

การพัฒนาเทคนิค HELICASE DEPENDENT AMPLIFICATION ควบคู่กับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยใช้
ย้อมสี SYBR GREEN I (HDA/SYBR GREEN I) สำหรับการตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์
เกล็ดโลหิต



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF HELICASE DEPENDENT AMPLIFICATION TECHNIQUE WITH NECKED
EYE DETECTION BY SYBR GREEN I (HDA/SYBR GREEN I) FOR DETECTION OF BACTERIAL
CONTAMINATION IN PLATELET PRODUCTS



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

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาเทคนิค HELICASE DEPENDENT

AMPLIFICATION ควบคุมกับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี

SYBR GREEN I (HDA/SYBR GREEN I) สำหรับการตรวจ

การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

โดย

น.ส.วรางคณา แยมเกิด

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์

และวิทยาภูมิคุ้มกัน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ภาวิณี คุปตวินทุ)

วรางคณา แยมเกต : การพัฒนาเทคนิค HELICASE DEPENDENT AMPLIFICATION ควบคู่กับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR GREEN I (HDA/SYBR GREEN I) สำหรับการตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต. (DEVELOPMENT OF HELICASE DEPENDENT AMPLIFICATION TECHNIQUE WITH NECKED EYE DETECTION BY SYBR GREEN I (HDA/SYBR GREEN I) FOR DETECTION OF BACTERIAL CONTAMINATION IN PLATELET PRODUCTS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย อาจก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิตที่รุนแรงและนำไปสู่การเสียชีวิตได้ ดังนั้นจึงมีการกำหนดมาตรฐานให้งานธนาคารโลหิต ทำการตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตก่อนนำไปใช้กับผู้ป่วย เพื่อลดอาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้น วิธีการตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดที่พบได้บางประการ อาทิเช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สามารถปฏิบัติได้ในห้องปฏิบัติการทางธนาคารโลหิต การทดสอบที่ใช้ระยะเวลาาน ซึ่งไม่เหมาะสมกับอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่สั้นประมาณ 5 วัน และต้นทุนของการทดสอบที่มีราคาแพง วัตถุประสงค์ของการศึกษารั้งนี้เพื่อพัฒนาเทคนิค Helicase dependent amplification ควบคู่กับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR Green I (HDA/SYBR Green I) สำหรับตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต โดยใช้ Primer ที่ถูกออกแบบให้จำเพาะต่อยีน 16s rRNA ซึ่งเป็น Universal gene ของเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดสอบกับตัวอย่างผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ จำนวน 96 ตัวอย่าง พบว่าเทคนิค HDA/SYBR Green I มีความไวและความจำเพาะสูง เท่ากับ 96% และ 100% ตามลำดับ และมีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค HDA/AGE เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR การนับจำนวนโคโลนี และเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System พบว่าเทคนิค HDA/SYBR Green I มีความจำเพาะสูงเท่ากับ 100% แต่มีความไวอยู่ในช่วงระหว่าง 63-76% จึงทำให้มีความสอดคล้องกันในระดับปานกลางถึงดี อย่างไรก็ตาม เมื่อนำเทคนิค HDA/SYBR Green I ตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตเฉพาะวันที่ 2 ถึง 5 ของการเก็บรักษา พบว่ามีความไวที่สูงขึ้น เท่ากับ 88% และมีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก เทคนิค HDA/SYBR Green I มีค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของ DNA ต้นแบบที่สามารถตรวจได้ เท่ากับ 1 ng และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีโอกาสพบการปนเปื้อนได้ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต เทคนิค HDA/SYBR Green I ที่ได้พัฒนาขึ้น มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน อาศัยเพียงกล่องควบคุมอุณหภูมิที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิตทั่วไปในการทำปฏิกิริยา และให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว สามารถนำไปพัฒนาต่อและประยุกต์ใช้สำหรับตรวจคัดกรองหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตในอนาคต

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2562	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6076759037 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: PLATELET, BACTERIAL CONTAMINATION, HELICASE DEPENDENT AMPLIFICATION, SYBR GREEN I

Warangkana Yamket : DEVELOPMENT OF HELICASE DEPENDENT AMPLIFICATION TECHNIQUE WITH NECKED EYE DETECTION BY SYBR GREEN I (HDA/SYBR GREEN I) FOR DETECTION OF BACTERIAL CONTAMINATION IN PLATELET PRODUCTS. Advisor: Asst. Prof. PANAN RATTHAWONGJIRAKUL, Ph.D.

Bacterial contamination of platelet products may lead to severe sepsis that can be fatal to the recipient's death. Thus bacterial contamination in the platelet products should be detected before applying with the patients, in order to minimise any adverse reaction that may occur. Up to now, several bacterial contamination detection methods still have some limitations. These include an unsuitable practice for bacterial culture in the blood banking working area, time-consuming that not agree with a 5-day short shelf life of the platelet, and also the high cost of the assay. This study aimed to develop Helicase dependent amplification technique in combination with a necked eye detection using SYBR Green I (HDA/ SYBR Green I) for detection of bacterial contamination in platelet products. Primers used in this study was specifically designed to combine with a universal bacterial gene, 16s rRNA. When testing with 96 spiked platelet products derived from different storage periods, HDA/SYBR Green I showed 96% and 100% of sensitivity and specificity respectively with almost perfect correlation compared with HDA/AGE. While analysing with PCR, colony count and BacT/Alert system, HDA/SYBR Green I showed 63-76% and 100% of sensitivity and specificity respectively with moderate to good correlation. However, when testing with only a 2-day or over platelet products, HDA/SYBR Green I showed a higher sensitivity of 88% with almost perfect correlation. A limit of detection of HDA/SYBR Green I was 1 ng, and these were no cross-reaction with other organisms that may probably contaminate in platelet products. The developed HDA/SYBR Green I is rapid and simplistic, and only requires an easy-to-find heat box, which is available in general blood banking laboratories, for the amplification step. This technique is suitable for further development as the alternative methods to detect bacterial contamination in the platelet product in future.

Field of Study:	Molecular Science of Medical Microbiology and Immunology	Student's Signature
Academic Year:	2019	Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับความกรุณาอย่างสูงจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณามอบโอกาสในการเป็นนิสิตในความดูแลของท่าน มอบความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือและแรงสนับสนุนในทุกด้าน ตลอดจนแนวทางแก้ไขปัญหาดังต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ ด้วยความตระหนักถึงความทุ่มเทของอาจารย์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ที่กรุณาเป็นประธานสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อาจารย์ภาวิณี คุปตวิณฑุ รองผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่กรุณาเป็นกรรมการภายนอกในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.รัชนิพร ดิยะวิสุทธิ์ศรี ที่เป็นกรรมการในการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ หัวหน้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก

ขอขอบพระคุณศูนย์บริการโลหิตและภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 4 จ.ราชบุรี สภากาชาดไทย ที่อนุเคราะห์ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณนางสาวสมรภัท เพชรโฉมฉาย หัวหน้าภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 4 จ.ราชบุรี สภากาชาดไทย ที่กรุณามอบโอกาสในการศึกษาต่อ คำแนะนำ และความช่วยเหลือในทุกด้าน และขอขอบพระคุณเพื่อนร่วมงานทุกท่าน ที่ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 4 จ.ราชบุรี สภากาชาดไทย สำหรับการแบ่งเบาภาระงานขณะศึกษาต่อ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัย ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ถ่ายทอดประสบการณ์ และวิชาความรู้ต่าง ๆ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณเพื่อน พี่ และน้อง คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาต่าง ๆ และท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนในทุกด้านเพื่อการศึกษาต่อในครั้งนี้

จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
3. ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต.....	5
1.1 เกล็ดโลหิต.....	5
1.2 ข้อบ่งชี้การใช้ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต.....	6
2. การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต.....	7
2.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจากการรวม Buffy coat และขจัดเม็ดโลหิตขาวด้วยการ ปั่น (Pooled Leukocytes Poor Platelet Concentrate: LPPC).....	7
2.2 การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจากการรวม Interim platelet unit concentrates (IPU PCs).....	8
2.3 การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตด้วยวิธี Plateletpheresis (Single donor platelet: SDP).....	8

3. ความเสี่ยงจากการรับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตและอาการแทรกซ้อนที่ไม่พึงประสงค์	9
4. เกณฑ์การวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียจากการรับโลหิต (Transfusion transmitted bacterial infection, TTBI).....	10
5. แหล่งที่มาของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต	11
6. อุบัติการณ์การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต.....	12
7. การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเกล็ดโลหิต.....	14
7.1 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีดั้งเดิม	15
7.2 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่องอัตโนมัติ	16
7.3 ScanSystem	17
7.4 ชุดทดสอบ Pan Genera Detection (PGD).....	17
7.5 การตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่า pH	18
7.6 เทคนิค Flow cytometry.....	18
7.7 วิธีการตรวจระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา	19
8. Helicase dependent amplification (HDA).....	20
8.1 หลักการทำงานของเทคนิค HDA	20
8.2 ข้อได้เปรียบของเทคนิค HDA ที่มีต่อเทคนิค Isothermal amplification อื่น ๆ.....	21
8.3 การประยุกต์ใช้เทคนิค HDA ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย	24
9. การตรวจสอบผลผลิตภายหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค HDA.....	25
9.1 การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Real time.....	25
9.2 การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis	26
9.3 การตรวจสอบผลผลิตด้วยหลักการ Lateral flow	27
9.4 การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Microfluidic	28
9.5 การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Flocculation.....	29
9.6 การตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I.....	29

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์	31
2. เครื่องมือ.....	32
3. วิธีการทดลอง.....	32
3.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ใช้ในการศึกษา.....	32
3.2 เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	33
3.3 การสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	33
3.4 การออกแบบ Primer	33
3.5 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของ PCR Primer ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR).....	34
3.6 การพัฒนาเทคนิค Helicase dependent amplification ควบคู่กับการอ่านผลด้วยสี SYBR Green I (HDA/SYBR Green I) สำหรับตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต.....	35
3.7 การทดสอบความจำเพาะ.....	39
3.8 การทดสอบหา Limit of detection.....	39
3.9 การตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา.....	40
3.10 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของเทคนิค HDA/SYBR Green I.....	45
3.11 การคำนวณค่าความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยค่าสถิติ Kappa.....	48
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	50
1. การสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก.....	50
2. การวิเคราะห์คุณสมบัติของ Primer ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม Blast.....	50
3. การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของ PCR Primer ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)	55

3.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR.....	55
3.2 การหาลำดับเบสของผลผลิต PCR.....	56
4. การพัฒนาเทคนิค Helicase dependent amplification ควบคู่กับการอ่านผลด้วยสี SYBR Green I (HDA/SYBR Green I) สำหรับตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต	60
4.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Primer	62
4.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....	67
4.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของ MgSO ₄ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....	73
4.4 การทดสอบหาความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	78
4.5 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....	83
4.6 การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....	88
4.7 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี SYBR Green I.....	95
5. การทดสอบความจำเพาะ	101
6. การทดสอบหา Limit of detection	103
7. การทดสอบตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา	113
8. การคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของเทคนิค HDA/SYBR Green I.....	131
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	138
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	151
บรรณานุกรม.....	153
ประวัติผู้เขียน.....	168

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ความชุกของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตในแต่ละประเทศ (49, 50).....	13
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต.....	20
ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบรายละเอียดของเทคนิค Isothermal amplification ชนิดต่าง ๆ (63, 64, 66, 67).....	23
ตารางที่ 4 รายละเอียดของ Primer ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้.....	34
ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค HDA/AGE.....	46
ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ของเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค PCR.....	46
ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ของเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลการทดสอบจากการนับจำนวนโคโลนี.....	47
ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ของเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลการทดสอบจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System.....	47
ตารางที่ 9 วิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา จากเทคนิคต่าง ๆ ด้วยค่าสถิติ Kappa.....	48
ตารางที่ 10 เกณฑ์การพิจารณาระดับความสอดคล้องกันของสถิติ Kappa ตามแนวทางของ Landis และ Koch (93).....	49
ตารางที่ 11 สรุปลักษณะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต.....	101

ตารางที่ 12 ความเข้มข้นน้อยที่สุดของ DNA ต้นแบบที่เทคนิค HDA และ PCR สามารถตรวจได้ โดยตรวจสอบผลผลิต HDA ด้วยการเติมสี SYBR Green I (HDA/SYBR Green I) และเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis (HDA/AGE) และตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค 1.5% Agarose gel electrophoresis.....	104
ตารางที่ 13 การทดสอบตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I.....	116
ตารางที่ 14 การทดสอบตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/AGE	117
ตารางที่ 15 การทดสอบตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค PCR.....	118
ตารางที่ 16 การทดสอบตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System	119
ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 0 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับเทคนิค HDA/AGE	132
ตารางที่ 18 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 0 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลจากการทดสอบด้วยเทคนิค PCR	132
ตารางที่ 19 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 0 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับการนับจำนวนโคโลนี	133

<p>ตารางที่ 20 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 0 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับ ผลจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System.....</p>	<p>134</p>
<p>ตารางที่ 21 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 2 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับ เทคนิค HDA/AGE</p>	<p>135</p>
<p>ตารางที่ 22 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 2 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับ ผลจากการทดสอบด้วยเทคนิค PCR</p>	<p>135</p>
<p>ตารางที่ 23 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 2 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับ การนับจำนวนโคโลนี</p>	<p>136</p>
<p>ตารางที่ 24 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 2 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับ ผลจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System.....</p>	<p>137</p>

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 กระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค HDA	21
รูปที่ 2 หลักการทำงานของ TaqMan probe ในการตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณ สารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real time	26
รูปที่ 3 การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยหลักการ Lateral flow	28
รูปที่ 4 ตัวอย่างการตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Flocculation ของเชื้อ Mycobacterium.....	29
รูปที่ 5 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของ Forward PCR primer ด้วยโปรแกรม BLAST.....	51
รูปที่ 6 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของ Reverse PCR primer ด้วยโปรแกรม BLAST	52
รูปที่ 7 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของ Forward HDA primer ด้วยโปรแกรม BLAST.....	53
รูปที่ 8 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของ Reverse HDA primer ด้วยโปรแกรม BLAST	54
รูปที่ 9 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR Primer ที่จำเพาะต่อยีน 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก บน 1.5% Agarose gel electrophoresis.....	55
รูปที่ 10 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ <i>S. aureus</i> (ATCC29523) กับฐานข้อมูล ในธนาคารยีนของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST	57
รูปที่ 11 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> กับฐานข้อมูลในธนาคารยีน ของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST.....	58
รูปที่ 12 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ <i>B. cereus</i> กับฐานข้อมูลในธนาคารยีน ของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST.....	58
รูปที่ 13 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ <i>E. coli</i> (ATCC25922) กับฐานข้อมูล ในธนาคารยีนของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST	59
รูปที่ 14 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853) กับฐานข้อมูล ในธนาคารยีนของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST	59

รูปที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ <i>S. marcescens</i> กับฐานข้อมูลในธนาคารยีน ของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST.....	60
รูปที่ 16 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก บน 2% Agarose gel electrophoresis	61
รูปที่ 17 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย Primer ความเข้มข้น 50 nmol ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก.....	63
รูปที่ 18 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย Primer ความเข้มข้น 100 nmol ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	64
รูปที่ 19 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย Primer ความเข้มข้น 150 nmol ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	65
รูปที่ 20 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย Primer ความเข้มข้น 200 nmol ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	66
รูปที่ 21 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย DNA ความเข้มข้น 1 ng ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	68
รูปที่ 22 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย DNA ความเข้มข้น 5 ng ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	69
รูปที่ 23 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย DNA ความเข้มข้น 10 ng ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก.....	70
รูปที่ 24 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย DNA ความเข้มข้น 15 ng ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก.....	71
รูปที่ 25 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย DNA ความเข้มข้น 20 ng ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก.....	72
รูปที่ 26 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย MgSO ₄ ความเข้มข้น 3 mM ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	74
รูปที่ 27 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย MgSO ₄ ความเข้มข้น 3.5 mM ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	75

รูปที่ 41 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยระยะเวลา 60 นาที ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	92
รูปที่ 42 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยระยะเวลา 75 นาที ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	93
รูปที่ 43 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยระยะเวลา 90 นาที ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	94
รูปที่ 44 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 100X ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	96
รูปที่ 45 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 200X ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก	97
รูปที่ 46 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 300X ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก.....	98
รูปที่ 47 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก.....	99
รูปที่ 48 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 500X ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก.....	100
รูปที่ 49 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา HDA ที่จำเพาะต่อยีน 16s rRNA.....	102
รูปที่ 50 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ <i>S. aureus</i> (ATCC29523).....	105
รูปที่ 51 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ <i>S. epidermidis</i>	106
รูปที่ 52 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ <i>B. cereus</i>	108
รูปที่ 53 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ <i>E. coli</i> (ATCC25922).....	109

หน้า

รูปที่ 54 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853).....	111
รูปที่ 55 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ <i>S. marcescens</i>	112
รูปที่ 56 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ <i>S. aureus</i> (ATCC29523) ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR.....	120
รูปที่ 57 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR.....	122
รูปที่ 58 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ <i>B. cereus</i> ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR.....	124
รูปที่ 59 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ <i>E. coli</i> (ATCC25922) ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR.....	126
รูปที่ 60 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853) ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR.....	128
รูปที่ 61 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ <i>S. marcescens</i> ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR.....	130

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

โลหิตและส่วนประกอบโลหิต เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการรักษาผู้ป่วยโดยยังไม่สามารถหาสิ่งใดมาทดแทนได้ (1) การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในโลหิตและส่วนประกอบโลหิตเป็นปัญหาที่พบมายาวนาน และยังคงมีการรายงานมาจนถึงปัจจุบัน (2, 3) จากรายงาน Serious Hazard of Blood Transfusion (SHOT) ประเทศอังกฤษ ในปี ค.ศ. 1996-2017 พบผู้ป่วยติดเชื้อจากการได้รับโลหิตและส่วนประกอบโลหิต ที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียเป็นอัตราส่วนสูงที่สุด ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิตอย่างรวดเร็วและรุนแรง นำไปสู่การเสียชีวิต (4) สอดคล้องกับการรายงานขององค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) ในปี ค.ศ. 2012-2016 ที่พบว่าสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ป่วยจากการได้รับโลหิตและส่วนประกอบโลหิต ที่เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียเป็นอันดับ 3 รองจากการเกิด Transfusion related acute lung injury (TRALI) และ Transfusion associated circulatory overload (TACO) ตามลำดับ (5) ในปัจจุบันแม้ว่าจะมีการพัฒนาปรับปรุงและควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ในการเจาะเก็บโลหิต รวมไปถึงการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในโลหิตและส่วนประกอบโลหิต (6, 7) แต่สำหรับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตมีการจัดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5-7 วัน ภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า (8) ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวสามารถเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนเข้ามาในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต การศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตกับระยะเวลาในการเก็บรักษา (9) ซึ่งหากผู้ป่วยได้รับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย อาจเกิดผลกระทบที่มีความรุนแรงของอาการทางคลินิก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย และสภาวะของผู้ป่วยขณะนั้น (10)

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในโลหิตและส่วนประกอบโลหิต ก่อนนำไปใช้กับผู้ป่วยเป็นแนวทางในการลดความเสี่ยงของการรับโลหิตและส่วนประกอบโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย (11)

โดยในปี ค.ศ. 2004 สมาคมธนาคารโลหิตแห่งสหรัฐอเมริกา (American association of blood banks: AABB) ได้กำหนดมาตรฐานไว้ว่าธนาคารโลหิต ศูนย์บริการโลหิต หรือศูนย์การถ่ายโลหิต ควรมีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตก่อนนำไปใช้กับผู้ป่วย (12) เพื่อลดอาการไม่พึงประสงค์จากการติดเชื้อแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนเข้ามาได้ การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย แม้ว่าจะยังเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์โลหิตต่าง ๆ แต่ด้วยข้อจำกัดของลักษณะห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิต ที่ไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ในพื้นที่ห้องปฏิบัติการได้ ทำให้เทคนิคดังกล่าวไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานประจำ สมาคมธนาคารโลหิตแห่งสหรัฐอเมริกาได้แนะนำวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต อาทิเช่น การตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติ BacT/ALERT การตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติ eBDS (Enhancement of a culture-based bacterial detection system) การตรวจด้วยชุดตรวจชนิดรวดเร็ว PGD (Pan Genera Detection) หรือการตรวจหาความเข้มข้นของระดับน้ำตาลกลูโคสและพีเอชในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต นอกจากนี้ด้วยความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีในปัจจุบันทำให้มีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ มาใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตเพิ่มมากขึ้น อาทิเช่น เทคนิค Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) หรือเทคนิค Flow cytometry อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวยังไม่เป็นที่นิยมใช้แพร่หลายในงานประจำสำหรับการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต เนื่องจากมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายที่สูง และต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะซึ่งต้องมีการดูแลรักษาต่อเนื่อง (13)

ปัจจุบันเทคนิค Helicase dependent amplification (HDA) ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อจุลชีพอย่างแพร่หลาย โดยเทคนิคดังกล่าวอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิเดียว (Isothermal amplification) ซึ่งเริ่มจากเอนไซม์ Helicase ช่วยในการแยก DNA แม่แบบสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยการทำลายพันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมระหว่าง DNA สายคู่ จากนั้น Single strand binding protein เข้ามาจับที่ DNA สายเดี่ยว เพื่อป้องกันไม่ให้ DNA แม่แบบเกิดกลับไปจับกันเป็น DNA สายคู่ หลังจากนั้น Primer เข้ามาจับกับบริเวณที่เป็นลำดับเบสคู่สมของ DNA แม่แบบ และเอนไซม์ Polymerase จะนำ Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ที่เป็นคู่สมกับสาย DNA แม่แบบเข้ามาต่อความยาวออกไปจาก Primer ในทิศทาง 5' ไป 3' ทำให้เกิด DNA สายใหม่ ปฏิกริยาดำเนินต่อไปเป็นวัฏจักรทำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารพันธุกรรม (14)

เทคนิค HDA มีจุดเด่นหลายประการ อาทิเช่น การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิเดียว มีขั้นตอนในการทดลองไม่ซับซ้อน มีความสะดวก รวดเร็ว สามารถนำไปอ่านผลด้วยเทคนิคต่าง ๆ ได้ง่าย มีความไวในการตรวจจับและความจำเพาะต่อเป้าหมายในการตรวจสูง และไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะ โดยในขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิอาจให้ความร้อนโดยการใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลอง หรือปฏิกิริยาเคมี ซึ่งเหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์จำกัด ไม่มีเครื่องมือเฉพาะทาง (14-16)

จากข้อมูลดังกล่าวมาข้างต้น ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำเทคนิค HDA มาพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา HDA และ Primer ที่จำเพาะต่อ Universal gene ของเชื้อแบคทีเรีย และใช้การอ่านผลด้วยตาเปล่าภายหลังการเติมสี SYBR Green I ซึ่งเทคนิคดังกล่าวใช้เวลาในการทดสอบจนถึงกระบวนการอ่านผลทั้งสิ้นเพียง 60-90 นาที และไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะหรืออุปกรณ์เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใด ๆ จึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตในห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิตได้อย่างรวดเร็ว ก่อนนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปใช้กับผู้ป่วย ซึ่งจะส่งผลเชิงบวกต่อขั้นตอนการรักษาผู้ป่วยของแพทย์

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิค HDA ควบคู่กับการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR Green I (HDA/SYBR Green I) สำหรับตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

3. ขอบเขตของงานวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้พัฒนาเทคนิค HDA/SYBR Green I สำหรับตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิเดียวคงที่โดยใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATCC29523) เชื้อ *Escherichia coli* (ATCC25922) เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) เชื้อ *Bacillus cereus* เชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และเชื้อ *Serratia marcescens* เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์

ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ซึ่ง DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก ถูกสกัดโดยวิธีการต้ม เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา HDA โดยใช้ Primer ซึ่งจำเพาะกับยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิต HDA ด้วยการเติมสี SYBR Green I ซึ่งสามารถอ่านผลที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า ทั้งนี้ทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Primer DNA MgSO₄ NaCl สี SYBR Green I อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I จากนั้นนำเทคนิค HDA/SYBR Green I ที่ได้พัฒนาขึ้นมาทดสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างเทคนิค PCR การนับจำนวนโคโลนี และเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

4.1 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจทางอณูชีววิทยาที่สะดวก รวดเร็ว มีความไวและจำเพาะสูง และไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะ สำหรับตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

4.2 สามารถนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการทางธนาคารโลหิตของภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 4 จ.ราชบุรี เพื่อช่วยตรวจคัดกรองการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ซึ่งจะช่วยให้ผู้รับบริจาคหรือผู้ป่วยได้รับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีความปลอดภัย อันเป็นการลดความสูญเสียที่อาจเกิดขึ้นตามมาได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

1.1 เกล็ดโลหิต

ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากโลหิตที่ได้รับการบริจาค สามารถถูกเตรียมแบ่งออกได้เป็น เม็ดโลหิตแดง เม็ดโลหิตขาว พลาสมา และเกล็ดโลหิต (17) ซึ่งแต่ละผลิตภัณฑ์มีองค์ประกอบ ขั้นตอนการเตรียม และข้อบ่งชี้ในการใช้งานที่แตกต่างกันออกไป ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต หมายถึง ส่วนประกอบของโลหิตที่ช่วยทำให้เลือดแข็งตัว และช่วยอุดรอยฉีกขาดของเส้นเลือด (18) ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตสามารถเตรียมได้จากโลหิตครบส่วน (Whole blood derived platelets) ซึ่งนำมาปั่นแยกเพื่อเก็บเฉพาะเกล็ดโลหิตอีกครั้ง หรือการเตรียมด้วยวิธี Apheresis ซึ่งเป็นการแยกส่วนประกอบโลหิตชนิดใดชนิดหนึ่งออกจากตัวผู้บริจาค และคืนส่วนประกอบอื่นที่เหลือทั้งหมดกลับสู่ร่างกายผู้บริจาค องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้กำหนดชื่อผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตตามขั้นตอนกระบวนการเตรียม ตัวอย่างเช่น Platelets, Whole blood derived platelets, Random donor platelets หรือ Platelet concentrates ซึ่งเตรียมจากผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตโลหิตครบส่วน Plateletpheresis, Single donor platelets หรือ Apheresis platelets ซึ่งเตรียมด้วยวิธี Apheresis อย่างไรก็ตามการกำหนดชื่อด้วยวิธีดังกล่าวอาจสร้างความสับสนกับแพทย์ผู้สั่งใช้ผลิตภัณฑ์ จึงเป็นข้อจำกัดของการใช้ชื่อผลิตภัณฑ์ตามขั้นตอนกระบวนการเตรียม

การเตรียมผลิตภัณฑ์ในแต่ละวิธีจะได้ปริมาณเกล็ดโลหิตที่แตกต่างกัน อาทิเช่น หากเทียบกับขนาดการรักษาในผู้ใหญ่ (Therapeutic dose) ปริมาณเกล็ดโลหิตที่ต้องการเท่ากับ $3-4 \times 10^{11}$ เซลล์ ซึ่งผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่เตรียมจากโลหิตครบส่วน มีปริมาณเกล็ดโลหิตเท่ากับ 5.5×10^{10} เซลล์/ยูนิต ดังนั้นจึงต้องใช้ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตประมาณ 4-6 ยูนิต เพื่อให้มีปริมาณเหมาะสมกับขนาดการรักษาในผู้ใหญ่ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่เตรียมด้วยวิธี Apheresis มีปริมาณเกล็ดโลหิตสูงเท่ากับ 2 ถึง 3 เท่าของขนาดการรักษาในผู้ใหญ่ ดังนั้นในทางปฏิบัติจำเป็นต้องมีการแบ่งใช้ในแต่ละครั้ง

การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจากโลหิตครบส่วนจะถูกเก็บรักษาในถุงบรรจุโลหิตที่มีสาร Anticoagulant preservative ประกอบด้วย Citrate phosphate dextrose และ adenine (CPDA-1) หรือ มีเฉพาะ Citrate phosphate dextrose (CPD) เพียงอย่างเดียว ซึ่งโลหิตครบส่วนจะถูกนำไปปั่นแยกและเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตต่อไป ส่วนผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่เตรียมด้วยวิธี Apheresis จะถูกเก็บรักษาในสาร Anticoagulant preservative ที่ประกอบด้วย Citric acid sodium citrate และ dextrose (ACD-A) โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตมีอายุประมาณ 5-7 วัน และมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.4-7.4 การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตควรเก็บที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าตลอดเวลาจนกว่าจะถูกนำไปใช้ และถุงบรรจุเกล็ดโลหิตต้องมีคุณสมบัติที่ยอมให้ก๊าซออกซิเจนผ่านได้ เนื่องจากเกล็ดโลหิตจำเป็นต้องใช้ก๊าซออกซิเจนในการสร้างพลังงานผ่านกระบวนการ Aerobic mitochondrial phosphorylation หากปริมาณก๊าซออกซิเจนไม่เพียงพอ เกล็ดโลหิตจะเปลี่ยนมาสร้างพลังงานผ่านกระบวนการ Anaerobic glycolytic pathway แทน ทำให้เกิดกรดแลคติกซึ่งทำให้ค่าพีเอชมีความเป็นกรดมากขึ้น ส่งผลให้จำนวนเกล็ดโลหิตมีปริมาณลดลงได้ นอกจากนี้ในปัจจุบันเริ่มมีการนำ Platelet additive solutions (PAS) มาใช้ในการเก็บรักษาเกล็ดโลหิตแทนพลาสมา เนื่องมาจากการเก็บเกล็ดโลหิตในพลาสมาเพียงอย่างเดียว ทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ จากการเปลี่ยนแปลงทางปฏิกิริยาชีวเคมี ซึ่งเอนไซม์หลายชนิดมีผลเสียต่อคุณภาพของเกล็ดโลหิต นอกจากนี้สารละลาย PAS ยังสามารถรักษาระดับพีเอชได้สูงกว่า 6.0 จึงเป็นการป้องกันการเสื่อมคุณภาพของเกล็ดโลหิตที่อาจเกิดขึ้นได้ (8, 19, 20)

1.2 ข้อบ่งชี้การใช้ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

เกล็ดโลหิตมีหน้าที่หลักในกระบวนการห้ามเลือด โดยการทำงานของเกล็ดโลหิต เริ่มต้นจากกระบวนการ Platelet adhesion ซึ่งเกล็ดโลหิตจะเข้ายึดเกาะบริเวณ Subendothelial cell ของหลอดเลือดที่เกิดการฉีกขาด โดยอาศัย Glycoprotein receptor ที่อยู่บนผิวของเกล็ดโลหิต หลังจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการ Platelet activation ที่มีการส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของเกล็ดโลหิต ทำให้เกล็ดโลหิตมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และหลั่งสารต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเกล็ดโลหิต เช่น Adenosine diphosphate (ADP) และ Thromboxane A2 (TXA2) เพื่อกระตุ้นเกล็ดโลหิตบริเวณใกล้เคียงให้เกิดการทำงาน และเข้าสู่กระบวนการ Platelet aggregation โดย GPIIb/IIIa บนผิวเกล็ดโลหิตจับกับ Fibrinogen และ Von Willebrand factor ทำให้เกิดการเชื่อมโยงเกล็ดโลหิต

เข้าด้วยกัน เกิดเป็น Platelet plug มาดูบริเวณที่มีการฉีกขาดของหลอดเลือด (21, 22) ดังนั้นจึงนิยมให้ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตแก่ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับการแข็งตัวของโลหิต อาทิเช่น ผู้ป่วยโรค Von Willebrand ผู้ที่มีภาวะเกล็ดโลหิตต่ำ อาทิเช่น ผู้ป่วยโรคไขเลือดออก ผู้ป่วยที่มีอาการก้าวหน้าของโรคมะเร็ง หรือโรคไขกระดูกล้มเหลว หรือโรค aplastic anemia การใช้รักษาอาการบาดเจ็บที่มีการเสียเลือดต่าง ๆ เพื่อใช้ในกระบวนการห้ามเลือด (8, 23, 24) อย่างไรก็ตามไม่แนะนำให้เกล็ดโลหิตก่อนการผ่าตัดเพื่อป้องกันภาวะเลือดออกจากการผ่าตัด ยกเว้นรายที่มีเกล็ดโลหิตต่ำอยู่ก่อนแล้ว หรือมีโรคที่มีข้อบ่งชี้ต้องให้เกล็ดโลหิต ได้แก่ Immune thrombocytopenic purpura (ITP) Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) Untreated disseminated intravascular coagulation (DIC) และ Thrombocytopenic ที่เกิดจากภาวะ septicemia ซึ่งต้องรักษาสาเหตุก่อนจึงจะพิจารณาให้เกล็ดโลหิต ตามความจำเป็นขึ้นกับดุลยพินิจของแพทย์ (25, 26)

2. การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

สมาคมธนาคารโลหิตแห่งสหรัฐอเมริกา (American Association of Blood Banks: AABB) แนะนำเทคนิคการเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ซึ่งสามารถเตรียมได้หลายวิธี ดังนี้

2.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจากการรวม Buffy coat และขจัดเม็ดโลหิตขาวด้วยการปั่น (Pooled Leukocytes Poor Platelet Concentrate: LPPC)

Pooled Leukocytes Poor Platelet Concentrate หรือ LPPC เป็นผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ได้จากการรวม Buffy coat จำนวน 4 ยูนิต ของผู้บริจาคโลหิตที่มีหมู่โลหิตเดียวกัน โดย Buffy coat ทั้งหมดจะถูกนำมาผสมกับพลาสมา 1 ยูนิต ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวช่วยในการรวม แล้วนำมาปั่นแยกด้วยรอบการปั่นเบา (Light Spin) จากนั้นบีบแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นพลาสมาซึ่งมีเกล็ดโลหิตอยู่ ส่วนที่ขจัดทิ้งไปคือ เม็ดโลหิตขาว โดย LPPC 1 ยูนิต จะมีเกล็ดโลหิตมากกว่า 2.4×10^{11} เซลล์/ยูนิต ในพลาสมา 220-280 ml และมีปริมาณเม็ดโลหิตขาวไม่เกิน 2×10^8 เซลล์/ยูนิต (25, 27, 28) การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในงานประจำของงานบริการโลหิต เนื่องจากมาจาก LPPC จัดเป็น Leukocyte reduced blood components จึงลดโอกาสการเกิดการต่อต้านเกล็ดโลหิต (Platelet refractoriness) จาก HLA alloimmunization และการเกิด Febrile nonhemolytic transfusion reaction (FNHTR) (29) ปัจจุบันมีการนำสารละลาย PAS มาใช้ในการ

