances of misclassification: one for *Strombomonas*, which was correctly identified 95% of the time but misclassified as *Trachelomonas*, and one for *Trachelomonas*, which was correctly identified 90% of the time but misclassified as *Euglena*.

Furthermore, the confusion matrix indicates that the model has difficulty distinguishing between eye spots and backgrounds (to be more specific, when there is no object in the image). Backgrounds are often misclassified as eye spots up to 75% of the time, suggesting that the model still struggles to differentiate between eye spots and backgrounds.

It can be observed that each genus had misclassifications, mainly because some species exhibit similar morphological characteristics. For instance, *Phacus* sp. resembles a green leaf-like structure, and sometimes, it may lack color due to not being exposed to sunlight. This led the model to misclassify some of them as background rather than detecting them as part of the sample. Additionally, eye spots exhibit various colors, such as dark green, red, transparent red, and white, all of which are

colors found in *Euglena* spp. Consequently, the model struggled to differentiate between the colors of *Euglena* spp. and the colors of the eye spots, resulting in low accuracy in eye spot identification. Furthermore, some genera of euglenoids share similar morphological features from certain angles, making it challenging to distinguish between them, such as *Phacus* sp. and *Trachelomonas* sp.

With current information, the model could infer that the water source under study is hypereutrophic. However, further work must be done to develop a water quality assessment program capable of calculating AARL-PP scores because the assessment requires identifying and counting all phytoplankton genera in Peerapormpisal (2007), which exceeds the number of genera considered in this study. Therefore, to develop an accurate AARL-PP score calculation program, it is necessary to create a model that can identify all phytoplankton genera in Peerapormpisal (2007) and validate the program's scores against other water quality indicators such as DO and BOD values over various time periods and sampling locations.

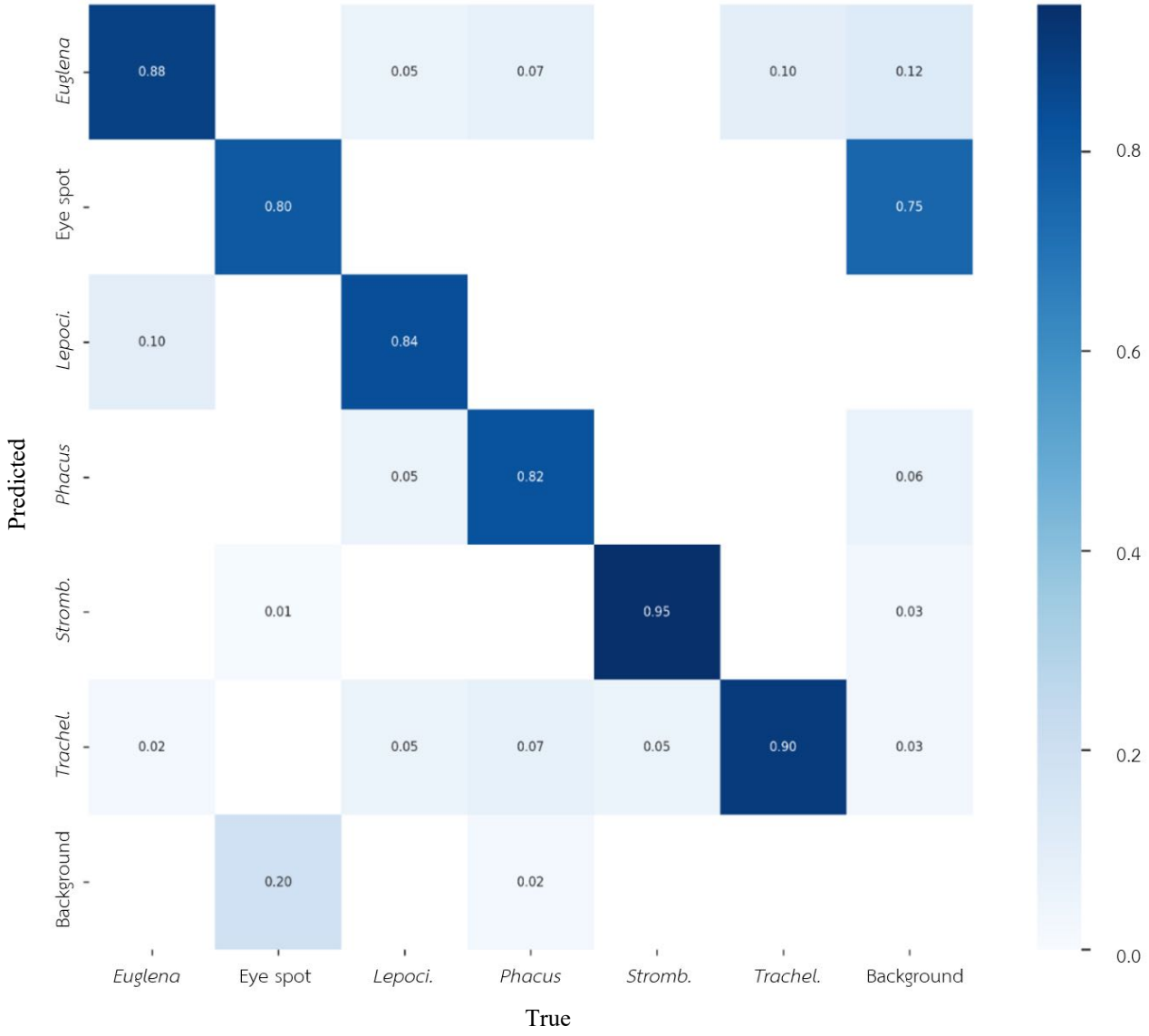


Figure 6 Confusion matrix of YOLOv5l, showing the truth and the predictions, dark blue represents a proportion of 1.0, while white represents 0.0. The intensity of the color corresponds to the proportion of data in each cell

IV. CONCLUSION

In the water quality assessment, the identification of various phytoplankton genera is crucial. However, the freeform morphology within euglenoids makes species identification challenging, leading to high error rates. To mitigate this issue, a deep learning model was developed to reduce errors in species identification and further extended into a water quality assessment program, the AARL-PP scoring system. The YOLOv5l model achieved an F1-score of 0.856, the highest among the eight tested models. It demonstrated efficient detection of *Euglena, Phacus, Trachelomonas, Lepocinclis,* and *Strombomonas* species with similar performance levels, while unable to identify eye spots. This model exhibited high accuracy and low misclassification rates. In the future, it is possible to enhance the program by developing a model capable of identifying all phytoplankton genera in Peerapormpisal, Y. *et al.* (2007). Subsequently, the program's scores can be validated against other water quality indicators.

V. REFERENCES

Guiry, M.D., *in* Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2017, December 30). *AlgaeBase.* World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org

Guiry, M.D., *in* Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2018, January 1). *AlgaeBase.* World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org

Guiry, G.M., *in* Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (04 March 2022). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org

IBM. (2024). *What is deep learning?* https://www.ibm.com/topics/deep-learning

Jocher, G., Chaurasia, A., Stoken, A., Borovec, J. & Kwon, Y. (2022). ultralytics/yolov5: v7.0 - YOLOv5 SOTA Realtime Instance Segmentation (v7.0). *Zenodo.* https://doi.org/10.5281/zenodo.7347926

Molinari Novoa, E.A., *in* Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (10 May 2021). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org

Peerapormpisal, Y., Pekkoh, J., Powangprasit, D., Tonkhamdee, T., Hongsirichat, A. & Kunpradid, T. (2007). Assessment of Water Quality in Standing Water by Using Dominant Phytoplankton (AARL- PP Score). J*ournal of Fisheries Technology Research, 1*(1): 71-81.

Simachaya, W. (2003). A decade of water quality monitoring in Thailand's four major rivers: the results and the implications for management. *6th International Conference on the Environmental Management of Enclosed Coastal Seas*, November 18-21, 2003, Bangkok, Thailand.

Solito de Solis. (2020, August 31). *Strombomonas gibberosa* [Video]. Youtube. https://youtu.be/0kJilYOjqF0

Solito de Solis. (2020, September 2). *Strombomonas eurystoma* [Video]. Youtube. https://youtu.be/lrmUDwzsef0

Solito de Solis. (2020, September 26). *Lepocinclis spirogyroides* [Video]. Youtube. https://youtu.be/CsxC2KcrnZs

Solito de Solis. (2022, March 27). *Lepocinclis fusca* [Video]. Youtube. https://youtu.be/87Tlb1FeQ-8

Wongrat, L., Wongrat, P., & Ruangsomboon, S. (2017). Freshwater Phytoplankton in Thailand I: Euglenophyceae. *Kasetsart University Fishery Research Bulletin, 27*: 1–34.

Wu, Y., Kirillov, A., Massa, F., Lo, W. & Girshick, R. (2019). *Detectron2.* Github. https://github.com/facebookresearch/detectron2

Acknowledgments

This research has been successfully completed thanks to the kindness and valuable assistance from Tanyaratana Dumkua and Associate Professor Dr. Orawan Chaowalit. They generously devoted their time to provide guidance throughout the research process, including reviewing and correcting deficiencies from the beginning until completion. Special thanks to the faculty members in the Department of Biology and Health sciences for their advice and support. Gratitude also goes to Dr. Jiroat Sangrattanaprasert for his assistance in equipment usage. Lastly, sincere appreciation to Mahidol Wittayanusorn School for providing material and equipment support as well as facilitating the dissemination of research findings. Ultimately, thanks to the Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology (IPST) for organizing programs to develop environmental innovations, providing guidance, and offering financial support for future research endeavors.

โมเดลเรียนรู้เชิงลึกสำหรับตรวจจับแพลงก์ตอนพืชในแหล่งน้ำ เพื่อเป็นต้นแบบในการประเมินคุณภาพน้ำ

รวิทย์ ผ่านภูวงษ์[1*], จิรวัฒน์ อมรโอภาสเสถียร[1], กันต์ธร ไข่มุกข์[1]
ธัญญรัตน์ ดำเกาะ[1]และ อรวรรณ เชาวลิต[2]
[1]โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย
[2]ภาควิชาคอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
*rawit.pha_g31@mwit.ac.th

บทคัดย่อ
ในประเทศไทย มีรายงานการพบยูกลีนอยด์ในสกุล Euglena, Phacus, Trachelomonas, Lepocinclis และ Strombomonas ซึ่งส่วนใหญ่พบในแหล่งน้ำที่มีอินทรียวัตถุมาก ยูกลีนอยด์หลายชนิดจึงถูกใช้บ่งชี้คุณภาพน้ำเสียจนถึงเสียมาก ยูกลีนอยด์กลุ่มนี้มีสัณฐานอิสระทำให้การระบุสกุลและนับจำนวนมีโอกาสผิดพลาดสูง รายงานนี้เสนอโปรแกรมตรวจจับวัตถุเพื่อลดความผิดพลาดดังกล่าว ข้อมูลภาพของยูกลีนอยด์ทั้ง 5 สกุลถูกรวบรวมตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม ค.ศ. 2022 ด้วยกล้องดิจิตอลสำหรับกล้องจุลทรรศน์และกล้องโทรศัพท์จากการส่องตัวอย่างน้ำจากคลองมหาสวัสดิ์ จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย ชุดข้อมูลถูกกำหนดขอบเขตวัตถุบนรูปภาพและฝึกฝนโปรแกรมด้วยโมเดลเรียนรู้เชิงลึก 4 โมเดลได้แก่ Detectron2, YOLOv5, YOLOv7 และ YOLOv8 วัดค่าความแม่นยำและความไวของโมเดลและปรับปรุงโมเดลด้วยการแต่งเติมรูปภาพเพื่อครอบคลุมความเป็นไปได้ของภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โมเดลดีที่สุดคือโมเดล YOLOv5l มีค่าความแม่นยำและความไวเท่ากับ 0.839 และ 0.873 ตามลำดับ โมเดลนี้มีประสิทธิภาพสูงในแง่ของความถูกต้อง โดยมีอัตราการระบุสกุลผิดที่ต่ำ

คำสำคัญ การประเมินคุณภาพน้ำ, ยูกลีนอยด์, การตรวจจับวัตถุ, การเรียนรู้เชิงลึก

1. บทนำ

การวัดคุณภาพน้ำเป็นสำคัญในงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มีหลายวิธีในการทดสอบคุณภาพน้ำ เช่น การตรวจสอบสี ความสามารถในการส่งผ่านแสง คุณสมบัติทางเคมีเช่น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ความเป็นกรด-เบส ความเค็ม และคุณสมบัติทางชีวภาพเช่น ค่า BOD และการวัดความหลากหลายและปริมาณของสิ่งมีชีวิตในน้ำ การขยายตัวของชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศไทยก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในแม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำท่าจีน เช่น ค่า DO ต่ำ ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนสูงและค่า BOD สูง (Simachaya, W., 2003) ซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ น้ำที่มีคุณภาพแตกต่างกันจะมีสิ่งมีชีวิตชนิดและปริมาณที่แตกต่าง จึงใช้สิ่งมีชีวิตบางชนิดในการประเมินคุณภาพน้ำ

งานวิจัยนี้ใช้ข้อมูลการบ่งชี้คุณภาพน้ำโดยใช้แพลงก์ตอนคือคะแนน AARL-PP (Assessment of Water Quality in Standing Water by Using Dominant Phytoplankton) ของยุวดี พีรพรพิศาล (2007) ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้สารเคมีและบ่งชี้คุณภาพน้ำได้ในช่วงเวลาอย่างกว้าง การประเมินวิธีนี้ใช้ค่าคะแนน 2 ส่วนในการประเมิน ส่วนที่ 1 เป็นการสร้างคะแนนมาตรฐานคุณภาพน้ำโดยอิงระดับสารอาหารแบ่งแต่ละระดับโดยใช้ประสบการณ์ที่มีมาก่อนดังตารางที่ 1 ในขณะที่ส่วนที่ 2 เป็นการให้คะแนนแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นที่ปรากฏในแหล่งน้ำซึ่งมีคุณภาพต่าง

ค่าคะแนน	คุณภาพน้ำโดยอิงระดับสารอาหาร	คุณภาพน้ำทั่วไป
1.0 - 2.0	ดี	สะอาด
2.1 - 3.5	ดีถึงปานกลาง	สะอาดถึงปานกลาง
3.6 - 5.5	ปานกลาง	ปานกลาง
5.6 - 7.5	ปานกลางถึงไม่ดี	ปานกลางถึงมลพิษ
7.6 - 9.0	ไม่ดี	มลพิษ
9.1 - 10.0	ไม่ดีมาก	มลพิษมาก

ตารางที่ 1 ค่าคะแนนคุณภาพน้ำอิงระดับสารอาหารและทั่วไป

กัน โดยให้คะแนน 1 - 10 คะแนนน้อยจะบ่งชี้คุณภาพน้ำดี ส่วนคะแนนมากจะบ่งชี้คุณภาพน้ำไม่ดี การศึกษาคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำที่ศึกษา ทำได้โดยรวบรวมแพลงก์ตอนพืชมาวินิจฉัยและนับจำนวนมากน้อยของแต่ละสกุล นำสกุลเด่นซึ่งเรียง

