

การพัฒนาเซนเซอร์ชนิดการไหลในแนวระนาบสำหรับการตรวจโรค ไวรัสตับอักเสบบีจากน้ำลาย

ณัฐชานนท์ รอดเดช^{1*}, กริชเพชร โคตรหลักคำ¹, อุษา จินเจนกิจ¹, สุดเขต ไชโย²

¹โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม

²สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

*natchanon.pak@gmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มุ่งเน้นการใช้วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยใช้หลักการพื้นฐานเดียวกับการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างเลือด โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มการเข้าถึงได้โดยการพัฒนาเซนเซอร์ชนิดการไหลในแนวระนาบแบบลาเทอรอลโฟลว์สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในตัวอย่างน้ำลาย เนื่องจากการเก็บตัวอย่างน้ำลายทำได้ง่ายและรุกรานผู้ป่วยน้อย เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจแอนติเจนจากเปลือกไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B surface antigen; HBsAg) และสามารถแสดงผลให้เห็นด้วยตาเปล่า โดยใช้เทคนิคทดสอบอิมมูโนแอสเสย์ชนิดการไหลในแนวระนาบ (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) ดังนั้นแถบเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงเป็นเซนเซอร์ต้นแบบทางเลือกหนึ่งที่ย่างง่ายและไม่ยุ่งยากสำหรับการตรวจหาแอนติเจนไวรัสตับอักเสบบีในน้ำลาย และยังสามารถนำไปต่อยอดพัฒนาสู่การทดสอบผู้ป่วยจริงในอนาคต

คำสำคัญ เทคนิคทดสอบอิมมูโนแอสเสย์ชนิดการไหลในแนวระนาบ (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 โดย

ระยะของโรคไวรัสตับอักเสบบีมีหลายระยะ 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 ซึ่งเป็นสารคัดหลั่งที่เก็บตัวอย่างได้ง่ายและไม่รุกรานผู้ป่วย (Non-invasive) จากคุณสมบัติข้างต้นทำให้ HBsAg เป็นทางเลือกที่ดีในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี และจะทำให้การจัดการโรคเป็นไปได้อย่างรวดเร็วมากขึ้น (Cruz et al, 2011).

การตรวจ HBsAg ผ่านทางน้ำลายเพื่อตรวจคัดกรองโรคไวรัสตับอักเสบบีเป็นวิธีที่ไม่รุกรานและสะดวกมากกว่าการตรวจผ่านทางตัวอย่างเลือด นอกจากการลดความไม่สบายใจของผู้ป่วย การตรวจผ่านทางน้ำลายยังสามารถทำให้การคัดกรองทั่วถึงมากขึ้นเนื่องจากการตรวจคัดกรองที่สะดวกและไม่ยุ่งยากทำให้ผู้ป่วยเข้าถึงระบบการคัดกรองมากขึ้น 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 นำมา

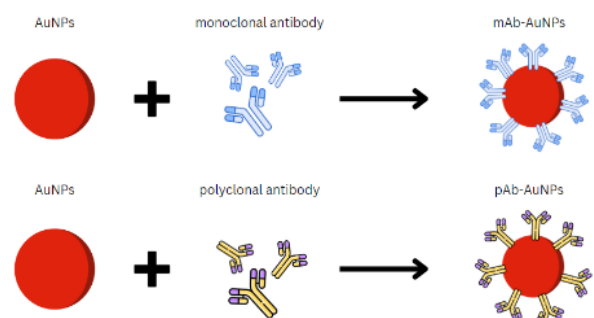
ทำปฏิกิริยาในปิกเกอร์ที่ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมภายในบรรจุน้ำปราศจากไอออน (DI water) 25 mL กวนด้วยความเร็ว 5000 rpm ภายใต้อุณหภูมิ $100^{\circ}C$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยดสารละลาย $K(AuCl_4) \cdot nH_2O$ (1%, w/v) ที่ละลายที่ขอบปิกเกอร์ หลังจากที่ยอดสารละลายเริ่มเดือด เติมสารละลาย Trisodium citrate (1%, w/v) ลงไป สารละลายที่ได้จะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม จากนั้นทำการปรับ pH เป็น 8.1 ด้วย $NaHCO_3$ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ ภายในขวดปลอดเชื้อ ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนปริมาตรของสารละลาย Trisodium citrate (1%, w/v) เป็น 0.25 mL, 0.5 mL, 1 mL และ 2 mL ตามลำดับ

ตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 350-700 nm วิเคราะห์กราฟความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความยาวคลื่นแสงกับการดูดกลืนแสงของสารละลาย AuNPs

2: การสังเคราะห์เซนเซอร์

การศึกษาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ติดฉลาก

เตรียม polyclonal antibody (Rabbit anti-Surface Ag pAb: Ab68519) ชนิดละ 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 6.25 $\mu g/mL$, 12.5 $\mu g/mL$, 25 $\mu g/mL$, 50 $\mu g/mL$, 100 $\mu g/mL$ และ 200 $\mu g/mL$ 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-Surface Ag mAb: Ab252692) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การติดฉลากแอนติบอดีกับ AuNPs

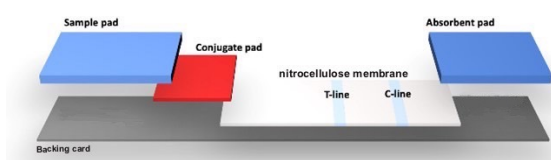
การศึกษาคู่แอนติบอดีที่เหมาะสม

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

การศึกษาความเข้มข้นของ polyclonal antibody

ตรึง polyclonal antibody ปริมาตร 0.5 μ L บนเส้นทดสอบ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 mg/mL ถึง 3.0 mg/mL โดยเพิ่มความเข้มข้นทีละ 0.5 mg/mL ความเข้มข้นละ 3 เส้นทดสอบ และหยด mAb-AuNPs ปริมาตร 8 μ L 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 μ g/mL ผสม PBT buffer อัตราส่วน 2:1 ลงบนแผ่นรองรับตัวอย่างของชุด positive ปริมาตรชุดละ 100 μ L และหยด PBT buffer ลงบนแผ่นรองรับตัวอย่างของชุด negative ปริมาตรชุดละ 100 μ L วัดค่าความเข้มแสงของเส้นทดสอบที่ได้ด้วยโปรแกรม ImageJ

การศึกษาปริมาณ mAb-AuNPs บนแผ่นคอนจูเกต

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

การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์

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

3: การทดสอบความประสิทธิภาพของแถบเซนเซอร์

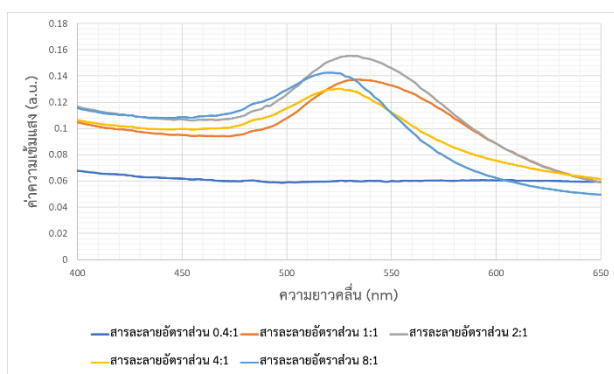
เตรียมน้ำลายเทียมตามที่ระบุในงานวิจัยของ Engelhart et al. (2016) ตรวจสอบขีดจำกัดการตรวจวัดของเซนเซอร์โดยทดสอบกับน้ำลายเทียมที่มี HBsAg ความเข้มข้นตั้งแต่ 6 μ g/mL ถึง 0.01 μ g/mL ปริมาตร 100 μ L สังเกตการแสดงผลของเซนเซอร์หลังจากการทดสอบ วัดค่าความเข้มแสงของเส้นทดสอบที่ได้ด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อทดสอบค่าขีดจำกัดการตรวจวัด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

3. ผลและอภิปรายผลการทดลอง

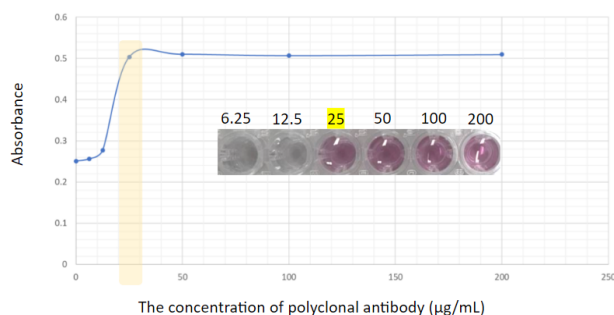
1: การสังเคราะห์อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร

ขนาดที่เหมาะสมของ AuNPs ที่ใช้ในการทำชุดทดสอบอิมมูโนแอสเสย์ชนิดการไหลในแนบระนาบคือระหว่าง 20-40 nm ซึ่งจะมีค่า $\lambda_{\max}$ อยู่ในช่วง 520-540 nm จากการสังเคราะห์อนุภาค AuNPs โดยการศึกษาปริมาณของสารละลาย Trisodium citrate (1%, w/v) ต่อ ปริมาตร สารละลาย 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 สามารถเกิดการแขวนลอยอยู่ในของอนุภาคทองคำได้ สารละลายจึงเห็นเป็นสีแดงเข้ม ซึ่งจากการศึกษาพบว่าขนาดของ AuNPs ที่แตกต่างกันจะมีค่า $\lambda_{\max}$ แตกต่างกัน สารละลาย AuNPs ที่สังเคราะห์ได้จากอัตราส่วน 1:1, 2:1, 4:1, และ 8:1 มีค่า $\lambda_{\max}$ อยู่ในช่วง 520-540 nm ทั้งหมด เมื่อพิจารณาสีของสารละลาย



รูปที่ 3 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Trisodium citrate ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs



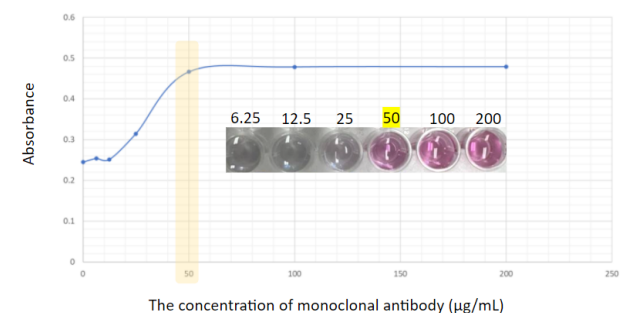
รูปที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ polyclonal antibody กับค่าการดูดกลืนแสงของ pAb-AuNPs ที่ความยาวคลื่น 538 nm

AuNPs พบว่าสารละลาย AuNPs ที่ได้จากสารละลาย 1:1 มีค่า $\lambda_{\max}$ เท่ากับ 534 nm ซึ่งจะให้สีแดงที่เข้มที่สุด จึงสามารถสรุปได้ว่าสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์ AuNPs ในการทดลองนี้คืออัตราส่วน 1:1