เก็บรักษาเกล็ดโลหิตแทนพลาสมา เรียกผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตชนิดนี้ว่า LPPC with PAS ซึ่งหมายถึง ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ได้จากการรวม Buffy coat จำนวน 4 ยูนิต ของผู้บริจาคโลหิตที่มีหมู่โลหิต เดียวกัน โดย Buffy coat ทั้งหมดจะถูกนำมาผสมกับพลาสมาที่ลดปริมาตรลงและมีการเติม PAS เข้าไปแทนที่ โดยมีสัดส่วนปริมาตรของพลาสมาและ PAS คิดเป็น 40% และ 60% การเตรียม ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตวิธีนี้มีข้อดี คือ การลดสัดส่วนของพลาสมาในเกล็ดโลหิตจะช่วยลด ภาวะแทรกซ้อนที่อาจพบได้ เช่น Transfusion related acute lung injury (TRALI) หรือ ปฏิกิริยา การแพ้อื่น ๆ ที่มีผลจากการรับพลาสมาในเกล็ดโลหิต และกรณีที่ต้องให้เกล็ดโลหิตต่าง หมู่โลหิต จะช่วยลดปัญหาเรื่องพลาสมาที่ไม่เข้ากัน เนื่องจากมีพลาสมาเหลืออยู่น้อย (30)

2.2 การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจากการรวม Interim platelet unit concentrates (IPU PCs)

หมายถึงเกล็ดโลหิตที่เตรียมมาจากการบริจาคโลหิตครบส่วนและนำไปปั่นแยกส่วนประกอบ โลหิต โดยสามารถปั่นแยกได้เป็นส่วนประกอบโลหิตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เม็ดโลหิตแดง พลาสมา และ IPU PCs ซึ่งใน IPC PCs จะมีพลาสมาของผู้บริจาคหลงเหลืออยู่ประมาณ 30 ml จากนั้นนำไปเก็บ รักษาที่ตู้เขย่าเกล็ดโลหิตข้ามคืนเพื่อให้เกิดการคลายตัวของเกล็ดโลหิต จากนั้นนำ IPU PCs จำนวน 4 ยูนิตมารวมกันใน Platelet additive solution (PAS) หรือสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้สำหรับ เก็บรักษาเกล็ดโลหิตแทนพลาสมา เพื่อผลิตเป็น IPU PCs 1 ยูนิต โดยจะมีเกล็ดโลหิตประมาณ 2.5×10^{11} เซลล์/ยูนิต และมีปริมาตรของพลาสมาและ PAS คิดเป็น 40% และ 60% ของปริมาตร ของเหลวโดยรวมทั้งหมด (8) ในขณะที่มีปริมาณเม็ดโลหิตขาวไม่เกิน 1.0×10^6 เซลล์/ยูนิต (29) การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตวิธีนี้มีข้อดีคือมีขั้นตอนการทำงานที่ลดลง ทำให้การเตรียมเกล็ดโลหิต มีความรวดเร็วมากขึ้น เมื่อเทียบกับการเตรียมเกล็ดโลหิตจากการบริจาคโลหิตครบส่วนเหมือนกัน (31)

2.3 การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตด้วยวิธี Plateletpheresis (Single donor platelet: SDP)

เป็นการเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจากผู้บริจาคคนเดียวเท่านั้น โดยเจาะเก็บด้วย กระบวนการ Plateletpheresis ด้วยเครื่อง Blood cell separator ซึ่งในขณะที่เจาะเก็บ โลหิตจาก ตัวผู้บริจาคจะไหลเข้าสู่เครื่อง จากนั้นเครื่องจะทำการคัดแยกเก็บเฉพาะเกล็ดโลหิตอย่างเดียว และ

ปล่อยโลหิตกลับคืนสู่ร่างกายผู้บริจาค การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตด้วยวิธีดังกล่าว 1 หน่วย จะประกอบไปด้วยเกล็ดโลหิตอย่างน้อย 3.5×10^{11} เซลล์/หน่วย (25) ในขณะที่มีปริมาณเม็ดโลหิตขาวไม่เกิน 1.0×10^6 เซลล์/หน่วย (32) การเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตวิธีนี้มีข้อดีคือมีปริมาณเกล็ดโลหิตสูงถึง 4-10 เท่าจากผู้บริจาคคนเดียว ลดความเสี่ยงจากการติดเชื้อจากการได้รับเกล็ดโลหิต เนื่องจากลดจำนวนการรับเกล็ดโลหิตจากผู้บริจาคหลายคน และมีปริมาณเม็ดโลหิตขาวต่ำ จึงช่วยลดโอกาสการเกิด Platelet refractoriness จาก HLA alloimmunization และการเกิด Febrile nonhemolytic transfusion reaction (FNHTR) ข้อเสียคือต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง (33)

3. ความเสี่ยงจากการรับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตและอาการแทรกซ้อนที่ไม่พึงประสงค์

แม้ว่าโลหิตและส่วนประกอบโลหิตต่าง ๆ รวมไปถึงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต จะมีประโยชน์อย่างมากในการรักษาหรือช่วยชีวิตผู้ป่วย แต่หากมีการปฏิบัติใช้งานที่ไม่ถูกต้อง อาจทำให้เกิดผลแทรกซ้อนที่รุนแรงจนส่งผลให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิต ทั้งนี้ผลเสียจากการให้โลหิตและความรุนแรงของปัญหาขึ้นอยู่กับชนิดของส่วนประกอบโลหิตที่ให้แก่ผู้ป่วย ซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ผลเกิดจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน (Immune mediated reaction) และผลที่ไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน (Non-immune mediated reaction) ตัวอย่างของกลุ่มผลเสียที่เกิดจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน อาทิเช่น ภาวะเม็ดโลหิตแดงแตก (Hemolytic transfusion reaction) สามารถเกิดในทันทีขณะให้โลหิต หรือหลังจากให้โลหิตแล้ว ส่วนใหญ่เกิดจากการให้เม็ดโลหิตแดงผิดหมู่ในระบบ ABO รวมไปถึงการที่ผู้ป่วยมีแอนติบอดีที่ความจำเพาะต่อแอนติเจนอื่นที่อยู่บนเม็ดโลหิตแดงของผู้บริจาคโลหิต (34) เช่น ผู้ป่วยมีหมู่โลหิตบี แต่ได้รับโลหิตหมู่เอ หลังจากได้รับโลหิต แอนติบอดีในร่างกายมาจับกับแอนติเจนบนผิวเม็ดโลหิตแดงที่ให้เข้าไป กลายเป็นคอมเพล็กซ์ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ไปกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ จนทำให้เม็ดโลหิตแดงแตก ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีความรุนแรง ทำให้ผู้ป่วยมีภาวะ Disseminated intravascular coagulation (DIC) ซ็อค ไตวาย และอาจส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ในขณะที่ตัวอย่างของกลุ่มผลเสียที่ไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน อาทิเช่น การได้รับโลหิตและส่วนประกอบโลหิตต่าง ๆ ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพที่ติดต่อมาจากผู้บริจาค เช่น เชื้อเอชไอวี เชื้อไวรัสตับอักเสบบี เชื้อไวรัสตับอักเสบบี และเชื้อซิฟิลิส รวมทั้งภาวะแทรกซ้อนอื่น ๆ (34-36) ซึ่งการติดเชื้อดังกล่าวอาจไม่ส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในทันที แต่มักก่อให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังที่ส่งผลเสียต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยในระยะยาว ประกอบกับการติดเชื้อบางประเภทยังไม่มียารักษาที่เหมาะสมในปัจจุบัน (34, 37, 38)

ความเสี่ยงจากการรับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่เป็นผลจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน สามารถเกิดขึ้นได้จากการรับหมู่โลหิตไม่ตรงกัน อาจทำให้เกิดภาวะเม็ดโลหิตแดงแตกจากแอนติบอดีเอ และ/หรือ แอนติบอดีบี ในพลาสมาของเกล็ดโลหิต โดยอาจจะพบ 1 ใน 2000 ถึง 1 ใน 46,176 ขึ้นกับจำนวนของการให้เกล็ดโลหิต (26, 39, 40) ในขณะที่ความเสี่ยงที่ไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน นอกจากจะมีสาเหตุมาจากเชื้อจุลชีพที่ติดต่อมาจากผู้บริจาคดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น ยังพบว่าอาจเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในขณะเจาะเก็บโลหิต หรือในระหว่างกระบวนการเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต (41, 42) ประกอบกับสภาวะที่ใช้เก็บรักษาเกล็ดโลหิตภายใต้อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ จึงส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนเข้ามาเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนก่อโรคได้ภายหลังได้รับผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ในขณะที่การเก็บรักษาเม็ดโลหิตแดงและผลิตภัณฑ์พลาสมา ใช้อุณหภูมิประมาณ 2-6 องศาเซลเซียส และต่ำกว่า -18 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (25, 34) จึงลดโอกาสการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเข้ามาในผลิตภัณฑ์เหล่านี้ กรณีที่ผู้รับบริจาคได้รับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียเข้าไป หากปริมาณเชื้อมีจำนวนมากจนสามารถเอาชนะภูมิคุ้มกันต้านทานในร่างกายของผู้รับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต จะสามารถก่อให้เกิดอาการไข้ หนาวสั่น ในทันทีหรือภายใน 2 ชั่วโมง หลังจากได้รับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต นอกจากนี้อาจพบอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ปัสสาวะน้อย ความดันต่ำ หัวใจเต้นเร็วหรือระบบหายใจผิดปกติ หากอาการรุนแรงทำให้เกิดภาวะช็อค นำไปสู่การเสียชีวิตได้ (43-46)

4. เกณฑ์การวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียจากการรับโลหิต (Transfusion transmitted bacterial infection, TTBI)

ในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับโลหิต หรือส่วนประกอบโลหิตต่าง ๆ รวมไปถึงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย มักพบอาการแทรกซ้อนที่ไม่พึงประสงค์ตามมา ดังนั้นจึงมีเกณฑ์ที่ใช้วินิจฉัยอาการแทรกซ้อนดังกล่าว เพื่อช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียจากการรับโลหิต (Transfusion transmitted bacterial infection, TTBI) (43) ได้แก่ การมีไข้สูงกว่า 39 องศาเซลเซียส หรือมีอุณหภูมิร่างกายที่สูงขึ้นมากกว่า 2 องศาเซลเซียส ภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากได้รับโลหิต ประกอบกับอาการเพิ่มเติมดังต่อไปนี้อย่างน้อย 2 อาการ คือ มีอาการหนาวสั่น หัวใจเต้นเร็วกว่า 120 ครั้งต่อนาทีหรือมีการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 40 ครั้งต่อนาทีหลังจากได้รับโลหิต

ความดันโลหิต systolic เพิ่มขึ้นหรือลดลง 30 มม.ปรอท ภายในเวลา 4 ชั่วโมงหลังจากได้รับโลหิต
 ปวดท้องหรือท้องเสีย ซึ่งกลุ่มอาการดังกล่าว หากมีอาการรุนแรงมากอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตจากการ
 เกิดภาวะช็อค (43, 46)

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้จัดทำคู่มือการเฝ้าระวังความปลอดภัยของ
 โลหิต ซึ่งได้ระบุระดับของความเชื่อมั่นในการวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียจากการรับโลหิต ดังนี้ (43)

1) ความเป็นไปได้ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียจากการรับโลหิต (Possible TTBI) ประกอบด้วย
 หลักฐานตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในส่วนประกอบโลหิตที่ให้ผู้ป่วย โดยใช้วิธีการตรวจที่เชื่อถือได้ แต่ไม่พบ
 เชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิตของผู้ป่วย หรือตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิตของผู้ป่วย แต่ไม่พบ
 ในส่วนประกอบโลหิตที่ให้แก่ผู้ป่วย โดยไม่มีเหตุผลอื่น ๆ ที่ทำให้ตรวจพบการติดเชื้อในผู้ป่วย

2) การยืนยันได้ว่าการติดเชื้อแบคทีเรียจากการรับโลหิต (Confirmed TTBI) ประกอบด้วย
 หลักฐานการตรวจพบแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันในกระแสโลหิตของผู้ป่วยและในส่วนประกอบของ
 โลหิตที่ให้แก่ผู้ป่วย โดยใช้วิธีการตรวจที่เชื่อถือได้

5. แหล่งที่มาของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

สาเหตุหลักที่สำคัญและพบได้บ่อยของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต
 ได้แก่ กระบวนการทำความสะอาดผิวหน้าก่อนการเจาะเก็บโลหิตที่เหมาะสมและทำให้เชื้อแบคทีเรีย
 ประจำถิ่นบริเวณผิวหนังปนเปื้อนเข้าไปในผลิตภัณฑ์ (7, 47) เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นบริเวณผิวหนังที่
 พบบ่อย อาทิเช่น เชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และเชื้อ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นแบคทีเรีย
 แกรมบวกและไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 1-6 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน
 อย่างรวดเร็วได้ที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษา
 ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต (44) ในขณะที่เชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบบ่อย
 บริเวณผิวหนัง และมักเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์โลหิตต่าง ๆ (42) ในบางกรณีเกิดจาก
 ผู้บริจาคโลหิตอยู่ในภาวะที่มีแบคทีเรียในกระแสโลหิตเพียงชั่วคราว (Transient bacteremia)
 โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และไม่มีอาการแสดงทางคลินิก ทำให้สามารถบริจาคโลหิต
 และนำไปสู่การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ตัวอย่างเช่นการพบเชื้อ *Yersinia*
enterocolitica ในกระแสโลหิตของผู้บริจาคเพียงชั่วคราว และปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์เม็ดโลหิตแดง

(44, 48) นอกจากนี้ยังสามารถพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการเตรียม ส่วนประกอบโลหิตต่าง ๆ การรายงานในประเทศเดนมาร์กและสวีเดนพบการระบาดของเชื้อ *Serratia marcescens* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เม็ดโลหิตแดง ซึ่งเกิดการปนเปื้อนขึ้นระหว่าง กระบวนการผลิตถุงบรรจุโลหิต (44)

6. อุบัติการณ์การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

การรายงานขององค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 2012-2016 พบอัตราการเสียชีวิตจากการได้รับโลหิต และส่วนประกอบโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียคิดเป็นร้อยละ 10 ของจำนวนผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้งหมดที่มีสาเหตุเกี่ยวข้องกับการได้รับโลหิตและส่วนประกอบโลหิต โดยพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เม็ดโลหิตแดงอัดแน่นจำนวน 7 ราย ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจำนวน 11 ราย และในผลิตภัณฑ์พลาสมาจำนวน 1 ราย (5) การรายงานประจำปี ในประเทศอังกฤษระหว่างเดือนตุลาคม ปี ค.ศ. 1996 ถึงเดือนธันวาคม ปี ค.ศ. 2017 โดยระบบการเฝ้าระวังความปลอดภัยของการใช้โลหิต Serious Hazard of Blood Transfusion (SHOT) พบว่าการติดเชื้อจากการได้รับโลหิตและส่วนประกอบโลหิตมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุด ซึ่งมีการรายงานทั้งหมด 44 ราย โดยมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เม็ดโลหิตแดงอัดแน่นจำนวน 7 ราย และผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจำนวน 37 ราย (4) นอกจากนี้ยังมีรายงานจากธนาคารโลหิต ศูนย์บริการโลหิตหรือศูนย์การถ่ายโลหิตของประเทศต่าง ๆ เกี่ยวกับความชุกของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตดังแสดงตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความชุกของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตในแต่ละประเทศ (49, 50)

ประเทศ	จำนวนยูนิตทั้งหมด	ผลบวกทั้งหมด ¹ (ยูนิต)	ผลบวกจริง ²	
			จำนวน (ยูนิต)	อัตราส่วนต่อ 1,000
สภากาชาดสหรัฐอเมริกา	1,786,142	1,285	351	0.2 (1/5,088)
สภากาชาดเบลเยียม	107,827	1,030	803	7.4 (1/134)
ศูนย์บริการโลหิตแคนาดา	917,321	811	93	0.1 (1/9863)
สภากาชาดออสเตรเลีย	302,386	3,207	550	1.8 (1/549)
ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกันและการถ่ายเลือด ประเทศนอร์เวย์	36,896	88	12	0.3 (1/3074)
ศูนย์ถ่ายโลหิตประเทศเดนมาร์ก	22,057	84	21	1.0 (1/1,050)
ศูนย์บริการสุขภาพแห่งชาติ ประเทศอังกฤษ	1,020,688	4,185	320	0.3 (1/3,189)
ศูนย์บริการโลหิต มณฑลเจ้อเจียง ประเทศจีน	8,000	21	5	0.6 (1/1,600)
สภากาชาดญี่ปุ่น	43,569	80	47	1.1 (1/927)
ศูนย์บริการโลหิตเวลส์	54,828	257	38	0.7 (1/1,442)
ศูนย์ถ่ายโลหิตโคเปนเฮเกน ประเทศเดนมาร์ก	22,165	50	34	1.5 (1/651)

หมายเหตุ ¹ผลบวกทั้งหมด หมายถึง ผลบวกจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System ซึ่งเป็น การตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยา แห่งสหรัฐอเมริกา

²ผลบวกจริง หมายถึง ผลบวกจากการตรวจซ้ำในส่วนประกอบโลหิตชนิดอื่น และ/หรือผลบวกจากตัวอย่างโลหิตของผู้รับเกล็ดโลหิต

จากการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตส่วนใหญ่ เป็นเชื้อประจำถิ่นที่มักพบบริเวณผิวหนังอาทิเช่น เชื้อกลุ่ม coagulase-negative staphylococci (เช่น เชื้อ *S. epidermidis*) เชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อกลุ่ม viridans group streptococci เชื้อ *Bacillus spp.* และเชื้อ *Corynebacteria spp.* (45) ในปีค.ศ. 2004 จากการทบทวนรายงาน

การติดเชื้อแบคทีเรียจากการรับโลหิตของ Wagner พบว่าการติดเชื้อแบคทีเรียจากการรับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตส่วนใหญ่ประมาณ 56% มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก อย่างไรก็ตามมากกว่า 60% ของผู้ที่ติดเชื้อและเสียชีวิตพบว่าส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบโดยเชื้อแบคทีเรียที่พบว่าเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อดังกล่าว ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus spp.* 42% เชื้อ *Escherichia coli* 9% เชื้อ *Bacillus spp.* 9% เชื้อ *Salmonella spp.* 9% เชื้อ *Streptococcus spp.* 12% เชื้อ *Serratia spp.* 8% เชื้อ *Enterobacter spp.* 7% และจุลินทรีย์อื่น ๆ 4% (31) ในปี 2006 Yomtovian และคณะ (51) ได้รายงานข้อมูลจากโปรแกรมเฝ้าระวังเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดเลือดในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยในช่วงปีค.ศ. 1991 ถึงค.ศ. 2004 ซึ่งมีจำนวนการถ่ายผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตให้กับผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 216,283 ยูนิต และพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวที่มีการรายงานจากการเฝ้าระวังดังกล่าว ได้แก่ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

7. การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเกล็ดโลหิต

การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตเป็นหนึ่งในปัญหาที่มักพบได้บ่อยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรักษาผู้รับบริจาค หรือผู้ป่วยด้วยผลิตภัณฑ์โลหิต และส่วนประกอบโลหิต เนื่องจากการได้รับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย อาจนำไปสู่การติดเชื้อที่รุนแรงและเสียชีวิตได้ หนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียที่สูงมาจากอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตอยู่ที่ 20-24 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจึงมีความจำเป็น เพื่อป้องกันการให้ผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนแก่ผู้รับบริจาคหรือผู้ป่วย และช่วยลดอัตราการติดเชื้อหรือเสียชีวิตที่อาจเกิดขึ้น (7, 11, 13) อย่างไรก็ตามการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตยังมีข้อจำกัดที่พบได้บางประการ อาทิเช่น การมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างต่ำในระยะแรกของช่วงอายุเกล็ดโลหิต ทำให้โอกาสการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างน้อย ความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ทำให้ต้องการวิธีที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่มีความหลากหลายได้อย่างครอบคลุม นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตมีอายุการเก็บรักษาที่สั้นประมาณ 5 วัน และหากต้องการที่จะ

ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในช่วงวันที่ใกล้จะนำเกล็ดโลหิตไปให้ผู้ป่วยมากที่สุด จึงจำเป็นต้องใช้วิธีที่ให้ผลรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง (13, 52)

ในปี ค.ศ. 2004 สมาคมธนาคารโลหิตแห่งสหรัฐอเมริกาได้กำหนดมาตรฐานให้ธนาคารโลหิต ศูนย์บริการโลหิตหรือศูนย์การถ่ายโลหิต ควรมีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตทุกยูนิตก่อนนำไปให้กับผู้รับบริจาคหรือผู้ป่วย (12) โดยวิธีที่ใช้ในการตรวจควรเป็นวิธีที่ทำงานง่าย มีความไวเพียงพอที่จะตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในระดับต่ำได้ มีความจำเพาะสูง และต้องให้ผลรวดเร็วเนื่องจากเกล็ดโลหิตมีอายุสั้น (53) ปัจจุบันมีวิธีตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการหลายวิธีที่สามารถนำมาตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต โดยมีสรุปดังที่แสดงในตารางที่ 2 และดังรายละเอียดที่อธิบายด้านล่าง ดังนี้

7.1 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีดั้งเดิม

วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตแบบดั้งเดิม โดยนำผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตมาเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Broth) บ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หากมีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมากพอ จะสังเกตเห็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยตาเปล่า เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น หรือ มีการเปลี่ยนสี จากนั้นจึงทำการถ่ายเชื้อมาเพาะเลี้ยงต่อ (Subculture) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Solid media) ย้อมสีแกรม (Gram stain) และวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical test) (7) อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความไวในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากจำนวนเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นที่อยู่ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตอาจมีปริมาณน้อยมาก ทำให้โอกาสตรวจพบเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างน้อยหรืออาจตรวจไม่พบ ประกอบกับข้อจำกัดของการทดสอบทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกที่จำเป็นต้องแยกเป็นพื้นที่เฉพาะ ไม่สามารถรวมอยู่กับห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิตได้ และต้องอาศัยเครื่องมือวิทยาศาสตร์เพื่อประกอบการวินิจฉัยหลายชนิด รวมไปถึงต้องอาศัยบุคลากรผู้ที่มีความชำนาญเฉพาะทางเทคนิคทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (54) นอกจากนี้ระยะเวลาที่บ่มเพาะเชื้อใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน ซึ่งอาจไม่ทันต่อเวลาที่ต้องจ่ายผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตให้คนป่วย

7.2 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่องอัตโนมัติ

เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติซึ่งช่วยเพิ่มความไวในการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิม แม้ว่าปัจจุบันมีเครื่องอัตโนมัติที่สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตหลายรูปแบบ แต่มีเครื่องอัตโนมัติเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้แก่เครื่อง BacT/Alert System (บริษัท BioMérieux จำกัด ประเทศฝรั่งเศส) และเครื่อง Enhancement of a culture-based bacterial detection system (eBDS, บริษัท Pall จำกัด ประเทศสวิสเซอร์แลนด์) รายละเอียดของเครื่องอัตโนมัติชนิดต่าง ๆ ได้อธิบายดังต่อไปนี้

7.2.1 เครื่อง BacT/Alert System

เป็นการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต โดยอาศัยหลักการตรวจวัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น ภายหลังจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียภายในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ Platelet aerobic culture bottle (BPA) โดยใช้ตัวอ่านการเปลี่ยนแปลงสีของก้นขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะบ่มในเครื่อง BacT/Alert ซึ่งเป็นเครื่องอัตโนมัติที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ก่อโรคในกระแสโลหิต (55) โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียต่ำสุดที่เครื่อง BacT/Alert สามารถตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 10 CFU/ml สำหรับเชื้อแบคทีเรียในหลายสายพันธุ์ หรือเท่ากับ 5 CFU/ml ในเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* (44)

7.2.2 เครื่อง eBDS

เครื่อง eBDS ได้ถูกออกแบบมาโดยเฉพาะ สำหรับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในโลหิตและส่วนประกอบโลหิต โดยอาศัยหลักการวัดปริมาณการใช้ออกซิเจนเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ถ้ามีแบคทีเรียปนเปื้อน หรือมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย จะส่งผลให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นผ่านทางกระบวนการเผาผลาญพลังงาน ทำให้ปริมาณออกซิเจนลดลงและสามารถตรวจวัดได้อย่างไรก็ตามเครื่อง eBDS สามารถตรวจได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรีย

ที่ต้องใช้ออกซิเจนในการเติบโต มีความไวในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย 1-15 CFU/ml การรายงานผลทำได้ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งต่างจากเครื่องอัตโนมัติที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องติดตามผลอย่างต่อเนื่อง (48, 52, 56)

7.2.3 เครื่อง ESP Culture System (ESP) II

อาศัยหลักการวัดความแตกต่างของความดันบริเวณที่ว่างด้านบนของขวดเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งหากในขวดดังกล่าวมีเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโต จะเกิดผลผลิตแก๊สจากกระบวนการเมตาบอลิซึม ส่งผลให้ความดันบริเวณที่ว่างด้านบนของขวดเกิดการเปลี่ยนแปลง (57) เครื่อง ESP II สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งเชื้อที่ต้องการใช้ออกซิเจนในการเติบโต และเชื้อที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเติบโต โดยภายหลังบรรจุเกล็ดโลหิตใส่ขวดเพาะเลี้ยงเชื้อ ต้องบ่มเพาะเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ในกรณีที่เชื้อแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเติบโตช้า ต้องเพิ่มระยะเวลาในการบ่มเพาะให้นานขึ้น โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ต่ำสุดที่เครื่อง ESP II สามารถตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 10 CFU/ml (48, 52)

7.3 ScanSystem

เป็นชุดตรวจสำหรับตรวจหาเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต โดยอาศัยหลักการ Solid phase fluorescent cytometric ชุดตรวจประกอบด้วยส่วนชุดกรอง ส่วนการย้อมสี และส่วนตัวอ่านผลที่ใช้ Solid phase cytometry เชื้อแบคทีเรียจะถูกแยกออกจากเกล็ดโลหิต โดยการกรองผ่านชุดกรอง ส่วนของเชื้อแบคทีเรียจะสามารถผ่านชุดกรองได้ หลังจากนั้น DNA ของเชื้อแบคทีเรียจะถูกติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ และตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง ScanSystem analyser โดยการยิงอาร์กอนเลเซอร์ที่ความยาวคลื่น 488 nm สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนภายหลังจากเจาะเก็บโลหิตแล้ว 30-72 ชั่วโมง (2, 13)

7.4 ชุดทดสอบ Pan Genera Detection (PGD)

เป็นชุดทดสอบชนิดเร็ว (Rapid test) ที่ตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตในเชิงคุณภาพ สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีและวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Double sandwich immunoassay

ซึ่งในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจะตรวจหา Lipoteichoic acid ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะตรวจหา Lipopolysaccharide ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อ สามารถตรวจหาได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจนในการเติบโต และแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเติบโต ใช้เวลาในการตรวจประมาณ 20-30 นาที และมีความไวในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่เท่ากับ 10^3 - 10^5 CFU/ml (48, 58, 59)

7.5 การตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่า pH

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่า pH ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย จะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อเกิดขึ้น โดยน้ำตาลกลูโคสจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการย่อยสลายกลูโคส ซึ่งเป็นผลให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่า pH ในถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตลดลงจึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้ (13) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Yomtovian และคณะพบว่าวิธีดังกล่าวให้ผลบวกปลอมสูง นำไปสู่การจำหน่ายผลิตภัณฑ์ที่ประมาณ 2% ของจำนวนผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ผลิตขึ้นมา นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่มีความไวที่ต่ำ จึงอาจไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในงานประจำวัน (51)

7.6 เทคนิค Flow cytometry

เทคนิค Flow cytometry ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต โดยการย้อม DNA ของเชื้อแบคทีเรียด้วยสี Thiazole orange ซึ่งเป็นสีฟลูออเรสเซนต์ หลังจากนั้นเครื่อง Flow cytometry ตรวจวัดปริมาณความเข้มของการเรืองแสงที่เกิดขึ้น โดยการยิงแสงอาร์กอนเลเซอร์ความยาวคลื่น 488 nm มาตกกระทบกับตัวเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่าน ใช้เวลาในการตรวจทั้งสิ้น 0.75 - 1 ชั่วโมง และมีความไวในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 150 CFU/ml (52, 59, 60) อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวไม่นิยมนำมาใช้ในงานประจำวัน เนื่องจากความสามารถของการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจำเป็นต้องมีเชื้อในปริมาณค่อนข้างสูงเท่านั้น ดังนั้นความเป็นไปได้ของการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียอาจต้องทำภายหลังผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตหมดอายุ (61)

7.7 วิธีการตรวจระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจระดับโมเลกุลหลายวิธีที่อาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต Tamimount และคณะ ได้ทดสอบใช้เทคนิค Real-time PCR ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต จำนวน 2,146 ยูนิต โดยใช้ยีน 16S rRNA ของยูแบคทีเรีย พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียคิดเป็น 0.83% ซึ่งเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นเชื้อประจำถิ่นบริเวณผิวหนัง สามารถจำแนกชนิดได้เป็น เชื้อ *Propionibacterium spp.* จำนวน 7 ยูนิต เชื้อ *Staphylococcus spp.* จำนวน 6 ยูนิต เชื้อ *Bacillus spp.* จำนวน 2 ยูนิต เชื้อ *Micrococcus spp.* จำนวน 2 ยูนิต และเชื้อ *Peptostreptococcus spp.* จำนวน 1 ยูนิต (53) หรือการพัฒนาเทคนิค PCR ซึ่งตรวจหา ribosomal RNA บริเวณส่วนอนุรักษ์ (conserved regions) ได้แก่ 16S rRNA หรือ 23S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียได้ระหว่าง 1-10 CFU/ml แม้ว่าเทคนิคทางอณูชีววิทยาจะเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต แต่พบว่ายังมีข้อจำกัดที่ทำให้ยากต่อการนำใช้งานในห้องปฏิบัติการงานประจำ อาทิเช่น ราคาต่อการทดสอบค่อนข้างสูง ต้องการเครื่องมือที่จำเพาะซึ่งปกติไม่ได้มีประจำอยู่ในห้องปฏิบัติการงานธนาคารโลหิต รวมไปถึงต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ อีกทั้งความไวของแต่ละวิธีขึ้นอยู่กับคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้ (13, 45, 62)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

วิธีการตรวจ	ข้อดี	ข้อเสีย
เครื่อง BacT/ALERT และ เครื่อง ESP	วิธีการตรวจง่าย ไม่ซับซ้อน จึงเป็นวิธีที่ได้รับความนิยม	มีการลงทุนในด้านการติดตั้งเครื่องมือ การรายงานผลใช้ระยะเวลานาน 3-5 วัน
เครื่อง eBDS	การรายงานผลทำได้ภายใน 24 ชั่วโมง	มีการลงทุนในด้านการติดตั้งเครื่องมือ
ชุดทดสอบ PGD	ไม่มีการลงทุนในด้านการติดตั้ง เครื่องมือ มีความสะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาในการตรวจประมาณ 20-30 นาที	ต้องใช้แบคทีเรียในการตรวจ ปริมาณมาก ไม่สามารถตรวจ ครอบคลุมแบคทีเรียได้ทุกชนิด
การวัดปริมาณน้ำตาล กลูโคสและค่า pH	มีความสะดวก รวดเร็ว	ผลบวกปลอมสูง
เทคนิค Flow cytometry	ความไวและความจำเพาะสูง การรายงานผลทำได้ภายใน 0.75-1 ชั่วโมง	มีการลงทุนในด้านการติดตั้งเครื่องมือ
เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น Real-time PCR หรือ PCR	ความไวและความจำเพาะสูง การรายงานผลทำได้ภายใน 6-8 ชั่วโมง	มีการลงทุนในด้านการติดตั้งเครื่องมือ

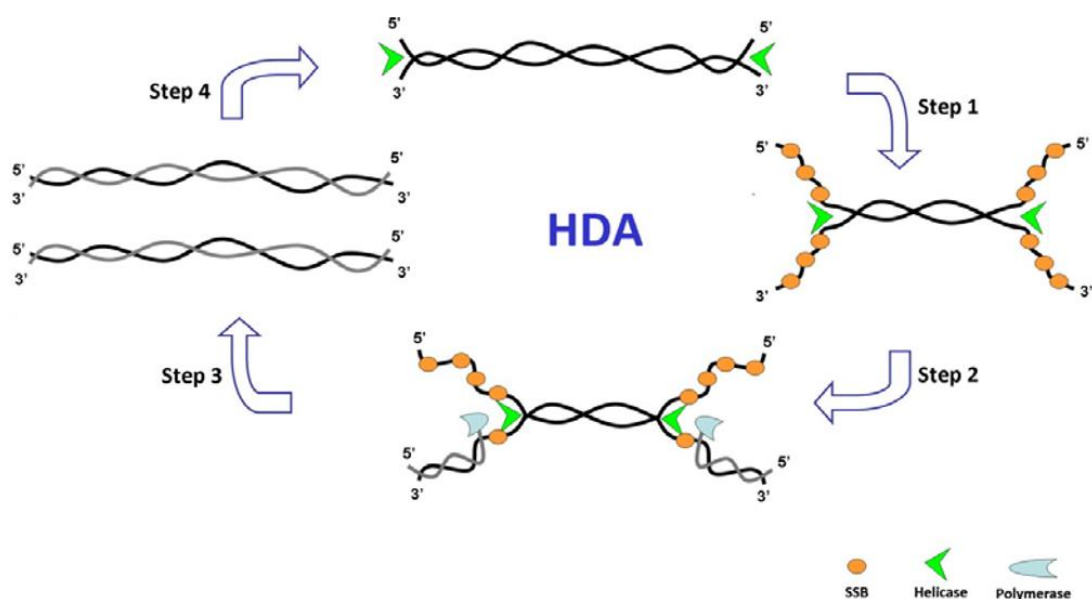
CHULALONGKORN UNIVERSITY

8. Helicase dependent amplification (HDA)

8.1 หลักการทำงานของเทคนิค HDA

เทคนิค Helicase dependent amplification (HDA) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ (Isothermal amplification) มีจุดเริ่มต้นจากการค้นพบคุณสมบัติของเอนไซม์ Helicase ที่สามารถใช้แยก DNA แม่แบบสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวได้ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวผลิตได้จากเชื้อ *E. coli* ในปี 1976 ทำให้นักวิจัยนำคุณสมบัตินี้มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเอนไซม์ Polymerase และโปรตีนที่มีชื่อว่า Single strand binding protein ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ ในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยา เอนไซม์ Helicase ช่วยในการแยก DNA