ตามลำดับความมากน้อย 3 - 5 สกุล ให้คะแนนระดับคุณภาพน้ำจากส่วนที่ 2 หาค่าเฉลี่ยแล้วนำไปเปรียบเทียบกับคะแนนมาตรฐานคุณภาพน้ำในส่วนที่ 1 จะสามารถหาคุณภาพน้ำได้ มีการทดลองใช้การประเมินนี้ ในแหล่งน้ำ 50 แห่งในภาคเหนือ ส่วนภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ภาคละ 20 แห่ง ผลปรากฏว่าให้ความถูกต้องมากกว่าร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมี เช่นค่า BOD ค่า DO

เลือกศึกษายูกลีนอยด์ 5 สกุล โดยสกุล Euglena, Phacus, Trachelomonas และ Strombomonas มีคะแนนเท่ากับ 10, 8, 8 และ 8 ตามลำดับ ในขณะที่สกุล Lepocinclis ยังไม่มีคะแนน เนื่องจากสิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้มีคะแนน AARL-PP สูง ดังนั้นแหล่งน้ำที่พบยูกลีนอยด์มักจะเป็นน้ำคุณภาพไม่ดีมาก (Hypereutrophic status)

แต่อย่างไรก็ตาม ยูกลีนอยด์สามารถเปลี่ยนแปลงสัณฐานได้อย่างอิสระ ทำให้มีโอกาสที่จะระบุสกุลผิดได้ เนื่องจากสมาชิกยูกลีนอยด์ต่างสกุลมีคะแนน AARL-PP ต่างกัน การระบุสกุลของสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องมีผลต่อคะแนนและความเที่ยงตรงในการประเมินคุณภาพน้ำ งานวิจัยนี้จึงเสนอโปรแกรมตรวจจับวัตถุเพื่อลดความผิดพลาดดังกล่าว เพื่อสร้างโปรแกรมที่สามารถระบุสกุลยูกลีนอยด์ออกจากแพลงก์ตอนชนิดอื่นและสิ่งปนเปื้อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ เพื่อในอนาคตผู้วิจัยสามารถต่อยอดนำข้อมูลยูกลีนอยด์ในฐานะตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Bio indicator) จากโปรแกรมมาใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำด้วยการอ้างอิงตามคะแนน AARL-PP ด้วยความเที่ยงตรง หนึ่งในวิธีการแก้ปัญหาที่ถูกเสนอคือการตรวจจับอายสปอต (Eye spot) เนื่องจากอายสปอตเป็นออร์แกแนลล์คล้ายเม็ดสี มักพบในยูกลีนอยด์ ใช้ในการรับแสง ดังนั้นถึงแม้สัณฐานของยูกลีนอยด์จะอิสระมาก การตรวจจับอายสปอตยังคงสามารถช่วยในการระบุยูกลีนอยด์

การเรียนรู้เชิงลึก (Deep Learning) คือวิธีการเรียนรู้แบบอัตโนมัติด้วยการเลียนแบบการทำงานของโครงข่ายประสาทของมนุษย์ โดยนำระบบโครงข่ายประสาท (Neural Network) มาซ้อนกันหลายชั้น (Layer) และทำการเรียนรู้ข้อมูลตัวอย่าง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในการตรวจจับรูปแบบหรือจัดหมวดหมู่ข้อมูล หลักการของทุกโมเดลคือแบ่งภาพในชุดข้อมูลเป็นหลายส่วน ประมวลแต่ละส่วนด้วยสมการที่เชื่อมโยงกันคล้ายโครงข่ายประสาท แสดงผลลัพธ์ออกมาและทุกครั้งที่แสดงผลลัพธ์จะมีการเปลี่ยนแปลงบางพารามิเตอร์ในสมการจนกว่าผลลัพธ์จะตรงกับต้นแบบที่ออกแบบ ในโมเดลแต่ละโมเดลมีการออกแบบระบบโครงข่ายประสาทและจำนวนชั้นที่แตกต่างกันเกิดเป็นโมเดลการเรียนรู้ที่มีประสิทธิภาพการเรียนรู้หลากหลายรูปแบบ ซึ่งสามารถชี้วัดประสิทธิภาพเหล่านี้ด้วยค่าสำหรับการประเมิน (Evaluation metrics) เช่นค่าความแม่นยำ ค่าความไว คะแนนเอฟวัน (IBM, 2024)

สำหรับการสร้างโมเดลตรวจจับวัตถุ เริ่มจากการเลเบลตำแหน่งของวัตถุเพื่อบอกตำแหน่งและลักษณะของวัตถุให้โปรแกรมเรียนรู้ แล้วนำข้อมูลออกแยกเป็น 3 ชุดได้แก่ชุดสำหรับฝึกฝน (Training set) ชุดสำหรับการตรวจสอบ (Validation set) และชุดสำหรับการทดสอบ (Testing set) เป็นสัดส่วนที่ต้องการ เพื่อให้โปรแกรมฝึกฝนเรียนรู้ตามหลักการที่กล่าวไป ตรวจสอบโปรแกรมกับชุดตรวจสอบและทดสอบจริง

2. การทดลอง

การเก็บตัวอย่างและการเตรียมชุดข้อมูล

สรุปการวิจัยได้รวบรวมตัวอย่างน้ำจากพิกัด 13°48'25"N, 100°17'3"E ที่คลองมหาสวัสดิ์ ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม ตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงตุลาคม ค.ศ. 2022 ด้วยตาข่ายขนาด 21 ไมครอน และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงไบรท์ฟิลด์กับการขยาย 400 เท่า เพื่อบันทึกภาพสัณฐานวิทยาของ Euglena spp., Phacus spp., Trachelo-monas spp., Lepocinclis spp. และ Strombo-monas spp. จำแนกสกุลและเตรียมชุดข้อมูลทั้งหมดอ้างอิงจาก Wongrat, L. และคณะ (2017) และฐานข้อมูล AlgeaBase จัดทำโดย M.D. & Guiry, G.M. ดังตารางที่ 2 นอกจากนี้ยังรวบรวมชุดข้อมูลภาพเคลื่อนไหวจาก Solito de Solis (2020) และนำมาคัดเลือกภาพตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยต้องมีอย่างน้อย 1 สกุลของยูกลีนอยด์จาก 5 สกุลและมีสิ่งมีชีวิตอื่นอย่างเช่น สาหร่ายและมีสิ่งปนเปื้อน เช่น เศษตะกอนในน้ำ ภาพไม่จำกัดสี ความสว่าง และค่ารูรับแสงจากกล้องจุลทรรศน์ และไม่จำกัดความละเอียดของภาพที่ถูกเลือกไว้ในการวิจัยนี้

รวบรวมเกณฑ์การระบุสกุลและรวบรวมรูปภาพของยูกลีนอยด์ที่ผ่านการคัดเลือก นำรูปภาพมาระบุสกุล ตำแหน่งของยูกลีนอยด์แต่ละตัวบนรูปภาพเรียกกระบวนนี้ว่าการเลเบล (Labeling) เลเบลด้วยกล่องกำหนดขอบเขต (Bounding box) โดยมีเกณฑ์ในการเลเบลภาพจะได้ชุดข้อมูล 2 ชุดได้แก่ชุดข้อมูลที่เลเบลด้วยกล่องกำหนดขอบเขตและชุดข้อมูลที่เลเบลแบบแบ่งส่วน (Instance segmentation) นำข้อมูลออกแยกเป็น 3 ชุดได้แก่ชุดสำหรับฝึกฝน (Training set) ชุดสำหรับการตรวจสอบ (Validation set) และชุดสำหรับการทดสอบ (Testing set) เป็นสัดส่วนร้อยละ 70, 20 และ 10 ตามลำดับ จากการรวบรวมชุดข้อมูลจากตัวอย่างน้ำและแหล่งภายนอกได้รูปภาพของ Euglena spp., Phacus spp., Trachelomonas spp., Lepocinclis spp. และ Strombomonas spp. ที่สามารถนำไปใช้ต่อได้จำนวน 284, 180, 115, 187 และ 102 ภาพตามลำดับ

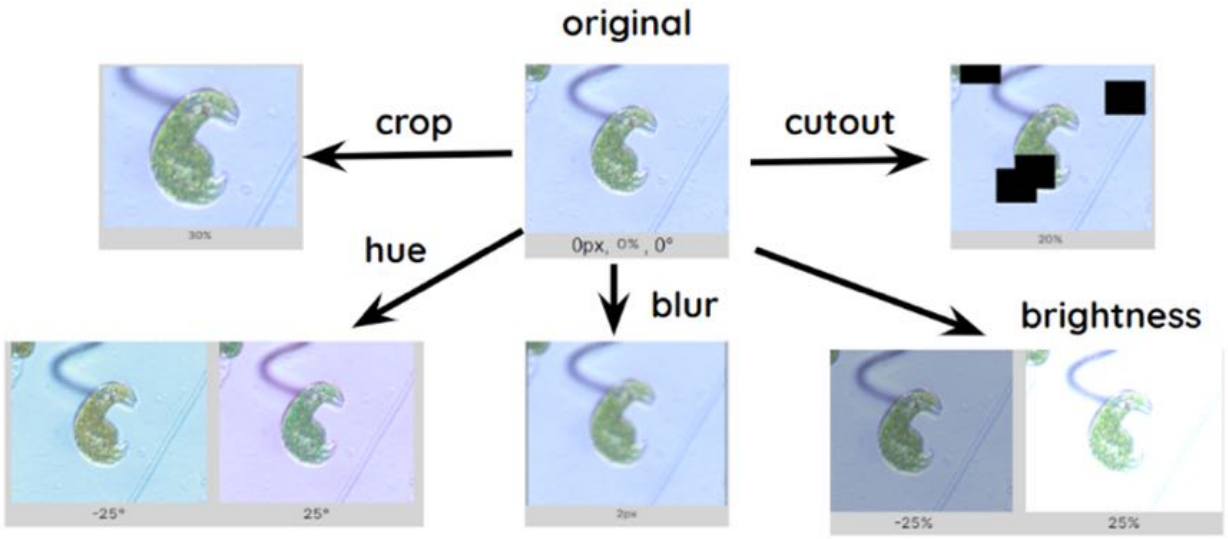
หลังจากการนำภาพไปเลเบลแล้วจะนำภาพที่ได้ทำการแต่งเติมชุดข้อมูลภาพ (Image augmentation) เพื่อจำลองปัจจัยในภาพที่ส่งผลต่อการระบุสกุลได้แก่ ความสว่างและสีของแสงจากกล้องจุลทรรศน์ โฟกัสและความคมชัดของภาพ ตำแหน่งของสัณฐานยูกลีนอยด์และสิ่งกีดขวางภาพ สามารถแต่งเติมด้วยหลากหลายวิธีได้แก่การครอบตัดภาพ (Crop) ร้อยละ +0 ถึง +30 การเปลี่ยนแปลงสี (Hue) ร้อยละ -25 ถึง +25 การตัดภาพบางส่วน (Cutout) ร้อยละ 20 ความขุ่นมัว (Blur) ค่า 0 ถึง 2 พิกเซลและความสว่าง (Brightness) ร้อยละ -25 ถึง +25 และเพิ่มจำนวนชุดข้อมูลเป็น 2,055 ภาพจะได้ผลลัพธ์ดังรูปที่ 1

การสร้างโมเดลค่าโครงข่ายการเรียนรู้เชิงลึก

สร้างโมเดลโครงข่ายการเรียนรู้เชิงลึกจากโมเดล 4 แบบได้แก่ Detectron2, YOLOv5, YOLOv7 และ YOLOv8 โดยสร้างโมเดลการเรียนรู้ของโมเดลย่อยของ YOLOv5 ได้แก่ YOLOv5s, YOLOv5n, YOLOv5m, YOLOv5l และ YOLOv5x หลักการของโมเดลโครงข่าย

สกุลของยูกลีนอยด์	ที่มาของชุดข้อมูล	ที่มาของเกณฑ์การจำแนก
Euglena Ehrenberg, 1830	ภาพถ่ายจากตัวอย่างน้ำจากคลองมหาสวัสดิ์ จ.นครปฐม	M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2017)
Phacus Dujardin, 1841		E.A. Molinari Novoa in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2021)
Trachelomonas Ehrenberg, 1834		M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2017)
Lepocinclis Perty, 1849	ภาพถ่ายจากตัวอย่างน้ำจากคลองมหาสวัสดิ์ จ.นครปฐมและจาก Solito de Solis (2020)	G.M. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2022)
Strombomonas Deflandre, 1930		M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2018)

ตารางที่ 2 ตารางที่มาของชุดข้อมูลและเกณฑ์ที่ใช้จำแนกสกุลของยูกลีนอยด์



รูปที่ 1 ผลลัพธ์ชุดข้อมูลที่ผ่านการแต่งเติม (Image augmentation)

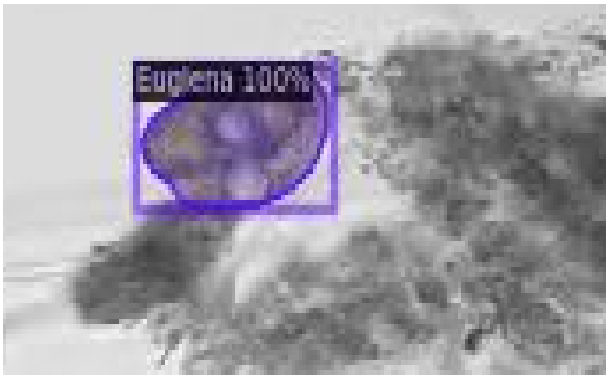
การเรียนรู้เชิงลึกคือแบ่งภาพในชุดข้อมูลเป็นหลายส่วน ประมวลแต่ละส่วนด้วยสมการ แสดงผลลัพธ์ออกมาและทุกครั้งที่แสดงผลลัพธ์จะมีการเปลี่ยนแปลงสมการจนกว่าผลลัพธ์จะตรงกับโมเดลที่ออกแบบฝึกฝน โมเดล YOLO มีขนาดโมเดลที่เหมาะสมกับขนาดชุดข้อมูลที่แตกต่างกัน ซึ่งระบุขนาดโมเดลที่ตัวอักษรสุดท้ายของชื่อโมเดลเช่น s แทนขนาดเล็ก (Jocher, G., 2022) ปัจจุบันมีการพัฒนาจนถึงเวอร์ชันที่ 8 เรียกว่า YOLOv8 แต่อย่างไรก็ตามโมเดลเวอร์ชันที่ 5 หรือ YOLOv5 เป็นที่นิยมใช้มากที่สุด ในขณะที่โมเดล Detectron เป็นโมเดลขั้นตอนวิธีในการตรวจจับวัตถุที่มีความเร็วสูงและนำไปใช้งานได้อย่างยืดหยุ่น (Wu, Y., 2019)