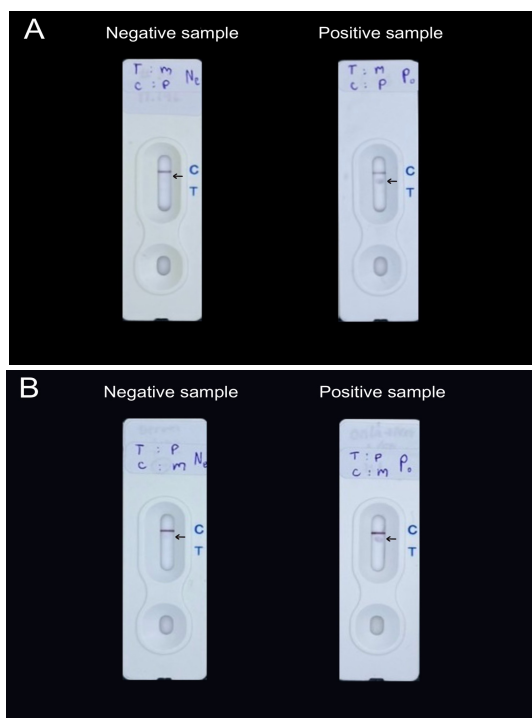
2: การสังเคราะห์เซนเซอร์

จากการศึกษาค่าความยาวคลื่นของดูดกลืนแสงของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย AuNPs ในช่วงความยาวคลื่น 450-700 nm เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการติดฉลาก เมื่อพิจารณาจากการดูดกลืนแสงของ pAb-AuNPs ที่ค่าความยาวคลื่น 538 nm (ค่า $\lambda_{\max}$ ของ AuNPs ก่อนทำการติดฉลาก) พบว่าความเข้มข้นของ polyclonal antibody ที่เหมาะสมที่สุดในการติดฉลากกับ AuNPs คือ 25 $\mu\text{g/mL}$ เนื่องจากใช้ปริมาณแอนติบอดีต่ำที่สุด (รูปที่ 4) และความเข้มข้นของ monoclonal antibody ที่เหมาะสมที่สุดในการติดฉลากกับ AuNPs คือ 50 $\mu\text{g/mL}$ (รูปที่ 5)

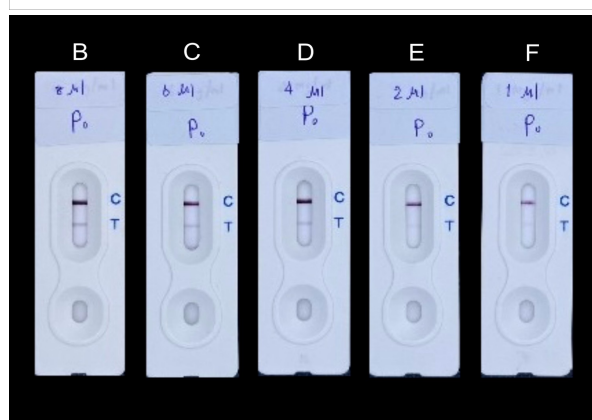
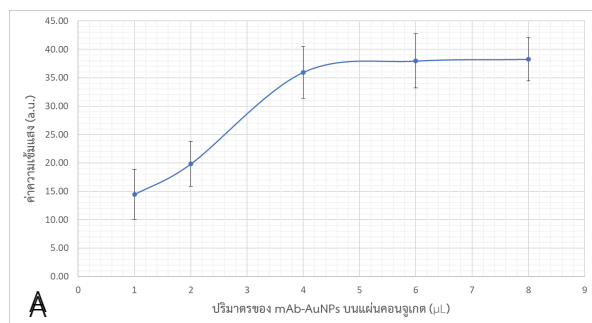
จากการทดสอบหาแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบระหว่าง 1. pAb-AuNPs อยู่ที่แผ่นคอนจูเกตและ monoclonal antibody อยู่ที่เส้นทดสอบ 2. mAb-AuNPs อยู่ที่แผ่นคอนจูเกตและ polyclonal antibody อยู่ที่เส้นทดสอบ พบว่าเมื่อทดสอบผลด้วยตัวอย่าง positive ทั้งสองวิธีสามารถทำให้เกิดจุดสีขึ้น (ชี้ด้วยลูกศร) ที่เส้นทดสอบได้ (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

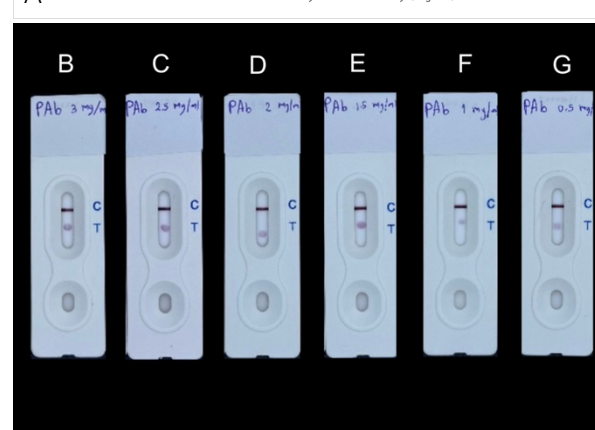
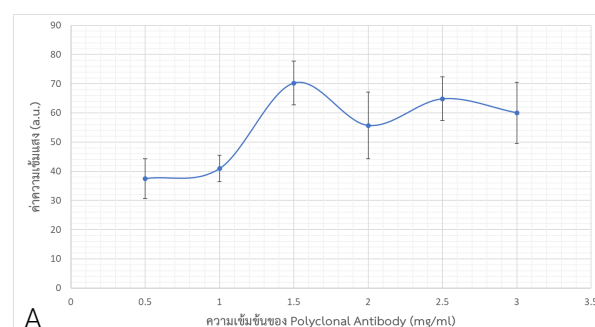