แม่แบบสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยการทำลายพันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมระหว่าง DNA สายคู่ จากนั้น Single strand binding protein เข้ามาจับที่ DNA สายเดี่ยว เพื่อป้องกันไม่ให้ DNA แม่แบบเกิดกลับไปจับกันเป็น DNA สายคู่ หลังจากนั้น Primer เข้ามาจับกับบริเวณที่เป็นลำดับเบสคู่สมของ DNA แม่แบบ และเอนไซม์ Polymerase จะนำ Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ที่เป็นคู่สมกับสาย DNA ต้นแบบเข้ามาต่อยาวออกไปจาก Primer ในทิศทาง 5' ไป 3' ทำให้เกิด DNA สายใหม่ ปฏิริยาดำเนินต่อไปเป็นวัฏจักรทำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารพันธุกรรม (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 กระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค HDA (14)

8.2 ข้อได้เปรียบของเทคนิค HDA ที่มีต่อเทคนิค Isothermal amplification อื่น ๆ

นอกเหนือจากเทคนิค HDA แล้ว ยังมีเทคนิค Isothermal amplification ชนิดอื่นที่ถูกคิดค้นขึ้นมาในปัจจุบัน อาทิเช่น 1. เทคนิค Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม RNA ที่ใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ Reverse transcriptase RNase H และ T7 RNA polymerase โดย Primer ที่จำเพาะต่อบริเวณ T7 Promoter sequence จะเข้าไปจับกับสาย RNA แม่แบบ จากนั้นเอนไซม์ Reverse transcriptase จะสร้างสาย cDNA ขึ้นมา และเอนไซม์ RNase H จะย่อยสลายสาย RNA แม่แบบ หลังจากนั้นเอนไซม์ T7 RNA polymerase จะสร้างสาย RNA สายใหม่โดยใช้สาย cDNA เป็นแม่แบบ 2. เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม DNA โดยใช้ Primer 4 ชุดหรือ 6 ชุด

ที่จำเพาะต่อ DNA แม่แบบ โดยใช้อุณหภูมิคงที่ และใช้ปฏิกิริยา Strand displacement ของเอนไซม์ Bst DNA polymerase เริ่มต้นจากการขึ้นตอนการสร้าง Stem loop ทั้ง 2 ข้างของ DNA แม่แบบ หลังจากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอน Cycle amplification เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA จาก Stem loop

3. เทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยอาศัยหลักการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ Recombinase เอนไซม์ Polymerase และโปรตีนที่มีชื่อว่า Single strand binding protein ในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยา เอนไซม์ Recombinase จะเข้าไปจับกับทั้ง Forward primer และ Reverse primer เกิดเป็น Recombinase-primer complex ซึ่งแทรกตัวเข้ามาจับกับบริเวณที่เป็นลำดับเบสคู่สมของ DNA แม่แบบ โดยมีเอนไซม์ Recombinase ช่วยในการแยก DNA แม่แบบสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว จากนั้น Single strand binding protein เข้ามาจับที่ DNA สายเดี่ยว เพื่อป้องกันไม่ให้ DNA แม่แบบเกิดกลับไปจับกันเป็น DNA สายคู่ หลังจากที่เอนไซม์ Recombinase หลุดออกจาก Primer ด้วยกระบวนการย่อยสลาย ATP เอนไซม์ Polymerase จะนำ Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ที่เป็นคู่สมกับสาย DNA ต้นแบบเข้ามาต่อยาวออกไปจาก Primer ในทิศทาง 5' ไป 3' ทำให้เกิด DNA สายใหม่ ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปเป็นวัฏจักรทำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารพันธุกรรม (Biosencer 2003)

4. เทคนิค Strand-displacement amplification (SDA) เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม DNA โดยอาศัยการทำงานของ Primer 2 ชุด คือ ชุดที่หนึ่งประกอบด้วย Primer S1 และ S2 ซึ่งส่วนปลายด้าน 5' มีลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งเป็นส่วนที่ยื่นออกมาและไม่ได้จับกับ DNA แม่แบบ ชุดที่สองประกอบด้วย Primer B1 และ B2 โดยที่ Primer B1 จับกับตำแหน่งทางด้าน 3' ของ DNA แม่แบบ บริเวณตำแหน่งเหนือ Primer S1 ขณะที่ Primer B2 จับกับตำแหน่งทางด้าน 3' ของ DNA แม่แบบ บริเวณตำแหน่งเหนือ Primer S2 จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase จะเข้าทำการสร้าง DNA สายใหม่ เมื่อ Primer B2 เข้าจับกับ DNA สายใหม่ที่มี S1 ขณะที่ Primer B1 เข้าจับกับ DNA สายใหม่ที่มี S2 เกิดการสร้าง DNA สายใหม่อีกรอบ ซึ่งเมื่อสิ้นสุดขั้นตอนนี้จะได้ผลผลิต DNA สายคู่ที่มีลำดับเบสตรงปลายด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ

5. เทคนิค Rolling circle amplification (RCA) เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม DNA หรือ RNA ที่มีลักษณะเป็นวงกลม โดยอาศัยการทำงานของ Primer สายสั้น ๆ และเอนไซม์ DNA polymerase หรือ RNA polymerase ตามลำดับ (63-67)

อย่างไรก็ตามเทคนิค HDA มีข้อได้เปรียบเทคนิค Isothermal amplification ชนิดต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้น อาทิเช่น มีขั้นตอนการทดสอบที่ง่ายไม่ซับซ้อนมีความไวและความจำเพาะสูง สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ Primer หลายคู่ต่อเป้าหมายหนึ่งตำแหน่งได้ ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาคงที่อยู่ในช่วง 60-65 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนแยกสาย DNA แม่แบบสายคู่ให้กลายเป็น DNA สายเดี่ยว (Denaturation) ก่อนการทำปฏิกิริยา (14-16) ดังรายละเอียดที่แสดงการเปรียบเทียบเทคนิค Isothermal amplification ชนิดต่าง ๆ ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบรายละเอียดของเทคนิค Isothermal amplification ชนิดต่าง ๆ (63, 64, 66, 67)

	PCR	NASBA	LAMP	HDA	SDA	RCA	RPA
การเพิ่มปริมาณ DNA	+	+	+	+	+	+	+
การเพิ่มปริมาณ RNA	+	+	+	+	+	+	+
	(RT-PCR)		(RT-LAMP)	(RT-HDA)	(RT-SDA)	(RT-RCA)	(RT-RPA)
จำนวนเอนไซม์	1	2-3	1	2	2	2	3
จำนวน Primer	2	2	4 หรือ 6	2	2	2	2
การออกแบบ Primer	พื้นฐาน	พื้นฐาน	ซับซ้อน	พื้นฐาน	ซับซ้อน	พื้นฐาน	พื้นฐาน
อุณหภูมิในปฏิกิริยา (องศาเซลเซียส)	94, 55-60, 72	37-42	60-65	RT*, 37, 60-65	37	37	25-42
เวลาในการทำปฏิกิริยา	1.5-2.5	1.5-2	<1	0.5-2	2	1.5	0.3-1.5
ขั้นตอนการ Denature	+	+	-	-	+	-	-
สิ่งที่ช่วย Denaturing	Heat	RnaseH, DMSO	Betaine	Helicase	Restriction enzymes, Bumper primers	Strand displacement property of Φ 29 DNA polymerase	Recombinase SSB

	PCR	NASBA	LAMP	HDA	SDA	RCA	RPA
วิธีการตรวจสอบ ผลผลิต	GE, ELISA, Real-time	GE, ELISA, Real-time, ECL	GE, Turbidity, Real-time	GE, ELISA, Real-time	GE, Real-time	GE	GE, Turbidity, Real-time
การประยุกต์ใช้กับ Multiplex	+	+	-	+	-	+	+

RT=reverse transcriptase; *RT= อุณหภูมิ 22–24 องศาเซลเซียส; GE= gel electrophoresis; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; ELOSA=enzyme-linked oligosorbent assay; ECL=electrochemiluminescence

8.3 การประยุกต์ใช้เทคนิค HDA ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย

ปัจจุบันเทคนิค HDA กำลังได้รับความนิยมสูงในการนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ โดยมีการศึกษานำเทคนิคดังกล่าวเพื่อตรวจหาโรคมะเร็ง หรือโรคอื่น ๆ รวมไปถึงการนำไปตรวจหาเชื้อก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ ประกอบด้วยเชื้อไวรัส เชื้อปรสิต เชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย (14, 15, 68-70)

Kolm และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค HDA ร่วมกับ Lateral flow เพื่อตรวจหาฮีน 16s rRNA ของแบคทีเรียในกลุ่ม Bacteroidetes ในอุจจาระของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรม หรือ Microbial source tracking (MST) Marker เพื่อใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่จะเชื่อมโยงไปสู่แหล่งกำเนิดมลพิษหรือสามารถบ่งชี้แหล่งที่มาของการปนเปื้อนกลับไปได้ พบว่า มีความไวและความจำเพาะในเชิงคุณภาพเทียบเท่ากับเทคนิค Quantitative PCR (QPCR) (16) การศึกษาของ Chow และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค HDA ร่วมกับ Lateral flow ในการตรวจวินิจฉัย Toxin genes ของเชื้อ *Clostridium difficile* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วง พบว่า มีความแม่นยำในการวินิจฉัยสูง ความไวและความจำเพาะ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR และมีความไวและความจำเพาะ 90.9% และ 100% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Enzyme immunoassays (EIAs) (71) การศึกษาของ Gill และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค HDA ร่วมกับ Gold nanoparticle probes เพื่อตรวจหาฮีน *ureC* ของเชื้อ *Helicobacter pylori* พบว่า สามารถตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ได้ต่ำที่สุดที่ 10 CFU/ml ภายในเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง และผลที่ได้จากตัวอย่างการตรวจชิ้นเนื้อในกระเพาะอาหาร พบว่า มีความไวและความจำเพาะ 92.5% และ 95.4% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ และมีความไวและความจำเพาะ 100% และ

98.8% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา เทคนิค HDA มีความสะดวก ช่วยลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายที่จำเป็นสำหรับการวินิจฉัยเชื้อ *H. pylori* ในระดับโมเลกุล ส่งผลให้เทคนิค HDA มีศักยภาพในการตรวจหาเชื้อในระยะแรกได้อย่างมีประสิทธิภาพ (72) การศึกษาของ O'Neil และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค Multiplex HDA ในการตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อก่อโรค 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Chlamydia trachomatis* และเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งเป็นการตรวจหายีน *omp* gene ของเชื้อ *C. trachomatis* และยีน *opa* ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* ได้ต่ำที่สุดที่ 0.05 CFU/ml และตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ได้ต่ำที่สุดที่ 0.003 CFU/ml (73) เทคนิค HDA เป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว ใช้อุปกรณ์น้อย สามารถใช้ในงานภาคสนามได้ จึงเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นการตรวจวินิจฉัยสำหรับการเฝ้าระวังหรือติดตามป้องกันการระบาดของโรคต่าง ๆ ได้ (15, 71)

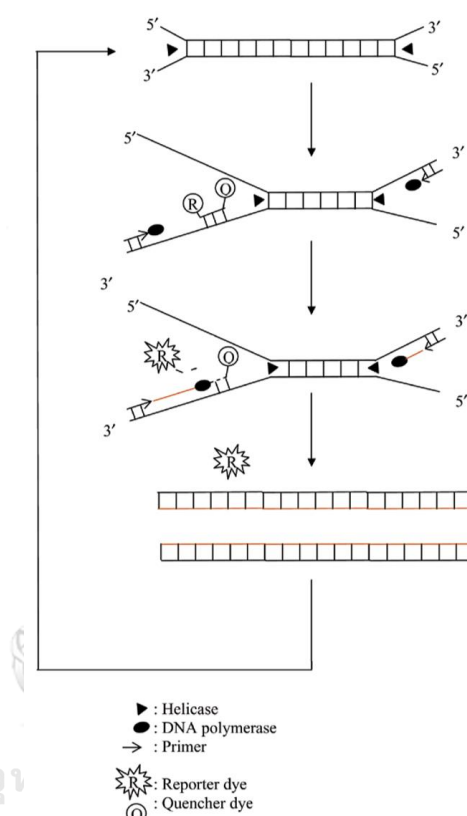
9. การตรวจสอบผลผลิตภายหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค HDA

การตรวจสอบผลผลิตภายหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค HDA สามารถตรวจสอบได้ทั้งระหว่างปฏิกิริยากำลังดำเนินหรือภายหลังปฏิกิริยาลิ้นสุด ซึ่งการตรวจสอบทั้งสองแบบมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน การตรวจสอบผลผลิตระหว่างปฏิกิริยากำลังดำเนินส่วนใหญ่อาศัยหลักการเปล่งแสงของสีฟลูออเรสเซนต์ ที่ติดอยู่กับ Probe ที่ใส่ในปฏิกิริยา จึงสามารถอ่านผลได้รวดเร็ว ไม่ต้องรอให้เสร็จสิ้นปฏิกิริยา แต่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือในการตรวจวัดการเปล่งแสงของฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะ ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง ในขณะที่การตรวจสอบผลผลิตภายหลังปฏิกิริยาเสร็จสิ้น อาจไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะ จึงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าและเหมาะสมในการนำไปใช้ภาคสนามหรือในพื้นที่ที่ไม่จำเป็นต้องติดตั้งเครื่องมือ (15)

9.1 การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Real time

เป็นการตรวจสอบผลผลิตระหว่างปฏิกิริยา HDA กำลังดำเนิน โดยการใช้ Probe ที่จำเพาะต่อผลผลิต ได้แก่ TaqMan probe ซึ่งเป็น Oligonucleotide สายเดี่ยว ที่มีการติดฉลากสารเรืองแสง (Reporter dye) ที่ปลาย 5' และติดด้วยดบัง (Quencher) ที่ปลาย 3' ซึ่งในสภาวะปกติจะไม่มีสารเรืองแสงเนื่องจาก Quencher จะยับยั้งโมเลกุลของสารเรืองแสงที่ติดไว้ที่ probe ไม่ให้ปล่อยพลังงานออกมา แต่ในขณะที่เกิดปฏิกิริยา Probe จะเข้าไปจับ DNA ต้นแบบ ในบริเวณที่มีลำดับ

นิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันได้ เมื่อเอนไซม์ DNA polymerase ทำการสร้าง DNA สายใหม่ โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติ 5'->3' Exonuclease activity ซึ่งสามารถย่อย TaqMan probe ได้ ทำให้โมเลกุลของสารเรืองแสงและ Quencher หลุดออกจากกัน ดังนั้นจึงเกิดการเรืองแสงขึ้น โดยปริมาณสารเรืองแสงจะแปรผันกับปริมาณของ DNA ที่เพิ่มขึ้นดังรายละเอียดที่แสดงในรูปที่ 2 (74)



รูปที่ 2 หลักการทำงานของ TaqMan probe ในการตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real time (74)

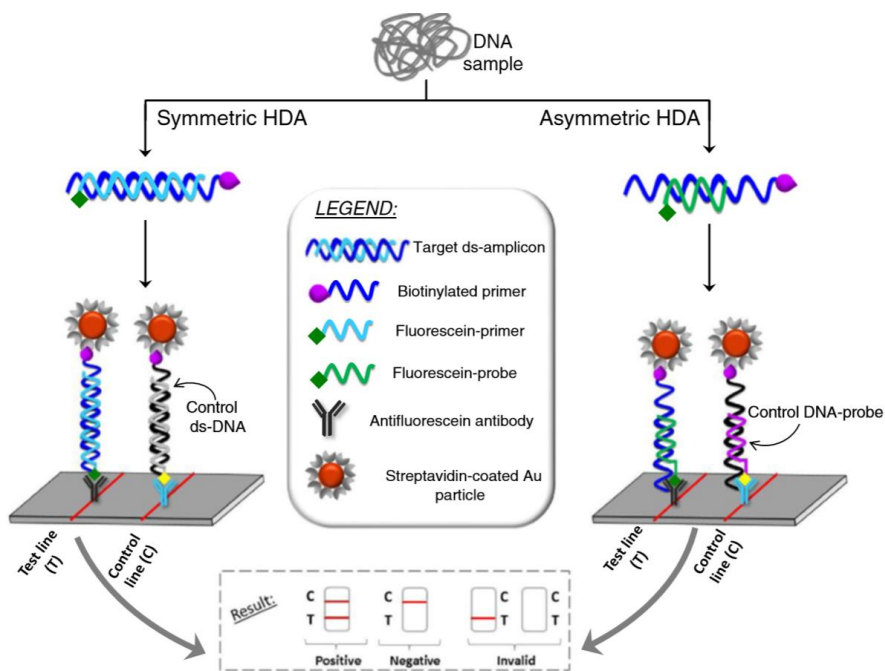
9.2 การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสามารถใช้แยก DNA ที่มีขนาดตั้งแต่ 100 bp ถึง 25 kb ออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้าโดยผ่านตัวกลางค้ำจุนที่เป็นวุ้น โดยอาศัยหลักการที่โครงสร้างของ DNA มีหมู่ฟอสเฟต ทำให้มีประจุโดยรวมเป็นลบเมื่ออยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าโมเลกุลของ DNA จะถูกผลักให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวกความสามารถในการเคลื่อนที่ของ DNA ขึ้นอยู่กับขนาดและลักษณะรูปร่างของ DNA โดย DNA ที่มี

รูปร่างเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อน (Supercoiled DNA) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA ที่มีรูปร่างเป็นเส้นตรง (Linear DNA) และวงแหวน (Circular DNA) ตามลำดับ ในขณะที่หาก DNA มีรูปร่างเหมือนกันเช่น DNA รูปร่างเป็นเส้นตรงนั้น DNA ที่มีขนาดเล็กกว่าจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA ที่มีขนาดใหญ่ นอกจากนี้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของ DNA ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของวุ้น Agarose ขนาดรูพรุนของวุ้น Agarose และความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ภายหลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนการแยก DNA สามารถอ่านผลได้โดยการนำวุ้น Agarose ที่มีแถบ DNA ไปย้อมสี อาทิเช่น สี Ethidium bromide สี SYBR Gold และสี SYBR green I เป็นต้น และศึกษาแถบของ DNA ภายใต้อัลตราไวโอเล็ตตามลำดับ (75-77)

9.3 การตรวจสอบผลผลิตด้วยหลักการ Lateral flow

การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายหลังการเกิดปฏิกิริยาด้วยหลักการ Lateral flow มีการใช้ Primer ที่ปลาย 5' ติดกับ Biotin และออกแบบ Probe โดยปลาย 3' ของ Probe ติดฉลากด้วยสารปลดตรงสีกลุ่ม Hapten เช่น Fluorescein Digoxigenin หรือ 2,4 dinitrophenyl ภายหลังจากที่ Primer และ Probe จับกับ DNA ต้นแบบ และมีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ทำให้ได้ผลผลิตที่มี Biotin และสารปลดตรงสีกลุ่ม Hapten ติดอยู่ในผลผลิต (รูปที่ 3) ซึ่งหลังจากนั้น Probe จะจับกับแอนติบอดีหรือโปรตีนที่จำเพาะกับ Probe นั้น ที่ถูกตรึงไว้บน Nitrocellulose membrane และตรวจสอบสัญญาณ โดยมี Streptavidin ที่จับกับอนุภาคสีเป็นตัวช่วยในการเพิ่มสัญญาณในการอ่านผล (15)



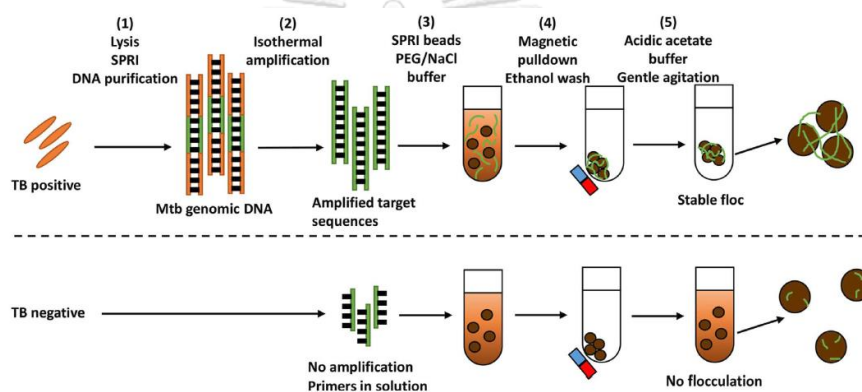
รูปที่ 3 การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยหลักการ Lateral flow (15)

9.4 การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Microfluidic

เทคนิค Microfluidic เป็นการควบคุมของไหลของสารผ่านช่องขนาดเล็ก อุปกรณ์ Microfluidic ซึ่งประกอบไปด้วยวาล์วเครื่องผสมและปั๊มที่สามารถควบคุมการไหลของของไหลภายในอุปกรณ์ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค Microfluidic มาพัฒนาเป็นการตรวจแบบ Lab-on-a-chip โดยการเปลี่ยนลายวงจรของ Microchip ที่ใช้ในแผงวงจรไฟฟ้าขนาดเล็ก ซึ่งแต่เดิมเป็นที่วิ่งของกระแสไฟฟ้าให้กลายเป็นท่อหรือช่องทางไหลของของเหลว หรือก๊าซที่ต้องการตรวจวัด นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวัสดุที่ใช้ทำ Chip ที่หลากหลาย อาทิเช่น พลาสติก แก้ว และกระดาษ รวมทั้งมีการพัฒนาเทคโนโลยีในการออกแบบสร้างช่องทางไหล และระบบจัดการให้ Chip ทำหน้าที่ได้อย่างแม่นยำ เหมาะสำหรับการตรวจแบบ Point-of-care หรือในงานภาคสนาม โดยการศึกษาของ Ramalingam และคณะ ได้มีการพัฒนาเทคนิค HDA ร่วมกับเทคนิค Microfluidic ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของชิ้นส่วน BNI-1 ของ SARS cDNA ได้สำเร็จ โดยที่ส่วนของน้ำยาที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จะถูกเก็บไว้ในอุปกรณ์ Microfluidic ในขณะที่ตัวอย่าง DNA และ primer ถูกเติมเข้ามาทีหลัง (14, 78-80)

9.5 การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Flocculation

หลักการของ Flocculation คือการใช้สาย DNA ที่มีความยาวเพียงพอที่จะเชื่อมอนุภาคเม็ดปิดเข้าด้วยกันเป็นกลุ่มก้อนภายใต้สภาวะสารละลายบัฟเฟอร์ที่จำเพาะ ทำให้สามารถเห็นการตกตะกอนด้วยตาเปล่า ดังตัวอย่างรูปที่ 4 การตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Mycobacterium* จากการศึกษาของ Benjamin และคณะ พบว่าเทคนิคนี้มีความจำเพาะสูงต่อเชื้อ *Mycobacterium* มีความไวในการวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* เท่ากับ 10 CFU และไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์จำเพาะ หรืออุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการที่มีราคาแพงจึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยสำหรับ Point-of-care (81)



รูปที่ 4 ตัวอย่างการตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Flocculation ของเชื้อ *Mycobacterium* (81)

9.6 การตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I

สี SYBR Green I ซึ่งเป็นสารเรืองแสงในกลุ่มสีเขียวไนน์มีคุณสมบัติในการจับกับร่องขนาดเล็กหรือ Minor groove ของ DNA สายคู่ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่นสูงสุด 497 nm และมีค่าการเปล่งแสงสีเขียวที่ความยาวคลื่นสูงสุด 520 nm ดังนั้นหากมีผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทำให้สี SYBR Green I สามารถจับกับ Minor groove ของ DNA ที่เป็นผลผลิตซึ่งสามารถมองเห็นเป็นสีเขียวได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ หรือเกิดการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แต่ถ้าหากไม่มีผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเกิดขึ้นจะมองเห็นเป็นสีส้มด้วยตาเปล่าหรือไม่เกิดการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (82) การศึกษาที่ผ่านมา มีการนำสี SYBR Green I มาใช้ตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA

เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) ผลการศึกษาพบว่ามีความจำเพาะ 100 % และมีความไว 97.95 % และ 99.32% สำหรับการตรวจหาฮีน IS6110 และ IS1081 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน PCR (83) สี SYBR Green I ยังถูกนำมาใช้ร่วมกับเทคนิค LAMP เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* ที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย พบว่ามีความแม่นยำในการวินิจฉัยสูง ความไวและความจำเพาะ 100% สำหรับการวินิจฉัยเชื้อ *P. falciparum* และความไวและความจำเพาะ 95.16% และ 96.7% ตามลำดับ สำหรับการวินิจฉัยเชื้อ *P. vivax* เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR (84) การตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I สามารถอ่านผลได้ทันทีภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยาโดยการเติมสี โดยไม่จำเป็นต้องมีช่วงระยะเวลาการบ่มเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนสี ทำให้การตรวจวัดผลผลิตมีขั้นตอนที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้อุปกรณ์จำเพาะอื่นเพิ่มเติม และสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ (82)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้งานวิจัย มีรายละเอียด ดังนี้

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วย Tryptic soy agar (TSA) ซื้อจากบริษัท Oxoid จำกัด สหราชอาณาจักร และ BacT/Alert ซื้อจากบริษัท BioMérieux จำกัด ประเทศฝรั่งเศส

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ประกอบด้วยชุดน้ำยาเอนไซม์ Taq DNA polymerase ซื้อจากบริษัท New England BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific Inc. จำกัด สหรัฐอเมริกา และ primer สั่งสังเคราะห์จากบริษัท Bioneer Corporation จำกัด สาธารณรัฐเกาหลีใต้

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรมจากผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ด้วยชุดทดสอบ QIAamp DNA Microbiome ประกอบด้วย QIAamp UCP Mini Columns, Collection tubes, Pathogen Lysis tubes L, Elution tubes, AHL Buffer, RDD Buffer, Benzonase, ATL Buffer, Reagent DX, APL2 Buffer, AW1 Buffer, AW2 Buffer, Proteinase K และ AVE Buffer ซื้อจากบริษัท Qiagen จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค helicase dependent amplification (HDA) ประกอบด้วย 10X annealing buffer, Magnesium sulfate ($MgSO_4$), Sodium chloride (NaCl), IsoAmp dNTPs solution และเอนไซม์ IsoAmp enzyme mix ซื้อจากบริษัท BioLabs จำกัด สหรัฐอเมริกา สี SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain ซื้อจากบริษัท Favorgen Biotech Corporation จำกัด สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน)

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ประกอบด้วย Tris base ซื้อจากบริษัท Amresco Inc. จำกัด

สหรัฐอเมริกา acetic acid ซื้อจากบริษัท Merck จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด สหรัฐอเมริกา Agarose ซื้อจากบริษัท Serva จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี DNA มาตรฐาน 100 bp ซื้อจากบริษัท Thermo Fish Scientific Inc. จำกัด สหรัฐอเมริกา 6x Loading dye ซื้อจากบริษัท Biotechrabbit จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี UltraPower™ DNA/RNA safe dye ซื้อจากบริษัท Gellex International Inc. จำกัด ประเทศญี่ปุ่น

2. เครื่องมือ

เครื่องวัดปริมาณ DNA (Nanodrop™ 100 spectrophotometer) จากบริษัท Thermo Fish Scientific Inc. จำกัด สหรัฐอเมริกา เครื่อง Thermo cycle จากบริษัท Biometra GmbH จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Dry Bath Incubator) จากบริษัท Hangzhou Allsheng Instruments จำกัด สาธารณรัฐประชาชนจีน เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง (Spectrafuge™ 16M High Speed Microcentrifuge) เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spectrafuge™ Mini Laboratory Centrifuge) และเครื่อง Electrophoresis จากบริษัท Labnet International Inc. จำกัด สหรัฐอเมริกา เครื่องจ่ายกำลังไฟฟ้า (Power Supply) และเครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Gel Doc™ XR ChemiDoc™ XRS) จากบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc. จำกัด สหรัฐอเมริกา

3. วิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่หมดอายุ ณ วันที่ 5 ของการเก็บรักษา จากภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 4 จังหวัดราชบุรี สภากาชาดไทย การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เลขที่รับรองโครงการ COA.NBC 15/2019

3.2 เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก

การศึกษารั้งนี้ใช้เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* ซึ่งเชื่อดังกล่าวทั้งหมด เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มักพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจากการศึกษาที่ผ่านมา (31, 45, 51) เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

3.3 การสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกลงบน Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย 1 loop มาผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ml ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้ด้วย เครื่องวัดปริมาณ DNA (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer, บริษัท Thermo scientific จำกัด, สหรัฐอเมริกา) เก็บ DNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.4 การออกแบบ Primer

Primer เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่ใช้ในการพัฒนาเทคนิค HDA/SYBR Green I สำหรับการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และ HDA ในการศึกษารั้งนี้ ถูกออกแบบให้จำเพาะต่อส่วนบริเวณอนุรักษ์ (Conserved region) ของยีน 16s rRNA ซึ่งเป็นยีนที่พบในแบคทีเรียทุกชนิด มีความผันแปรทางวิวัฒนาการต่ำและมีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง ซึ่งถูกออกแบบโดยใช้ลำดับเบสของยูแบคทีเรียส่วนบริเวณอนุรักษ์จำนวน 275,057 ชนิด จากฐานข้อมูล Ribosomal Database Project (RDP) ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาของ Wang และคณะ (85) เป็นต้นแบบ และออกแบบให้ HDA Primer มีความยาวประมาณ 20-32 bp ซึ่งเป็นความยาวของ

Primer ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา HDA (86) และให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ผลผลิตขนาดเท่ากับ 104 bp ซึ่งเป็นความยาวของ DNA ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I (87) ตรวจสอบคุณสมบัติและความจำเพาะของ Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และ HDA ด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) รายละเอียดของ Primer ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 รายละเอียดของ Primer ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

Primer	ลำดับเบส (5' - 3')	ขนาดของผลผลิต (bp)	ที่มา
PCR	Forward CCARACTCCTACGGGAGGCAGCAGTRRGGA	200	การศึกษาครีงนี้
	Reverse ATTACCGCGGCTGCTGGCACGDAGTTAGCC		การศึกษาครีงนี้
HDA	Forward AGTCCCRYAACGAGCGCAACCC	104	การศึกษาครีงนี้
	Reverse TTGACGTCRTCCCCRCCTTCC		การศึกษาครีงนี้

3.5 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของ PCR Primer ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

3.5.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR

นำ PCR Primer ที่ถูกออกแบบ มาประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้น ด้วยการนำไปใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกจำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ จากในข้อ 3.3 ในปฏิกิริยา PCR ประกอบไปด้วย 10x PCR buffer (1x Buffer : 7.5 mM Tris-HCl pH=8.75, 25 mM KCl, 1mM MgCl₂), 10 mM Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 1U *Taq* DNA polymerase, Forward primer และ Reverse primer อย่างละ 10 µM, DNA ต้นแบบ 10 ng และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 50 µl ทำปฏิกิริยา PCR ในสภาวะต่อไปนี้ เริ่มต้นจากอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบ PCR

product ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis ที่ผสมสีย้อม DNA (Gelstar™, ประเทศญี่ปุ่น) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพที่เกิดขึ้น

3.5.2 การหาลำดับเบสของผลผลิต PCR

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากข้อ 3.5.1 ที่เกิดขึ้นจากการใช้ PCR Primer มาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing เพื่อยืนยันผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวกด้วย PCR Primer ตามลำดับ โดยใช้ผลผลิต PCR ที่มีปริมาตรรวม 35 μ l และมีความเข้มข้น DNA ไม่น้อยกว่า 50 ng/ μ l พร้อมกับ Forward Primer ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่ บริษัท Bioneer sequencing service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ นำผลการหาลำดับเบสมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.6 การพัฒนาเทคนิค Helicase dependent amplification ควบคู่กับการอ่านผลด้วยสี SYBR Green I (HDA/SYBR Green I) สำหรับตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้พัฒนาเทคนิค HDA ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิเดียวคงที่ โดยใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวก จำนวน 6 สายพันธุ์ ที่สกัดได้จากในข้อ 3.3 ใช้ HDA Primer ซึ่งจำเพาะกับยีน 16S rRNA ที่ออกแบบได้ในข้อ 3.4 ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิต HDA ด้วยการเติมสี SYBR Green I ซึ่งสามารถอ่านผลที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า

การพัฒนาเทคนิค HDA ใช้ชุดน้ำยา Iso Amp® II Universal tHDA Kit (บริษัท BioLabs จำกัด, สหรัฐอเมริกา) โดยใน 1 หลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 50 μ l ประกอบไปด้วย Forward primer และ Reverse primer ความเข้มข้นอย่างละ 5 μ M 10X Annealing buffer II 5 μ l MgSO₄ 2 μ l NaCl 4 μ l IsoAmp dNTPs solution 3.5 μ l IsoAmp enzyme mix 3.5 μ l DNA ต้นแบบ 10 ng และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรครบ 50 μ l โดยทำปฏิกิริยาควบคุมบวกของน้ำยาโดยใช้ Primer และ DNA ตัวควบคุมบวกของชุดน้ำยา HDA ร่วมด้วย บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา แบ่งผลผลิต HDA เป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรก นำผลผลิต HDA ไปตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I ซึ่งมีคุณสมบัติในการเข้าจับกับร่องขนาดเล็กของ DNA สายคู่ที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นมา ตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าทันที โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย หากสารละลายเป็นสีเขียว หมายถึง ปฏิกิริยา HDA เป็นบวกเนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยการจับอย่างจำเพาะของ Primer และ DNA ต้นแบบ จึงสามารถมองเห็นสารละลายด้วยตาเปล่าเป็นสีเขียวภายใต้แสงธรรมชาติ หรือเกิดการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต หากสารละลายเป็นสีส้ม หมายถึง ปฏิกิริยา HDA เป็นลบเนื่องจาก ไม่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เนื่องจากว่า Primer ไม่สามารถเข้าจับกับ DNA ต้นแบบได้ ทำให้มองเห็นสารละลายด้วยตาเปล่าเป็นสีส้มภายใต้แสงธรรมชาติ หรือไม่เกิดการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต การอ่านผลการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ทำการอ่านแบบ Blind test โดยใช้ผู้อ่านผลสองคนอ่านผลคู่ขนานกัน หากการอ่านผลจากทั้งสองคนสอดคล้องกัน จึงบันทึกผลการทดลอง ในกรณีที่การอ่านผลจากทั้งสองคนไม่สอดคล้องกัน หรือหากสารละลายเป็นสีก้ำกึ่งระหว่างสีเขียวกับสีส้มซึ่งไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นสีใด ต้องทำการทดสอบและอ่านผลใหม่ จึงบันทึกผลการทดลองที่เกิดขึ้น

ผลผลิต HDA ส่วนที่สอง ถูกตรวจสอบด้วย 2% Agarose gel electrophoresis ที่ผสมสีย้อม DNA (Gelstar™, ประเทศญี่ปุ่น) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 40 นาที อ่านผลแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพที่เกิดขึ้น

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I ดังต่อไปนี้

3.6.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Primer

ทดสอบปฏิกิริยาของ HDA โดยใช้ DNA ปริมาณ 10 ng กับ Primer ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 50, 100, 150 และ 200 nmol บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X เทียบกับเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นของ Primer ที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจนที่สุดและเกิด

Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.6.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

เจือจาง DNA ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 5, 10, 15 และ 20 ng นำมาทำปฏิกิริยา HDA โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Primer จากข้อ 3.6.1 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X เทียบกับเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นของ DNA ที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.6.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทดสอบปฏิกิริยา HDA โดยใช้ปริมาณ Primer และ DNA ที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.1 และข้อ 3.6.2 ตามลำดับ กับ $MgSO_4$ ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 3, 3.5, 4, และ 4.5 mM นำมาทำปฏิกิริยา HDA บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X เทียบกับเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.6.4 การทดสอบหาความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทดสอบปฏิกิริยา HDA โดยใช้ปริมาณ Primer DNA และ $MgSO_4$ ที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.1 ข้อ 3.6.2 และข้อ 3.6.3 ตามลำดับ กับ NaCl ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 20, 30, 40 และ

50 mM นำมาทำปฏิกิริยา HDA บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X เทียบกับเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นของ NaCl ที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.6.5 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทดสอบปฏิกิริยา HDA โดยใช้ปริมาณ Primer DNA $MgSO_4$ และ NaCl ที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.1 ข้อ 3.6.2 ข้อ 3.6.3 และข้อ 3.6.4 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ได้แก่ 63, 65, 67 และ 69 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยา HDA ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตน้ำยา เป็นเวลา 90 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X เทียบกับเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis เลือกอุณหภูมิที่เห็นผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.6.6 การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทดสอบปฏิกิริยาของ HDA โดยใช้ปริมาณ Primer DNA $MgSO_4$ และ NaCl ที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.1 ข้อ 3.6.2 ข้อ 3.6.3 และข้อ 3.6.4 ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 3.6.5 บ่มที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้ 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X เทียบกับเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis เลือกระยะเวลาการบ่มที่เห็นผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.6.7 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี SYBR Green I

ทำปฏิกิริยา HDA โดยใช้ปริมาณ Primer DNA MgSO₄ และ NaCl ที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.1 ข้อ 3.6.2 ข้อ 3.6.3 และข้อ 3.6.4 ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มที่ให้ผลของปฏิกิริยาชุดที่สุดจากข้อ 3.6.5 และ 3.6.6 ตามลำดับ โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 100X, 200X, 300X, 400X และ 500X เทียบกับเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นของสี SYBR Green I ที่เห็นผลของปฏิกิริยาชุดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.7 การทดสอบความจำเพาะ

ทดสอบความจำเพาะของเทคนิค HDA/SYBR Green I กับ DNA ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีโอกาสพบการปนเปื้อนได้ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ได้แก่ เชื้อ *Candida albicans* เชื้อ *Cryptococcus neoformans* เชื้อ *Aspergillus* spp. เชื้อ *Rhizopus* spp. เชื้อไวรัสตับอักเสบบี และ Human DNA ทำปฏิกิริยา HDA โดยใช้สภาวะที่พัฒนาได้ในข้อ 3.6 โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I เทียบกับเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพที่เกิดขึ้น ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งในเวลาที่แตกต่างกัน

3.8 การทดสอบหา Limit of detection

ทดสอบหา Limit of detection ของเทคนิค HDA/SYBR Green I โดยเตรียม DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวกทั้งหมด 6 สายพันธุ์ จากข้อ 3.3 มาเจือจางในน้ำกลั่นและปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 10 ng จากนั้นเจือจางเชื้อแบบ 10-fold dilution ในน้ำกลั่น จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ng นำ DNA แต่ละความเข้มข้น ไปทดสอบด้วยเทคนิค

HDA/SYBR Green I ทำปฏิกิริยา HDA โดยใช้สภาวะที่พัฒนาได้ในข้อ 3.6 โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I เทียบกับเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพที่เกิดขึ้น นำ DNA ต้นแบบของแต่ละความเข้มข้นไปทดสอบด้วยปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนการทดสอบในข้อ 3.5.1 เพื่อนำผลมาเปรียบเทียบ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งในเวลาที่แตกต่างกัน ค่า Limit of detection คือความเข้มข้นของ DNA ที่ต่ำสุด ที่ปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I หรือ PCR ตรวจพบได้ โดยคำนวณความเข้มข้นของ DNA จากหน่วย ng ให้มีหน่วยเป็น CFU ตามวิธีการคำนวณด้านล่าง

คำนวณความเข้มข้นของ DNA จากหน่วย ng ให้เป็น DNA copy number ด้วยสมการดังนี้ (88)

$$\text{DNA copy number} = \frac{X \text{ ng} * 6.0221 \times 10^{23} \text{ molecules/mole}}{(N * 660 \text{ g/mole}) * 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

X แทน ปริมาณ DNA (ng)

N แทน ขนาดผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (bp)

จากการศึกษาของ Vetrovsky and Baldrian (89) พบว่า เชื้อ *S. aureus* เชื้อ *S. epidermidis* และเชื้อ *B. cereus* ที่จัดอยู่ใน Phylum *Firmicutes* และเชื้อ *E. coli* เชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *S. marcescens* ที่จัดอยู่ใน Phylum *Proteobacteria* Class *Grammaproteobacteria* มีจำนวน ยีน 16S rRNA เท่ากับ 5.8 ± 2.8 ต่อ 1 genome ดังนั้นนำค่า DNA copy number ของยีน 16S rRNA ที่พบใน 1 genome ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ที่คำนวณได้จากสูตรข้างต้น มาเทียบอัตราส่วน เพื่อให้มีหน่วยเป็น CFU

3.9 การตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา

ทดสอบตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ถูกเก็บในตู้แช่เยือกเกล็ดโลหิต อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส ณ วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR

Green I ที่พัฒนาได้จากข้อ 3.6 โดยเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1 CFU/ml แบบจำลอง เนื่องจากแนวทางการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตในปัจจุบัน ต้องการวิธีการตรวจที่มีความไวสูงที่สุด ที่สามารถตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้ที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดคือ 1 CFU/ml (52) นำเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* มาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic soy broth (TSB) และปรับความขุ่นเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland standard หรือเท่ากับ 10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางเชื้อแบบ 10-fold dilution ใน TSB จนได้ความเข้มข้นเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 10^2 ใช้เข็มฉีดยาดูดเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางในความเข้มข้น 10^2 ปริมาตร 3 ml ฉีดใส่ถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีปริมาตรของเหลวข้างในเท่ากับ 297 ml และเขย่าให้เข้ากัน ดังนั้นจะได้ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 CFU/ml และนับเป็นวันที่ 0 หรือวันแรกที่ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตถูกจัดเตรียมเสร็จและเริ่มต้นการเก็บรักษา เก็บรักษาผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตในตู้เขย่าเกล็ดโลหิตอุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส จนครบระยะเวลา 5 วัน ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเก็บรักษา ตามอายุของผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต นำผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเก็บรักษาในแต่ละวัน ตั้งแต่ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ไปตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับเทคนิคทางอณูชีววิทยา ได้แก่ การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR เทคนิคทางพีโนไทป์ ได้แก่ การนับจำนวนโคโลนี และเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาให้การรับรอง ตามรายละเอียดด้านล่าง

3.9.1 การสกัด DNA จากผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา

ทำการสกัด DNA จากผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ณ วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ของการเก็บรักษา โดยใช้ชุดทดสอบ QIAamp DNA Microbiome ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ดูดสารละลายในถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ปริมาตร 1000 μ l ผสมกับบัฟเฟอร์ AHL ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่มีส่วนใส นำเฉพาะส่วนตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ RDD

ปริมาตร 190 ul เติม Benzonase ปริมาตร 2.5 ul ผสมสารละลายให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 600 rpm เป็นเวลา 30 นาที เติม Proteinase K ปริมาตร 20 ul และบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 600 rpm เป็นเวลา 30 นาที เติมบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 200 ul ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายมาใส่หลอด Pathogen lysis tube L จากนั้นใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายที่เป็นส่วนใสด้านบนมาใส่หลอด 1.5 ml เติม Proteinase K ปริมาตร 40 ul และบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 600 rpm เป็นเวลา 30 นาที เติมบัฟเฟอร์ ALP2 200 ul ผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) เป็นเวลา 30 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Ethanol ปริมาตร 200 ul ผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) เป็นเวลา 15-30 วินาที ปิเปตสารละลายปริมาตร 700 ul ใส่ QI Amp UCP mini column จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ul นำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 1 นาที ย้ายส่วน Column ไปใส่ Collection tube และเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ul นำไปปั่นที่ความเร็ว 20,000 g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นย้ายส่วน Column ไปใส่ Collection tube นำไปปั่นที่ความเร็ว 20,000 g เป็นเวลา 1 นาที ย้ายส่วน Column ไปใส่ Elution tube เติมบัฟเฟอร์ AVE ปริมาตร 50 ul และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัด ปริมาณ DNA (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer, บริษัท Thermo scientific จำกัด, สหรัฐอเมริกา) เก็บ DNA ที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

3.9.2 การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลองด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา

นำ DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวกทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ที่สกัดได้จาก ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตโลหิต ณ วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ของการเก็บรักษามาใช้เป็น DNA ต้นแบบสำหรับ ตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลองด้วย เทคนิค HDA /SYBR Green I โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I ที่พัฒนาได้จากข้อ 3.6 ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา HDA ทำการแบ่งผลผลิต HDA เป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรก นำผลผลิต HDA ไปตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I ซึ่งอ่านผลแบบ Blind test โดยผู้ที่ไม่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยอย่างน้อย 2 คน และผลผลิต HDA ส่วนที่สอง จะถูกตรวจสอบด้วย 2% Agarose gel electrophoresis ที่ผสมสีย้อม DNA (Gelstar™, ประเทศญี่ปุ่น) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 40 นาทีอ่านผลแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพที่เกิดขึ้น และทำการทดลองทั้งหมด 2 ครั้งในเวลาที่แตกต่างกัน และนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.9.3 การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลองด้วยเทคนิค PCR ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา

นำ DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวกทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ของการเก็บรักษามาใช้เป็น DNA ต้นแบบสำหรับตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลองด้วยเทคนิค PCR ในปฏิกิริยา PCR ประกอบไปด้วย 10x PCR buffer (1x Buffer : 7.5 mM Tris-HCl pH=8.75, 25 mM KCl, 1 mM MgCl₂), 10 mM Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 1U *Taq* DNA polymerase, Forward primer และ Reverse primer อย่างละ 10 μM, DNA ต้นแบบ 10 ng และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 50 μl ทำปฏิกิริยา PCR ในสภาวะต่อไปนี้ เริ่มต้นจากอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบ PCR product ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis ที่ผสมสีย้อม DNA (Gelstar™, ประเทศญี่ปุ่น) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 45 นาทีอ่านผลแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพที่เกิดขึ้น และทำการทดลองทั้งหมด 2 ครั้งในเวลาที่แตกต่างกัน และนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.9.4 การนับจำนวนโคโลนีจากผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา

ดูสารละลายในแต่ละถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตโลหิต ณ วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ของการเก็บรักษา เจือจางเชื้อแบบ 10-fold dilution ใน TSB จนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-10} หลังจากนั้นดูเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 μ l เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำ 2 ซ้ำใน 1 การทดลอง และทำการทดลองทั้งหมด 2 ครั้งในเวลาที่แตกต่างกัน นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นและนำมาหาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตโลหิต ณ วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ของการเก็บรักษาคำนวณจากสูตรต่อไปนี้ (90)

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหาร}}{\text{ระดับความเจือจาง} \times \text{ปริมาตรที่ดูมา (ml)}}$$

3.9.5 การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในเกล็ดโลหิตด้วยเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา

ดูสารละลายในถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ของการเก็บรักษา ปริมาตร 10 ml ใส่ในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ BacT/Alert[®] BPA (บริษัท bioMérieux จำกัด ประเทศฝรั่งเศส) บ่มเพาะด้วยเครื่อง BacT/Alert System เป็นเวลา 7 วัน โดยเครื่องใช้เซ็นเซอร์วัดสีและแสงสะท้อน เพื่อตรวจสอบสถานะและการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ หากผลการทดสอบให้ผลบวกหรือพบเชื้อในตัวอย่างทดสอบจะพบว่า เชื้อจะมีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองของเซ็นเซอร์ก๊าซซิมผ่านที่ติดตั้งที่ด้านล่างของขวดเพาะเลี้ยง และผลการทดสอบให้ผลลบหรือไม่พบเชื้อในตัวอย่างทดสอบจะไม่พบการเปลี่ยนสีด้านล่างของขวดเพาะเลี้ยง

ดูสารละลายจากขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ BacT/Alert[®] BPA ทั้งขวดที่ให้ผลบวกและขวดที่ให้ผลลบเพาะเลี้ยงเชื้อบน TSA ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น นำโคโลนีไปวินิจฉัยจำแนกสายพันธุ์เชื้อด้วยเครื่อง MALDI รุ่น Microflex series (บริษัท Bruker จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ทำการวินิจฉัย

จำแนกเชื้อโดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ทำการทดลองทั้งหมด 2 ครั้งในเวลาที่แตกต่างกัน และนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.10 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของเทคนิค HDA/SYBR Green I

นำผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA ที่ถูกตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I (HDA/SYBR Green I) เปรียบเทียบการตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis (HDA/AGE) (ตารางที่ 5) เทคนิค PCR (ตารางที่ 6) การนับจำนวนโคโลนี (ตารางที่ 7) และเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System (ตารางที่ 8) เพื่อคำนวณหาความไวและความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% โดยจำนวนตัวอย่างที่นำมาคำนวณคือ ผลการทดสอบของผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวกทั้ง 6 สายพันธุ์ (6 ตัวอย่าง) และตัวควบคุมลบที่เป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (1 ตัวอย่าง) และผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ (1 ตัวอย่าง) รวมทั้งหมด 8 ตัวอย่าง และทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง รวมจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 16 ตัวอย่าง ซึ่งทำการทดสอบในแต่ละวัน ตั้งแต่วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 รวมทั้งหมด 6 วัน ดังนั้นการคำนวณความไวและความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ จึงคำนวณจากตัวอย่างทั้งสิ้น 96 ตัวอย่าง

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค HDA/AGE

	พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค HDA/AGE	ไม่พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค HDA/AGE
พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค HDA/SYBRGreen I	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค HDA/SYBRGreen I	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ของเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค PCR

	พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค PCR	ไม่พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค PCR
พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค HDA/ SYBR Green I	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค HDA/ SYBR Green I	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ของเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลการทดสอบจากการนับจำนวนโคโลนี

	พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย การนับจำนวนโคโลนี	ไม่พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย การนับจำนวนโคโลนี
พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค HDA/ SYBR Green I	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค SYBR Green I	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ของเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลการทดสอบจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System

	พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System	ไม่พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System
พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค HDA/SYBRGreen I	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบการปนเปื้อน เชื้อแบคทีเรียเมื่อตรวจด้วย เทคนิค HDA/SYBRGreen I	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

สูตรคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ (91)

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

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

$$\text{ค่าทำนายผลบวก} = a/(a+b)$$

$$\text{ค่าทำนายผลลบ} = d/(c+d)$$

3.11 การคำนวณค่าความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยค่าสถิติ Kappa

ค่าสถิติ Kappa (Cohen's kappa coefficient : K) เป็นค่าสถิติที่ใช้ทดสอบความสอดคล้อง (Consistency) กันของข้อมูล 2 กลุ่ม ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา จากเทคนิคต่าง ๆ ได้แก่ เทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับเทคนิค HDA/AGE เทคนิค PCR เทคนิคการนับจำนวนโคโลนี และเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System โดยใช้ค่าสถิติ Kappa ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS statistical (Version 22 for windows)

ตารางที่ 9 วิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา จากเทคนิคต่าง ๆ ด้วยค่าสถิติ Kappa

	ผลบวกจากเทคนิค 1	ผลลบจากเทคนิค 1	รวม
ผลบวกจากเทคนิค 2	a	b	a+b
ผลลบจากเทคนิค 2	c	d	c+d
รวม	a+c	b+d	a+b+c+d

สูตรคำนวณค่าสถิติ Kappa (92)

$$\text{ค่าสถิติ Kappa} = \frac{Pr_a - Pr_e}{1 - Pr_e}$$

เมื่อ Pr_a แทนค่าความสอดคล้องที่สังเกตได้จริง หรือผลรวมของสัดส่วนในแต่ละช่องด้าน
แนวทแยง ซึ่งเป็นสัดส่วนของค่าสังเกต หรือจำนวนข้อมูลเทคนิคการตรวจคู่ที่จัดอันดับความ
สอดคล้องกัน หรือ

$$Pr_a = \left(\frac{a}{(a+b+c+d)} \right) + \left(\frac{d}{(a+b+c+d)} \right)$$

และ Pr_e แทนค่าโอกาสของความสอดคล้องกัน หรือผลรวมแบบเดียวกับค่า Pr_a แต่เป็น
สัดส่วนกับค่าคาดหวัง หรือ

$$Pr_e = \left(\frac{a+c}{(a+b+c+d)} \right) \left(\frac{a+b}{(a+b+c+d)} \right) + \left(\frac{b+d}{(a+b+c+d)} \right) \left(\frac{c+d}{(a+b+c+d)} \right)$$

และใช้เกณฑ์การประเมินเปรียบเทียบระดับความสอดคล้องกันตาม Landis และ Koch ตาม
ตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เกณฑ์การพิจารณาระดับความสอดคล้องกันของสถิติ Kappa ตามแนวทางของ Landis
และ Koch (93)

ค่าสถิติ Kappa	ระดับความสอดคล้องกัน
0.81 – 1.00	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ ดีมาก (Almost perfect)
0.61 – 0.80	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ ดี (Substantial)
0.41 – 0.60	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ ปานกลาง (Moderate)
0.21 – 0.40	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ พอใช้ (Fair)
0.00 – 0.20	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ เล็กน้อย (Slight)
น้อยกว่า 0.00	ไม่มีความสอดคล้องกัน (Poor)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก

สกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* ผลการวัดปริมาณ DNA ที่สกัดได้ด้วย เครื่องวัดปริมาณ DNA (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer, บริษัท Thermo scientific จำกัด, สหรัฐอเมริกา) ที่ความยาวคลื่น 260 nm พบว่าปริมาณ DNA ที่สกัดได้อยู่ในช่วงระหว่าง 130.3 ถึง 157.9 ng/ul และมีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วงระหว่าง 1.96 – 2.05 DNA ที่สกัดได้มีปริมาณและความบริสุทธิ์เพียงพอที่นำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

2. การวิเคราะห์คุณสมบัติของ Primer ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม Blast

ภายหลังการตรวจสอบคุณสมบัติและความจำเพาะของ PCR Primer และ HDA primer ด้วยโปรแกรม Blast พบว่า มีลำดับเบสคล้ายกับส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16s rRNA โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 90.00 - 96.67% และมีค่า E value อยู่ระหว่าง $6e-0.5$ – 6.7 (รูปที่ 5 ถึง 8)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Arcobacter canalis strain LMG 29148 chromosome, complete genome	51.4	308	100%	0.001	90.00%	CP042812.1
<input checked="" type="checkbox"/> Terriglobus albidus strain ORNL chromosome, complete genome	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	CP042806.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhodanobacter glycinis strain T01E-68 chromosome, complete genome	51.4	102	100%	0.001	90.00%	CP042807.1
<input checked="" type="checkbox"/> Youhialella tibetensis strain fig4 chromosome, complete genome	51.4	102	100%	0.001	90.00%	CP041690.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter pittii strain WCHAP100020 chromosome, complete genome	51.4	308	100%	0.001	90.00%	CP027254.3
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain WCHAB005078 chromosome, complete genome	51.4	308	100%	0.001	90.00%	CP027246.2
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter defluvi strain WCHA30 chromosome, complete genome	51.4	359	100%	0.001	90.00%	CP029397.2
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain WCHAB005133 chromosome, complete genome	51.4	308	100%	0.001	90.00%	CP026750.2
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain SCKP020046 chromosome, complete genome	51.4	411	100%	0.001	90.00%	CP028783.2
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter junii strain WCHAJ59 chromosome, complete genome	51.4	308	100%	0.001	90.00%	CP028800.2
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain SCKP020079 chromosome, complete genome	51.4	411	100%	0.001	90.00%	CP029384.2
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain SCKP020143 chromosome, complete genome	51.4	411	100%	0.001	90.00%	CP028548.2
<input checked="" type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila strain WCHAH045096 chromosome, complete genome	51.4	514	100%	0.001	90.00%	CP028568.2
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella varicola strain WCHKP19 chromosome, complete genome	51.4	411	100%	0.001	90.00%	CP028555.2
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae strain WCHKP2 chromosome, complete genome	51.4	411	100%	0.001	90.00%	CP028542.3
<input checked="" type="checkbox"/> Bartonella krasnovii strain OE 1-1 chromosome, complete genome	51.4	102	100%	0.001	90.00%	CP031844.2
<input checked="" type="checkbox"/> Bartonella kosoyi strain Tel Aviv chromosome, complete genome	51.4	102	100%	0.001	90.00%	CP031843.2
<input checked="" type="checkbox"/> Aquicella siphonis strain SGT-108 genome assembly, chromosome_1	51.4	102	100%	0.001	90.00%	LR699119.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aquicella lusitana strain SGT-39 genome assembly, chromosome_1	51.4	102	100%	0.001	90.00%	LR699114.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lawsonella clevelandensis isolate USB-603019 genome assembly, chromosome_1	51.4	102	100%	0.001	90.00%	LR584267.1
<input checked="" type="checkbox"/> Roseococcus sp. strain FW305-C-136D_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN305721.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain OTG012_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN305711.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain OTG011_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN305708.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Bacillus sp. clone BSC35_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN305699.1
<input checked="" type="checkbox"/> Labrenzia sp. strain 21p_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN305698.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured candidate division NC10 bacterium clone sikNC10_2-7_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MK909155.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured candidate division NC10 bacterium clone sikNC10_5-2_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MK909154.1
<input checked="" type="checkbox"/> Stenotrophomonas daejeonensis strain_16S_DB60_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN304751.1
<input checked="" type="checkbox"/> Stenotrophomonas sp. 16S_DB52_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN304750.1
<input checked="" type="checkbox"/> Stenotrophomonas sp. 16S_DB39_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN304749.1
<input checked="" type="checkbox"/> Stenotrophomonas maltophilia strain_16S_DB22_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN304748.1
<input checked="" type="checkbox"/> Stenotrophomonas sp. 16S_DB5_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN304747.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain Sha_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN298858.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium simiae strain 89m_16f_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MK416189.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. TRM49041_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN296320.1
<input checked="" type="checkbox"/> Caloramator sp. strain USBA_509_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN296304.1
<input checked="" type="checkbox"/> Caloramator sp. strain USBA_510_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN296303.1
<input checked="" type="checkbox"/> Thermoanaerobacter sp. strain USBA_132_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN296302.1
<input checked="" type="checkbox"/> Thermoanaerobacter sp. strain USBA_133_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN296301.1
<input checked="" type="checkbox"/> Desulfosoma sp. strain USBA_41_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN296300.1
<input checked="" type="checkbox"/> Thermoanaerobacter sp. strain USBA_28_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN296299.1
<input checked="" type="checkbox"/> Thermoanaerobacter sp. strain USBA_15_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN296298.1
<input checked="" type="checkbox"/> Thermoanaerobacter sp. strain USBA_18_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN296297.1
<input checked="" type="checkbox"/> Desulfosoma sp. strain USBA_03_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN296296.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus sp. (in: Bacteria) strain ICG200_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN294990.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. strain ICG100_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN294989.1
<input checked="" type="checkbox"/> Salinibacterium sp. strain dk5596_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN294988.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus altitudinis strain PRG2_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN294699.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycetocola sp. strain lr1169_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN294698.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycetocola sp. strain lr1170_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51.4	51.4	100%	0.001	90.00%	MN294697.1

รูปที่ 5 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของ Forward PCR primer ด้วยโปรแกรม BLAST

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Staphylococcus aureus B3 gene for 16S rRNA partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	LC554891.1
✓	Bacillus subtilis strain V26 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MT598166.1
✓	Staphylococcus aureus strain SKA 1 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MN960045.1
✓	Bacillus wiedmannii strain MPF-B1a 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK949348.1
✓	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	LR651262.1
✓	Staphylococcus epidermidis strain SAMC-RUSOL(10)1 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MN606201.1
✓	Uncultured bacterium clone 21198 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH776505.1
✓	Uncultured bacterium clone 15644 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH774925.1
✓	Uncultured bacterium clone 355 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH762569.1
✓	Bacillales bacterium 13B gene for 16S ribosomal RNA partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	LC490413.1
✓	Staphylococcus sciuri strain PB24 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK994020.1
✓	Ensifer sp. strain HBU06009 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK966382.1
✓	Uncultured bacterium clone whp_14Apr19 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK880420.1
✓	Bacillus cereus strain Z36 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH921665.1
✓	Lactobacillus plantarum strain LP1 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK780213.1
✓	Virgibacillus sp. strain L91 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK722416.1
✓	Streptomyces sacchari strain NMA11 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK544840.1
✓	Bacillus subtilis strain IGFRI_ePGPR_EPS12_16S 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK255074.1
✓	Streptomyces tempisqueusis strain MGVRRUK2 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK120492.1
✓	Bacillus solani strain kknpp_43 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK100430.1
✓	Uncultured bacterium clone E16 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MG979622.1
✓	Pseudomonas indoloxdans strain APBSWPTB1 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MG733474.1
✓	Bacillus infantis strain APBDSB17 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MG705563.1
✓	Stenotrophomonas maltophilia strain CN16-8 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK256880.1
✓	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain AIBL_16 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK479948.1
✓	Uncultured bacterium clone P1 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH424514.1
✓	Paraburkholderia sp. strain RL17-380-BIE-A 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK373675.1
✓	Burkholderia sp. strain RL17-374-BIF-D 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MK373618.1
✓	Uncultured bacterium clone 16S(V3-V4)-50 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH196622.1
✓	endophytic bacterium partial 16S rRNA gene isolate P1_R2A_R_9_S	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	LS433345.1
✓	Pseudomonas montellii strain ebst3 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MG953955.1
✓	Uncultured acilnobacterium clone 2_31_C1 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH478474.1
✓	Carnobacterium sp. strain X47 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MF152067.1
✓	Acidovorax sp. strain JZ9 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	KY996850.1
✓	Glutamicibacter nicotianae strain NIOSSD026507 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH255169.1
✓	Kocuria sp. strain S1D9C1 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH236165.1
✓	Uncultured bacterium clone OTU3595 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH229332.1
✓	Uncultured bacterium clone OTU3387 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH229127.1
✓	Uncultured bacterium clone OTU3282 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH229022.1
✓	Uncultured bacterium clone OTU403 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH226178.1
✓	Bacillus cereus strain ABE_12 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MH027594.1
✓	Uncultured prokaryote gene for 16S ribosomal RNA partial sequence_OTU-NOR14735	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	LC247394.1
✓	Uncultured bacterium clone OTU100 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MG928633.1
✓	Uncultured bacterium clone OTU16 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MG928549.1
✓	Lysinibacillus sp. strain ED33 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MG711883.1
✓	Uncultured Eubacteriaceae bacterium clone denovo216099 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	KY664449.1
✓	Uncultured bacterium clone OTU1980 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MG240576.1
✓	Salimicrobium sp. strain WN024 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MF770264.1
✓	Enterococcus faecium strain 24119 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	KX702964.1
✓	Uncultured bacterium clone E3C9_82009 16S ribosomal RNA gene partial sequence	55.3	55.3	100%	6e-05	96.67%	MF647757.1

รูปที่ 6 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของ Reverse PCR primer ด้วยโปรแกรม BLAST

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport strain SAP18-8729 chromosome, complete genome	38.4	268	100%	2.5	90.91%	CP041208.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio parahaemolyticus strain Vb0624 chromosome 1, complete sequence	38.4	422	100%	2.5	90.91%	CP041202.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio parahaemolyticus strain Vb0624 chromosome 2, complete sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	CP041201.1
<input checked="" type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain LMP18-H8393 chromosome, complete genome	38.4	230	100%	2.5	90.91%	CP041213.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudarthrobacter sp. NIBRBAC000502770 chromosome, complete genome	38.4	192	100%	2.5	90.91%	CP041198.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptococcus sp. Marseille-P644 partial 16S rRNA gene, strain Marseille-P644	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	LR597665.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain COPRO21317 chromosome	38.4	268	100%	2.5	90.91%	CP035706.1
<input checked="" type="checkbox"/> Microbulbifer sp. strain SH-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MK357718.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rickettsia racultii isolate Tomsok 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MK304546.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium sp. strain J 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116719.1
<input checked="" type="checkbox"/> Providencia sp. strain CRR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116684.1
<input checked="" type="checkbox"/> Microbispora sp. strain SCL1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116557.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain VC1-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116556.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain VC1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116555.1
<input checked="" type="checkbox"/> Kitasatospora sp. strain SKW16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116554.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain SSK10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116553.1
<input checked="" type="checkbox"/> Micrococcus sp. strain VCS-04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116552.1
<input checked="" type="checkbox"/> Amycolatopsis sp. strain VCS-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116551.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain CA1R205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116550.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nocardia sp. strain CA2R105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116549.1
<input checked="" type="checkbox"/> Actinomadura sp. strain CA3R107 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116548.1
<input checked="" type="checkbox"/> Microbispora sp. strain CA3R108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116547.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain CA2R106 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116546.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain CA3R110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116545.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain CA2R101 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116544.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain CA3R104 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116543.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain CA3R106 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116542.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain CA3R102 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116541.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain PLK1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116540.1
<input checked="" type="checkbox"/> Micromonospora sp. strain PLK3-29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116539.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain PLK6-34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116538.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain PLK3-71 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116537.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain PLK6-54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116536.1
<input checked="" type="checkbox"/> Micromonospora sp. strain PLK6-60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116535.1
<input checked="" type="checkbox"/> Microbispora sp. strain PLK5-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116534.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain PTD8-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116533.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain PTD4-29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116532.1
<input checked="" type="checkbox"/> Microbispora sp. strain PTD9-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116531.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain PTD6-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116530.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain PTD5-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116529.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain PTD9-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116528.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. strain PTD8-35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116527.1
<input checked="" type="checkbox"/> Synecocystis sp. 'A. Rai. Cs' strain A. Rai. Cs 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116455.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain HI1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MN116219.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured gamma proteobacterium clone band ac27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MK282204.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Paenibacillus sp. clone band ab26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MK282203.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Microbacterium sp. clone band aa25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MK282202.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone band v24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MK282201.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Chlamydia sp. clone band z23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.4	38.4	100%	2.5	90.91%	MK282200.1

รูปที่ 7 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของ Forward HDA primer ด้วยโปรแกรม BLAST

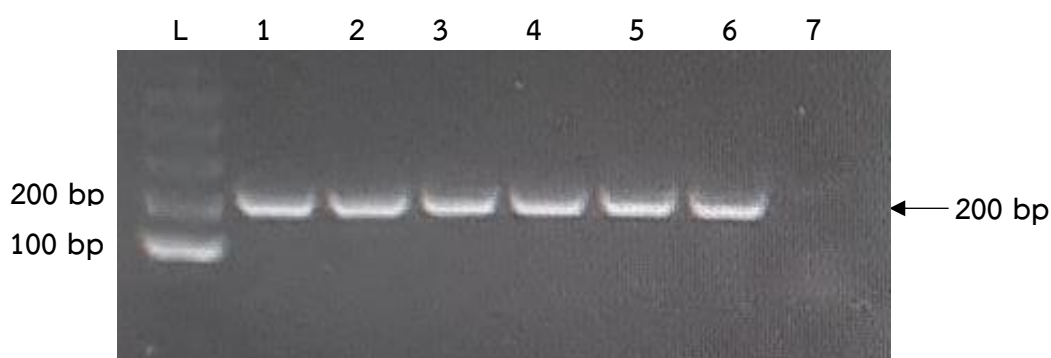
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Enterobacter cloacae strain RHBSTW-00490 chromosome, complete genome	36.4	291	100%	6.7	90.48%	CP056460.1
✓	Klebsiella pneumoniae strain RHBSTW-00510 chromosome, complete genome	36.4	291	100%	6.7	90.48%	CP056432.1
✓	Klebsiella pneumoniae strain RHBSTW-00515 chromosome, complete genome	36.4	291	100%	6.7	90.48%	CP056425.1
✓	Escherichia coli strain RHBSTW-00531 chromosome, complete genome	36.4	254	100%	6.7	90.48%	CP056412.1
✓	Klebsiella grimontii strain RHBSTW-00577 chromosome, complete genome	36.4	291	100%	6.7	90.48%	CP056701.1
✓	Flaviflexus sp. strain H23T48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT781412.1
✓	Flaviflexus sp. strain H23T48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT781411.1
✓	Klebsiella pneumoniae strain B2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786359.1
✓	Enterobacter asburiae strain B1-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786358.1
✓	Enterobacter asburiae strain B1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786357.1
✓	Exiguobacterium acetylicum strain BC-15Y 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786356.1
✓	Enterobacter hormaechei strain BC-15W 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786355.1
✓	Bacillus licheniformis strain A10203 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786354.1
✓	Enterobacter asburiae strain BC-12W 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786351.1
✓	Enterobacter asburiae strain BC-7Y 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786350.1
✓	Enterobacter asburiae strain BC-7W 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786349.1
✓	Sphingomonas paucimobilis strain 20200722 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786348.1
✓	Bacillus subtilis strain L249 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786346.1
✓	Enterobacter asburiae strain BC-2Y 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786345.1
✓	Enterobacter asburiae strain BC-2W 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786344.1
✓	Klebsiella oxytoca strain STA01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786342.1
✓	Staphylococcus sp. strain 9.9R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786321.1
✓	Enterobacter sp. strain 29.13R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786320.1
✓	Serratia sp. strain 61F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786319.1
✓	Ewingella sp. strain 32E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786318.1
✓	Pseudomonas sp. strain 62F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786316.1
✓	Serratia sp. strain 32.22R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786315.1
✓	Pseudomonas sp. strain 32.17R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786314.1
✓	Pseudomonas sp. strain 21.24R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786313.1
✓	Rahnella sp. strain M15-3A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786312.1
✓	Staphylococcus sp. strain 10.2R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786311.1
✓	Rahnella sp. strain 38E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786310.1
✓	Pseudomonas sp. strain P215 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786053.1
✓	Pseudomonas sp. strain P198 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786052.1
✓	Pseudomonas sp. strain P195 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786051.1
✓	Yersinia sp. strain P188 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786050.1
✓	Hafnia sp. strain MA35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786049.1
✓	Hafnia sp. strain MA36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786048.1
✓	Hafnia sp. strain MA63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786047.1
✓	Yersinia sp. strain P133 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786046.1
✓	Yersinia sp. strain P157 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786045.1
✓	Yersinia sp. strain P177 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786044.1
✓	Yersinia sp. strain P164 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786043.1
✓	Hafnia sp. strain MA109 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786042.1
✓	Kosakonia sp. strain P49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.4	36.4	100%	6.7	90.48%	MT786041.1