ทำการเรียนรู้โมเดลด้วยจำนวนรอบการเรียนรู้ (Epoch) เท่ากับ 300 ครั้ง ตรวจสอบค่าสำหรับการประเมิน (Evaluation metrics) ซึ่งมีหลากหลายได้แก่ ค่าความถูกต้องในการจำแนก (Classification accuracy) ค่าความแม่นยำ (Precision) ค่าความไว (Recall/Sensitivity) และคะแนนเอฟวัน (F1-score) โดยคะแนนเอฟวันมักถูกใช้ในการเปรียบเทียบโมเดลการเรียนรู้ โมเดลที่มีคะแนนเอฟวันสูงกว่า จะมีความสามารถในการจำแนกมากกว่า แต่ละค่ามีสูตรคำนวณดังนี้ โดยสูตรคำนวณจากจำนวนของ True Positive (TP), True Negative (TN), False Positive (FP) และ False Negative (FN) ตามลำดับ ค่าความถูกต้องในการจำแนกคำนวณจากสัดส่วนระหว่างจำนวน TP + TN ต่อจำนวน TP + TN + FP + FN ค่าความแม่นยำคำนวณจากสัดส่วนระหว่างจำนวน TP ต่อจำนวน TP + FP ค่าความไวคำนวณจากสัดส่วนระหว่างจำนวน TP ต่อจำนวน TP + FN และคะแนนเอฟวันเป็นค่าเฉลี่ยฮาร์มอนิกของค่าความถูกต้องกับค่าความไว

นอกจากนี้มีการประเมินค่าเฉลี่ยของความแม่นยำที่ IoU Threshold เท่ากับ k หรือค่า mean Average Precision at k (mAP@k) เป็นค่าการประเมิน (Evaluation metrics) ที่เหมาะสมกับการวัดความสามารถของโมเดลที่มีการจำแนกและเรียงอันดับ ซึ่งเหมาะสมกับการใช้ประยุกต์ใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำด้วย AARL-PP Score ในการตรวจจับวัตถุในภาพ (Object detection) ค่า k ที่นิยมใช้คือ 50 ถึง 95

3. ผลและอภิปรายการทดลอง

หลังจากสร้างโมเดลและทดลองป้อนรูปภาพเข้าโปรแกรมพบว่า โมเดลสามารถใช้จับภาพได้ตัวอย่างดังรูปที่ 2 และ 3 บนภาพระบุชื่อสกุลของยูกลีนอยด์ที่ตรวจจับได้ พร้อมกับค่าความเชื่อมั่น ตัวอย่างเช่นรูปที่ 2 ตรวจพบ Euglena sp. ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ

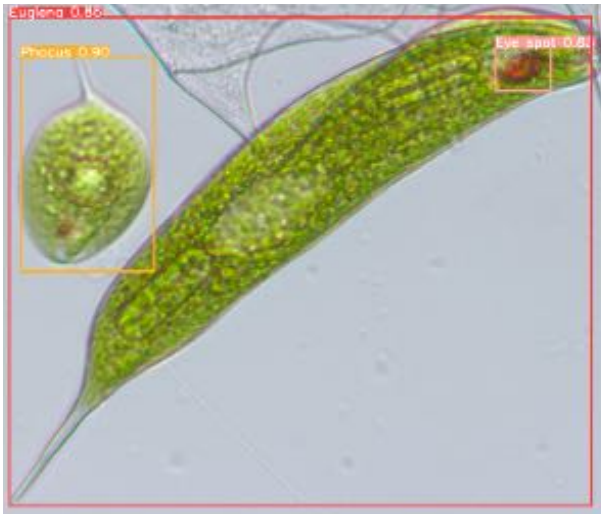


รูปที่ 2 ตัวอย่างการจับภาพของโมเดล Detectron2

100 และรูปที่ 3 ตรวจพบ Euglena sp., Phacus sp., และ อายสปอตด้วยระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 88, 90 และ 83 ตามลำดับ

หลังจากนำรูปภาพที่ได้ไปทำการเรียนรู้ด้วยโมเดลการเรียนรู้เชิงลึกทั้ง 8 โมเดล ได้ผลดังตารางที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบคะแนนเอฟวันของทั้ง 8 โมเดล โดย 8 โมเดลนี้รวมโมเดลย่อยของ YOLOv5 แล้ว โมเดลย่อยของ YOLOv5 หมายถึงขนาดโมเดลที่แตกต่างกันเหมาะสมกับขนาดชุดข้อมูลแทนด้วยตัวอักษรสุดท้ายของชื่อโมเดลเช่น s แทนข้อมูลขนาดเล็ก

โมเดลที่ดีที่สุดคือ YOLOv5l เนื่องจากมีคะแนนเอฟวันสูงสุด คะแนนเอฟวันคือค่าเฉลี่ยฮาร์มอนิกของค่าความแม่นยำและค่าความไว ซึ่งสองตัวแปรนี้เป็นค่าประเมินผลการเรียนรู้ของโมเดลที่มีประสิทธิภาพพิจารณาค่าเฉลี่ยฮาร์มอนิกของทั้งสองตัวแปรจึงเสมือนการพิจารณาทั้งสองตัวแปรโดยไม่ให้น้ำหนักการพิจารณาไปที่ตัวแปรใดและไม่เกิดความลำเอียงในการพิจารณาประสิทธิภาพของโมเดล ซึ่งโมเดลนี้มีรายละเอียดดังจะกล่าวต่อไปแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่าสำหรับการประเมิน (Metrics) ในแต่ละรอบการเรียนรู้ (Epoch) ดังรูปที่ 4



รูปที่ 3 ตัวอย่างการจับภาพของโมเดล YOLOv5

จากรูปที่ 4 พบว่ามีค่า Box loss, Objectness loss และ Classification loss ลดลงในแต่ละรอบการเรียนรู้ทั้งในชุดข้อมูลสำหรับการฝึกฝน (ดังรูปที่ 4A, 4B และ 4C) และชุดข้อมูลสำหรับการตรวจสอบ (ดังรูปที่ 4F, 4G และ 4H) ค่า Box loss แสดงถึงความสามารถของโมเดลในการระบุตำแหน่งกลางของวัตถุที่ตรวจจับและความสามารถในการทำนายกล่องกำหนดขอบเขตรอบวัตถุ ค่า Objectness หมายถึงความน่าจะเป็นที่วัตถุจะอยู่ในพื้นที่ในรูปภาพที่สนใจและ Classification loss แสดงถึงความสามารถของโมเดล

โมเดล	Precision	Recall	F1-score	mAP@50	mAP@50-95
Detectron2	0.833	0.847	0.840	0.915	0.731
YOLOv5					
YOLOv5s	0.871	0.804	0.836	0.844	0.527
YOLOv5n	0.877	0.750	0.809	0.831	0.532
YOLOv5m	0.841	0.858	0.849	0.868	0.687
YOLOv5l	0.839	0.873	0.856	0.894	0.715
YOLOv5x	0.833	0.847	0.840	0.915	0.731
YOLOv7	0.773	0.789	0.781	0.829	0.584
YOLOv8	0.854	0.833	0.803	0.866	0.567

ตารางที่ 3 ผลการเรียนรู้ของแต่ละโมเดล

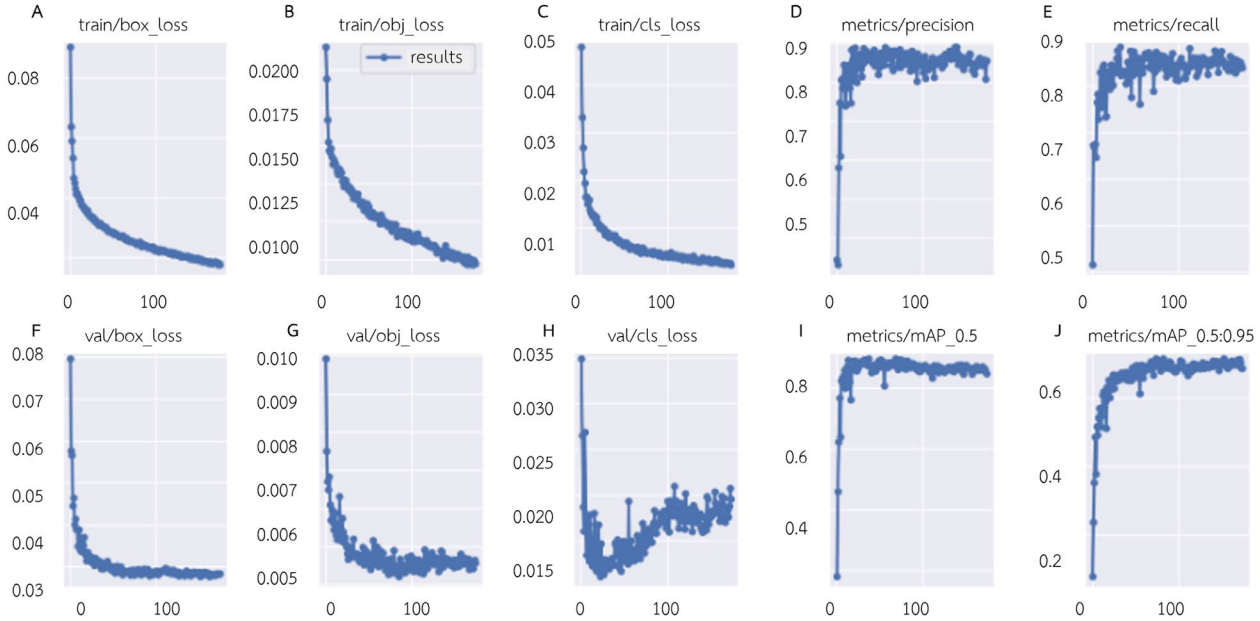
สกุล	Precision	Recall	F1-score	mAP@50	mAP@50-95
Euglena	0.772	0.881	0.822	0.900	0.763
Phacus	0.972	0.863	0.914	0.938	0.834
Trachelomonas	0.732	0.952	0.827	0.921	0.841
Lepocinclis	0.888	0.855	0.871	0.933	0.804
Strombomonas	0.904	0.947	0.925	0.964	0.757

ตารางที่ 4 ผลการเรียนรู้ของแต่ละสกุลของโมเดล YOLOv5l

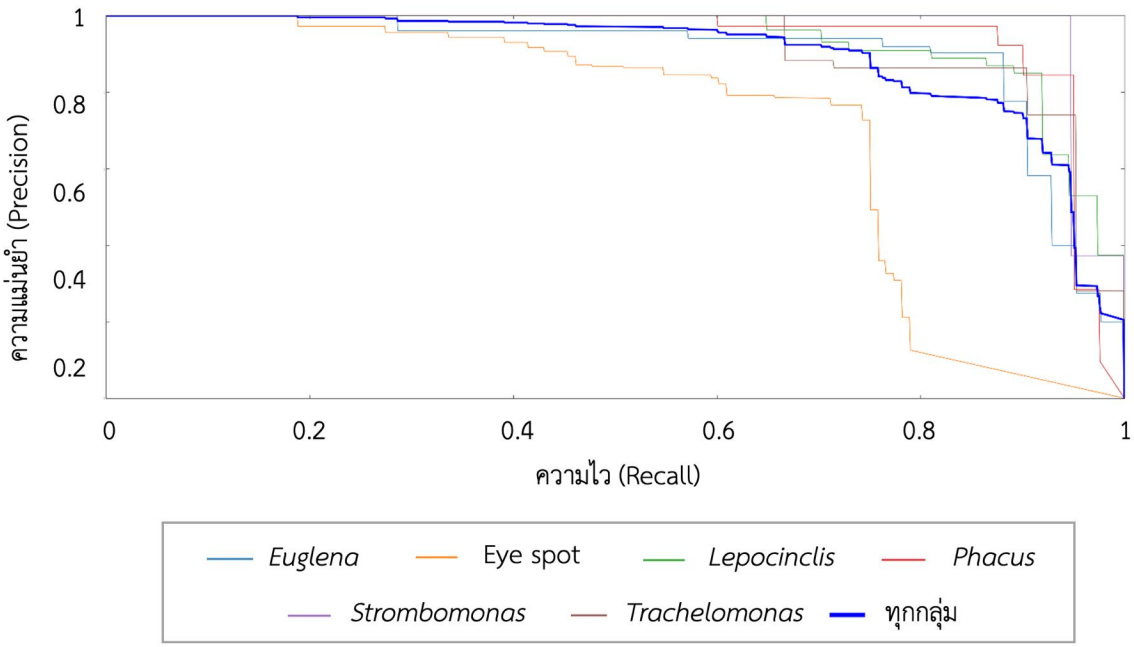
ในการทำนายการจัดจำแนกของวัตถุ ในขณะที่รูปที่ 4D, 4E, 4I และ 4J แสดงถึงค่าสำหรับการประเมิน ได้แก่ความแม่นยำ ความไว ค่า mAP@50 และค่า mAP@50-95 ตามลำดับ ทั้งสี่รูปมีการเพิ่มขึ้นของค่าสำหรับการประเมินแสดงว่าประสิทธิภาพของโมเดลโดยรวมจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบการฝึกฝน

รูปที่ 5 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความแม่นยำและความไว พื้นที่ใต้กราฟของกราฟสามารถแสดงว่าโมเดลมีทั้งความแม่นยำและความไวสูง ซึ่งความแม่นยำสูงหมายถึงอัตราการตรวจจับ False Positive ต่ำและความไวสูงหมายถึงอัตราการตรวจจับ False Negative ต่ำ พื้นที่ใต้กราฟข้างต้นสามารถแปลผลในลักษณะคล้ายกับคะแนนเอฟวันที่กล่าวไป เนื่องจากเป็นตัวแปรเพียงตัวเดียวแต่สามารถใช้ในการเปรียบเทียบตัวแปรทั้งสองตัวนั่นคือความแม่นยำและความไวได้ โดยไม่ให้น้ำหนักการพิจารณาไปที่ตัวแปรใดและไม่เกิดความลำเอียงในการพิจารณาประสิทธิภาพของโมเดล จากรูปที่ 5 แสดงว่าโมเดลสามารถตรวจจับอายสปอตด้วยประสิทธิภาพที่ต่ำมาก ในขณะที่ยูกลีนอยด์กลุ่มอื่นมีประสิทธิภาพที่สูงและค่าใกล้เคียงกัน ทำให้ข้อสันนิษฐานที่จะใช้อายสปอตช่วยในการระบุชนิดของยูกลีนอยด์จึงเป็นไปไม่ได้ เนื่องจากโมเดลสามารถตรวจจับยูกลีนอยด์ได้ดีกว่าอายสปอต

จากเมทริกซ์ความสับสนในรูปที่ 6 พบว่าโมเดลระบุสกุล Lepocinclis และ Phacus ถูกต้องร้อยละ 84 และร้อยละ 82 ตามลำดับ ถือเป็นแพลงก์ตอนที่ถูกระบุผิดเป็นอย่างอื่นจำนวนมากที่สุดคือ 3 อย่าง สกุล Lepocinclis ถูกระบุผิดเป็นสกุล Euglena, Phacus และ Trachelomonas และสกุล Phacus ถูกระบุผิดเป็นสกุล Euglena, Trachelomonas และเป็นพื้นหลังภาพ โมเดลระบุสกุล Euglena ถูกต้องร้อยละ