รูปที่ 7 (A) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มแสงของ T-line กับปริมาณของ mAb-AuNPs บนแผ่นคอนจูเกตสำหรับชุด positive (B) 8 μL (C) 6 μL (D) 4 μL (E) 2 μL (F) 1 μL

เปรียบเทียบกับชุดที่ 1 ดังนั้นคู่แอนติบอดีแบบชุดทดสอบที่ 2 จึงเหมาะสมที่สุด

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงผลของเซนเซอร์โดยการทดสอบปริมาณของ mAb-AuNPs, ความเข้มข้นของ polyclonal antibody บนเส้นทดสอบ และชนิดของบัฟเฟอร์ พบว่าปริมาณที่เหมาะสมที่สุดของ 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



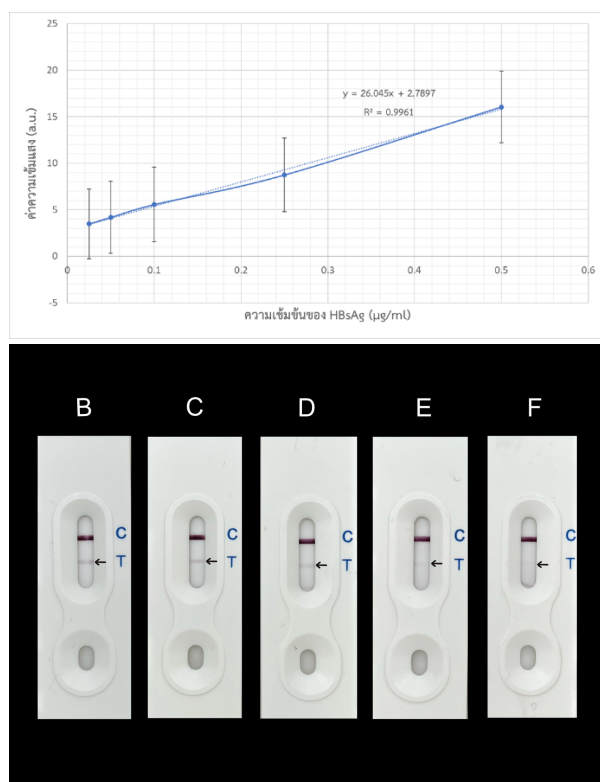
รูปที่ 8 (A) แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มแสงของ T-line กับความเข้มข้นของ polyclonal antibody (B) 3 mg/mL (C) 2.5 mg/mL (D) 2 mg/mL (E) 1.5 mg/mL (F) 1 mg/mL (G) 0.5 mg/mL

3: การทดสอบประสิทธิภาพของแถบเซนเซอร์

Buffer type	Migration time (min)
PBS	10.19
PBST _{0.5}	8.25
PBS + 1%BSA	14.30
PBT _{0.5}	12.05

ตารางที่ 1 ตารางแสดงระยะเวลาที่ mAb-AuNPs เคลื่อนไปถึงแผ่นดูดซับสำหรับสตริปเทสที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ บนแผ่นรองรับตัวอย่าง

ได้ด้วยตาเปล่าคือ 0.025 µg/mL (รูปที่ 9) สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพจริงของเซนเซอร์ จำเป็นต้องมีการทดสอบกับตัวอย่างน้ำลายจริงจากผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในระยะต่าง ๆ เนื่องจากจะมีความเข้มข้นของ 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% ดังนั้นแถบเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นเซนเซอร์ต้นแบบทางเลือกหนึ่งที่ยางและไม่ยุ่งยากสำหรับการตรวจหาแอนติเจนไวรัสตับอักเสบบีในน้ำลาย 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. ศิโรวัลล์ เรือนทิพย์ ที่ช่วยสนับสนุนและให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดลองเป็นอย่างดี ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ภายใต้สังกัดของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์พื้นฐานและห้องปฏิบัติการในการศึกษาวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (NSTDA) ที่ให้เงินทุนสนับสนุนการพัฒนาโครงการ