รูปที่ 8 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของ Reverse HDA primer ด้วยโปรแกรม BLAST

3. การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของ PCR Primer ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

3.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ PCR Primer ที่ถูกออกแบบให้จำเพาะต่อส่วนบริเวณอนุรักษ์ (Conserved region) ของยีน 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* ซึ่งมีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจาก Primer ทั้งสองชนิด บน 1.5% Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp พบแถบ DNA ของยีน 16s rRNA ขนาด 200 bp ซึ่งเกิดจากการใช้ PCR Primer (รูปที่ 9) และแถบ DNA ของยีน 16s rRNA ขนาด 104 bp ซึ่งเกิดจากการใช้



รูปที่ 9 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR Primer ที่จำเพาะต่อยีน 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก บน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 200 bp แถวที่ 7 เป็นตัวควบคุมลบโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ไม่พบแถบของผลผลิต

3.2 การหาลำดับเบสของผลผลิต PCR

นำ PCR product ที่เกิดขึ้นจากเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวก ด้วย PCR Primer และมาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing เพื่อยืนยันผล โดยวิเคราะห์ความเหมือนของส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16s rRNA จาก PCR product ที่ได้ทั้งหมด กับฐานข้อมูลในธนาคารยีนของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วย โปรแกรม BLAST พบว่า ทั้งหมดมีลำดับเบสคล้ายกับส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16s rRNA รายละเอียดดังนี้

- PCR product ที่เกิดขึ้นจากเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เมื่อมาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายกับส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16s rRNA ของเชื้อ *Staphylococcus spp.* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 99.33% และมีค่า E value เท่ากับ $3e-69$ (รูปที่ 10)
- PCR product ที่เกิดขึ้นจากเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. epidermidis* เมื่อมาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายกับส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16s rRNA ของเชื้อ *S. epidermidis* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 98.77% และมีค่า E value เท่ากับ $3e-74$ (รูปที่ 11)
- PCR product ที่เกิดขึ้นจากเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. cereus* เมื่อมาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายกับส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16s rRNA ของเชื้อ *Bacillus spp.* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 98.78% และมีค่า E value เท่ากับ $2e-75$ (รูปที่ 12)
- PCR product ที่เกิดขึ้นจากเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เมื่อมาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายกับส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรียไม่ทราบชื่อ (Uncultured bacterium) มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์

เท่ากับ 100% และมีค่า E value เท่ากับ $4e-78$ และมีลำดับเบสความคล้ายกับส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16s rRNA ของเชื้อ *E. coli* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 99.39% และมีค่า E value เท่ากับ $2e-76$ (รูปที่ 13)

- PCR product ที่เกิดขึ้นจากเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) เมื่อมาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายกับส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16s rRNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 98.77% และมีค่า E value เท่ากับ $3e-74$ (รูปที่ 14)

- PCR product ที่เกิดขึ้นจากเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. marcescens* เมื่อมาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายกับส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16s rRNA ของเชื้อ *Klebsiella spp.* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 96.36% และมีค่า E value เท่ากับ $6e-15$ และมีลำดับเบสความคล้ายกับส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16s rRNA ของเชื้อ *S. marcescens* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 96.30% และมีค่า E value เท่ากับ $2e-14$ (รูปที่ 15)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. SDT18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	272	272	94%	3e-69	99.33%	JX047449.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain X22 chromosome, complete genome	270	1600	99%	9e-69	97.50%	CP042650.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Staphylococcus sp. clone SPM9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	270	270	100%	9e-69	97.47%	MK779784.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain 13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	270	270	100%	9e-69	97.47%	MG162620.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain AB97 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	270	270	99%	9e-69	97.50%	KY438333.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain DH20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	270	270	100%	9e-69	97.47%	KX648542.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain MRI184 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	270	270	97%	9e-69	98.08%	JQ511373.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd2197f10c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	270	270	99%	9e-69	97.50%	JF191148.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd1852b05c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	270	270	99%	9e-69	97.50%	JF159168.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd1823h11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	270	270	99%	9e-69	97.50%	JF157353.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd1831e08c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	270	270	99%	9e-69	97.50%	JF143728.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone R4J7C4_F5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	270	270	99%	9e-69	97.50%	GQ468072.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone nck124e10c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	268	268	100%	3e-68	96.91%	KF089551.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium isolate DQGE gel band 028 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	268	268	95%	3e-68	98.68%	KC310441.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd2360e01c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	268	268	100%	3e-68	96.91%	JF199850.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd1939c12c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	268	268	100%	3e-68	96.91%	JF164035.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd1906a02c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	268	268	100%	3e-68	96.91%	JF164035.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd1482d09c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	268	268	100%	3e-68	96.91%	JF130315.1

รูปที่ 10 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) กับฐานข้อมูลใน

ธนาคารยีนของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Staphylococcus epidermidis strain DH20_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	289	289	99%	3e-74	98.77%	KX648542.1
✓	Staphylococcus epidermidis strain HD14_3in_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	287	287	96%	1e-73	99.37%	KX170749.1
✓	Staphylococcus sp. strain VH1_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	285	285	100%	4e-73	98.17%	MG680926.1
✓	Uncultured bacterium clone g3b24_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	285	285	98%	4e-73	98.17%	KF612701.1
✓	Uncultured bacterium clone g3b19_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	285	285	98%	4e-73	98.17%	KF612696.1
✓	Uncultured bacterium clone g3b12_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	285	285	98%	4e-73	98.17%	KF612694.1
✓	Marine bacterium SIMO-1580_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	285	285	98%	4e-73	98.17%	AY266424.1
✓	Staphylococcus epidermidis strain AS3_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	MK356385.1
✓	Staphylococcus sp. strain 42_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	1e-72	98.16%	MG162644.1
✓	Uncultured bacterium clone nck116a09c1_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	KF083287.1
✓	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: CAP1-55	283	283	100%	1e-72	97.60%	AB787715.1
✓	Uncultured bacterium clone ncd2648h01c1_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	JF230866.1
✓	Uncultured bacterium clone ncd2339e07c1_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	JF204818.1
✓	Uncultured bacterium clone ncd2038b08c1_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	JF176023.1
✓	Uncultured Staphylococcus sp. clone DH23_43_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	HM075342.1
✓	Uncultured Staphylococcus sp. clone DH07_46_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	HM074093.1
✓	Uncultured bacterium clone ncd1049c04c1_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	HM343695.1
✓	Uncultured bacterium clone ncd792e11c1_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	HM301395.1
✓	Uncultured bacterium clone nbw185c09c1_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	GQ071502.1
✓	Staphylococcus sp. SIB A20 (24)_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	DQ628968.1

รูปที่ 11 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *S. epidermidis* กับฐานข้อมูลในธนาคารยีนของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Bacillus sp. CC-CCM15-5_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	292	292	98%	2e-75	98.78%	EU689094.1
✓	Uncultured Bacillus sp. partial 16S rRNA gene, isolate DGGE band CH2	292	292	98%	2e-75	98.79%	AM749037.1
✓	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain HCV8_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	291	291	98%	8e-75	98.78%	MH628170.1
✓	Bacillus sp. strain MZB_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	291	291	99%	8e-75	98.20%	MF460451.1
✓	Bacillus sp. 72R2A17_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	291	291	98%	8e-75	98.77%	KX170709.1
✓	Bacillus cereus strain TH1-8_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	291	291	98%	8e-75	98.78%	HQ333012.1
✓	Bacillus sp. T5-12_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	291	291	98%	8e-75	98.78%	GU294129.1
✓	Bacillus thuringiensis strain Y4-36_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	291	291	99%	8e-75	98.20%	GU143905.1
✓	Bacillus sp. JZHS24_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	291	291	99%	8e-75	98.20%	DQ658965.1
✓	Bacillus sp. YACS15_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	291	291	99%	8e-75	98.20%	DQ658921.1
✓	Bacillus sp. YACN-9_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	291	291	98%	8e-75	98.78%	DQ649444.1
✓	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain WS121-9_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	289	289	97%	3e-74	98.77%	MH046762.1
✓	Bacillus sp. HD1ex_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	289	289	98%	3e-74	98.77%	KX170758.1
✓	Bacillus sp. 80R2A1_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	289	289	98%	3e-74	98.77%	KX170716.1
✓	Bacillus sp. JZDN22_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	289	289	98%	3e-74	98.19%	DQ659002.1
✓	Bacillus mycoides strain AC2_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	287	287	98%	1e-73	98.18%	MK323068.1
✓	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band B14_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	287	287	98%	1e-73	98.18%	MF581031.1
✓	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain WS83-14_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	287	287	98%	1e-73	98.18%	MH046763.1
✓	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: 16S-MF-0d52	287	287	95%	1e-73	99.37%	LC207092.1
✓	Bacillus weihenstephanensis strain I2_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	287	287	98%	1e-73	98.18%	KT027582.1

รูปที่ 12 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *B. cereus* กับฐานข้อมูลในธนาคารยีนของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium isolate DGGE gel band W1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	302	302	98%	4e-78	100.00%	KC991221.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium isolate DGGE gel band A8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	300	300	97%	1e-77	100.00%	KC991210.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Escherichia sp. partial 16S gene, isolate DGGE band N5	300	300	97%	1e-77	100.00%	AM748793.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Enterobacteriaceae bacterium clone DJ40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	298	298	96%	5e-77	100.00%	MH375503.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Escherichia sp. clone K53-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	298	298	96%	5e-77	100.00%	KJ767754.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium isolate DGGE gel band A2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	298	298	96%	5e-77	100.00%	KC991204.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	298	298	96%	5e-77	100.00%	GQ153955.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Enterobacteriaceae bacterium clone DJ28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	296	296	96%	2e-76	100.00%	MH375492.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain G388-aco-37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	296	296	98%	2e-76	99.39%	KY962911.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Enterobacteriaceae bacterium partial 16S rRNA gene, isolate 18N_23158	296	296	96%	2e-76	100.00%	LT697740.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium isolate DGGE gel band N5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	296	296	98%	2e-76	99.39%	KC991229.1
<input checked="" type="checkbox"/> Marine bacterium HB-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	296	296	96%	2e-76	100.00%	HM100750.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Escherichia sp. clone 69 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	294	294	97%	6e-76	99.39%	JQ013059.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0115-T286-S-NI_000238 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	294	294	97%	6e-76	99.39%	HQ789133.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 2009050504 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	294	294	95%	6e-76	100.00%	GQ202684.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Enterobacteriaceae bacterium clone DJ20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	292	292	96%	2e-75	99.38%	MH375484.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterobacteriaceae bacterium strain Aber_3E_4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	292	292	96%	2e-75	99.38%	KY922755.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterobacteriaceae bacterium strain Aber_2E_17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	292	292	96%	2e-75	99.38%	KY922753.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli partial 16S rRNA gene, strain C75	292	292	98%	2e-75	98.79%	LN554943.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium isolate DGGE gel band M3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	292	292	96%	2e-75	99.38%	KC991230.1

รูปที่ 13 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *E. coli* (ATCC25922) กับฐานข้อมูลในธนาคารยีนของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: MF105	289	289	98%	3e-74	98.77%	LC066145.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium isolate DGGE gel band DN4-1.6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	289	289	100%	3e-74	98.19%	HQ335373.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain Rk64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	287	287	98%	1e-73	98.77%	KP222546.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: MF106	285	285	98%	4e-73	98.17%	LC066146.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa partial 16S rRNA gene, strain 80	285	285	100%	4e-73	97.59%	LN554944.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain ODB 61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	285	285	100%	4e-73	97.59%	KJ187766.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. strain 10xw2-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	96%	1e-72	98.75%	MH470396.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain PA-BAT3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	MH118953.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Pseudomonas sp. isolate DGGE gel band B-50-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	95%	1e-72	99.36%	KY927421.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. P60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	EU852407.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 2F07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	AY537765.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 2D06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	AY537747.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 1G06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	AY537713.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 1F08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	AY537707.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 1F06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	AY537705.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 1B05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	100%	1e-72	97.60%	AY537674.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain RBAC DOB-S44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	281	281	97%	5e-72	98.15%	MF152609.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Pseudomonas sp. isolate DGGE gel band 20-b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	281	281	94%	5e-72	99.35%	KY927417.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured freshwater bacterium clone ADW5-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	281	281	99%	5e-72	97.59%	HQ730527.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured freshwater bacterium clone ADW2-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	281	281	99%	5e-72	97.59%	HQ730504.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 1E07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	281	281	97%	5e-72	98.15%	AY537699.1

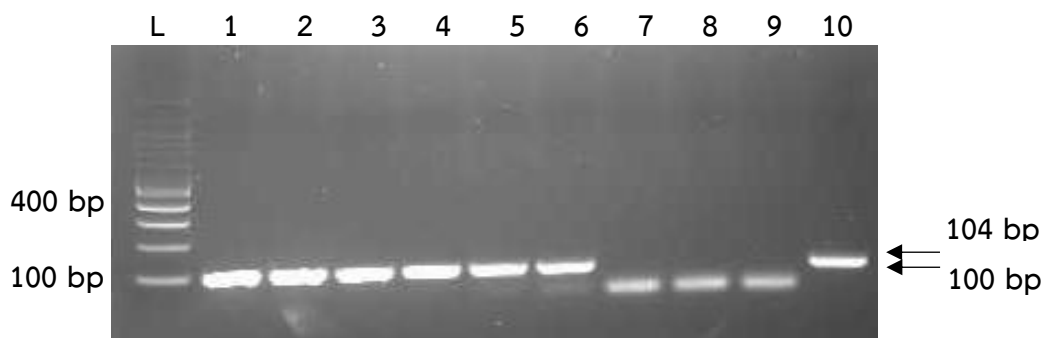
รูปที่ 14 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) กับฐานข้อมูลในธนาคารยีนของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Klebsiella sp. clone M01598_122_000000000-ADV8A_1_1104_25592_7590 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89.8	89.8	89%	6e-15	96.36%	KT301181.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Klebsiella sp. clone M01598_122_000000000-ADV8A_1_1102_6967_21877 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89.8	89.8	89%	6e-15	96.36%	KT297645.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae strain CECRI-IOC13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89.8	89.8	100%	6e-15	93.44%	HM756466.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone OKHOTSK-Bac-B21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89.8	89.8	86%	6e-15	98.04%	GQ201967.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OLDC-A3	89.8	89.8	89%	6e-15	96.36%	AB099803.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae strain MSK73 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	MK850131.1
<input checked="" type="checkbox"/> Serratia marcescens strain S115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	MH497629.1
<input checked="" type="checkbox"/> Serratia marcescens strain S114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	MH497627.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae strain S109 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	MH497599.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae strain S108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	MH497596.1
<input checked="" type="checkbox"/> Serratia sp. strain 011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	MH430593.1
<input checked="" type="checkbox"/> Serratia sp. strain 001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	MH430582.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella sp. strain 021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	MH430219.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella sp. strain 011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	MH430184.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella sp. strain 002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	MH430183.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudoalteromonas shioyasakiensis strain NIOSSD026343 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	MH255010.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Enterobacteriaceae bacterium clone DJ12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	84%	2e-14	98.00%	MH236258.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudoalteromonas sp. strain JL3512 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	84%	2e-14	98.00%	KX989066.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio sp. strain JI.3507 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.23%	KX989062.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae strain H1064 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87.9	87.9	89%	2e-14	96.30%	KY711150.1

รูปที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *S. marcescens* กับฐานข้อมูลในธนาคารยีนของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST

4. การพัฒนาเทคนิค Helicase dependent amplification ควบคู่กับการอ่านผลด้วยสี SYBR Green I (HDA/SYBR Green I) สำหรับตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

ประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของ HDA Primer โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา HDA โดยใช้ HDA Primer ที่ถูกออกแบบให้จำเพาะต่อส่วนบริเวณอนุรักษ์ (Conserved region) ของยีน 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกจำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบร่วมกับใช้ Primer และ DNA ตัวควบคุมบวกของชุดน้ำยา HDA ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp พบแถบ DNA ของยีน 16s rRNA ขนาด 104 bp และ 100 bp ซึ่งเป็นขนาดของ DNA ตัวควบคุมบวกของชุดน้ำยา ดังตัวอย่างแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก บน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ควบคุมบวก ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* ตามลำดับ พบแถบ ของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและ สารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 9 ตัวควบคุมลบของ Primer ของชุดน้ำยา HDA โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 10 DNA ตัวควบคุมบวกของกับ Primer ของชุดน้ำยา HDA ตามลำดับ พบแถบของผลผลิต ขนาด 100 bp

การศึกษาค้นคว้านี้ได้พัฒนาเทคนิค HDA/SYBR Green I ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ที่อุณหภูมิเดียวครั้งที่โดยใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวน 6 สายพันธุ์ ที่สกัด ได้จากในข้อ 3.3 ในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย เพื่อใช้เป็นตัวแทน DNA ในการพัฒนา และใช้ HDA primer ซึ่งจำเพาะกับยีน 16S rRNA ที่ออกแบบได้ในข้อ 3.4 ในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ร่วมกับการ ตรวจสอบผลผลิต HDA ด้วยการเติมสี SYBR Green I ซึ่งสามารถอ่านผลที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า ทันทีโดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย หากสารละลายเป็นสีเขียว หมายถึง ปฏิกิริยา HDA เป็นบวกเนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หากสารละลายเป็นสีส้ม หมายถึง ปฏิกิริยา HDA เป็นลบเนื่องจาก ไม่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หากสารละลายเป็นสีก้ำกึ่งระหว่างสีเขียว กับสีส้มซึ่งไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นสีใด ให้แปลผลปฏิกิริยา HDA เป็นลบ เปรียบเทียบกับการ ตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower

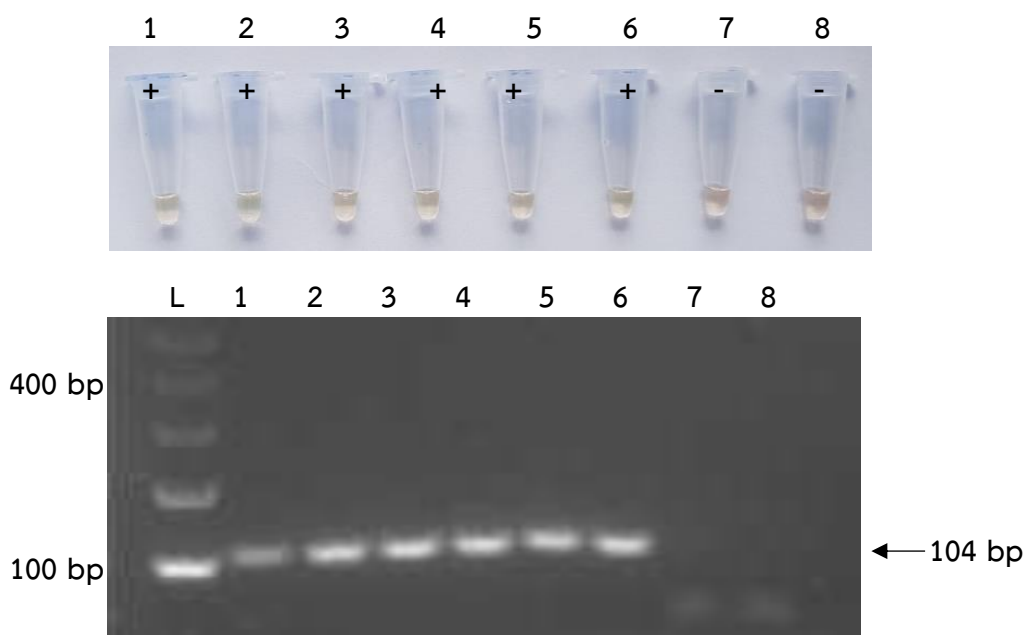
DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า โดยขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาเรียงตามลำดับ ดังนี้ ความเข้มข้นของ Primer ความเข้มข้นของ DNA ความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ความเข้มข้นของ NaCl อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และความเข้มข้นของสี SYBR Green I ตามรายละเอียดที่อธิบายในข้อ 3.6 ของบทวิธีดำเนินงานวิจัย

4.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Primer

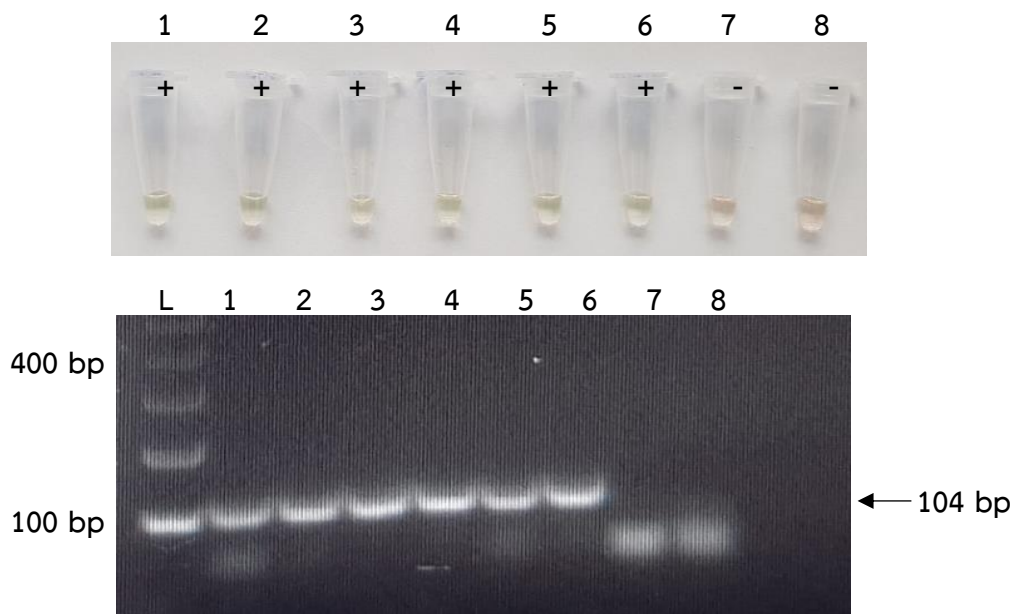
ทดสอบปฏิกิริยาของ HDA โดยใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ปริมาณ 10 ng กับ Primer ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 50, 100, 150 และ 200 nmol ป่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผลการตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X และเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp มีดังนี้

- Primer ความเข้มข้น 50 nmol (รูปที่ 17)
- Primer ความเข้มข้น 100 nmol (รูปที่ 18)
- Primer ความเข้มข้น 150 nmol (รูปที่ 19)
- Primer ความเข้มข้น 200 nmol (รูปที่ 20)

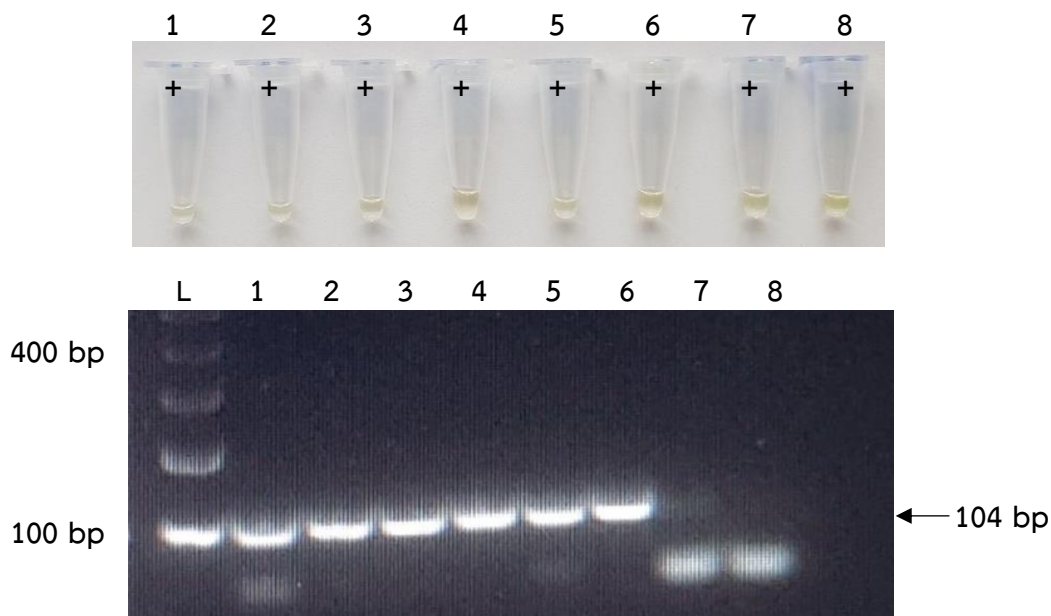
พบว่า Primer ความเข้มข้น 100 nmol ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์



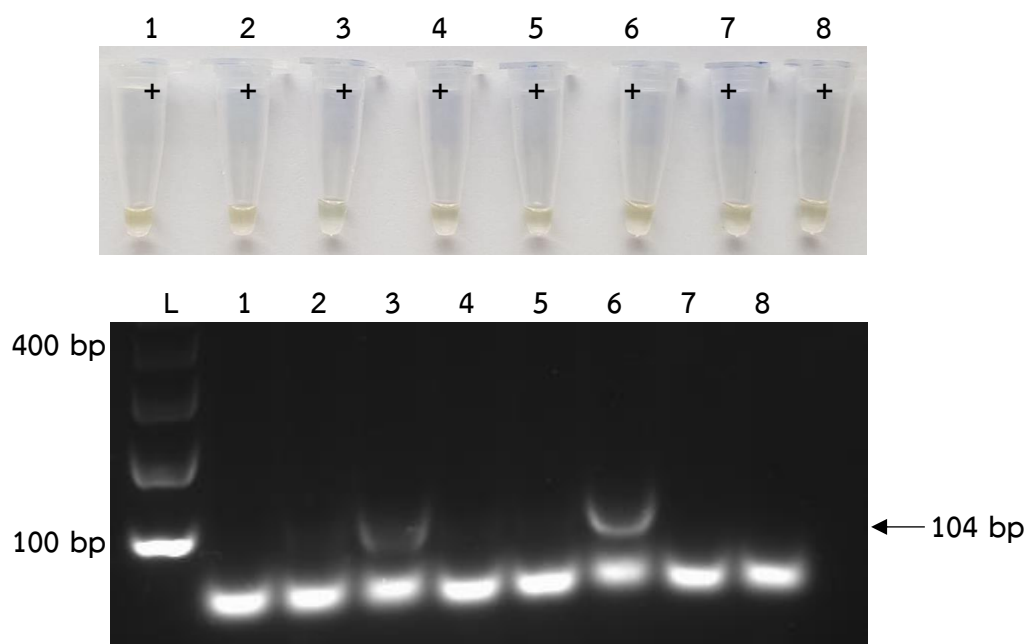
รูปที่ 17 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย Primer ความเข้มข้น 50 nmol ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 18 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย Primer ความเข้มข้น 100 nmol ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็น ตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 19 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย Primer ความเข้มข้น 150 nmol ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



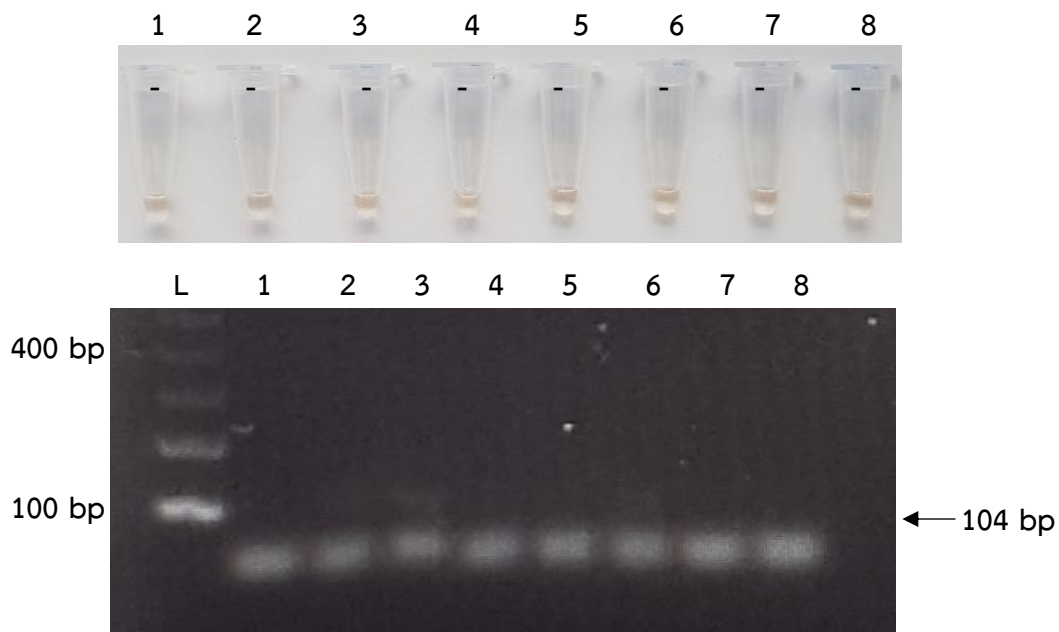
รูปที่ 20 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย Primer ความเข้มข้น 200 nmol ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บन) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลहितที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ โดยแถวที่ 1 2 4 และ 5 ไม่พบแถบของผลผลิต แต่แถวที่ 3 และ 6 พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่น ปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลहितที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบ ของผลผลิต

4.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

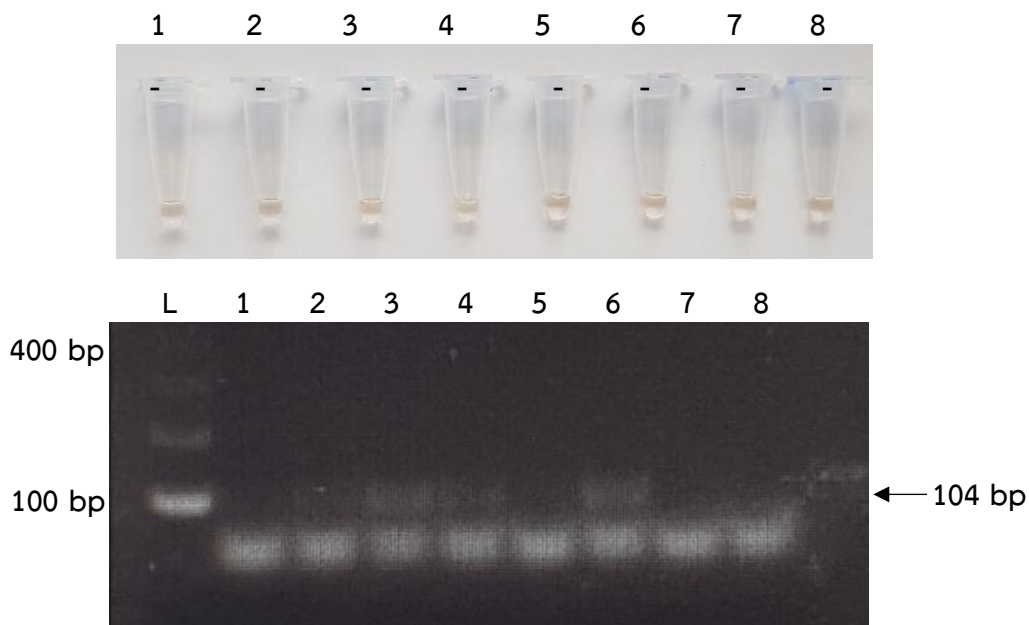
เจือจาง DNA ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 5, 10, 15 และ 20 ng นำมาทำปฏิกิริยา HDA โดยใช้ Primer ความเข้มข้น 100 nmol บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผลการตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X และเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp มีดังนี้

- DNA ความเข้มข้น 1 ng (รูปที่ 21)
- DNA ความเข้มข้น 5 ng (รูปที่ 22)
- DNA ความเข้มข้น 10 ng (รูปที่ 23)
- DNA ความเข้มข้น 15 ng (รูปที่ 24)
- DNA ความเข้มข้น 20 ng (รูปที่ 25)

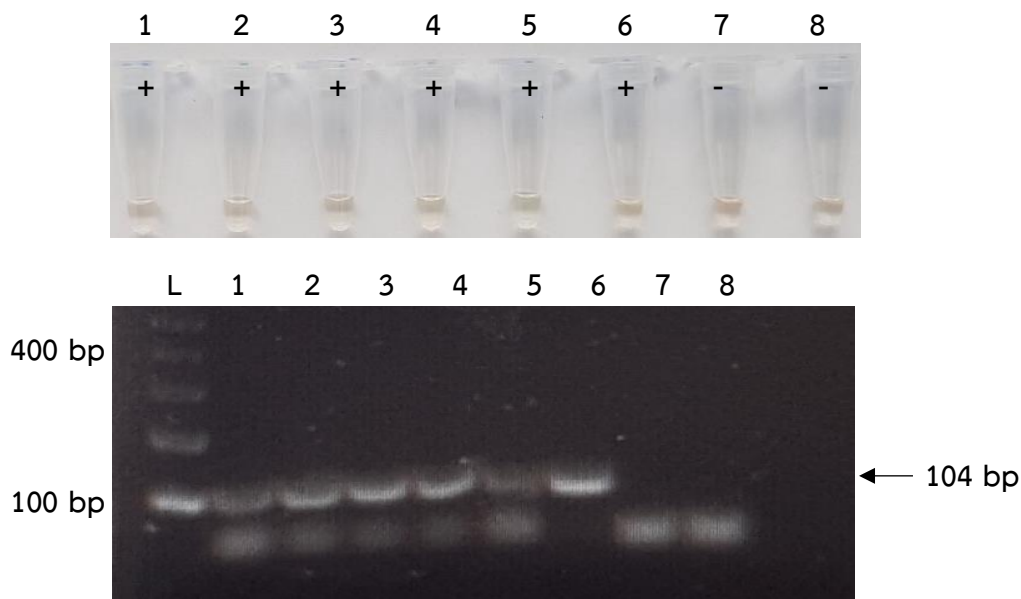
พบว่า DNA ความเข้มข้น 20 ng ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์