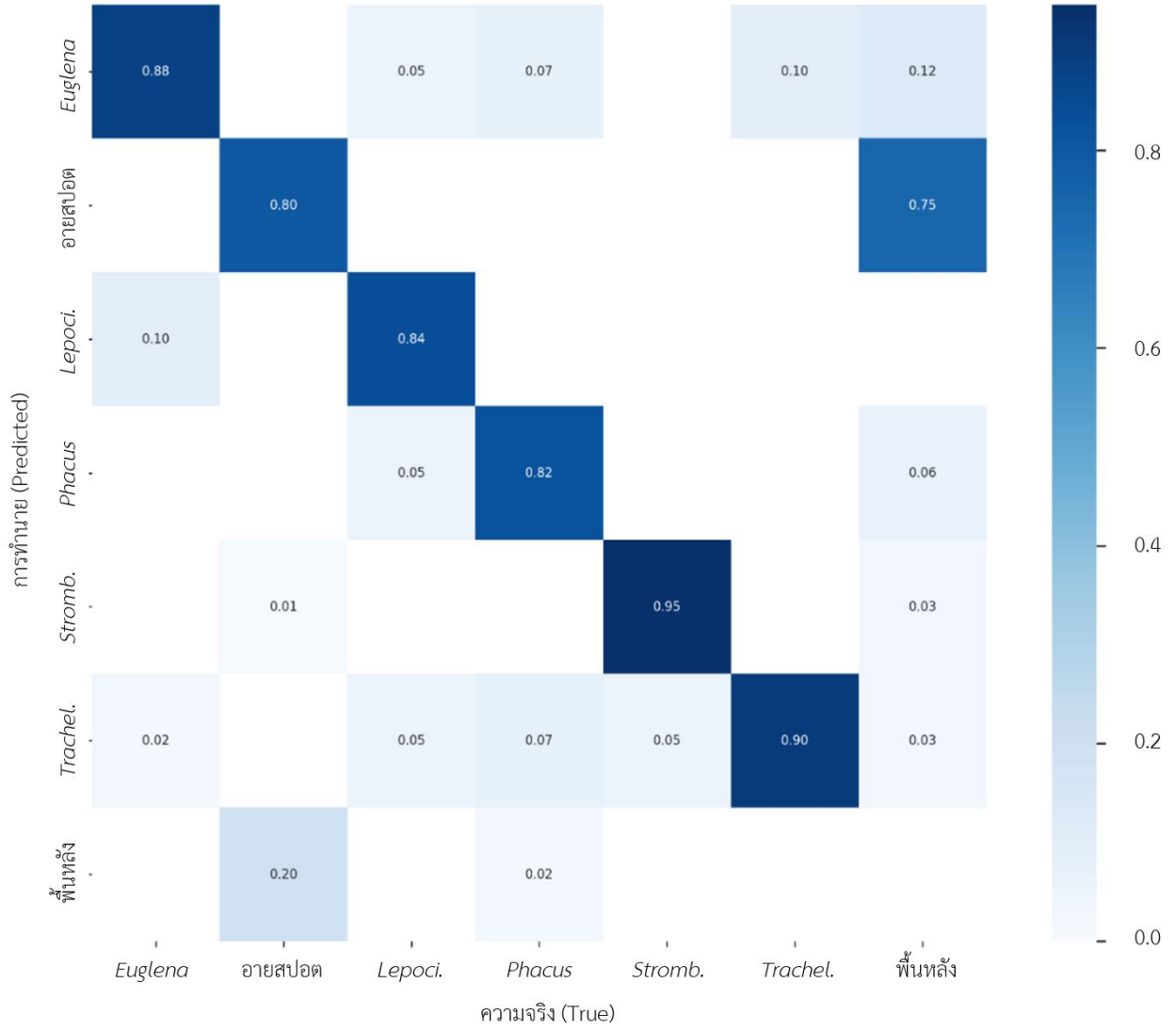
รูปที่ 4 ค่าสำหรับการประเมินในแต่ละจำนวนรอบการเรียนรู้ของโมเดล YOLOv5l ที่ดีที่สุด



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความแม่นยำกับความไว (Precision-Recall curve) ของโมเดล YOLOv5l ของสกุล Euglena, Eye spot, Lepocinclis, Phacus, Strombomonas, Trachelomonas และทุกกลุ่มตามลำดับ

ระบุผิดเป็นสกุล Euglena, Trachelomonas และเป็นพื้นหลังภาพ โมเดลระบุสกุล Euglena ถูกต้องร้อยละ 88 ระบุสกุล Euglena ผิดเป็นสกุล Lepocinclis และ Trachelomonas ในทางตรงกันข้ามมีแพลงก์ตอน 2 สกุลที่ถูกระบุผิดเป็นอย่างอื่น 1 อย่างคือสกุล Strombomonas และสกุล Trachelomonas ถูกต้องร้อยละ 95 และ 90 ตามลำดับ โมเดลระบุสกุล Strom ขbomonas ผิดเป็นสกุล Trachelomonas โมเดลระบุ Trachelomonas ผิดเป็นสกุล Euglena นอกจากนี้เมทริกซ์ความสับสนบ่งชี้ว่า โมเดลมีการระบุอายสปอตและพื้นหลังภาพ (กล่าวคือไม่มีวัตถุใดในภาพ) จะพบว่าภาพพื้นหลังมักถูกระบุผิดเป็นอายสปอตถึงร้อยละ 75 แสดงว่าโมเดลยังไม่สามารถแยกแยะระหว่างอายสปอตกับพื้นหลังได้

จากรูปที่ 6 แพลงก์ตอนแต่ละชนิดถูกระบุผิด เนื่องจากบางสกุลมีลักษณะสัณฐานคล้ายกับสกุลอื่นมาก เช่น Phacus sp. มีลักษณะเป็นแผ่นสีเขียวคล้ายใบไม้ บางครั้ง Phacus sp. ไม่มีสีเนื่องจากไม่ได้อยู่ภายใต้แสงแดด ทำให้โมเดลตรวจจับแพลงก์ตอนสกุลไม่ติดและตีความเป็นพื้นหลังมากกว่าสกุลอื่น รวมถึงอายสปอต (Eye spot) มีสีหลากหลายอาทิ สีเขียวเข้ม สีแดง สีแดงใส สีขาว ซึ่งล้วนเป็นสีของยูกลีนอยด์ ทำให้โมเดลไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างสีของยูกลีนอยด์กับสีของอายสปอตได้ ส่งผลให้ความถูกต้องในการจำแนกอายสปอตต่ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้ไม่พิจารณาการจำแนกอายสปอตของโมเดลการเรียนรู้ นอกจากนี้ยูกลีนอยด์บางสกุลมีสัณฐานในบางมุมมองคล้ายกันทำให้จำแนกยากเช่น Phacus sp. กับ Trachelomonas sp.แต่อย่างไรก็ตามโมเดลสามารถระบุสกุลของยูกลีนอยด์ 5 สกุลและไม่สามารถระบุอายสปอตได้ ด้วยข้อมูลนี้โมเดลสามารถระบุว่าแหล่งน้ำดังกล่าวเป็นน้ำไม่ดีมาก (Hypereutrophic water) ได้ แต่การสร้างโปรแกรมประเมินคุณภาพน้ำที่สามารถคำนวณเป็นคะแนน AARL-PP อย่างทันทียังไม่สามารถคำนวณคะแนนที่แม่นยำได้ เนื่องจากการประเมินคุณภาพน้ำด้วยคะแนน AARL-PP ต้องนับจำนวนแพลงก์ตอนพืชทั้งหมดในยุวดี พีรพรพิศาลและคณะ (2007) ซึ่งมีมากกว่าจำนวนสกุลในงานวิจัยนี้ การพัฒนาโปรแกรมคำนวณคะแนน AARL-PP ได้ทันทีต้องสร้างโมเดลที่สามารถระบุแพลงก์ตอนพืชทั้งหมดในงานวิจัยของยุวดี พีรพรพิศาลและคณะ (2007) และทดลองตรวจสอบคะแนนที่ได้จากโปรแกรมกับตัวบ่งชี้วัดคุณภาพน้ำอื่น เช่นค่า DO ค่า BOD ในหลายช่วงเวลาและหลายสถานที่เก็บตัวอย่าง



รูปที่ 6 เมทริกซ์ความสับสน (Confusion matrix) ของโมเดล YOLOv5l ระหว่างแพลงก์ตอนจริงบนรูปภาพและการทำนายโดยโมเดล โดยสีน้ำเงินเข้มแทนสัดส่วนเท่ากับ 1.0 สีขาวแทนสัดส่วนเท่ากับ 0.0 โดยสัดส่วนของข้อมูลในแต่ละช่องแปรผันตรงกับความเข้มของสี

4. สรุปผลการทดลอง

ในการประเมินคะแนนคุณภาพน้ำใช้การระบุสกุลของแพลงก์ตอนพืชหลายสกุล แต่ยูกลีนอยด์มีสัณฐานอิสระของยูกลีนอยด์ทำให้ยากต่อการระบุสกุลนำไปสู่ความคลาดเคลื่อนสูง โมเดลการเรียนรู้เชิงลึกจึงสร้างขึ้นเพื่อลดความผิดพลาดในการระบุสกุลและต่อยอดเป็นโปรแกรมการประเมินคะแนนคุณภาพน้ำคะแนน AARL-PP พบว่าโมเดล YOLOv5l มีคะแนนเอฟวันเท่ากับ 0.856 ซึ่งมีค่าสูงสุดในโมเดลทั้ง 8 โมเดลที่ทดสอบ โมเดลสามารถตรวจจับยูกลีนอยด์สกุล Euglena, Phacus, Trachelomonas, Lepocinclis และ Strombomonas ได้ด้วยประสิทธิภาพใกล้เคียงกันและไม่สามารถระบุอายสปอตได้ โมเดลนี้มีประสิทธิภาพสูงในแง่ของความถูกต้อง โดยมีอัตราการระบุสกุลผิดที่ต่ำ ในอนาคตสามารถพัฒนาโปรแกรมโดยการสร้างโมเดลที่สามารถระบุแพลงก์ตอนพืชทุกสกุลในงานวิจัยของยุวดี พีรพรพิศาลและคณะ (2007) และทดลองตรวจสอบคะแนนที่ได้จากโปรแกรมกับตัวบ่งชี้วัดคุณภาพน้ำอื่น

5. อ้างอิง

ยุวดี พีรพรพิศาล, จีรพรเพกเกาะ, ดวงกมล โพธิ์หวัง ประสิทธิ์, ธนพล ทนคำดี, อดินุช หงษสิริชาติ และทัตพร คุณประดิษฐ์. 2007. การประเมินคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำนิ่งโดยใช้แพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นด้วย AARL–PP Score. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง, 1(1): 71-81.

E.A. Molinari Novoa in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (10 May 2021). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org

G.M. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (04 March 2022). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org

IBM. (2024). What is deep learning? https://www.ibm.com/topics/deep-learning

Jocher, G., Chaurasia, A., Stoken, A., Borovec, J. & Kwon, Y. (2022). ultralytics/yolov5: v7.0 - YOLOv5 SOTA Realtime Instance Segmentation (v7.0). Zenodo. https://doi.org/10.5281/zenodo.7347926

M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2017, December 30). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org

M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2018, January 1). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org

Simachaya, W. (2003). A decade of water quality monitoring in Thailand's four major rivers: the results and the implications for management. 6th International Conference on the Environmental Management of Enclosed Coastal Seas, November 18-21, 2003, Bangkok, Thailand.

Solito de Solis. (2020, August 31). Strombomonas gibberosa [Video]. Youtube. https://youtu.be/0kJilYOjqF0

Solito de Solis. (2020, September 2). Strombomonas eurystoma [Video]. Youtube. https://youtu.be/lrmUDwzsef0

Solito de Solis. (2020, September 26). Lepocinclis spirogyroides [Video]. Youtube. https://youtu.be/CsxC2KcrnZs

Solito de Solis. (2022, March 27). Lepocinclis fusca [Video]. Youtube. https://youtu.be/87Tlb1FeQ-8

Wongrat, L., Wongrat, P., & Ruangsomboon, S. (2017). Freshwater Phytoplankton in Thailand I: Euglenophyceae. Kasetsart University Fishery Research Bulletin, 27: 1–34.

Wu, Y., Kirillov, A., Massa, F., Lo, W. & Girshick, R. (2019). Detectron2. Github. https://github.com/facebookresearch/detectron2

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากอาจารย์ธัญญรัตน์ ดำเกาะ และ ผศ.ดร.อรวรรณ เชาวลิต ท่านได้เสียสละเวลาอันมีค่ายิ่ง ในการให้คำปรึกษาการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนได้ตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่อง ตั้งแต่เริ่มดำเนินการจนกระทั่งดำเนินการเสร็จสมบูรณ์ ขอบคุณคณาจารย์ในสาขาวิชาชีววิทยาและวิทยาศาสตร์สุขภาพที่ให้คำแนะนำในการดำเนินการงานวิจัย และขอบคุณ ดร.จิโรจน์ แสงรัตนประเสริฐ สำหรับการช่วยเหลือในการใช้งานอุปกรณ์ ขอบคุณโรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ ที่ให้การสนับสนุนวัสดุ-อุปกรณ์และการเผยแพร่ผลงาน สุดท้ายนี้ขอบคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่ได้จัดรายการเพื่อพัฒนาและคิดค้นนวัตกรรมเพื่อสิ่งแวดล้อม ที่ได้ให้คำแนะนำและมอบเงินสนับสนุนในการดำเนินการพัฒนางานวิจัยต่อไป

The Development of Lateral Flow Immunoassay for Hepatitis B Detection in Saliva

Natchanon Rongdach[1*], Grichpeth Kotluckkom[1], Usa Jeenjenkit[1], Sudkate Chaiyo[2]
[1]*Mahidol Wittayanusorn School, Phutthamonthon, Nakhon Pathom, Thailand*
[2]*The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*
[*]*Email: natchanon.pak@gmail.com*

Abstract

This study addresses the conventional blood-based approach for hepatitis B testing, aiming to enhance accessibility by developing a lateral flow sensor for hepatitis B virus (HBV) detection in saliva samples. Saliva collection offers a less invasive and more convenient alternative. Employing a lateral flow immunoassay with gold nanoparticles (AuNPs) conjugated with antibodies (Ab-AuNPs), the sensor visually displays results based on hepatitis B surface antigen (HBsAg) detection. The sensor's performance was comprehensively assessed, considering the limit of detection, sensitivity, and specificity. Artificial saliva containing varying concentrations of HBsAg was tested, revealing the sensor's capability to detect concentrations as low as 0.025 µg/mL with the naked eye. The lateral flow demonstrated a sensitivity of 83% (10/12) in positive controls and a specificity of 100% (8/8) in negative controls. Evaluation of the lateral flow immunoassay's validity and utility indices underscores its potential for further development and future application in real patient testing.

Keywords: Lateral flow immunoassay (LFIA), Hepatitis B surface antigen (HBsAg), Labeled gold nanoparticles (Ab-AuNPs)

I. INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection is a global public health concern. According to the World Health Organization (WHO), it is estimated that approximately 300 million people worldwide are chronic carriers of the virus, with at least 1 million ultimately developing severe liver disease and, in some cases, liver cancer (World Health Organization, 2023). In Thailand, there are approximately 3.5 million people suffering from chronic HBV infection (Piratvisuth, 2020).

HBV can be transmitted through blood, body fluids, needle sharing, unprotected sexual contact, and from mother to child during childbirth due to the presence of the virus in blood, semen, and bodily fluids. The clinical spectrum of HBV infection ranges from subclinical to acute symptomatic hepatitis or, rarely, fulminant hepatitis during the acute phase and from the inactive hepatitis B surface antigen (HBsAg) carrier state to chronic hepatitis, cirrhosis, and its complications during the chronic phase (Sharma *et al*., 2005). Diagnosis of HBV currently involves blood tests to check liver function, HBV-specific blood tests for HBsAg and Anti-HBs, or liver biopsy, which is a specialized procedure performed by experts.

In addition to HBsAg, other antigens and antibodies associated with hepatitis B include hepatitis B e antigen (HBeAg), hepatitis B core antigen (HBcAg), and various antibodies such as anti-HBs, anti-HBe, and anti-HBc. While these markers provide comprehensive insights into the different stages of Hepatitis B infection, HBsAg stands out as a primary diagnostic target due to being the earliest detectable antigen during infection and signifies active viral replication. Its presence indicates both acute and chronic phases of Hepatitis B, making it a reliable marker for infection status (Kramvis *et al*., 2022). Finally, HBsAg is highly stable, facilitating accurate detection in various sample types, including saliva, which offers a non-invasive and easily collectible medium for diagnostic purposes. Its prominence in diagnostic assays is attributed to its sustained presence during the infectious period, allowing for early and accurate detection, critical for timely intervention and disease management (Cruz *et al*, 2011).

The advantages of detecting HBsAg in saliva are noteworthy. Saliva, being easily and non-invasively collectible, provides a patient-friendly alternative to blood sampling. The detection of HBsAg in saliva offers a practical and accessible means of diagnosing Hepatitis B, especially in settings where traditional blood tests may pose challenges. This method not only reduces discomfort for individuals undergoing testing but also facilitates widespread screening efforts. Moreover, the non-invasive nature of saliva collection may encourage more individuals to participate in regular screenings, ultimately contributing to early detection and timely management of hepatitis B infections.

For these reasons the development of a sensor for screening hepatitis B Virus from saliva has been undertaken, aiming to facilitate quick, convenient, and accessible testing for HBV, and enabling individuals to perform self-checks with ease.

II. METHODS

1: Synthesis of gold nanoparticles (AuNPs)

A solution of trisodium citrate (1%, w/v) was prepared with a volume of 0.1 mL, and a solution of $K(AuCl_4)\cdot nH_2O$ (1%, w/v) was prepared with a volume of 0.25 mL. In a flask sealed with aluminum foil, 25 mL of DI water was added and heated on a hot plate at 100°C, stirring at 5000 rpm for 10 minutes. $K(AuCl_4)\cdot nH_2O$ solution (1%, w/v) was incrementally added along the edges of the flask. After reaching the boiling point, 0.1 mL of trisodium citrate solution (1%, w/v) was added, and the solution was allowed to sit until it turned dark purple. The pH of the AuNPs solution was adjusted to 8.1 using $NaHCO_3$ solution. The AuNPs solution was transferred into sterilized plastic bottles and stored at 4°C. The process was repeated with volumes of trisodium citrate solution (1%, w/v) at 0.25 mL, 0.5 mL, 1 mL, and 2 mL, respectively.

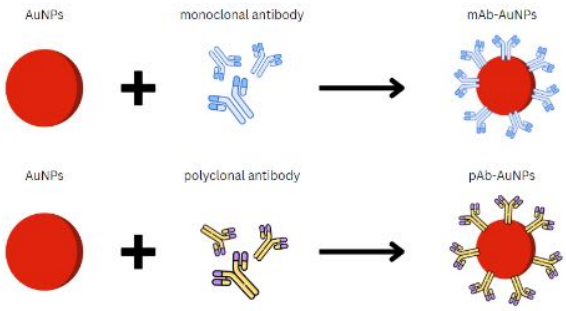


Figure 1. Antibodies conjugated to AuNPs

Light absorption testing was conducted in the wavelength range of 350-700 nm. The obtained values were analyzed by graphing the relationship between the wavelength spectrum and the light absorption of the AuNPs solution.

2: Sensor optimization

Testing of antibody concentrations

Polyclonal antibody (Rabbit anti-Surface Ag pAb: Ab68519) was diluted to six concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50, 100, and 200 µg/mL, each with a volume of 25 µL. Subsequently, 125 µL of AuNPs solution was added and stirred at room temperature for 15 minutes. Following this, 125 µL of NaCl solution (10%, w/v) was added. The resulting solution was then analysed by using light absorption spectroscopy in the range of 400-700 nm. The process was repeated, with the variation of antibody type to monoclonal antibody (Mouse anti-Surface Ag mAb: Ab252692) (Figure 1).

Testing of binding interaction

The anti-mouse antibody, with a concentration of 1.5 mg/mL, was affixed onto nitrocellulose membrane strips in the control line (C-line) using Biodot XYZ32100047. The strips were then left to dry for one hour at 37°C. Subsequently, a lateral flow test strip was assembled, comprising a sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane, absorbent pad, and backing card (Figure 2).

To create sensor strips, polyclonal antibody labeled with AuNPs (pAb-AuNPs) was dispensed onto the conjugate pad at a volume of 8 µL per strip and then dried at 37°C for 20 minutes. Monoclonal antibody, at a concentration of 1 mg/mL, was then dropped onto the test line (T-line) at a volume of 0.5 µL per strip. Testing was conducted by dropping HBsAg solution (1 µg/mL) mixed with PBT buffer in a 2:1 ratio onto the sample pad of positive control strips (100 µL each) and PBT buffer onto negative control strips (100 µL each). The light intensity of the test line was measured using ImageJ. The process was repeated, but with the substitution of mAb-AuNPs for pAb-AuNPs and exchanging the monoclonal antibody on the test line for polyclonal antibody.

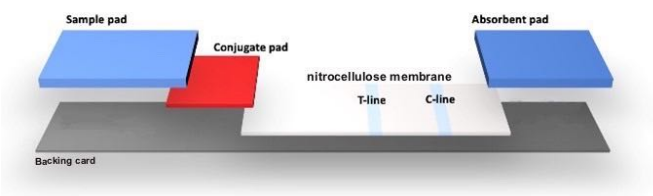


Figure 2. The test strip comprised a sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane, and absorbent pad affixed to a backing card.

Concentration of polyclonal antibodies
Polyclonal antibody was dispensed onto the test line at concentrations ranging from 0.5 to 3.0 mg/mL in increments of 0.5 mg/mL, each at a volume of 0.5 µL, and this process was repeated three times. mAb-AuNPs was dropped onto the conjugate pad at a volume of 8 µL per strip and then dried at 37°C for 20 minutes. Testing was carried out by dropping HBsAg solution (1 µg/mL) mixed with PBT buffer in a 2:1 ratio onto the sample pad of positive control strips (100 µL each) and PBT buffer onto negative control strips (100 µL each). The light intensity of the test line was subsequently measured using ImageJ.

Testing mAb-AuNPs on the conjugate pad
mAb-AuNPs were dispensed onto the conjugate pad at volumes ranging from 1 to 8 µL, followed by drying at 37°C for 20 minutes. Testing was conducted by dropping HBsAg solution (1 µg/mL) mixed with PBT buffer in a 2:1 ratio onto the positive control strips (100 µL each) and PBT buffer onto the negative control strips (100 µL each). The light intensity of the test line was measured using ImageJ.

Study of buffer type
Buffer solutions (PBS, PBS + 0.5% Tween20 (PBST0.5), PBS + 1% BSA and PBT + 0.5% Tween20 (PBTT0.5)) were dispensed at a volume of 400 µL onto the sample area of the test strip. The strips were dried at 37°C for 60 minutes. Artificial saliva was dropped onto the sample area, with a volume of 100 µL per strip. The flow of mAb-AuNPs and the display of the test line were observed.

3: Testing the efficiency of the sensor
To test the efficiency of the sensor, artificial saliva was prepared following Engelhart *et al*. (2016), and the limit of detection was tested among different HBsAg concentrations. The sensor was tested with HBsAg solutions in artificial saliva, ranging in concentrations from 6 µg/mL to 0.01 µg/mL, each with a volume of 100 µL. The light intensity of the test line was measured using ImageJ. The intensity values for each HBsAg concentration were recorded. The limit of detection for the sensor was calculated based on the obtained results. Sensitivity and specificity were tested by using positive artificial saliva samples with different concentrations for 12 samples and negative samples for 8 samples.

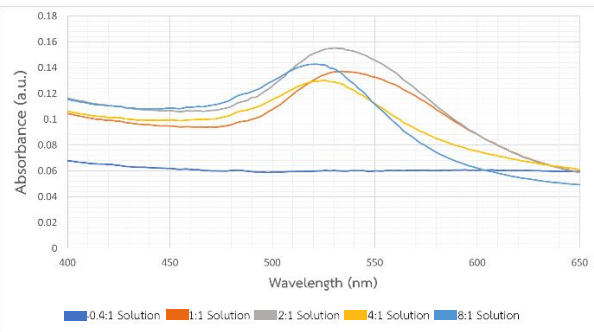


Figure 3. The relationship between the concentration of trisodium citrate solution and AuNPs absorbance

III. RESULTS AND DISCUSSION

1: Synthesis of gold nanoparticles (AuNPs)
In general, the most commonly used sizes for AuNPs in lateral flow immunoassays are between 20-40 nm and λ_{max} typically falls within the range of 520-540 nm. When considering the amount of substance used, the ratio of trisodium citrate solution (1%, w/v) to potassium tetrachloro-aurate(III) solution (1%, w/v) were tested using 0.4:1, 1:1, 2:1, 4:1, and 8:1 solutions (Figure 3). However, for the ratio of 0.4:1, AuNPs could not be synthesized. At the same time, AuNPs obtained from trisodium citrate solutions (1%, w/v) using the ratio of 1:1, 2:1, 4:1, and 8:1 can exhibit suspension in the solution, resulting in a pronounced dark red color. Through the study, it was observed that AuNPs of different sizes have varying λ_{max} values. Specifically, it was found that the AuNPs solutions obtained from 1:1, 2:1, 4:1, and 8:1 solution all have λ_{max} values within the range of 520-540 nm. And based on the absorbance wavelength values, we conclude that the optimal solution is the 1:1 ratio, as it provides the highest absorbance wavelength at 534 nm.

2: Sensor fabrication
From the study of the absorbance wavelength values of antibodies labeled with AuNPs in the range of 450-700 nm, aimed at finding the most suitable intensity for labeling, it was found that when analyzing the absorbance value at a wavelength of 538 nm, which is the λ_{max} of the

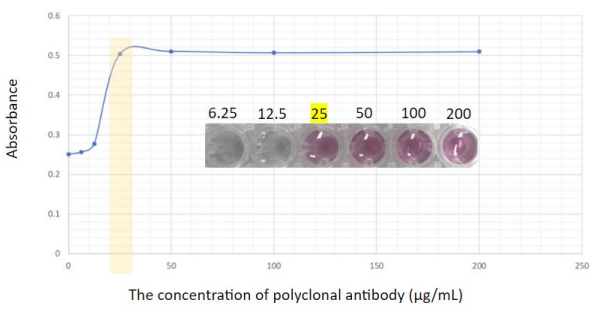


Figure 4. The relationship between the concentration of polyclonal antibody and the absorbance values of pAb-AuNPs at a wavelength of 538 nm

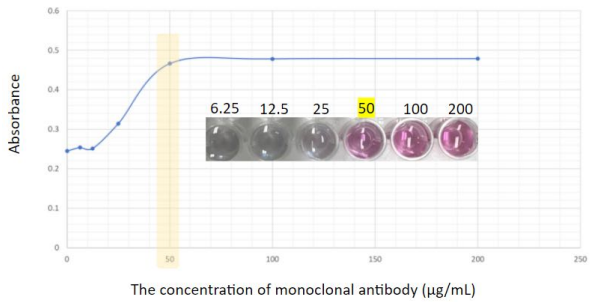


Figure 5. The relationship between the concentration of monoclonal antibody and the absorbance values of mAb-AuNPs at a wavelength of 538 nm

AuNPs solution. It was found that pAb-AuNPs obtained from polyclonal antibody with a concentration of 25 µg/mL has the optimal absorbance (Figure 4). Similarly, it was found that mAb-AuNPs obtained from monoclonal antibody with a concentration of 50 µg/mL (Figure 5) provided the optimal concentration for this assay.

Identifying suitable antibody pairs was done by comparing two methods: 1. pAb-AuNPs on the conjugate pad with monoclonal antibody on the test line and 2. mAb-AuNPs on the conjugate pad with polyclonal antibody on the test line. It was observed that both methods produced strong color on the test line (pointed by arrow) when tested with positive samples (Figure 6). When tested with negative samples, both methods resulted in faint color change on the test line (pointed by arrow), similar to each other. However, it was found that the mAb-AuNPs on the conjugate pad with polyclonal antibodies on the test line exhibited a higher light intensity on the T-line compared to the other method when tested with positive samples. Therefore, this method is suitable for this sensor.

Upon investigating the optimal conditions for the sensor, considering factors including mAb-AuNPs volume, polyclonal antibody concentration on the T-line, and buffer type, optimal parameters were established. An mAb-AuNPs volume of 4 µL (Figure 7) and a polyclonal antibody concentration of 1.5 mg/mL (Figure 8) proved optimal based on T-line light intensity, balancing effective detection without overwhelming the chemicals. The choice of $PBTS_{0.5}$ as the buffer was supported by its ability to expedite mAb-AuNPs movement toward the absorbent pad (Table 1).

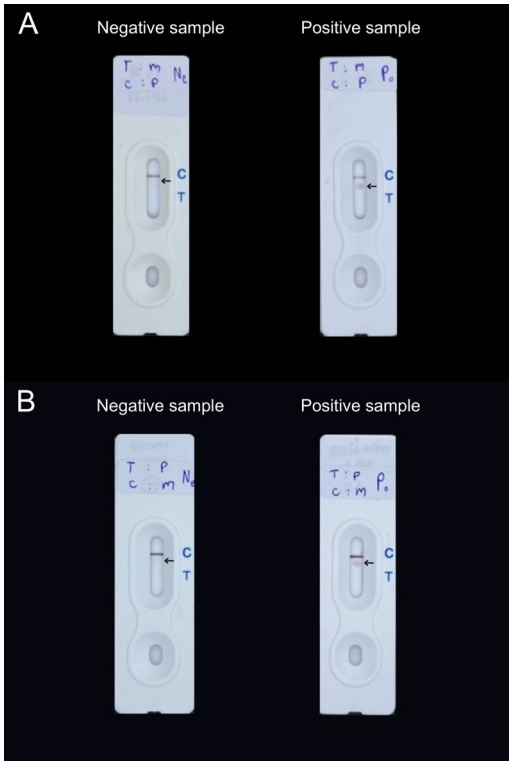


Figure 6. (A) The test strip where pAb-AuNPs are located on the conjugate pad, and monoclonal antibodies are situated on the test line. (B) The test strip with mAb-AuNPs on the conjugate pad and polyclonal antibodies on the T-line.