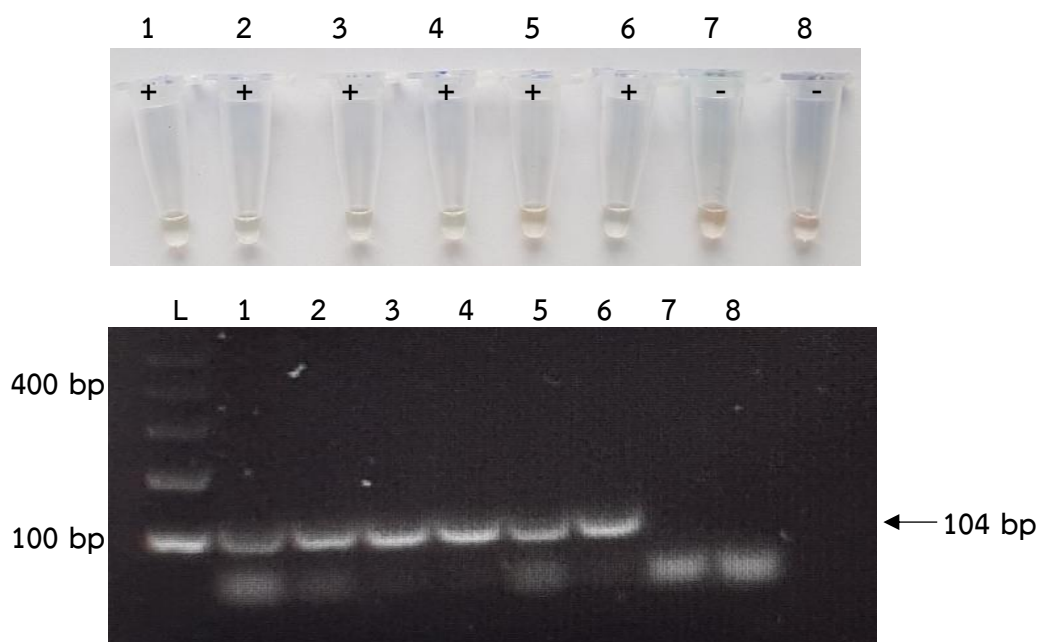
รูปที่ 21 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย DNA ความเข้มข้น 1 ng ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิกิริยาแต่ละแถวให้ผลลบ โดยไม่พบแถบของผลผลิต



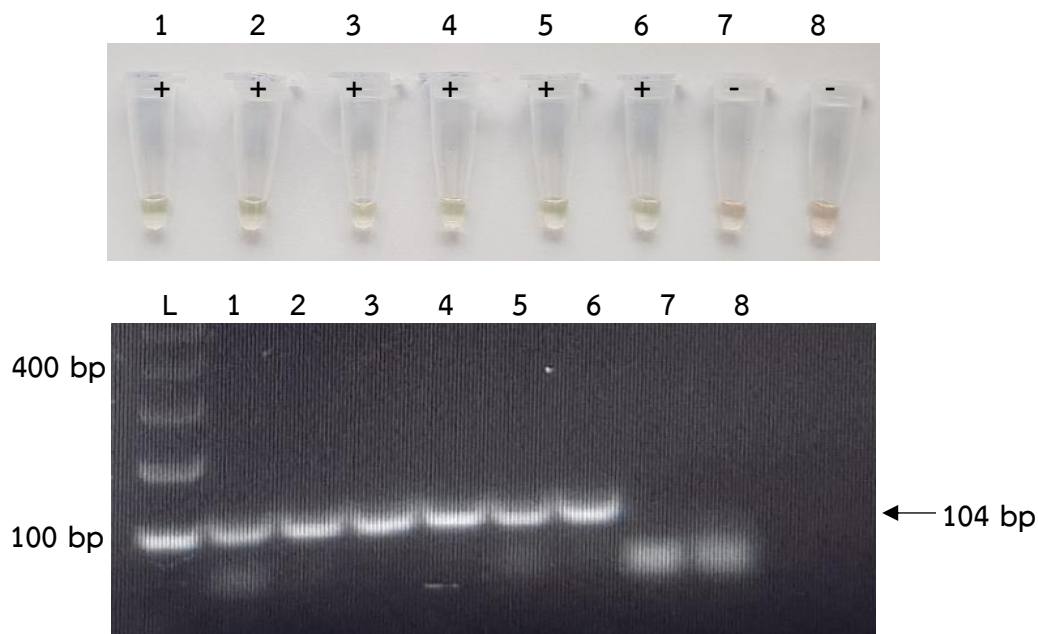
รูปที่ 22 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย DNA ความเข้มข้น 5 ng ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 23 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย DNA ความเข้มข้น 10 ng ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 24 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย DNA ความเข้มข้น 15 ng ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บन) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ฤงผลิตรภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็น ตัวควบคุมลบ โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ฤงผลิตรภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 25 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย DNA ความเข้มข้น 20 ng ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต

4.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

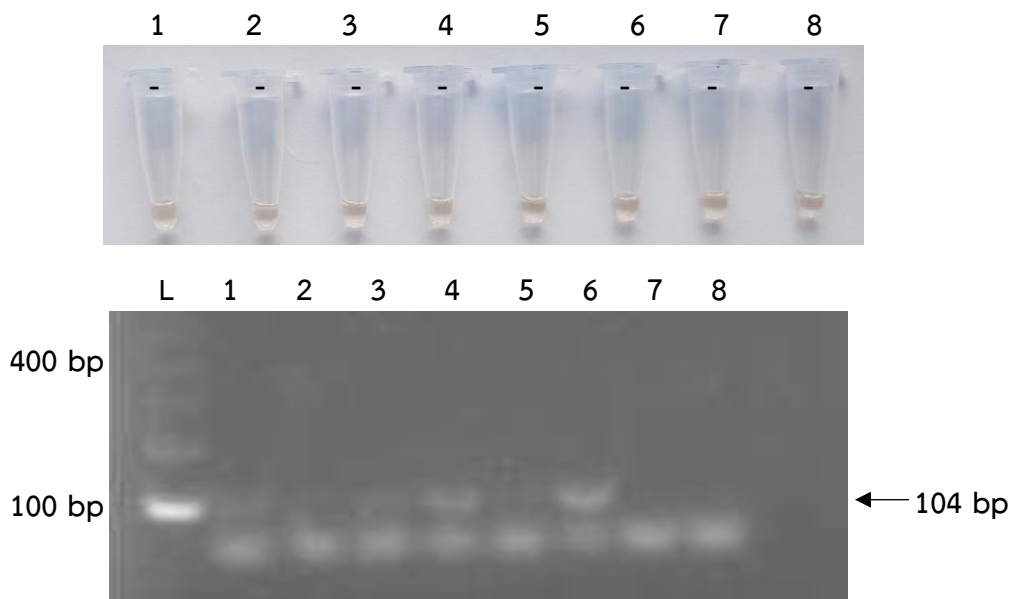
ทดสอบปฏิกิริยา HDA โดยใช้ Primer ความเข้มข้น 100 nmol และ DNA 20 ng กับ $MgSO_4$ ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 3, 3.5, 4, และ 4.5 mM นำมาทำปฏิกิริยา HDA บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์ เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผลการตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X และเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp มีดังนี้

- $MgSO_4$ ความเข้มข้น 3 mM (รูปที่ 26)
- $MgSO_4$ ความเข้มข้น 3.5 mM (รูปที่ 27)
- $MgSO_4$ ความเข้มข้น 4 mM (รูปที่ 28)
- $MgSO_4$ ความเข้มข้น 4.5 mM (รูปที่ 29)

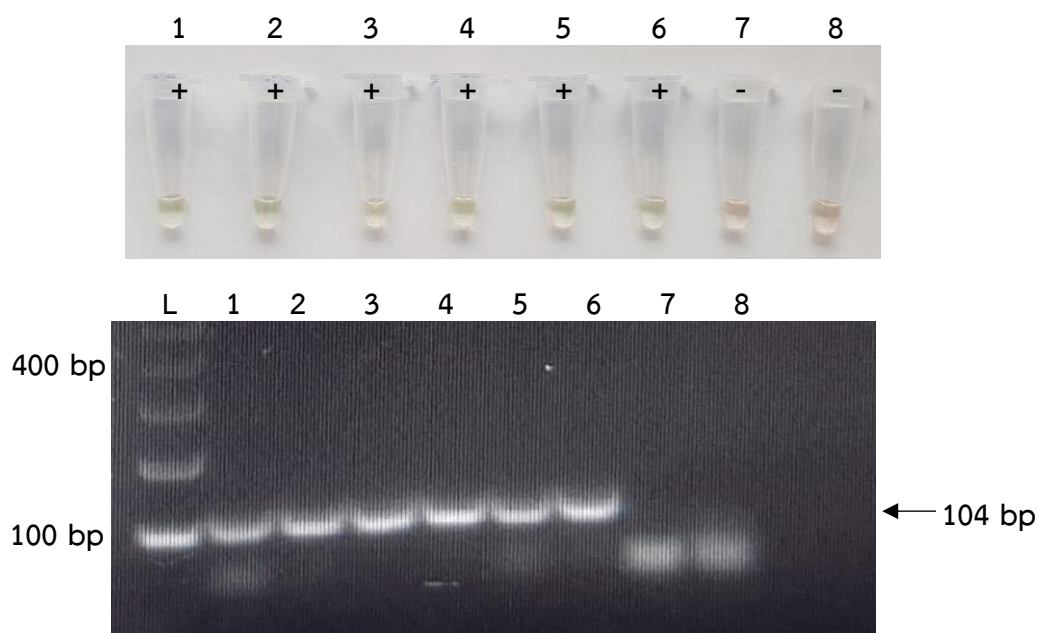
พบว่า $MgSO_4$ ความเข้มข้น 4 mM ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์



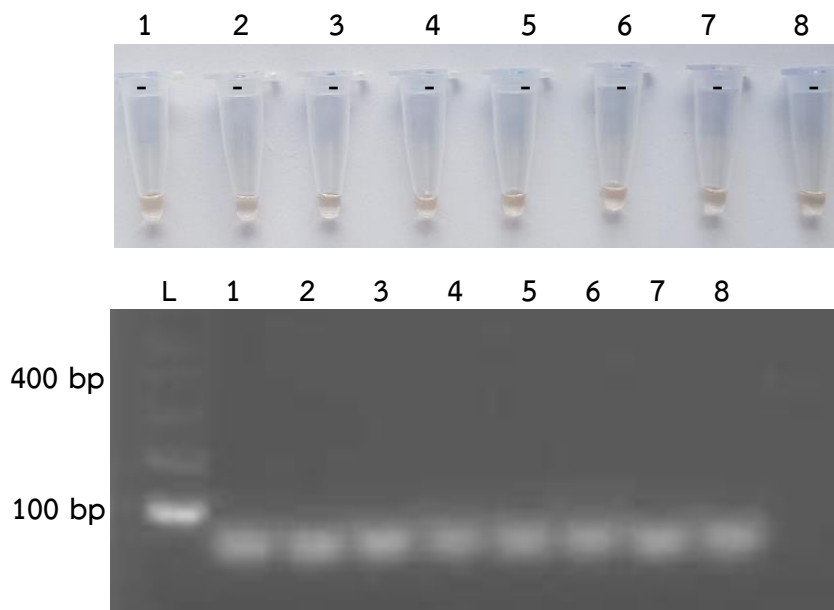
รูปที่ 26 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย $MgSO_4$ ความเข้มข้น 3 mM ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิกิริยาแต่ละแถวให้ผลลบ โดยไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 27 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย $MgSO_4$ ความเข้มข้น 3.5 mM ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 28 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย $MgSO_4$ ความเข้มข้น 4 mM ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



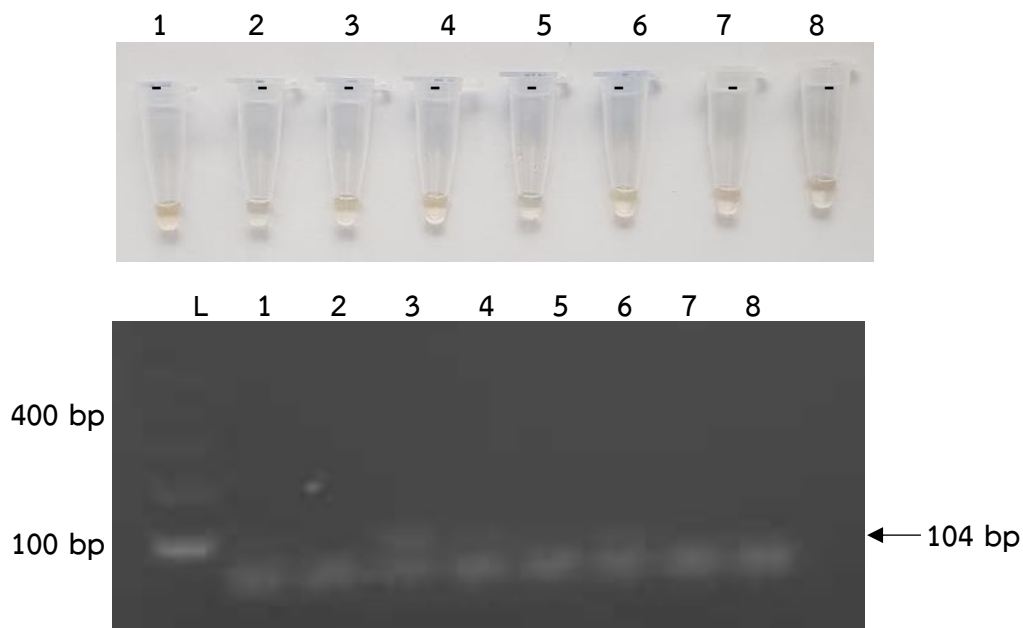
รูปที่ 29 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย $MgSO_4$ ความเข้มข้น 4.5 mM ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิกิริยาแต่ละแถวให้ผลลบ โดยไม่พบแถบของผลผลิต

4.4 การทดสอบหาความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

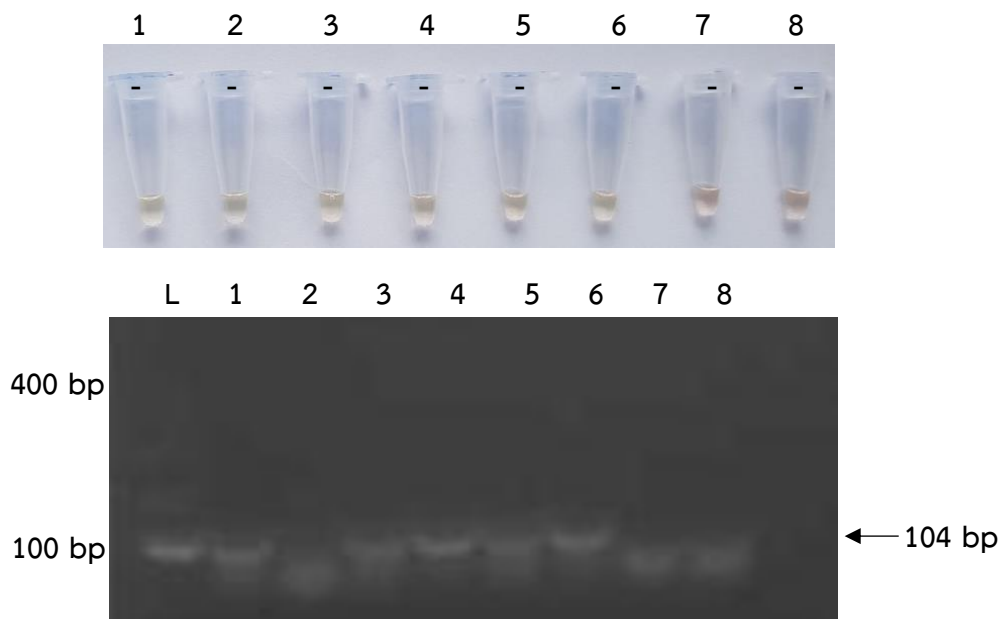
ทดสอบปฏิกิริยา HDA โดยใช้ Primer ความเข้มข้นของ 100 nmol DNA 20 ng และ $MgSO_4$ 4 mM กับ NaCl ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 20, 30, 40 และ 50 mM นำมาทำปฏิกิริยา HDA บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผลการตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X และเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp มีดังนี้

- NaCl ความเข้มข้น 20 mM (รูปที่ 30)
- NaCl ความเข้มข้น 30 mM (รูปที่ 31)
- NaCl ความเข้มข้น 40 mM (รูปที่ 32)
- NaCl ความเข้มข้น 50 mM (รูปที่ 33)

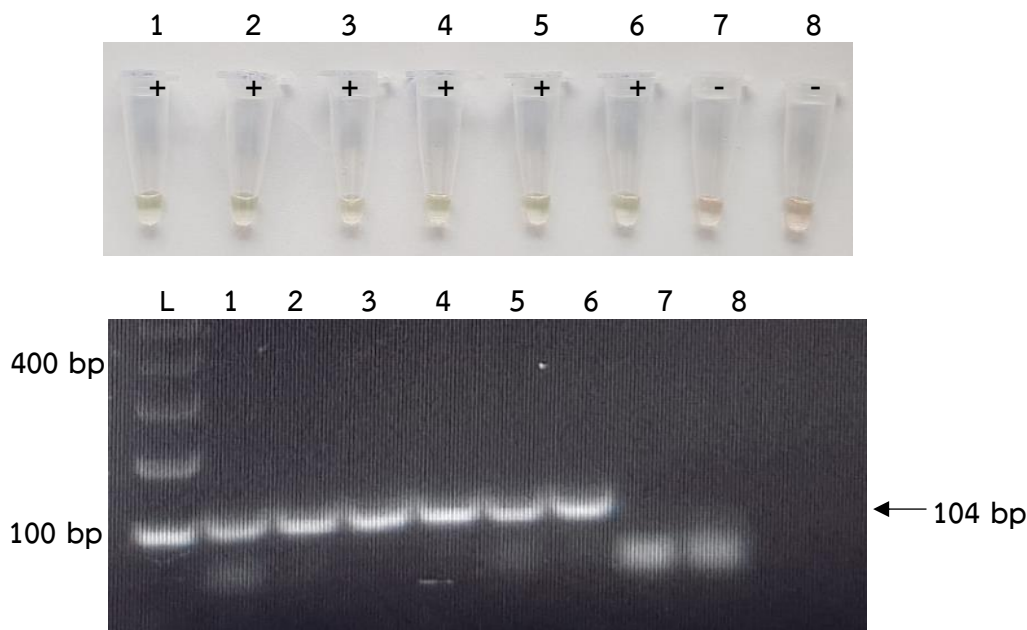
พบว่า NaCl ความเข้มข้น 40 mM ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์



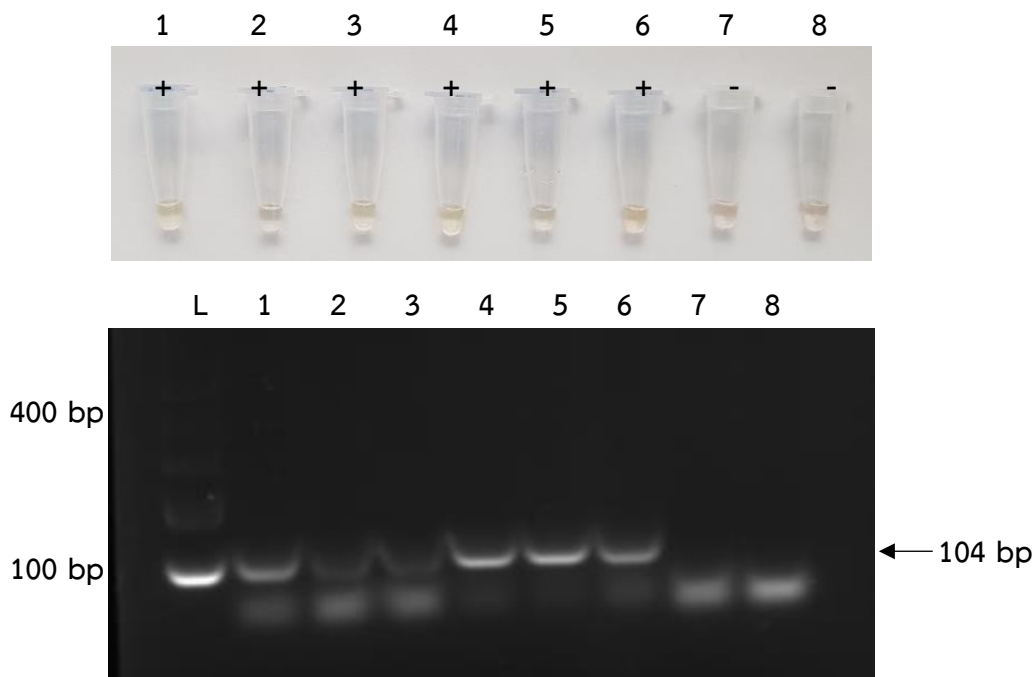
รูปที่ 30 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย NaCl ความเข้มข้น 20 mM ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลาย เป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิกิริยาแต่ละแถวให้ผลลบ โดยไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 31 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย NaCl ความเข้มข้น 30 mM ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถังผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็น ตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถังผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 32 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย NaCl ความเข้มข้น 40 mM ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



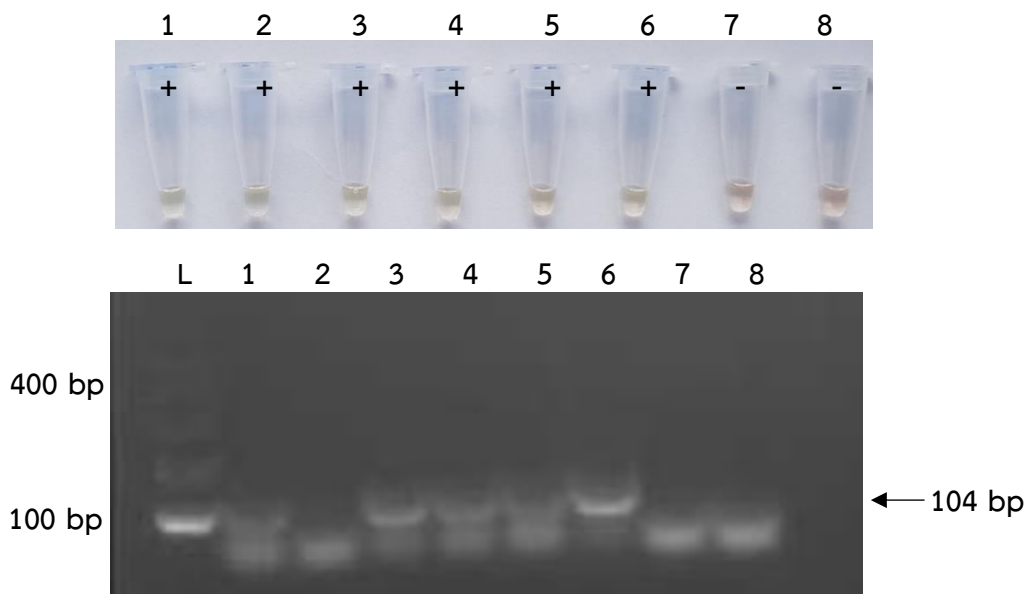
รูปที่ 33 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย NaCl ความเข้มข้น 50 mM ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลาย เป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็น ตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต

4.5 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

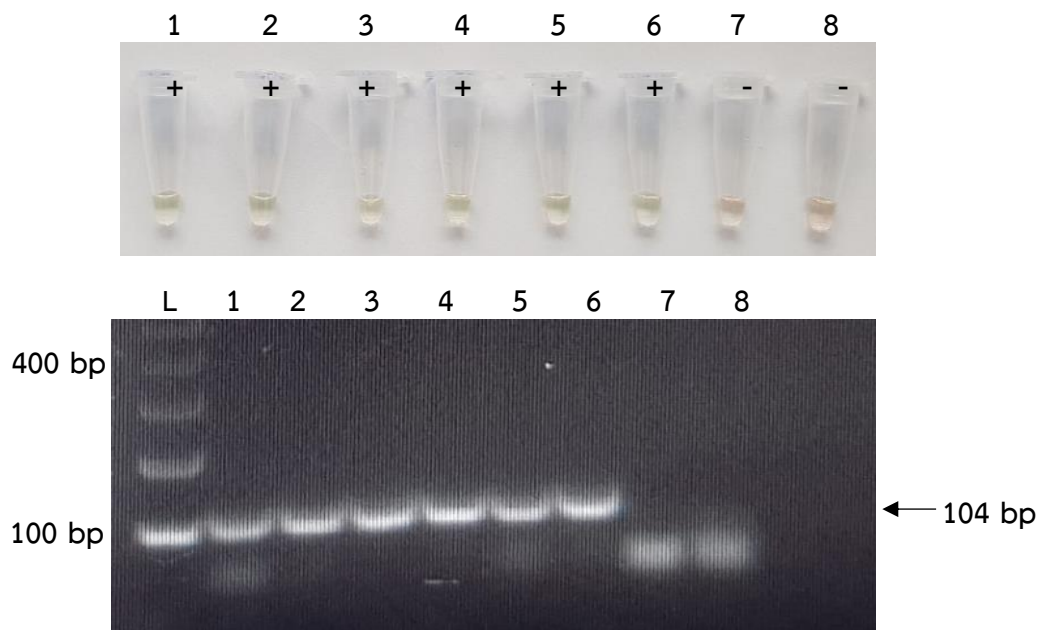
ทดสอบปฏิกิริยา HDA โดยใช้ Primer ความเข้มข้น 100 nmol DNA 20 ng MgSO₄ 4 mM และ NaCl 40 mM บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 63, 65, 67 และ 69 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยา HDA ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตน้ำยา เป็นเวลา 90 นาที ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผลการตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X และเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp มีดังนี้

- อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส (รูปที่ 34)
- อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (รูปที่ 35)
- อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส (รูปที่ 36)
- อุณหภูมิ 69 องศาเซลเซียส (รูปที่ 37)

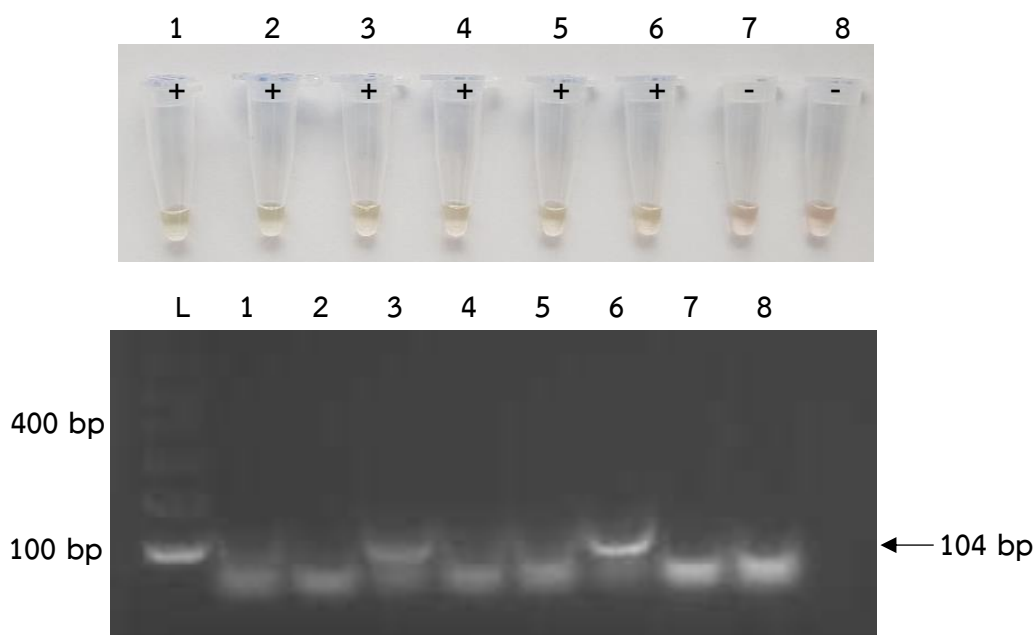
พบว่า ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์



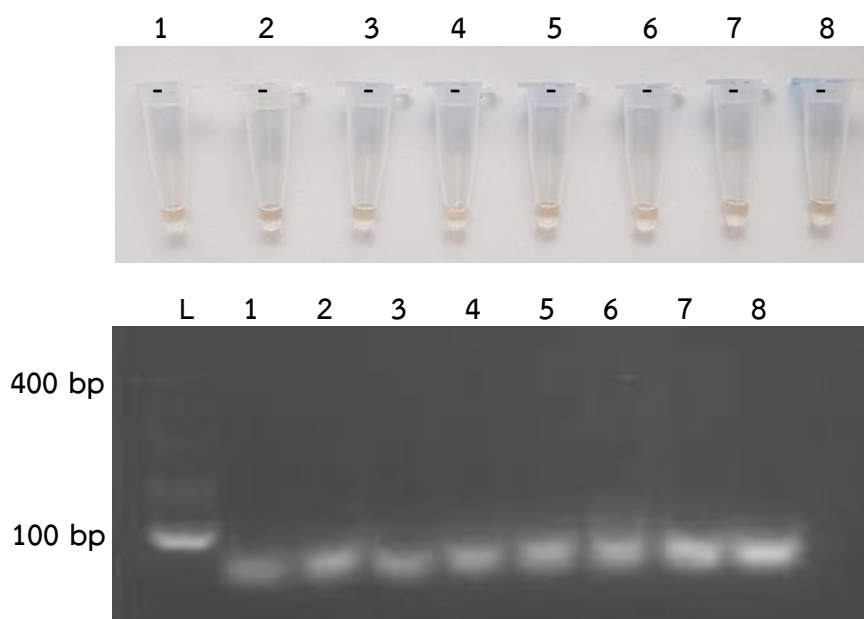
รูปที่ 34 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลาย เป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็น ตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 35 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลาย เป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็น ตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 36 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลาย เป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็น ตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถูงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



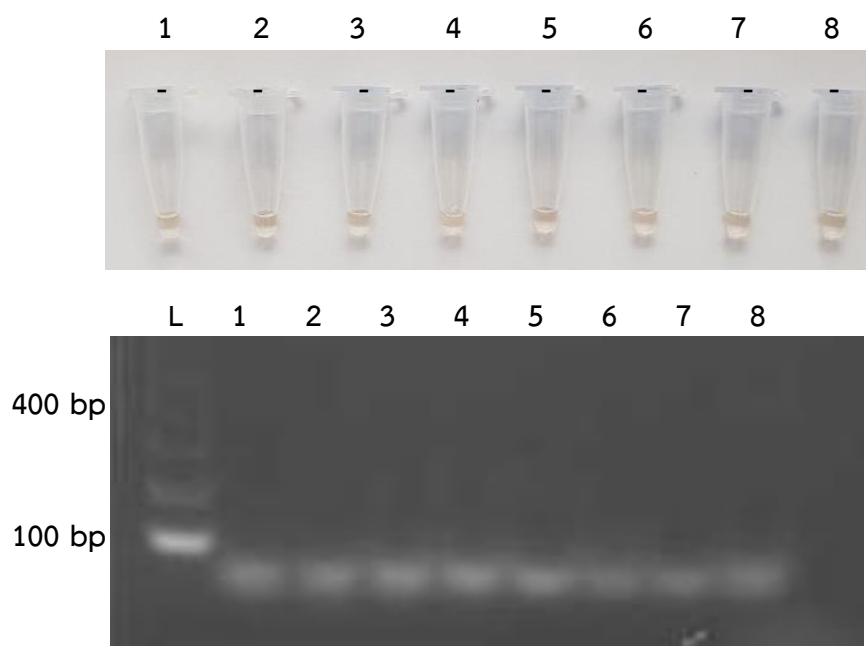
รูปที่ 37 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย อุณหภูมิ 69 องศาเซลเซียส ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลาย เป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก ถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสารละลายจากถูผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิกิริยาแต่ละแถวให้ผลลบ โดยไม่พบแถบของผลผลิต

4.6 การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

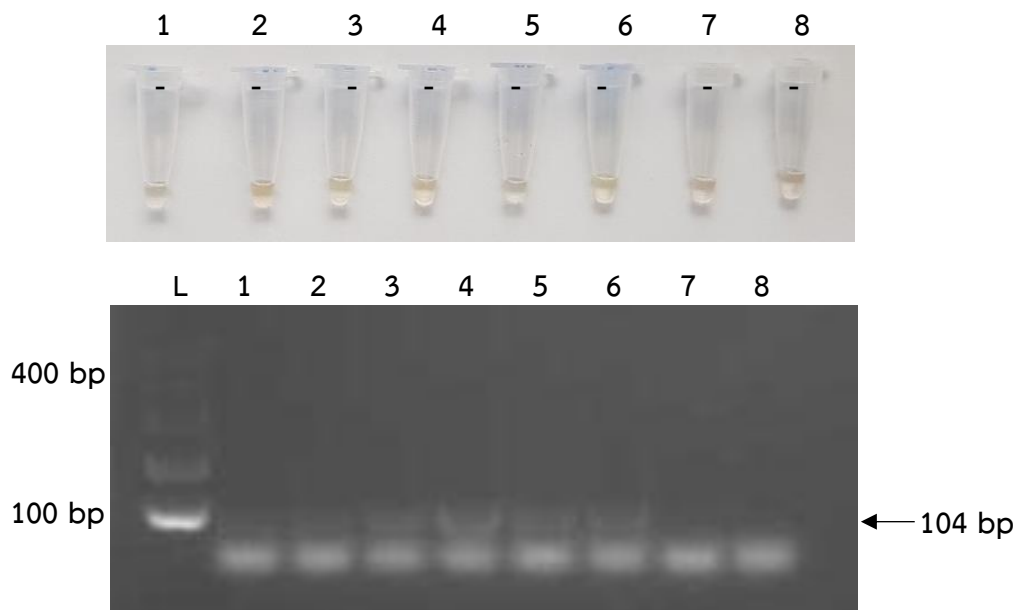
ทดสอบปฏิกิริยา HDA โดยใช้ Primer ความเข้มข้น 100 nmol DNA 20 ng MgSO₄ 4 mM และ NaCl 40 mM นำมาทำปฏิกิริยา HDA บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้ 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์ เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผลการตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X และเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp มีดังนี้

- ระยะเวลา 15 นาที (รูปที่ 38)
- ระยะเวลา 30 นาที (รูปที่ 39)
- ระยะเวลา 45 นาที (รูปที่ 40)
- ระยะเวลา 60 นาที (รูปที่ 41)
- ระยะเวลา 75 นาที (รูปที่ 42)
- ระยะเวลา 90 นาที (รูปที่ 43)

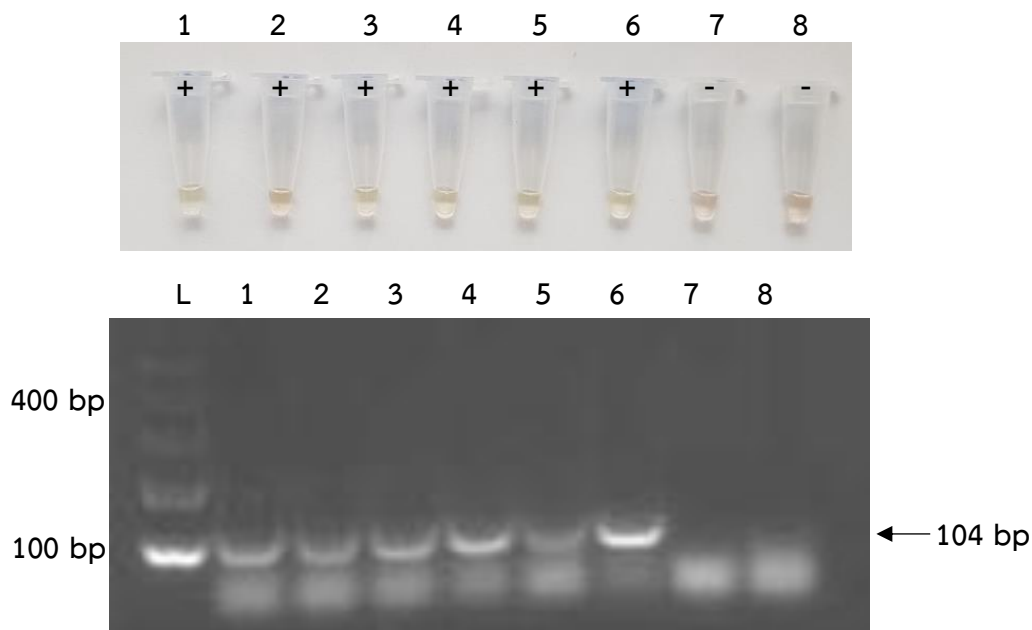
พบว่า ที่ระยะเวลา 60 นาที ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์