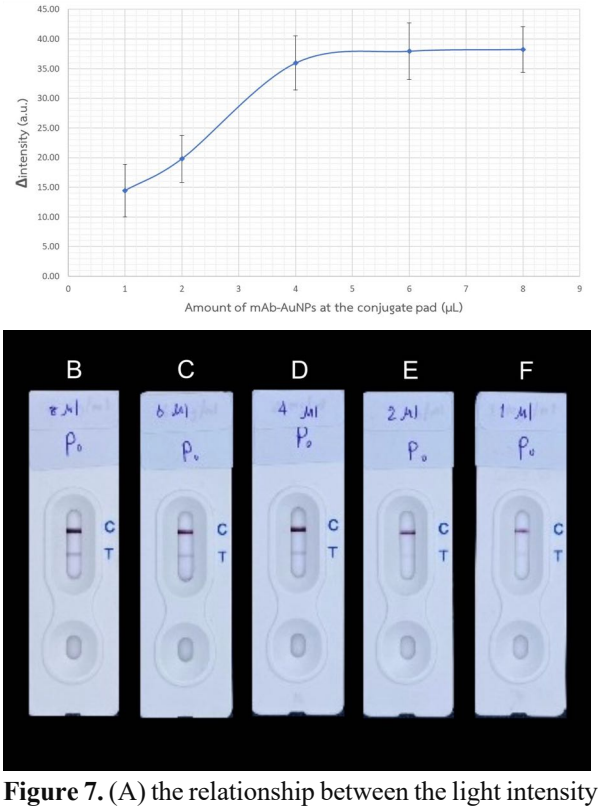
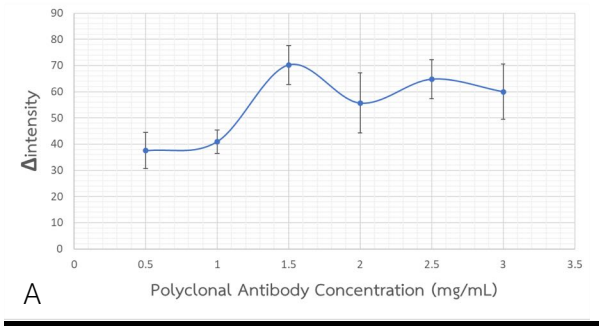


Figure 7. (A) the relationship between the light intensity of the T-line and the volume of mAb-AuNPs on the conjugate pad for positive samples. Sample test strips with variations at (B) 8 µL, (C) 6 µL, (D) 4 µL, (E) 2 µL, and (F) 1 µL.



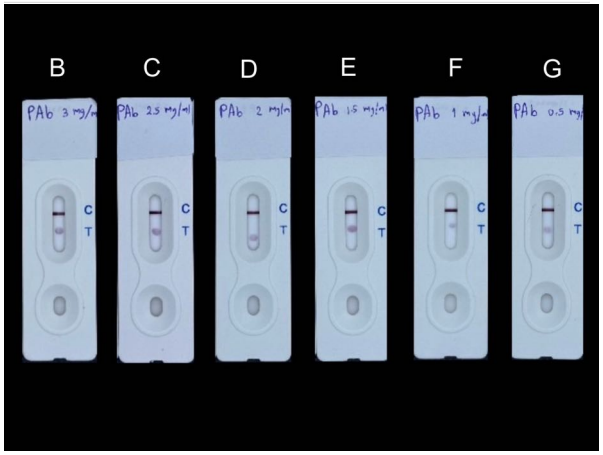


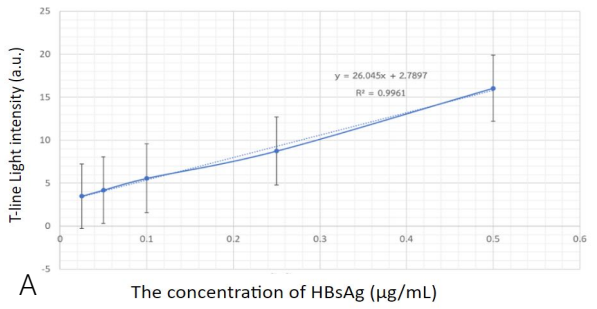
Figure 8. (A) the relationship between the light intensity of the T-line and the concentration of polyclonal antibody. Sample test strips with variations at (B) 3 mg/mL, (C) 2.5 mg/mL, (D) 2 mg/mL, (E) 1.5 mg/mL, (F) 1 mg/mL, and (G) 0.5 mg/mL.

3: Testing the efficiency of the sensor

From testing the sensor with an HBsAg solution in artificial saliva and gradually reducing the concentration of the HBsAg solution, observations were made regarding the performance of the test line and measurements of light intensity. It was found that this test line can detect HBsAg in artificial saliva visually at concentrations as low as 0.025 µg/mL (Figure 9). To assess the real-life display performance of the sensor, it is essential to conduct tests with actual saliva samples from patients at various stages of hepatitis B virus infection. Testing of the sensor with HBsAg solution in artificial saliva, using both positive and negative samples, revealed that the sensor achieved a sensitivity of 83.33% and a specificity of 100% (Table 2).

Buffer type	Migration time (min)
PBS	10.19
$PBST_{0.5}$	8.25
PBS + 1%BSA	14.30
$PBTT_{0.5}$	12.05

Table 1. Time taken for mAb-AuNPs to migrate to the absorbent pad for test strips composed of various buffer types on the sample support pad.



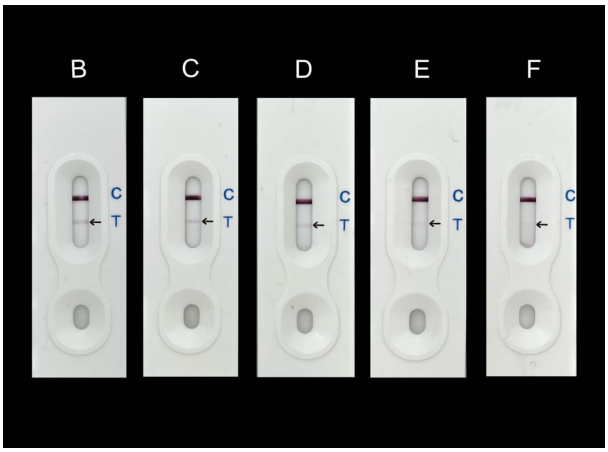


Figure 9. (A) The relationship between the intensity of the T-line and the concentration of HBsAg in the artificial saliva. Sample test strips with variations at (B) 0.5 µL/mL, (C) 0.25 µL/mL, (D) 0.1 µL/mL, (E) 0.05 µL/mL, and (F) 0.025 µL/mL.

IV. CONCUSION

In evaluating the performance of the developed sensor on artificial saliva samples containing the hepatitis B virus antigen, optimal conditions for the test strip were determined, including the use of 1.5 mg/mL of polyclonal antibody on the T-line, 4 µL of mAb-AuNPs on the conjugate pad, and $PBST_{0.5}$ as a buffer. The test strip demonstrated detection of hepatitis B virus antigen in artificial saliva samples at concentrations as low as 0.025 µg/mL, discernible with the naked eye. It achieved a sensitivity of 83.33% and a specificity of 100%. This underscores the potential of the sensor as a user-friendly and uncomplicated prototype for detecting the hepatitis B virus antigen in saliva samples. The promising outcomes position it as a viable candidate for further development and practical application in the future.

	HBsAg present	HBsAg absent
Positive	10 (True positive)	0 (False positive)
Negative	2 (False negative)	8 (True negative)

Table 2. Sensor testing results for positive and negative samples.

REFERENCES

Cruz, H. M., da Silva, E. F., Villela-Nogueira, C. A., Nabuco, L. C., do Ó, K. M., Lewis-Ximenez, L. L., Yoshida, C. F., Lampe, E., & Villar, L. M. (2011). Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen. Journal of clinical laboratory analysis, 25(2), 134–141. https://doi.org/10.1002/jcla.20447

Engelhart, K., Popescu, A., Bernhardt, J., Using mid infrared technology as new method for the determination of the dwell time of salivary substitutes on three-dimensional gingiva models. BMC Ear Nose Throat Disord. 2016 Mar 15;16:6. doi: 10.1186/s12901-016-0025-5. PMID: 26985168; PMCID: PMC4793747.

Kramvis, A., Hang, KM., Dandri, M. et al. A roadmap for serum biomarkers for hepatitis B virus: current status and future outlook. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 19, 727–745 (2022). https://doi.org/10.1038/s41575-022-00649-z

Piratvisuth, T. (2020). Hepatitis B: A very real health danger. https://www.samitivejhospitals.com/article/detail/hepatitis-b-a-very-real-health-danger

Sharma, S. K., Saini, N., & Chwla, Y. (2005). Hepatitis B virus: inactive carriers. Virology journal, 2, 82. https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-82

World Health Organization. (2023). Hepatitis B. World Health Organization; World Health Organization. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b

Acknowledgements

Grateful acknowledgment is extended to Dr. Sirowan Ruantip for valuable support and guidance. Appreciation is also expressed to the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, for providing essential equipment and research facilities. Finally, we extend our thanks to The National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for their financial support in the development of this study

การพัฒนาเซนเซอร์ชนิดการไหลในแนวระนาบสำหรับการตรวจโรคไวรัสตับอักเสบบีจากน้ำลาย

ณัฐชานนท์ รองเดช[1*], กริชเพชร โคตรหลักคำ[1], อุษา จีนเจนกิจ[1], สุดเขต ไชโย[2]
[1]โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม
[2]สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
[*]natchanon.pak@gmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มุ่งเน้นการใช้วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยใช้หลักการพื้นฐานเดียวกับการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างเลือด โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มการเข้าถึงได้โดยการพัฒนาเซนเซอร์ชนิดการไหลในแนวระนาบแบบลาเทอรัลโฟว์สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในตัวอย่างน้ำลาย เนื่องจากการเก็บตัวอย่างน้ำลายทำได้ง่ายและรุกล้ำผู้ป่วยน้อย เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจแอนติเจนจากเปลือกไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B surface antigen; HBsAg) และสามารถแสดงผลให้เห็นด้วยตาเปล่า โดยใช้เทคนิคทดสอบอิมมูโนแอสเสย์ชนิดการไหลในแนบระนาบ (Lateral flow immunoassay) มีโมเลกุลรายงานผลบนเซนเซอร์คืออนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร (Gold nanoparticles; AuNPs) ซึ่งถูกนำไปติดฉลากกับแอนติบอดีต่อแอนติเจนจากเปลือกไวรัสตับอักเสบบี (Ab-AuNPs) การทดสอบประสิทธิภาพของเซนเซอร์ทำได้โดยการหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection) ความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) จากการทดสอบเซนเซอร์ด้วยตัวอย่างน้ำลายเทียมที่มีแอนติเจนจากเปลือกไวรัสตับอักเสบบีที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าเซนเซอร์สามารถตรวจหาแอนติเจนจากเปลือกไวรัสตับอักเสบบีในน้ำลายเทียมได้ถึง 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยตาเปล่า มีความไวเท่ากับ 83% (10/12) และความจำเพาะเท่ากับ 100% (8/8) ดังนั้นแถบเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงเป็นเซนเซอร์ต้นแบบทางเลือกหนึ่งที่ง่ายและไม่ยุ่งยากสำหรับการตรวจหาแอนติเจนไวรัสตับอักเสบบีในน้ำลาย และยังสามารถนำไปต่อยอดพัฒนาสู่การทดสอบผู้ป่วยจริงในอนาคต

คำสำคัญ เทคนิคทดสอบอิมมูโนแอสเสย์ชนิดการไหลในแนบระนาบ (Lateral flow immunoassay), แอนติเจนจากเปลือกไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B surface antigen; HBsAg), อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตรที่ติดฉลากกับแอนติบอดี (Ab-AuNPs)

1. บทนำ

โรคไวรัสตับอักเสบบี ก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขทั่วโลก องค์การอนามัยโลก (WHO) คาดการณ์สถานการณ์ว่าประชากรโลกประมาณ 300 ล้านคน เป็นพาหะเรื้อรังของไวรัสตับอักเสบบี และอย่างน้อย 1 ล้านคน จะกลายเป็นโรคตับแข็งและมะเร็งตับในที่สุด (World Health Organization, 2023) โดยในประเทศไทยพบผู้ติดเชื้อตับอักเสบบีเรื้อรังประมาณ 3.5 ล้านคน (Piratvisuth, 2020)

โรคไวรัสตับอักเสบบี สามารถติดต่อผ่านทางเลือดและสารคัดหลั่ง โดยมักเกิดจากการใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน การมีเพศสัมพันธ์โดยไม่มีการป้องกัน และสามารถติดต่อจากแม่สู่ลูกได้ เนื่องจากสามารถพบไวรัสในเลือด อสุจิ และสารคัดหลั่งของผู้ติดเชื้อ โดยระยะของโรคไวรัสตับอักเสบบีมีหลายระยะ เริ่มจากระยะเฉียบพลัน (Acute symptomatic hepatitis) ผู้ป่วยบางรายอาจพบภาวะตับอักเสบชนิดร้ายแรง (Fulminant hepatitis) ในระยะนี้ได้ และสามารถกลายเป็นผู้ติดเชื้อเรื้อรัง (Chronic hepatitis) หรือกลายเป็นพาหะ (Carrier) ซึ่งจะตรวจพบแอนติเจนจากเปลือกไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg) และอาจเกิดพังผืดในตับ ตับแข็ง หรือมะเร็งตับร่วมด้วยได้ (Sharma et al., 2005) การวินิจฉัยโรคไวรัสตับอักเสบบี ในปัจจุบันทำได้โดยการเจาะเลือดตรวจค่าการทำงานของตับ (Liver function test) การเจาะเลือดตรวจเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพื่อตรวจสอบ HBsAg และ Anti-HBs หรือการตัดชิ้นเนื้อตับไป

ตรวจ ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงและต้องทำโดยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางเท่านั้น

นอกจากการใช้ HBsAg เป็นสารบ่งชี้ ผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบีสามารถพบสารบ่งชี้อื่นของโรคได้หลายชนิด ได้แก่ hepatitis B e antigen (HBeAg), hepatitis B core antigen (HBcAg) และแอนติบอดีหลายชนิด เช่น แอนติบอดีต่อ HBsAg (anti-HBs), แอนติบอดีต่อ HBeAg (anti-HBe) และแอนติบอดีต่อ HBcAg (anti-HBc) โดยสารบ่งชี้ของโรคแต่ละชนิดจะบ่งบอกระยะของโรคไวรัสตับอักเสบบีที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามสารบ่งชี้ที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยโรคไวรัสตับอักเสบบีคือ HBsAg เนื่องจากข้อดีดังต่อไปนี้ 1. สามารถพบ HBsAg ได้ง่ายในผู้ป่วยระยะแรกของการติดเชื้อ 2. สามารถพบ HBsAg ได้ทั้งระยะเฉียบพลันและเรื้อรัง (Kramvis et al., 2022) 3. HBsAg เป็นแอนติเจนที่มีความคงทนสูง สามารถพบในสารคัดหลั่งได้หลายประเภท เช่น น้ำลาย ซึ่งเป็นสารคัดหลั่งที่เก็บตัวอย่างได้ง่ายและไม่รุกล้ำผู้ป่วย (Non-invasive) จากคุณสมบัติข้างต้นทำให้ HBsAg เป็นทางเลือกที่ดีในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี และจะทำให้การจัดการโรคเป็นไปได้อย่างรวดเร็วมากขึ้น (Cruz et al, 2011).

การตรวจ HBsAg ผ่านทางน้ำลายเพื่อตรวจคัดกรองโรคไวรัสตับอักเสบเป็นวิธีที่ไม่รุกล้ำและสะดวกมากกว่าการตรวจผ่านทางตัวอย่างเลือด นอกจากการลดความไม่สบายใจของผู้ป่วย การตรวจผ่านทางน้ำลายยังสามารถทำให้การคัดกรองทั่วถึงมากขึ้น เนื่องจากเป็นการตรวจคัดกรองที่สะดวกและไม่ยุ่งยากทำให้ผู้ป่วยเข้าถึงระบบการคัดกรองมากขึ้น ซึ่งจะช่วยให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยดีขึ้นตามลำดับ

ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาเซนเซอร์สำหรับการตรวจไวรัสตับอักเสบบีผ่านทางน้ำลาย เพื่อช่วยให้การคัดกรองโรคสะดวกรวดเร็วและคนทั่วไปสามารถใช้งานได้

2. วิธีการทดลอง

1: การสังเคราะห์อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร

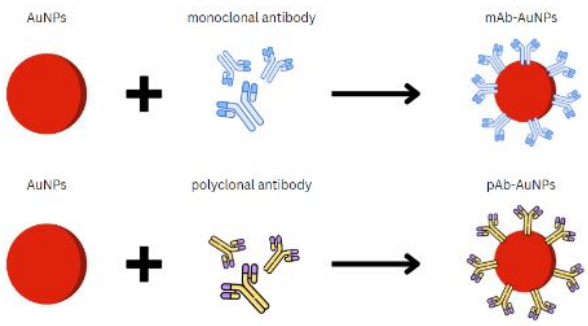
สังเคราะห์อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร (AuNPs) โดยใช้สารละลาย Trisodium citrate (1%, w/v) ปริมาตร 0.1 mL และสารละลาย $K(AuCl_4)\cdot nH_2O$ (1%, w/v) ปริมาตร 0.25 mL นำมาทำปฏิกิริยาในบีกเกอร์ที่ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมภายในบรรจุน้ำปราศจากไอออน (DI water) 25 mL กวนด้วยความเร็ว 5000 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยดสารละลาย $K(AuCl_4)\cdot nH_2O$ (1%, w/v) ทีละหยดที่ขอบบีกเกอร์หลังจากที่สารละลายเริ่มเดือด เติมสารละลาย Trisodium citrate (1%, w/v) ลงไป สารละลายที่ได้จะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม จากนั้นทำการปรับ pH เป็น 8.1 ด้วย $NaHCO_3$ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ภายในขวดปลอดเชื้อ ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนปริมาตรของสารละลาย Trisodium citrate (1%, w/v) เป็น 0.25 mL, 0.5 mL, 1 mL และ 2 mL ตามลำดับ

ตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 350-700 nm วิเคราะห์กราฟความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความยาวคลื่นแสงกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย AuNPs

2: การสังเคราะห์เซนเซอร์

การศึกษาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ติดฉลาก

เตรียม polyclonal antibody (Rabbit anti-Surface Ag pAb: Ab68519) ชนิดละ 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL และ 200 µg/mL ปริมาตรความเข้มข้นละ 25 µL และเติมสารละลาย AuNPs ปริมาตร 125 µL กวนสารเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย NaCl (10%, w/v) ปริมาตร 125 µL นำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 400-700 nm ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนชนิดของแอนติบอดีเป็น monoclonal antibody (Mouse anti-Suface Ag mAb: Ab252692) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การติดฉลากแอนติบอดีกับ AuNPs

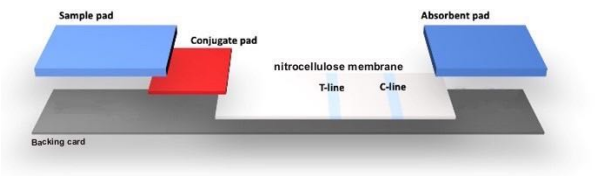
การศึกษาคู่แอนติบอดีที่เหมาะสม

นำ anti-mouse antibody ความเข้มข้น 1.5 mg/mL มาบนแผ่นเยื่อไนโตรเซลลูโลสตรงตำแหน่งเส้นควบคุม (C-line) โดยใช้ Biodot XYZ32100047 อบแห้งที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ประกอบเซนเซอร์โดยมีส่วนประกอบ 5 ส่วน คือ แผ่นรองรับตัวอย่าง (Sample pad), แผ่นคอนจูเกต (Conjugate pad), แผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose membrane), แผ่นดูดซับ (Absorbent pad) และแผ่นรองชุดทดสอบ (Backing card) ดังรูปที่ 2

เพื่อสร้างแถบเซนเซอร์ ตรึง polyclonal antibody ที่ติดฉลากด้วย AuNPs (pAb-AuNPs) ปริมาตร 8 µL ลงบนแผ่นคอนจูเกต อบแห้งที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที และตรึง monoclonal antibody ความเข้มข้น 1 mg/mL ลงบนเส้นทดสอบ (T-line) จากนั้นทดสอบโดยการหยดสารละลาย HBsAg 1 µg/mL ผสม PBT buffer อัตราส่วน 2:1 ลงบนแผ่นรองรับตัวอย่างของชุด positive ปริมาตรชุดละ 100 µL และหยด PBT buffer ลงบนแผ่นรองรับตัวอย่างของชุด negative ปริมาตรชุดละ 100 µL วัดค่าความเข้มแสงของเส้นทดสอบที่ได้ด้วยโปรแกรม ImageJ ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยน pAb-AuNPs เป็น mAb-AuNPs และเปลี่ยนชนิดของแอนติบอดีบนบนเส้นทดสอบจาก monoclonal antibody เป็น polyclonal antibody

การศึกษาความเข้มข้นของ polyclonal antibody

ตรึง polyclonal antibody ปริมาตร 0.5 µL บนเส้นทดสอบ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 mg/mL ถึง 3.0 mg/mL โดยเพิ่มความเข้มข้นทีละ 0.5 mg/mL ความเข้มข้นละ 3 เส้นทดสอบ และหยด mAb-AuNPs ปริมาตร 8 µL ลงบนแผ่นคอนจูเกต อบแห้ง



รูปที่ 2 แสดงองค์ประกอบทั่วไปของเส้นทดสอบ ประกอบด้วย 5 ส่วนคือ แผ่นรองรับตัวอย่าง (Sample pad), แผ่นคอนจูเกต (Conjugate pad), แผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose membrane), แผ่นดูดซับ (Absorbent pad) และแผ่นรองชุดทดสอบ (Backing card)

ที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทดสอบโดยการหยดสารละลาย HBsAg 1 µg/mL ผสม PBT buffer อัตราส่วน 2:1 ลงบนแผ่น รองรับตัวอย่างของชุด positive ปริมาตรชุดละ 100 µL และหยด PBT buffer ลงบนแผ่นรองรับตัวอย่างของชุด negative ปริมาตรชุดละ 100 µL วัดค่าความเข้มแสงของเส้นทดสอบที่ได้ด้วยโปรแกรม ImageJ

การศึกษาปริมาตร mAb-AuNPs บนแผ่นคอนจูเกต

ตรึง mAb-AuNPs ลงบนแผ่นคอนจูเกต ปริมาตรตั้งแต่ 1 µL ถึง 8 µL อบแห้งที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทดสอบโดยการหยดสารละลาย HBsAg 1 µg/mL ผสม PBT buffer อัตราส่วน 2:1 ลงบนแผ่น รองรับตัวอย่างของชุด positive ปริมาตรชุดละ 100 µL และหยด PBT buffer ลงบนแผ่นรองรับตัวอย่างของชุด negative ปริมาตรชุดละ 100 µL และวัดค่าความเข้มแสงของเส้นทดสอบที่ได้ด้วยโปรแกรม ImageJ

การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์

หยดบัฟเฟอร์ ได้แก่ PBS, PBS + 0.5% Tween20 (PBST0.5), PBS + 1% BSA และ PBT + 0.5% Tween20 (PBTT0.5) ปริมาตร 400 µL ลงบนแผ่นรองรับตัวอย่าง นำไปอบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที หยดน้ำลายเทียมลงบนแผ่นรองรับตัวอย่าง ปริมาตรชุดละ 100 µL สังเกตการไหลของ mAb-AuNPs และการแสดงผลของเส้นทดสอบ

3: การทดสอบความประสิทธิภาพของแถบเซนเซอร์

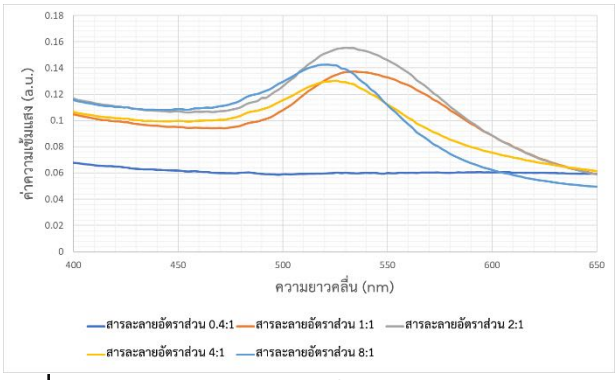
เตรียมน้ำลายเทียมตามที่ระบุในงานวิจัยของ Engelhart et al. (2016) ตรวจสอบขีดจำกัดการตรวจวัดของเซนเซอร์โดยทดสอบกับน้ำลายเทียมที่มี HBsAg ความเข้มข้นตั้งแต่ 6 µg/mL ถึง 0.01 µg/mL ปริมาตร 100 µL สังเกตการแสดงผลของเซนเซอร์หลังจากการทดสอบ วัดค่าความเข้มแสงของเส้นทดสอบที่ได้ด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อทดสอบค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection) จากนั้นนำเซนเซอร์ไปทดสอบตัวอย่าง positive ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน จำนวน 12 ตัวอย่าง และตัวอย่าง negative 8 ตัวอย่าง เพื่อทดสอบค่าความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity)

3. ผลและอภิปรายผลการทดลอง

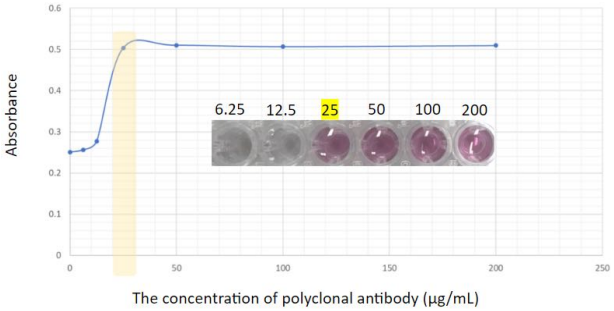
1: การสังเคราะห์อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร

ขนาดที่เหมาะสมของ AuNPs ที่ใช้ในการทำชุดทดสอบอิมมูโนแอสเสย์ชนิดการไหลในแนบระนาบคือระหว่าง 20-40 nm ซึ่งจะมีค่า λ_{max} อยู่ในช่วง 520-540 nm จากการสังเคราะห์อนุภาค AuNPs โดยการศึกษาปริมาตรของสารละลาย Trisodium citrate (1%, w/v) ต่อปริมาตรสารละลาย Potassium Tetrachloroaurate(III) n-Hydrate (1%, w/v) ในอัตราส่วน 0.4:1, 1:1, 2:1, 4:1, และ 8:1 (รูปที่ 3)

พบว่าสารละลายในอัตราส่วน 0.4:1 ไม่สามารถสังเคราะห์ AuNPs ได้ ขณะเดียวกัน AuNPs ที่ได้จากสารละลายอัตราส่วน 1:1, 2:1, 4:1, และ 8:1 สามารถเกิดการแขวนลอยอยู่ในของอนุภาคทองคำได้สารละลายจึงเห็นเป็นสีแดงเข้ม ซึ่งจากการศึกษาพบว่าขนาดของ AuNPs ที่แตกต่างกันจะมีค่า λ_{max} แตกต่างกัน สารละลาย AuNPs ที่สังเคราะห์ได้จากอัตราส่วน 1:1, 2:1, 4:1, และ 8:1 มีค่า λ_{max} อยู่ในช่วง 520-540 nm ทั้งหมด เมื่อพิจารณาสีของสารละลาย



รูปที่ 3 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Trisodium citrate ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs



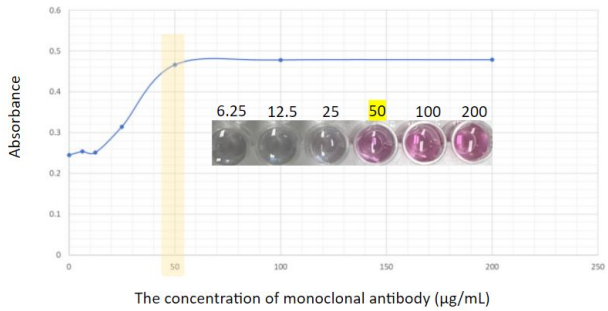
รูปที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ polyclonal antibody กับค่าการดูดกลืนแสงของ pAb-AuNPs ที่ความยาวคลื่น 538 nm

AuNPs พบว่าสารละลาย AuNPs ที่ได้จากสารละลาย 1:1 มีค่า λ_{max} เท่ากับ 534 nm ซึ่งจะให้สีแดงที่เข้มที่สุด จึงสามารถสรุปได้ว่าสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์ AuNPs ในการทดลองนี้คืออัตราส่วน 1:1

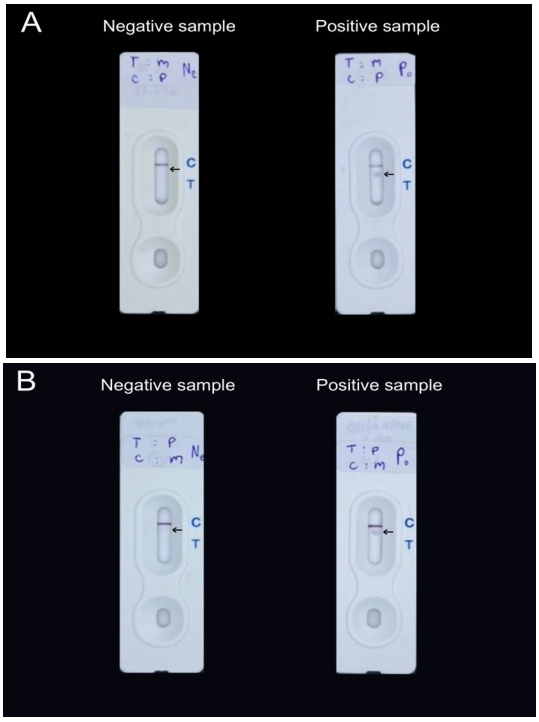
2: การสังเคราะห์เซนเซอร์

จากการศึกษาค่าความยาวคลื่นของดูดกลืนแสงของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย AuNPs ในช่วงความยาวคลื่น 450-700 nm เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการติดฉลาก เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของ pAb-AuNPs ที่ค่าความยาวคลื่น 538 nm (ค่า λ_{max} ของ AuNPs ก่อนทำการติดฉลาก) พบว่าความเข้มข้นของ polyclonal antibody ที่เหมาะสมที่สุดในการติดฉลากกับ AuNPs คือ 25 µg/mL เนื่องจากใช้ปริมาณแอนติบอดีต่ำที่สุด (รูปที่ 4) และความเข้มข้นของ monoclonal antibody ที่เหมาะสมที่สุดในการติดฉลากกับ AuNPs คือ 50 µg/mL (รูปที่ 5)

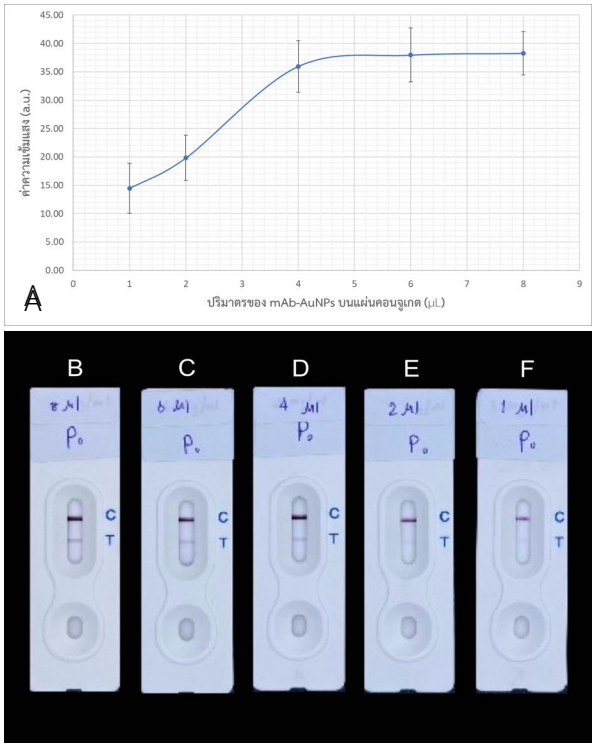
จากการทดสอบหาคู่แอนติบอดีที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบระหว่าง 1. pAb-AuNPs อยู่ที่แผ่นคอนจูเกตและ monoclonal antibody อยู่ที่เส้นทดสอบ 2. mAb-AuNPs อยู่ที่แผ่นคอนจูเกตและ polyclonal antibody อยู่ที่เส้นทดสอบ พบว่าเมื่อทดสอบผลด้วยตัวอย่าง positive ทั้งสองวิธีสามารถทำให้เกิดจุดสีขึ้น (ชี้ด้วยลูกศร) ที่เส้นทดสอบได้ (รูปที่ 6) แต่เมื่อทดสอบผลด้วยตัวอย่าง negative ทั้งสองวิธีเกิดจุดสีจางขึ้น (ชี้ด้วยลูกศร) ที่เส้นทดสอบเหมือนกัน อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบค่าความเข้มแสงของเส้นทดสอบ พบว่าเมื่อทดสอบด้วยตัวอย่าง positive ชุดการทดลองที่ 2 แสดงค่าความเข้มแสงมากกว่าเมื่อ



รูปที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ monoclonal antibody กับค่าการดูดกลืนแสงของ mAb-AuNPs ที่ความยาวคลื่น 538 nm



รูปที่ 6 (A) แสดงรูปถ่ายของชุดตรวจที่ pAb-AuNPs อยู่ที่แผ่นคอนจูเกตและ monoclonal antibody อยู่ที่เส้นทดสอบ (B) แสดงรูปถ่ายของชุดตรวจที่ mAb-AuNPs อยู่ที่แผ่นคอนจูเกตและ polyclonal antibody อยู่ที่เส้นทดสอบ

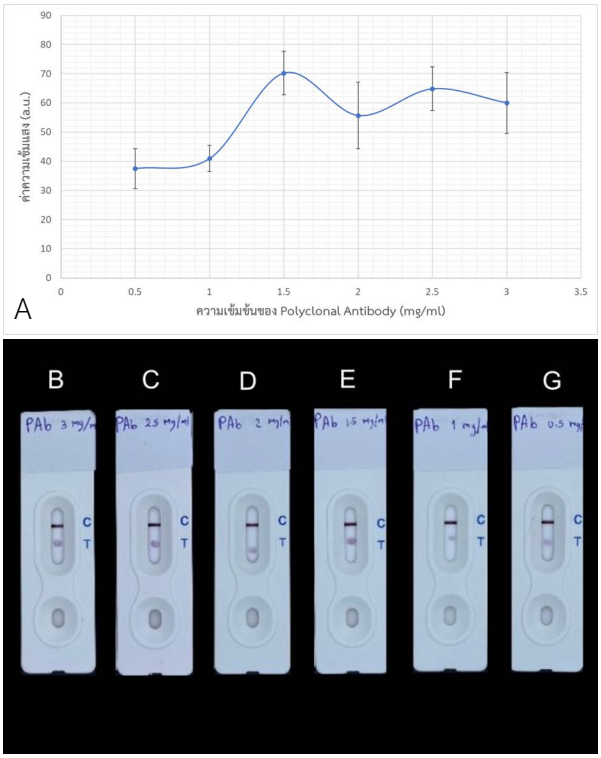


รูปที่ 7 (A) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มแสงของ T-line กับปริมาตรของ mAb-AuNPs บนแผ่นคอนจูเกตสำหรับชุด positive (B) 8 µL (C) 6 µL (D) 4 µL (E) 2 µL (F) 1 µL

เปรียบเทียบกับชุดที่ 1 ดังนั้นคู่แอนติบอดีแบบชุดทดสอบที่ 2 จึงเหมาะสมที่สุด

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงผลของเซนเซอร์โดยการทดสอบปริมาตรของ mAb-AuNPs, ความเข้มข้นของ polyclonal antibody บนเส้นทดสอบ และชนิดของบัฟเฟอร์ พบว่าปริมาตรที่เหมาะสมที่สุดของ mAb-AuNPs เท่ากับ 4 µL (รูปที่ 7) และความเข้มข้นของ polyclonal antibody ที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 1.5 mg/mL (รูปที่ 8) เนื่องจากสภาวะดังกล่าวแสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงและใช้ปริมาณสารต่ำ เมื่อทดสอบชนิดของบัฟเฟอร์กับระยะเวลาที่ mAb-AuNPs เคลื่อนไปถึงแผ่นดูดซับ (Migration time) พบว่า $PBST_{0.5}$ เป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเซนเซอร์มากที่สุด (ตารางที่ 1)

จากการทดสอบเซนเซอร์ด้วยสารละลาย HBsAg ในน้ำลายเทียมโดยลดความเข้มข้นของสารละลาย HBsAg สังเกตแสดงผลของเส้นทดสอบและวัดค่าความเข้มแสงของเส้นทดสอบ พบว่าความเข้มข้นสุดท้ายที่สามารถมองเห็นสีของแถบแสดงผล



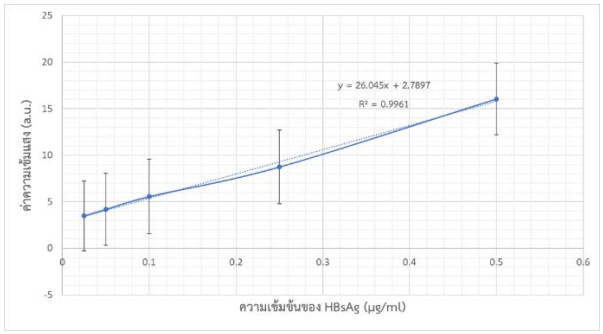
รูปที่ 8 (A) แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มแสงของ T-line กับความเข้มข้นของ polyclonal antibody (B) 3 mg/ml (C) 2.5 mg/ml (D) 2 mg/ml (E) 1.5 mg/ml (F) 1 mg/ml (G) 0.5 mg/ml

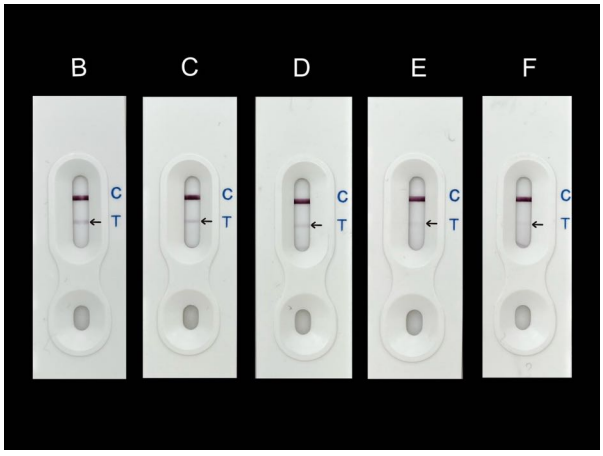
3: การทดสอบประสิทธิภาพของแถบเซนเซอร์

Buffer type	Migration time (min)
PBS	10.19
$PBST_{0.5}$	8.25
PBS + 1%BSA	14.30
$PBTT_{0.5}$	12.05

ตารางที่ 1 ตารางแสดงระยะเวลาที่ mAb-AuNPs เคลื่อนไปถึงแผ่นดูดซับสำหรับสตริปเทสที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ บนแผ่นรองรับตัวอย่าง

ได้ด้วยตาเปล่าคือ 0.025 µg/mL (รูปที่ 9) สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพจริงของเซนเซอร์จำเป็นต้องมีการทดสอบกับตัวอย่างน้ำลายจริงจากผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในระยะต่าง ๆ เนื่องจากจะมีค่าความเข้มข้นของ HBsAg ที่แตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละรายเมื่อทดสอบเซนเซอร์กับตัวอย่าง positive และ negative เพื่อคำนวณค่าความไวและความจำเพาะ พบว่ามีค่าเท่ากับ 83.33% และ 100% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)





รูปที่ 9 (A) แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มแสงของ T-line กับความเข้มข้นของสารละลาย HBsAg ในน้ำลายเทียม ที่ความเข้มข้น (B) 0.5 µL/mL (C) 0.25 µL/mL (D) 0.1 µL/mL (E) 0.05 µL/mL (F) 0.025 µL/mL

	HBsAg present	HBsAg absent
Positive	10 (True positive)	0 (False positive)
Negative	2 (False negative)	8 (True negative)

ตารางที่ 2 ตารางแสดงผลการทดสอบเซนเซอร์ด้วยตัวอย่าง positive และ negative

4. สรุปผลการทดลอง

ในการพัฒนาเซนเซอร์ชนิดการไหลในแนวระนาบสำหรับการตรวจโรคไวรัสตับอักเสบบีจากน้ำลาย โดยการศึกษาภาวะที่เหมาะสมบนเส้นทดสอบเพื่อใช้สำหรับตรวจแอนติเจนไวรัสตับอักเสบบีในน้ำลาย ประกอบไปด้วย 1. การศึกษาความเข้มข้นของ polyclonal antibody บนเส้นทดสอบ พบว่าความเข้มข้นของ polyclonal antibody บนเส้นทดสอบที่เหมาะสมคือ 1.5 mg/mL 2. การศึกษาปริมาตรของ mAb-AuNPs บนแผ่นคอนจูเกต พบว่าปริมาตรของ mAb-AuNPs บนแผ่นคอนจูเกตที่เหมาะสมคือ 4 µL และ 3. การทดสอบชนิดของบัฟเฟอร์ พบว่า $PBST_{0.5}$ เป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยแถบทดสอบนี้สามารถตรวจหาตรวจแอนติเจนไวรัสตับอักเสบบีในน้ำลายเทียมได้ถึง 0.025 µg/mL ด้วยตาเปล่า โดยมีความไว เท่ากับ 83% และมีความจำเพาะ เท่ากับ 100% ดังนั้นแถบเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นเซนเซอร์ต้นแบบทางเลือกหนึ่งที่ง่ายและไม่ยุ่งยากสำหรับการตรวจหาแอนติเจนไวรัสตับอักเสบบีในน้ำลาย และยังสามารถนำไปต่อยอดพัฒนาสู่เชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

5. เอกสารอ้างอิง

Cruz, H. M., da Silva, E. F., Villela-Nogueira, C. A., Nabuco, L. C., do Ó, K. M., Lewis-Ximenez, L. L., Yoshida, C. F., Lampe, E., & Villar, L. M. (2011). Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen. Journal of clinical laboratory analysis, 25(2), 134–141. https://doi.org/ 10.1002/jcla.20447

Engelhart, K., Popescu, A., Bernhardt, J., Using mid infrared technology as new method for the determination of the dwell time of salivary substitutes on three-dimensional gingiva models. BMC Ear Nose Throat Disord.

2016 Mar 15;16:6. doi: 10.1186/s12901-016-0025-5. PMID: 26985168; PMCID: PMC4793747.

Kramvis, A., Chang, KM., Dandri, M. et al. A roadmap for serum biomarkers for hepatitis B virus: current status and future outlook. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 19, 727–745 (2022). https://doi.org/10.1038/ s41575-022-00649-z

Piratvisuth, T. (2020). Hepatitis B: A very real health danger. https://www.samitivej hospitals.com/article/detail/hepatitis-b-a-very-real-health-danger

Sharma, S. K., Saini, N., & Chwla, Y. (2005). Hepatitis B virus: inactive carriers. Virology journal, 2, 82. https://doi.org/10.1186/ 1743-422X-2-82

World Health Organization. (2023). Hepatitis B. World Health Organization; World Health Organization. www.who.int/ news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. ศิโรวัลลิ์ เรือนทิพย์ ที่ช่วยสนับสนุนและให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดลองเป็นอย่างดี ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ภายใต้สังกัดของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์พื้นฐานและห้องปฏิบัติการในการศึกษาวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (NSTDA) ที่ให้เงินทุนสนับสนุนการพัฒนาโครงงาน