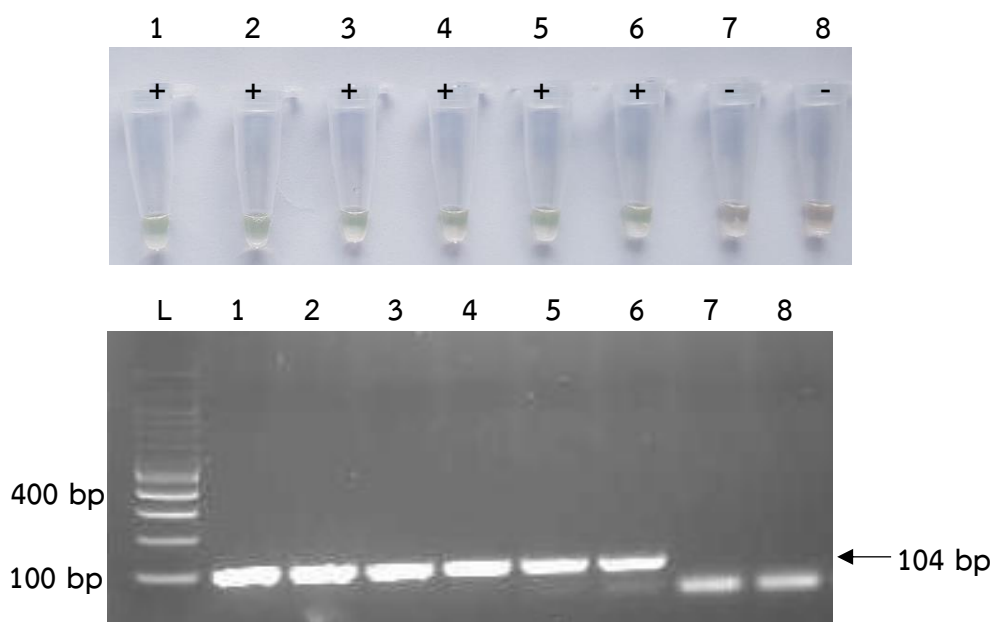
รูปที่ 38 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยระยะเวลา 15 นาที ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิกิริยาแต่ละแถวให้ผลลบ โดยไม่พบแถบของผลผลิต



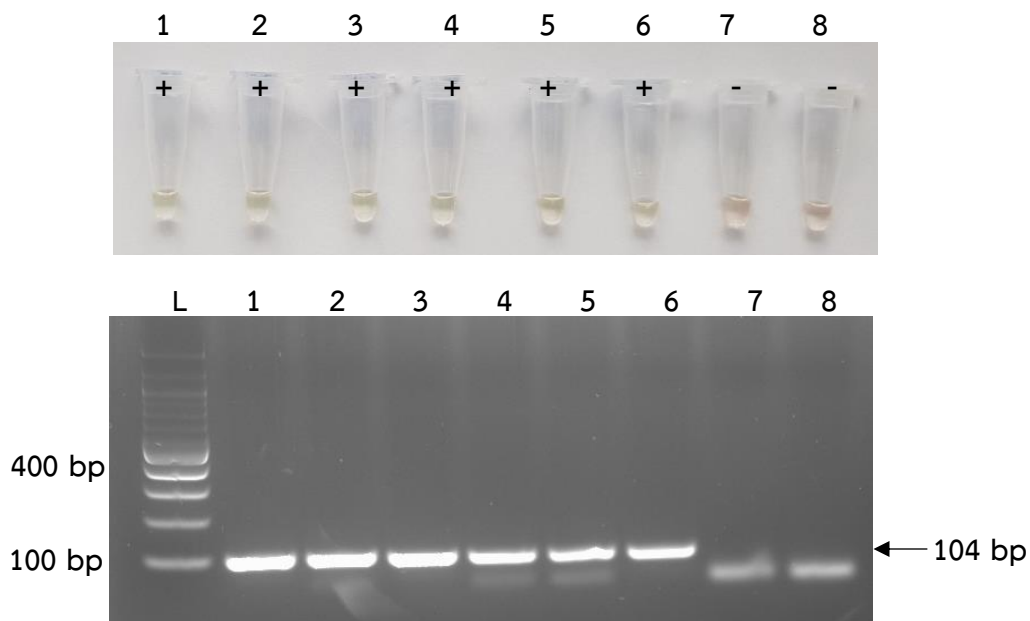
รูปที่ 39 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยระยะเวลา 30 นาที ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



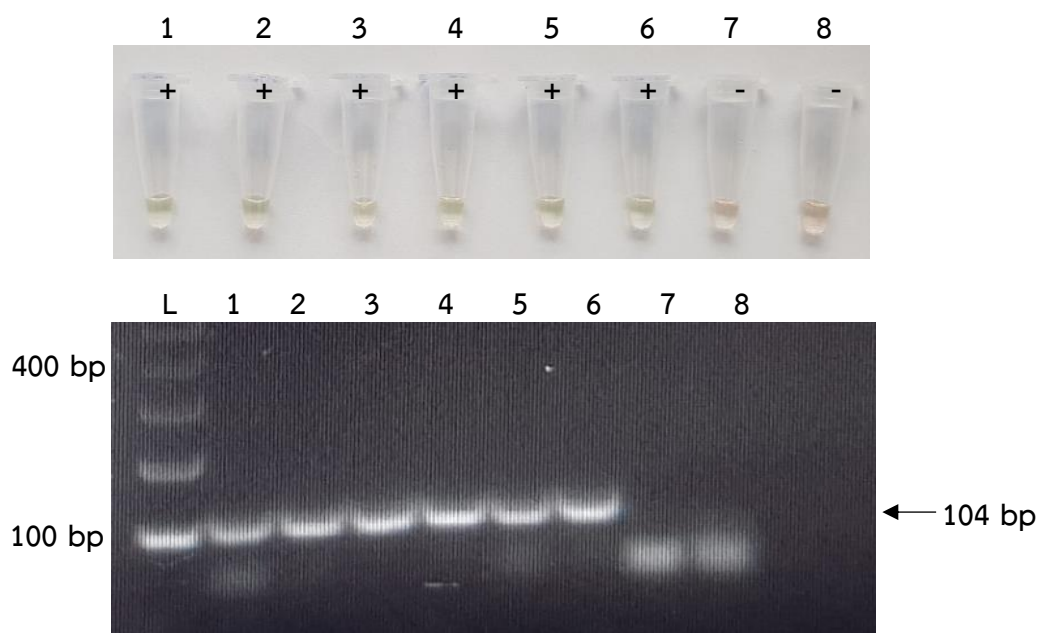
รูปที่ 40 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยระยะเวลา 45 นาที ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 41 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยระยะเวลา 60 นาที ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 42 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยระยะเวลา 75 นาที ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บन) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



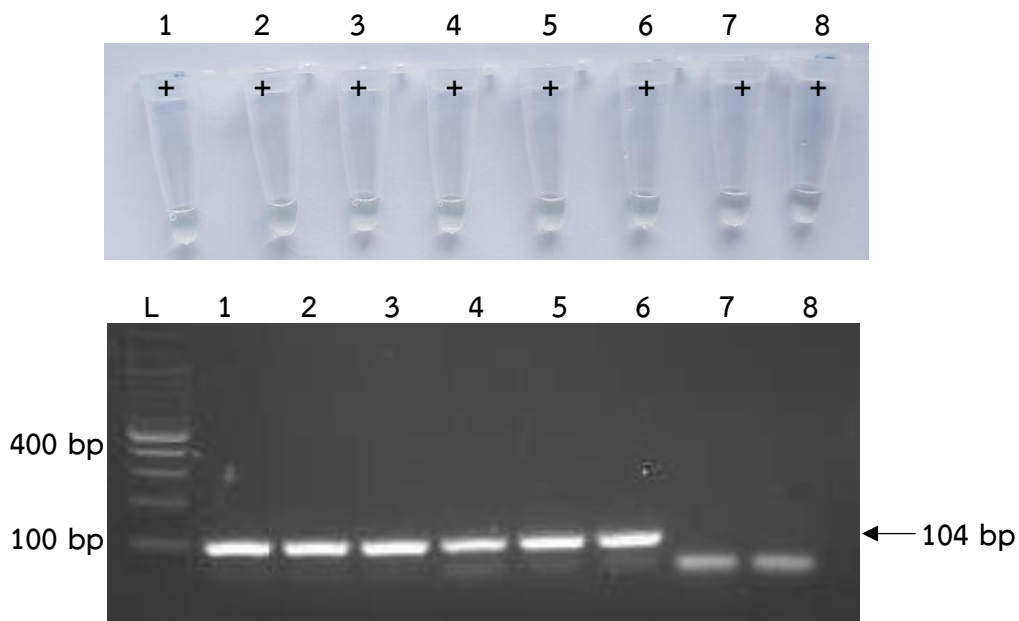
รูปที่ 43 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยระยะเวลา 90 นาที ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต

4.7 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี SYBR Green I

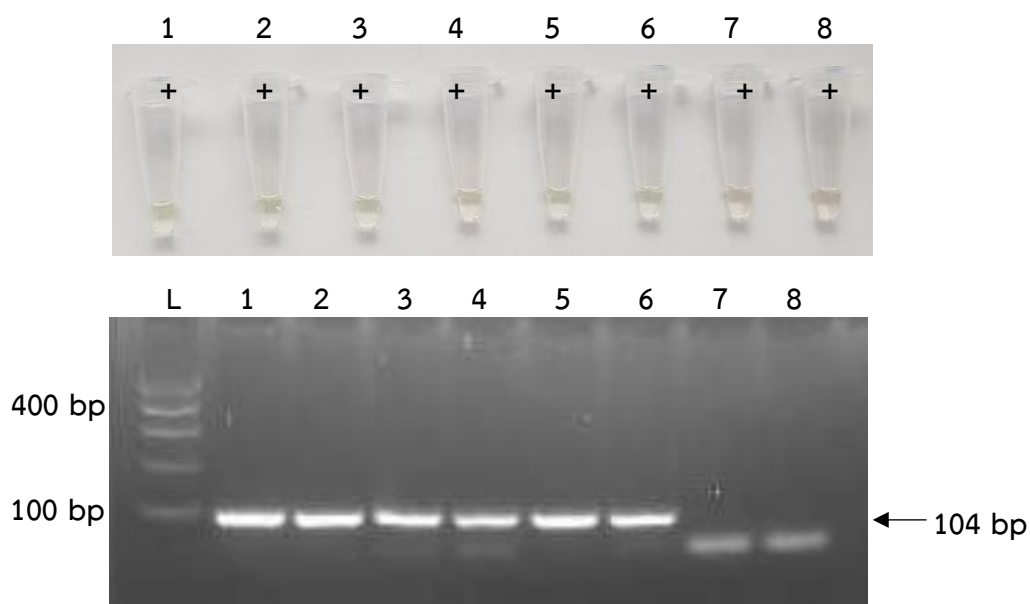
ทดสอบปฏิกิริยา HDA โดยใช้ Primer ความเข้มข้น 100 nmol DNA 20 ng MgSO₄ 4 mM และ NaCl 40 mM นำมาทำปฏิกิริยา HDA บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกสต์โลทิตที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 100X, 200X, 300X, 400X และ 500X เทียบกับเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp มีดังนี้

- สี SYBR Green I ความเข้มข้น 100X (รูปที่ 44)
- สี SYBR Green I ความเข้มข้น 200X (รูปที่ 45)
- สี SYBR Green I ความเข้มข้น 300X (รูปที่ 46)
- สี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X (รูปที่ 47)
- สี SYBR Green I ความเข้มข้น 500X (รูปที่ 48)

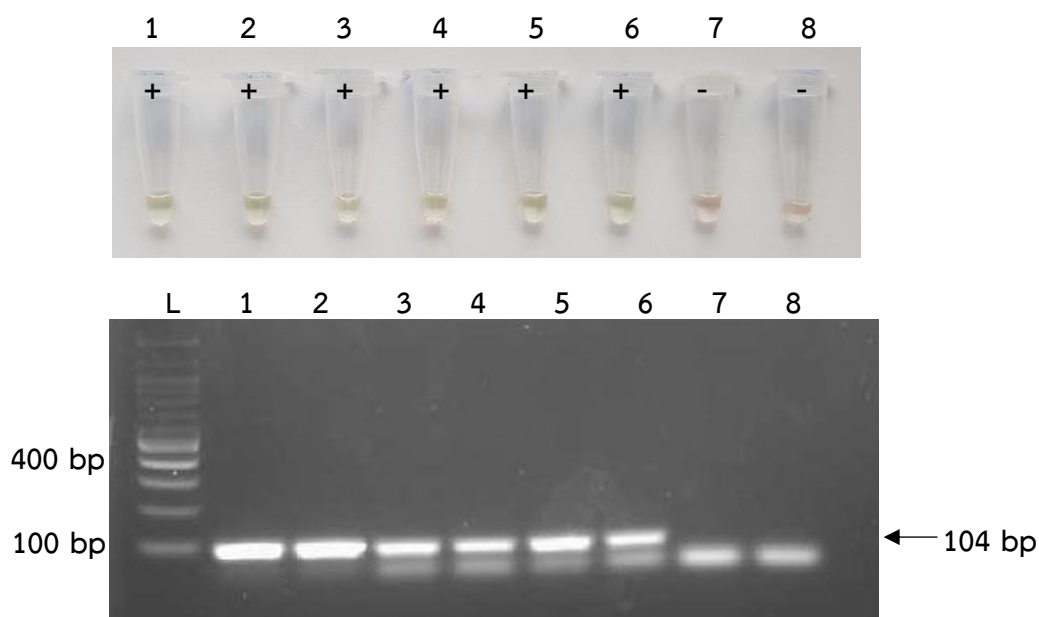
พบว่า สี SYBR Green I ที่ความเข้มข้น 400X ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดและเกิด Non specific product ที่น้อยสุดเมื่ออ่านผลด้วยสี SYBR Green I และ 2% Agarose gel electrophoresis กับ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุม จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์



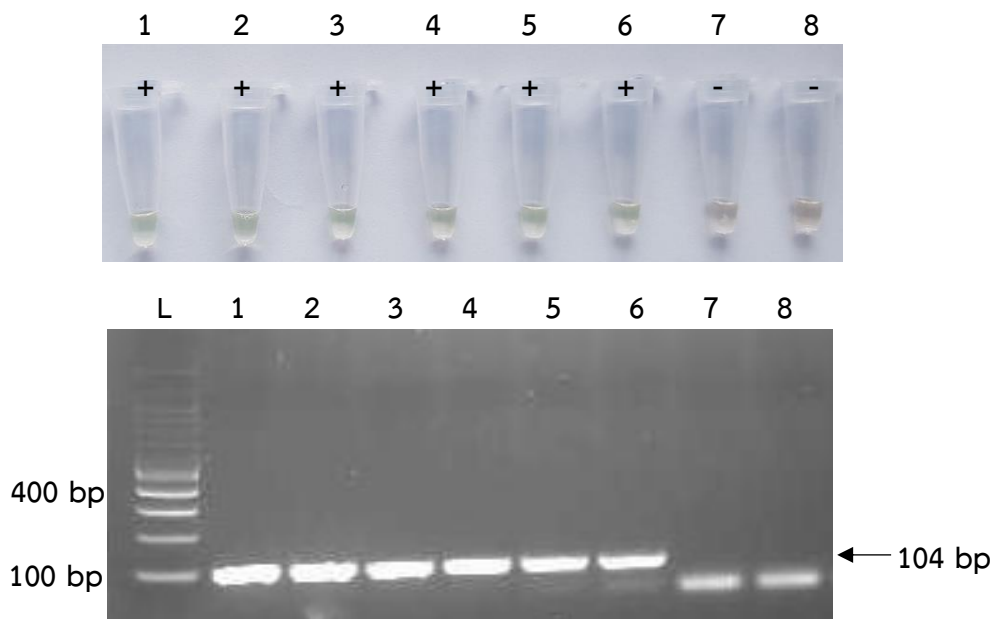
รูปที่ 44 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 100X ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นโดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



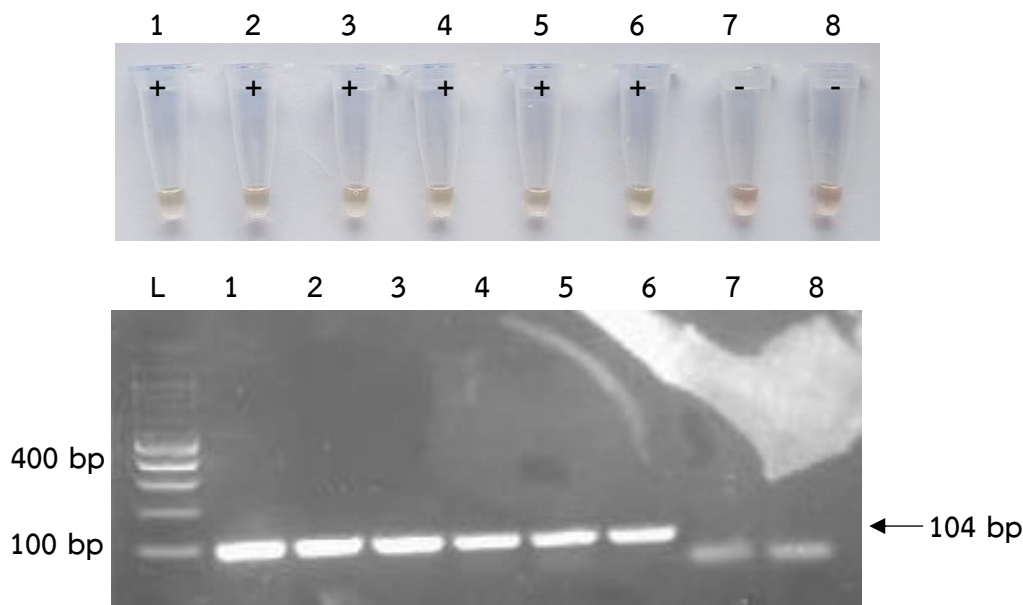
รูปที่ 45 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย สี SYBR Green I ความเข้มข้น 200X ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละ สายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็น ตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น บน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 46 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 300X ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 47 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย สีย SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละ สายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็น ตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น บน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 48 การตรวจสอบผลผลิต HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA ด้วย สีย SYBR Green I ความเข้มข้น 500X ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละ สายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว หลอดที่ 7 และ 8 เป็น ตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้น บน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวกแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ พบแถบของผลผลิตขนาด 104 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต

ทั้งนี้ สามารถสรุปผลสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I จากการพัฒนาในครั้งนี้ ดังรายละเอียดตามตารางที่ 11

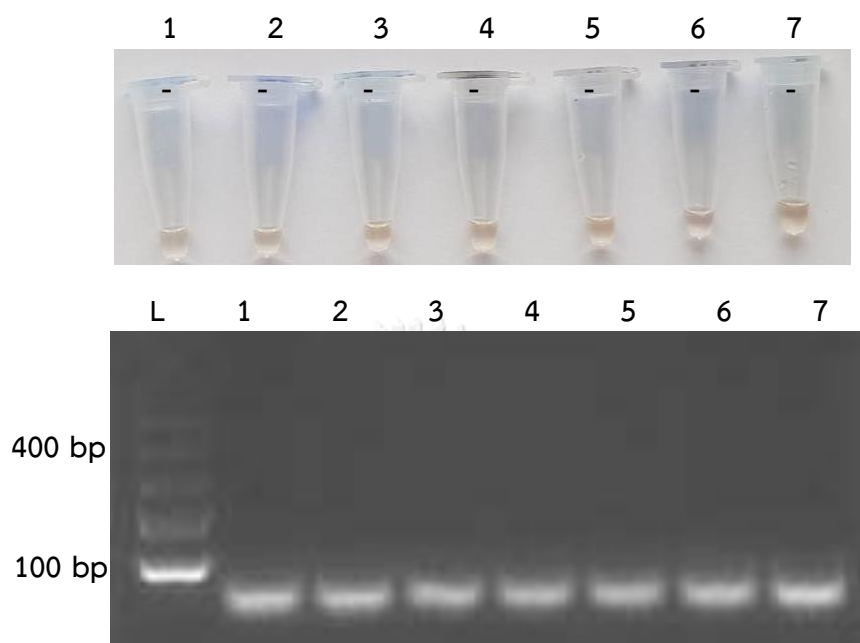
ตารางที่ 11 สรุปสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

เชื้อแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของ Primer (nmol)	ความเข้มข้นของ DNA (ng)	ความเข้มข้นของ MgSO ₄ (mM)	ความเข้มข้นของ NaCl (mM)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสี SYBR Green I
<i>S. aureus</i> (ATCC29523) <i>S. epidermidis</i> <i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> (ATCC25922) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853) <i>S. marcescens</i>	100	20	4	40	65	60	400X

5. การทดสอบความจำเพาะ

นำสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I ในตารางที่ 11 ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต มาทดสอบหาความจำเพาะกับ DNA ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีโอกาสพบการปนเปื้อนได้ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ได้แก่ เชื้อ *C. albicans* เชื้อ *C. neoformans* เชื้อ *Aspergillus* spp. เชื้อ *Rhizopus* spp. เชื้อไวรัสตับอักเสบบี และ Human DNA ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตามขั้นตอนที่อธิบายในข้อ 3.7 ของบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา HDA เติมนี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X และตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าทันทีโดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย เปรียบเทียบกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า ผลการทดสอบพบว่าปฏิกิริยา HDA ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารพันธุกรรมของเชื้อ *C. albicans* เชื้อ *C. neoformans* เชื้อ *Aspergillus* spp. เชื้อ *Rhizopus* spp. เชื้อไวรัสตับอักเสบบี และ Human DNA โดยไม่พบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ถูกเพิ่มขึ้น

เมื่อตรวจสอบสี SYBR Green I และเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis ตัวอย่างผลการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา HDA ดังแสดงในรูป 49



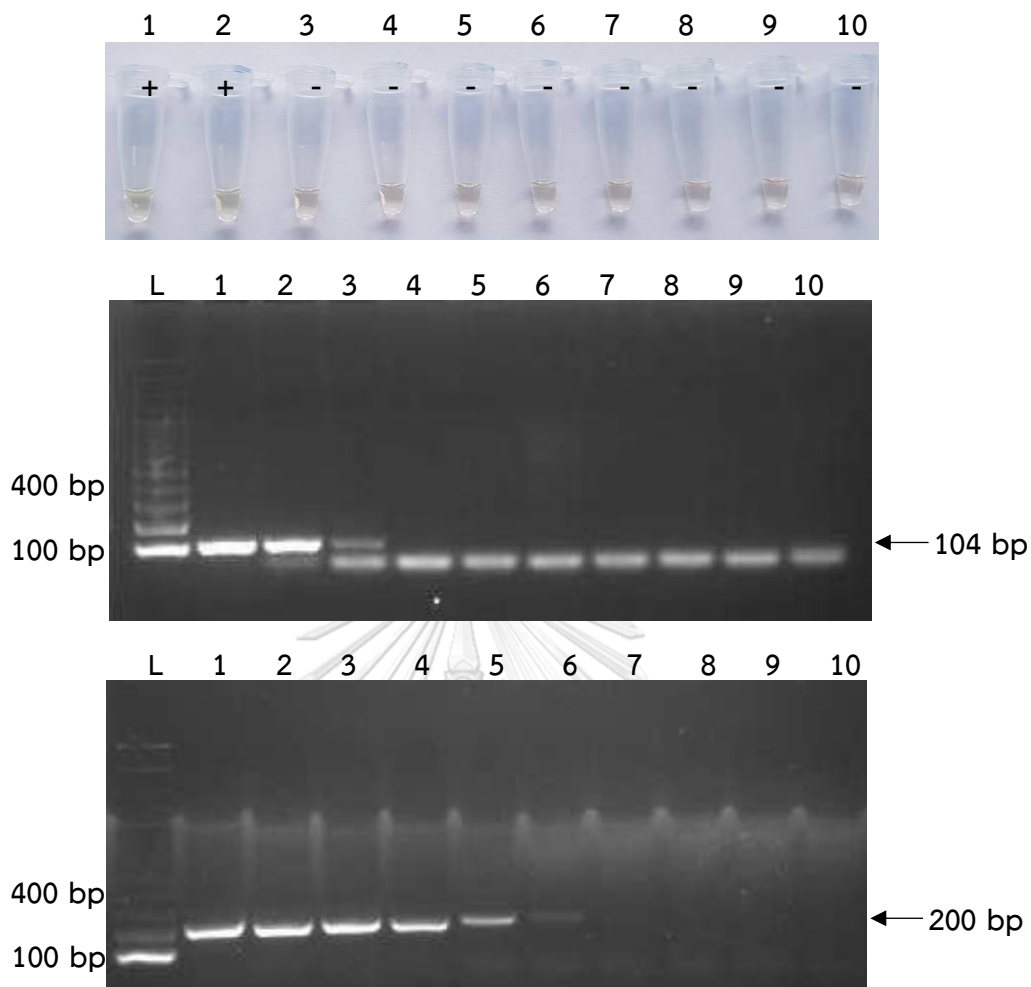
รูปที่ 49 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา HDA ที่จำเพาะต่อยีน 16s rRNA กับของ DNA เชื้อ *C. albicans* เชื้อ *C. neoformans* เชื้อ *Aspergillus* spp. เชื้อ *Rhizopus* spp. เชื้อไวรัสตับอักเสบบี และ Human DNA (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของแต่ละตัวอย่าง DNA ตามลำดับ ปฏิกิริยาทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 ตัวควบคุมลบโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปฏิกิริยาทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของแต่ละตัวอย่าง DNA ตามลำดับ แถวที่ 7 ตัวควบคุมลบโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปฏิกิริยาแต่ละแถวให้ผลลบ โดยไม่พบแถบของผลผลิต

6. การทดสอบหา Limit of detection

นำสถานะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I ในตารางที่ 11 ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต มาทดสอบหา Limit of detection โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวกทั้งหมด 6 สายพันธุ์ จากข้อ 3.3 ในบทวิธีการดำเนินการวิจัย มาเจือจางในน้ำกลั่นและปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 10 ng จากนั้นเจือจางเชื้อแบบ 10-fold dilution ในน้ำกลั่น จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ng และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ตามขั้นตอนที่อธิบายในข้อ 3.8 ของบทวิธีการดำเนินการวิจัย ภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา HDA เติมน้ำ SYBR Green I ความเข้มข้น 400X และตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าทันทีโดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย เปรียบเทียบกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า ในขณะเดียวกัน นำ DNA ในแต่ละความเข้มข้นไปทดสอบ Limit of detection ด้วยปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบด้วยเทคนิค 1.5% Agarose gel electrophoresis ผลการทดสอบพบว่าปฏิกิริยา HDA มีค่า Limit of detection เท่ากับ 1 ng เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I และเท่ากับ 0.1 ng เมื่อตรวจสอบด้วย 2% Agarose gel electrophoresis ในขณะที่ปฏิกิริยา PCR มีค่า Limit of detection เท่ากับ 0.0001 ng เมื่อตรวจสอบด้วย 2% Agarose gel electrophoresis เมื่อนำค่า Limit of detection ของแต่ละปฏิกิริยา ที่ตรวจพบเชื้อแต่ละสายพันธุ์ซึ่งมีหน่วยตั้งต้นเป็น ng มาคำนวณความเข้มข้นให้มีหน่วยเป็น CFU พบว่าปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I มีค่า Limit of detection อยู่ในช่วง 1.04×10^9 - 2.97×10^9 CFU ปฏิกิริยา HDA/AGE มีค่า Limit of detection อยู่ในช่วง 1.04×10^8 - 2.97×10^8 CFU และปฏิกิริยา PCR มีค่า Limit of detection อยู่ในช่วง 5.4×10^4 - 1.54×10^5 CFU ตารางที่ 12 เป็นตารางสรุปผลความเข้มข้นน้อยที่สุดของ DNA ต้นแบบที่เทคนิค HDA และ PCR สามารถตรวจได้ โดยมีรายละเอียดของผลการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 50 ถึง 55

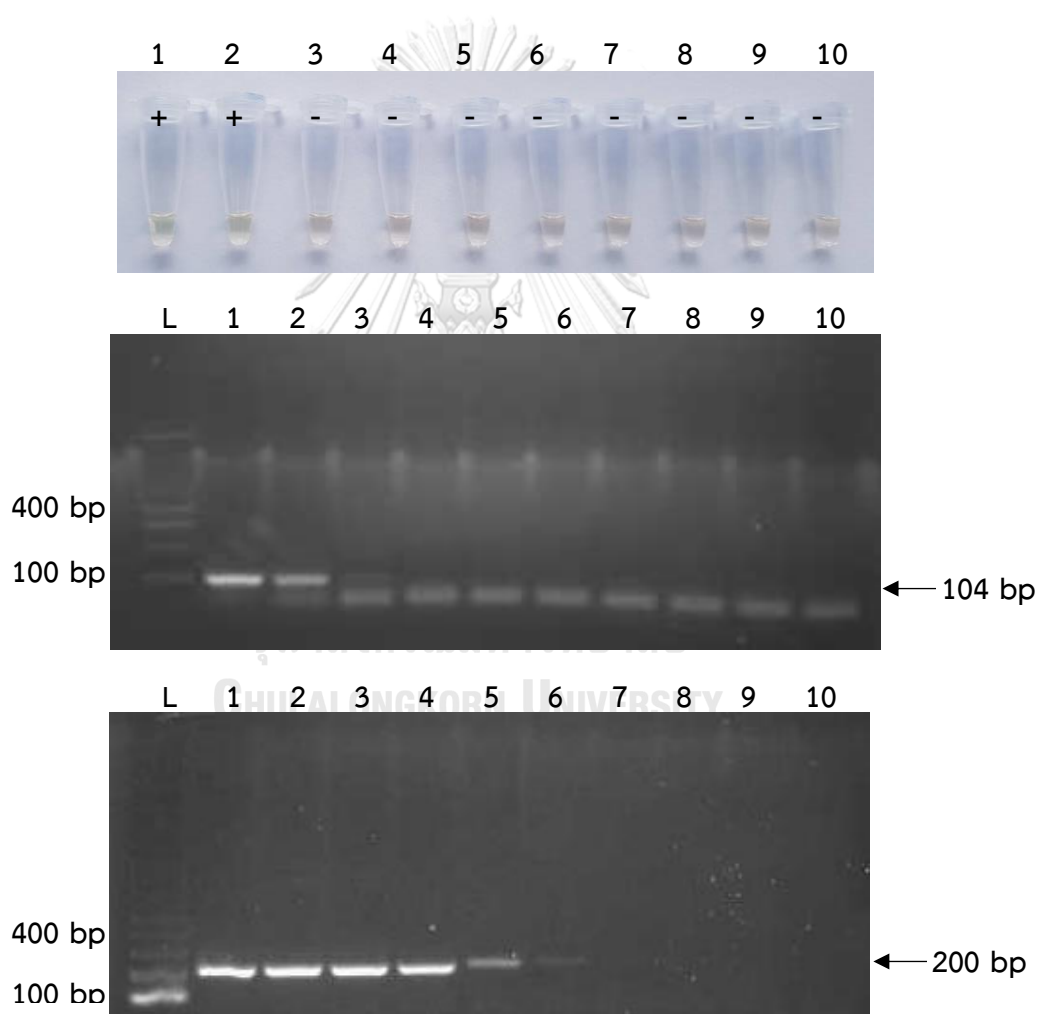
ตารางที่ 12 ความเข้มข้นน้อยที่สุดของ DNA ต้นแบบที่เทคนิค HDA และ PCR สามารถตรวจได้ โดยตรวจสอบผลผลิต HDA ด้วยการเติมสี SYBR Green I (HDA/SYBR Green I) และเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis (HDA/AGE) และตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค 1.5% Agarose gel electrophoresis

ค่า Limit of detection ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์	เทคนิค	HDA/SYBR Green I	HDA/AGE	PCR
<i>S. aureus</i> (ATCC25923)				
<i>S. epidermidis</i>		1 ng	0.1 ng	0.0001 ng
<i>B. cereus</i>		หรือเท่ากับ	หรือเท่ากับ	หรือเท่ากับ
<i>E. coli</i> (ATCC25922)		1.04×10^9 -	1.04×10^8 -	5.4×10^4 -
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853)		2.97×10^9 CFU	2.97×10^8 CFU	1.54×10^5 CFU
<i>S. marcescens</i>				



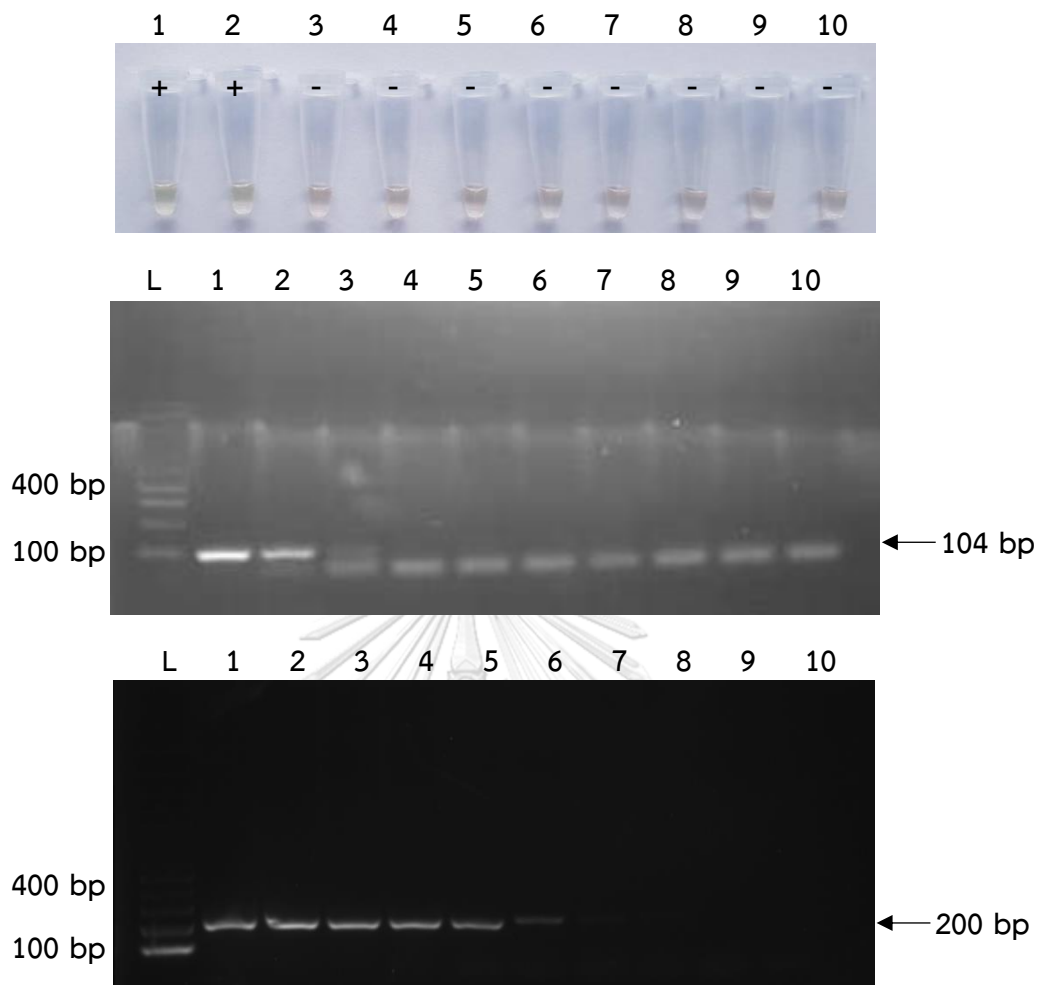
รูปที่ 50 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) ความเข้มข้น 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 0.00001 0.000001 ng (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ ปฏิริยาหลอดที่ 1 ถึง 2 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิริยาหลอดที่ 3 ถึง 8 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกิลดีโลहितที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิริยาทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 3 พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แถวที่ 4 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10

เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp ในขณะที่แถวที่ 7 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



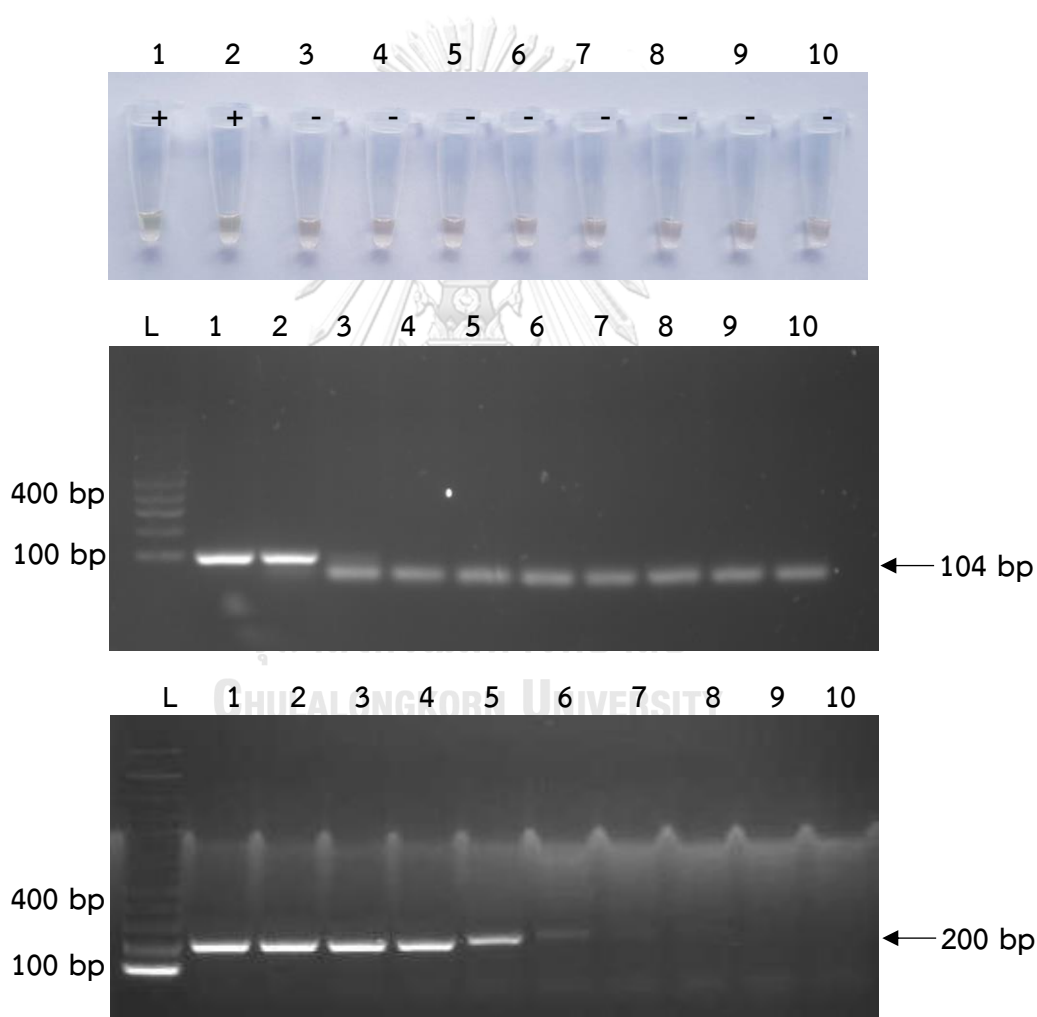
รูปที่ 51 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ *S. epidermidis* ความเข้มข้น 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 0.00001 0.000001 ng (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ

DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ ปฏิริยาหลอดที่ 1 ถึง 2 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิริยาหลอดที่ 3 ถึง 8 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิริยาหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 3 พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แถวที่ 4 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp ในขณะที่แถวที่ 7 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



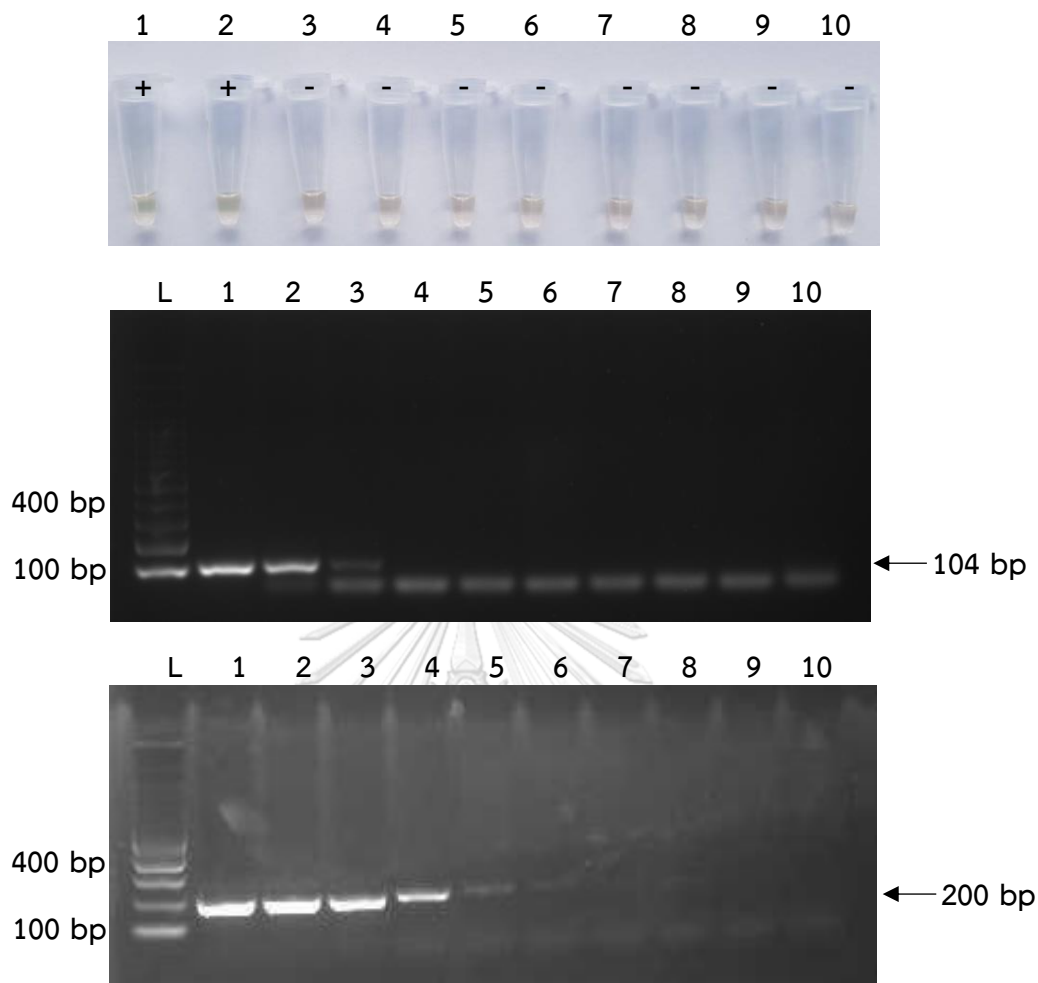
รูปที่ 52 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ *B. cereus* ความเข้มข้น 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 0.00001 0.000001 ng (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ ปฏิริยาหลอดที่ 1 ถึง 2 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิริยาหลอดที่ 3 ถึง 8 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิริยาทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 3 พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แถวที่ 4 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10

เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp ในขณะที่แถวที่ 7 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



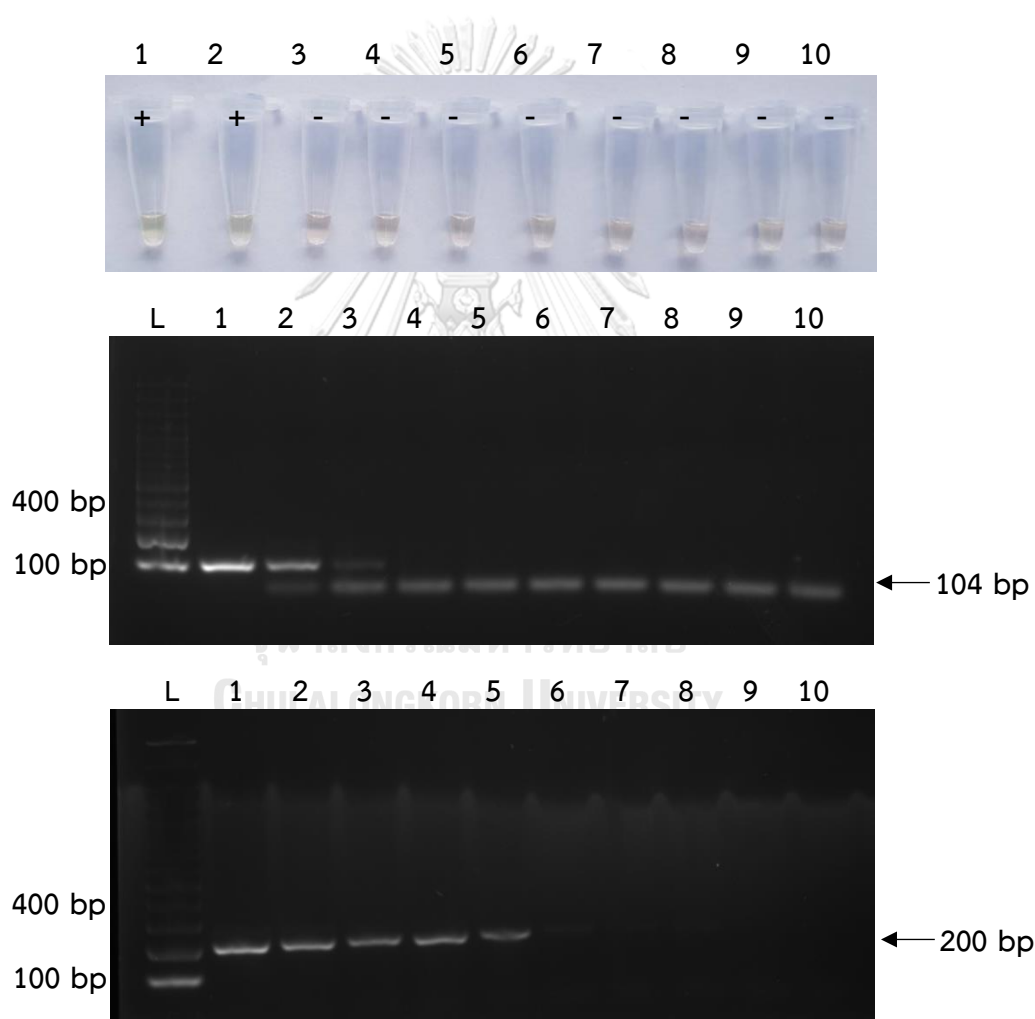
รูปที่ 53 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ *E. coli* (ATCC25922) ความเข้มข้น 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 0.00001 0.000001 ng (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ

DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ ปฏิกริยาหลอดที่ 1 ถึง 2 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิกริยาหลอดที่ 3 ถึง 8 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิกริยาทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 3 พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แถวที่ 4 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp ในขณะที่แถวที่ 7 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 54 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) ความเข้มข้น 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 0.00001 0.000001 ng (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ ปฏิริยาหลอดที่ 1 ถึง 2 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิริยาหลอดที่ 3 ถึง 8 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ปฏิริยาทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 3 พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แถวที่ 4 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10

เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp ในขณะที่แถวที่ 7 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต



รูปที่ 55 การทดสอบ Limit of detection ของปฏิกิริยา HDA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16s rRNA เมื่อทดสอบกับ DNA ของเชื้อ *S. marcescens* ความเข้มข้น 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 0.00001 0.000001 ng (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ

DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ ปฏิกริยาหลอดที่ 1 ถึง 2 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิกริยาหลอดที่ 3 ถึง 8 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิกริยาทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 3 พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แถวที่ 4 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA แต่ละความเข้มข้น ตามลำดับ แถวที่ 1 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp ในขณะที่แถวที่ 7 ถึง 8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 9 และ 10 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต

7. การทดสอบตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา

นำสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกริยา HDA/SYBR Green I ในตารางที่ 11 ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต มาทดสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียควบคุมบวกจำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา ได้แก่ วันที่ 0 หรือวันเริ่มต้นของการเก็บรักษา ถึงวันที่ 5 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเก็บรักษา ตามอายุของผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต โดยขั้นตอนการเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1 CFU/ml แบบจำลอง ตามที่อธิบายในข้อ 3.10 ของบทวิธีการดำเนินการวิจัย นำผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเก็บรักษาในแต่ละวัน ไปตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I ภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกริยา HDA เติมสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X และตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าทันทีโดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย เปรียบเทียบกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค 2% Agarose

gel electrophoresis ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า และเทคนิค PCR การนับจำนวนโคลน และเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System

พบว่าเทคนิค HDA/SYBR Green I ซึ่งใช้ระยะเวลาในการทดสอบตั้งแต่เริ่มปฏิบัติการจนถึงขั้นตอนอ่านผลเสร็จสิ้น ประมาณ 1 ชั่วโมง สามารถตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 1 ถึง 4 ของการเก็บรักษา โดยที่เชื้อ *B. cereus* ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 1 ของการเก็บรักษา เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* และเชื้อ *S. marcescens* ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา และเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา ในขณะที่เทคนิค HDA/AGE ใช้ระยะเวลาในการทดสอบตั้งแต่เริ่มปฏิบัติการจนถึงขั้นตอนอ่านผลเสร็จสิ้น ประมาณ 1 ชั่วโมง 40 นาที ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 1 ถึง 3 ของการเก็บรักษา โดยที่เชื้อ *B. cereus* ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 1 ของการเก็บรักษา เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* และเชื้อ *S. marcescens* ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) และเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา เทคนิค PCR ใช้ระยะเวลาในการทดสอบตั้งแต่เริ่มปฏิบัติการจนถึงขั้นตอนอ่านผลเสร็จสิ้น ประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 0 ถึง 1 ของการเก็บรักษา รักษา โดยที่เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *S. marcescens* ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 0 ของการเก็บรักษา และเชื้อ *B. cereus* ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 1 ของการเก็บรักษา การนับจำนวนโคลน ใช้ระยะเวลาในการทดสอบตั้งแต่นำเชื้อเพาะที่เจือจาง เกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มและนับจำนวนโคลนที่ขึ้นมา ประมาณ 24 ชั่วโมง ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 1 ถึง 2 ของการเก็บรักษา โดยที่เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *S. marcescens* ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 1 ของการเก็บรักษา และ เชื้อ *S. epidermidis* ตรวจพบการ

ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา และเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System ใช้ระยะเวลาในการทดสอบในการบ่มเพาะเชื้อจนถึงอ่านผลเมื่อเชื้อเจริญ ประมาณ 10 ชั่วโมง 54 นาที ถึง 18 ชั่วโมง 15 นาที ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 0 ถึง 1 ของการเก็บรักษา โดยที่เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *S. marcescens* ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 0 ของการเก็บรักษา และเชื้อ *B. cereus* ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เร็วที่สุดภายในวันที่ 1 ของการเก็บรักษา รายละเอียดของผลการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียควบคุมสายพันธุ์ต่าง ๆ มีดังนี้

- ผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I แสดงในตารางที่ 13
- ผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/AGE แสดงในตารางที่ 14
- ผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค PCR แสดงในตารางที่ 15
- ผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System แสดงในตารางที่ 16
- ผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา แสดงดังรูปที่ 56
- ผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *S. epidermidis* ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา แสดงดังรูปที่ 57
- ผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา แสดงดังรูปที่ 58
- ผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* (ATCC25922) ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา แสดงดังรูปที่ 59

- ผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา แสดงดังรูปที่ 60
- ผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *S. marcescens* ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา แสดงดังรูปที่ 61

ตารางที่ 13 การทดสอบตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I

เชื้อแบคทีเรีย	วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา					
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
<i>S. aureus</i> (ATCC29523)	- No growth	- 1.7×10^3 CFU/ml	+ 1.3×10^8 CFU/ml	+ 5.0×10^8 CFU/ml	+ 6.6×10^8 CFU/ml	+ 1.4×10^9 CFU/ml
<i>S. epidermidis</i>	- No growth	- No growth	+ 2.2×10^3 CFU/ml	+ 8.4×10^5 CFU/ml	+ 9.5×10^6 CFU/ml	+ 1.2×10^8 CFU/ml
<i>B. cereus</i>	- No growth	+ 1.9×10^3 CFU/ml	+ 2.0×10^8 CFU/ml	+ 4.1×10^8 CFU/ml	+ 6.9×10^8 CFU/ml	+ 7.8×10^8 CFU/ml
<i>E. coli</i> (ATCC25922)	- No growth	- 1.8×10^3 CFU/ml	- 1.1×10^8 CFU/ml	+ 2.4×10^8 CFU/ml	+ 2.2×10^8 CFU/ml	+ 2.9×10^9 CFU/ml
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853)	- No growth	- 5 CFU/ml	- 3.2×10^3 CFU/ml	- 7.2×10^5 CFU/ml	+ 4.0×10^7 CFU/ml	+ 3.1×10^{11} CFU/ml
<i>S. marcescens</i>	- No growth	- 8.8×10^2 CFU/ml	+ 7.4×10^4 CFU/ml	+ 2.6×10^9 CFU/ml	+ 1.1×10^{10} CFU/ml	+ 1.2×10^{10} CFU/ml

หมายเหตุ + หมายถึง ผลของปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I เป็นบวก

- หมายถึง ผลของปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I เป็นลบ

ตารางที่ 14 การทดสอบตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5
ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/AGE

เชื้อแบคทีเรีย	วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา					
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
<i>S. aureus</i> (ATCC29523)	- No growth	- 1.7×10^3 CFU/ml	+ 1.3×10^8 CFU/ml	+ 5.0×10^8 CFU/ml	+ 6.6×10^8 CFU/ml	+ 1.4×10^9 CFU/ml
<i>S. epidermidis</i>	- No growth	- No growth	+ 2.2×10^3 CFU/ml	+ 8.4×10^5 CFU/ml	+ 9.5×10^6 CFU/ml	+ 1.2×10^8 CFU/ml
<i>B. cereus</i>	- No growth	+ 1.9×10^3 CFU/ml	+ 2.0×10^8 CFU/ml	+ 4.1×10^8 CFU/ml	+ 6.9×10^8 CFU/ml	+ 7.8×10^8 CFU/ml
<i>E. coli</i> (ATCC25922)	- No growth	- 1.8×10^3 CFU/ml	- 1.1×10^8 CFU/ml	+ 2.4×10^8 CFU/ml	+ 2.2×10^8 CFU/ml	+ 2.9×10^9 CFU/ml
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853)	- No growth	- 5 CFU/ml	- 3.2×10^3 CFU/ml	+ 7.2×10^5 CFU/ml	+ 4.0×10^7 CFU/ml	+ 3.1×10^{11} CFU/ml
<i>S. marcescens</i>	- No growth	+ 8.8×10^2 CFU/ml	+ 7.4×10^4 CFU/ml	+ 2.6×10^9 CFU/ml	+ 1.1×10^{10} CFU/ml	+ 1.2×10^{10} CFU/ml

หมายเหตุ + หมายถึง ผลของปฏิกิริยา HDA/AGE เป็นบวก

- หมายถึง ผลของปฏิกิริยา HDA/AGE เป็นลบ

ตารางที่ 15 การทดสอบตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค PCR

เชื้อแบคทีเรีย	วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา					
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
<i>S. aureus</i> (ATCC29523)	+ No growth	+ 1.7×10^3 CFU/ml	+ 1.3×10^8 CFU/ml	+ 5.0×10^8 CFU/ml	+ 6.6×10^8 CFU/ml	+ 1.4×10^9 CFU/ml
<i>S. epidermidis</i>	+ No growth	+ No growth	+ 2.2×10^3 CFU/ml	+ 8.4×10^5 CFU/ml	+ 9.5×10^6 CFU/ml	+ 1.2×10^8 CFU/ml
<i>B. cereus</i>	- No growth	+ 1.9×10^3 CFU/ml	+ 2.0×10^8 CFU/ml	+ 4.1×10^8 CFU/ml	+ 6.9×10^8 CFU/ml	+ 7.8×10^8 CFU/ml
<i>E. coli</i> (ATCC25922)	+ No growth	+ 1.8×10^3 CFU/ml	+ 1.1×10^8 CFU/ml	+ 2.4×10^8 CFU/ml	+ 2.2×10^8 CFU/ml	+ 2.9×10^9 CFU/ml
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853)	+ No growth	+ 5 CFU/ml	+ 3.2×10^3 CFU/ml	+ 7.2×10^5 CFU/ml	+ 4.0×10^7 CFU/ml	+ 3.1×10^{11} CFU/ml
<i>S. marcescens</i>	+ No growth	+ 8.8×10^2 CFU/ml	+ 7.4×10^4 CFU/ml	+ 2.6×10^9 CFU/ml	+ 1.1×10^{10} CFU/ml	+ 1.2×10^{10} CFU/ml

หมายเหตุ + หมายถึง ผลของปฏิกิริยา PCR เป็นบวก

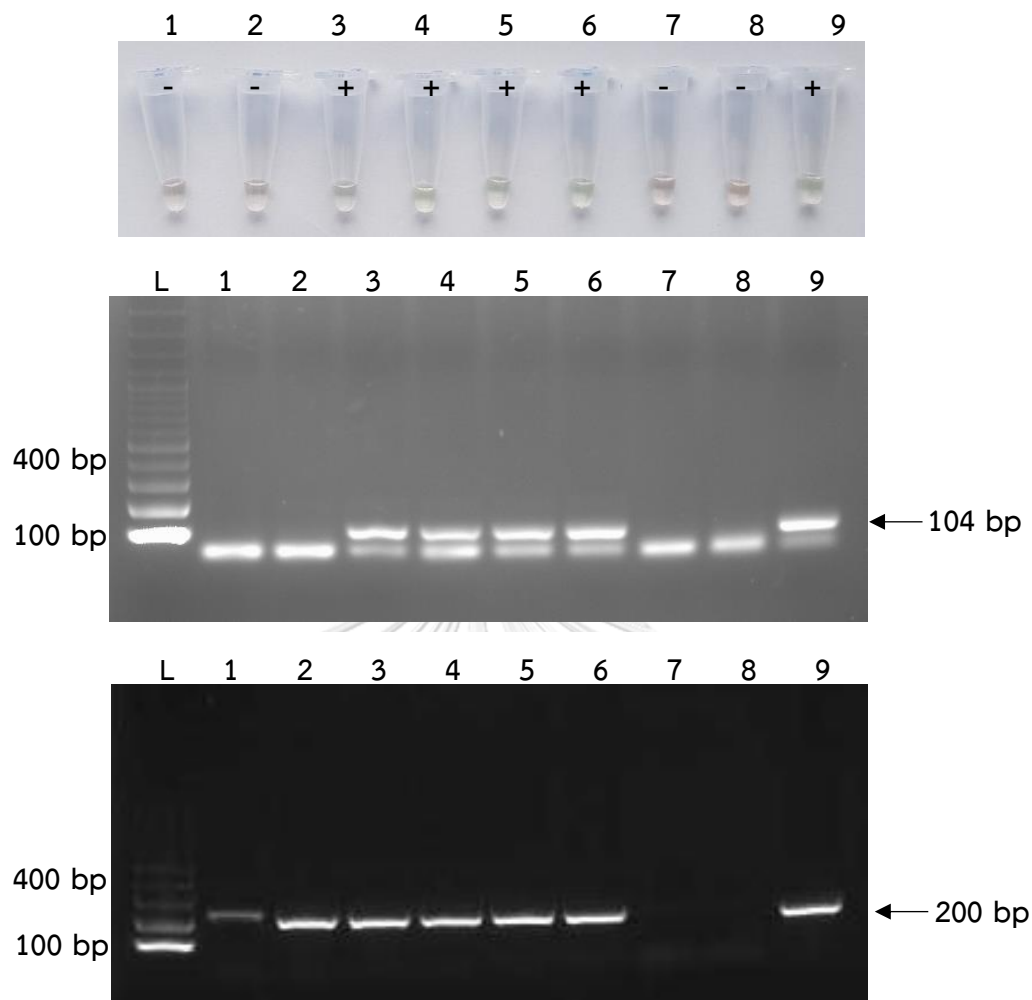
- หมายถึง ผลของปฏิกิริยา PCR เป็นลบ

ตารางที่ 16 การทดสอบตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System

เชื้อแบคทีเรีย	วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา					
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
<i>S. aureus</i> (ATCC29523)	+ No growth	+ 1.7×10^3 CFU/ml	+ 1.3×10^8 CFU/ml	+ 5.0×10^8 CFU/ml	+ 6.6×10^8 CFU/ml	+ 1.4×10^9 CFU/ml
<i>S. epidermidis</i>	+ No growth	+ No growth	+ 2.2×10^3 CFU/ml	+ 8.4×10^5 CFU/ml	+ 9.5×10^6 CFU/ml	+ 1.2×10^8 CFU/ml
<i>B. cereus</i>	- No growth	+ 1.9×10^3 CFU/ml	+ 2.0×10^8 CFU/ml	+ 4.1×10^8 CFU/ml	+ 6.9×10^8 CFU/ml	+ 7.8×10^8 CFU/ml
<i>E. coli</i> (ATCC25922)	+ No growth	+ 1.8×10^3 CFU/ml	+ 1.1×10^8 CFU/ml	+ 2.4×10^8 CFU/ml	+ 2.2×10^8 CFU/ml	+ 2.9×10^9 CFU/ml
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853)	+ No growth	+ 5 CFU/ml	+ 3.2×10^3 CFU/ml	+ 7.2×10^5 CFU/ml	+ 4.0×10^7 CFU/ml	+ 3.1×10^{11} CFU/ml
<i>S. marcescens</i>	+ No growth	+ 8.8×10^2 CFU/ml	+ 7.4×10^4 CFU/ml	+ 2.6×10^9 CFU/ml	+ 1.1×10^{10} CFU/ml	+ 1.2×10^{10} CFU/ml

หมายเหตุ + หมายถึง ผลการทดสอบจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System เป็นบวก

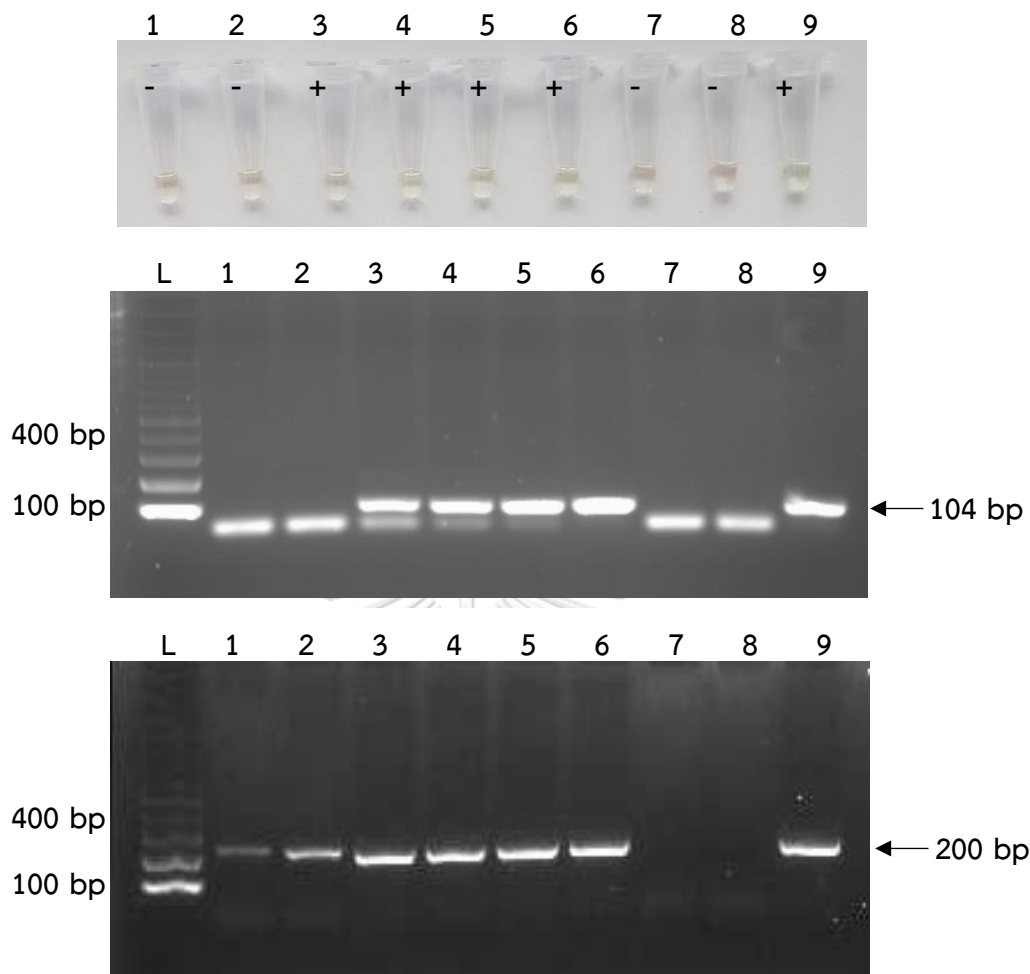
- หมายถึง ผลการทดสอบจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System เป็นลบ



รูปที่ 56 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ตามลำดับ ปฏิบัติหลอดที่ 3 ถึง 6 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิบัติหลอดที่ 1 ถึง 2 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิบัติทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) ปฏิบัติให้ผลเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523)

ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ แถวที่ 3 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แถวที่ 1 ถึง 2 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp

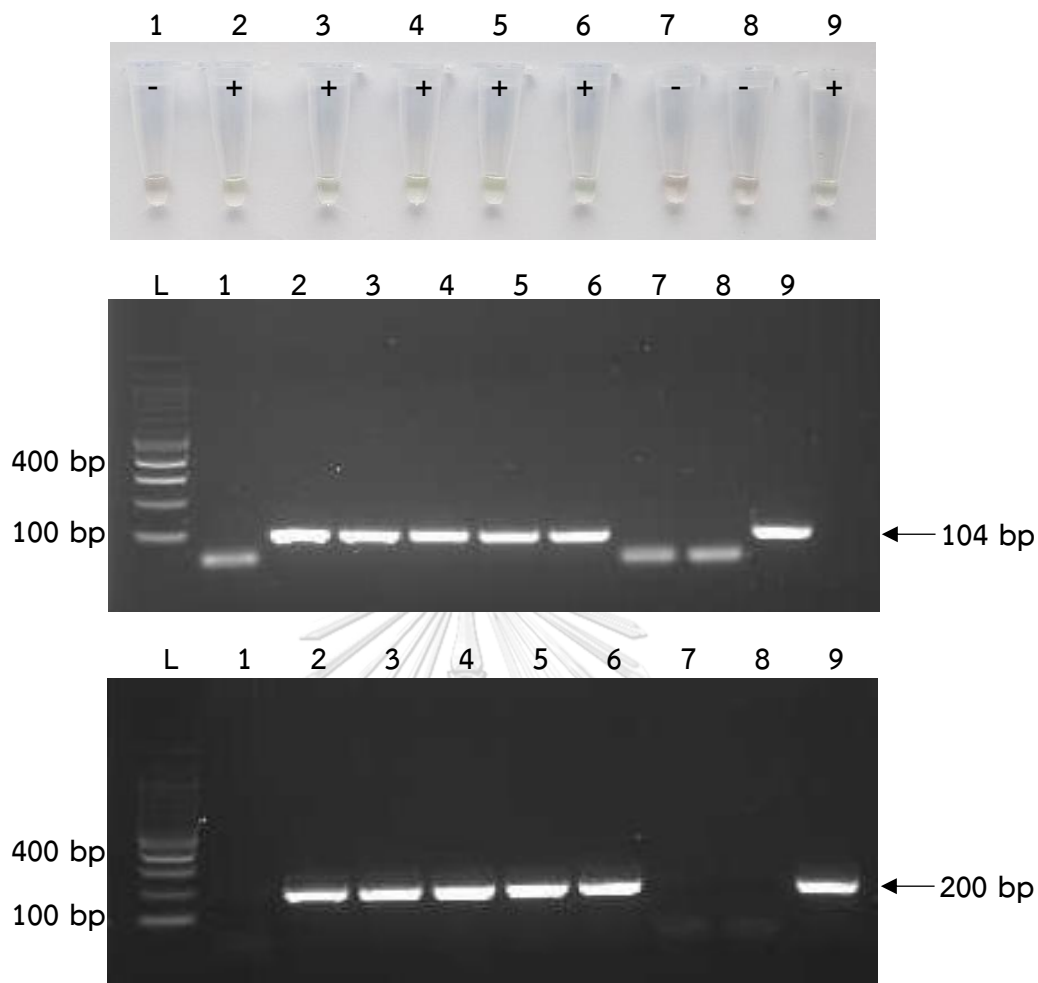




รูปที่ 57 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ *S. epidermidis* ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. epidermidis* ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ตามลำดับ ปฏิริยาหลอดที่ 3 ถึง 6 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิริยาหลอดที่ 1 ถึง 2 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิริยาทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ *S. epidermidis* ปฏิริยาให้ผลเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. epidermidis* ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5

ของการเก็บรักษา ตามลำดับ แถวที่ 3 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แถวที่ 1 ถึง 2 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคโลนีของเชื้อ *S. epidermidis* พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. epidermidis* ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp

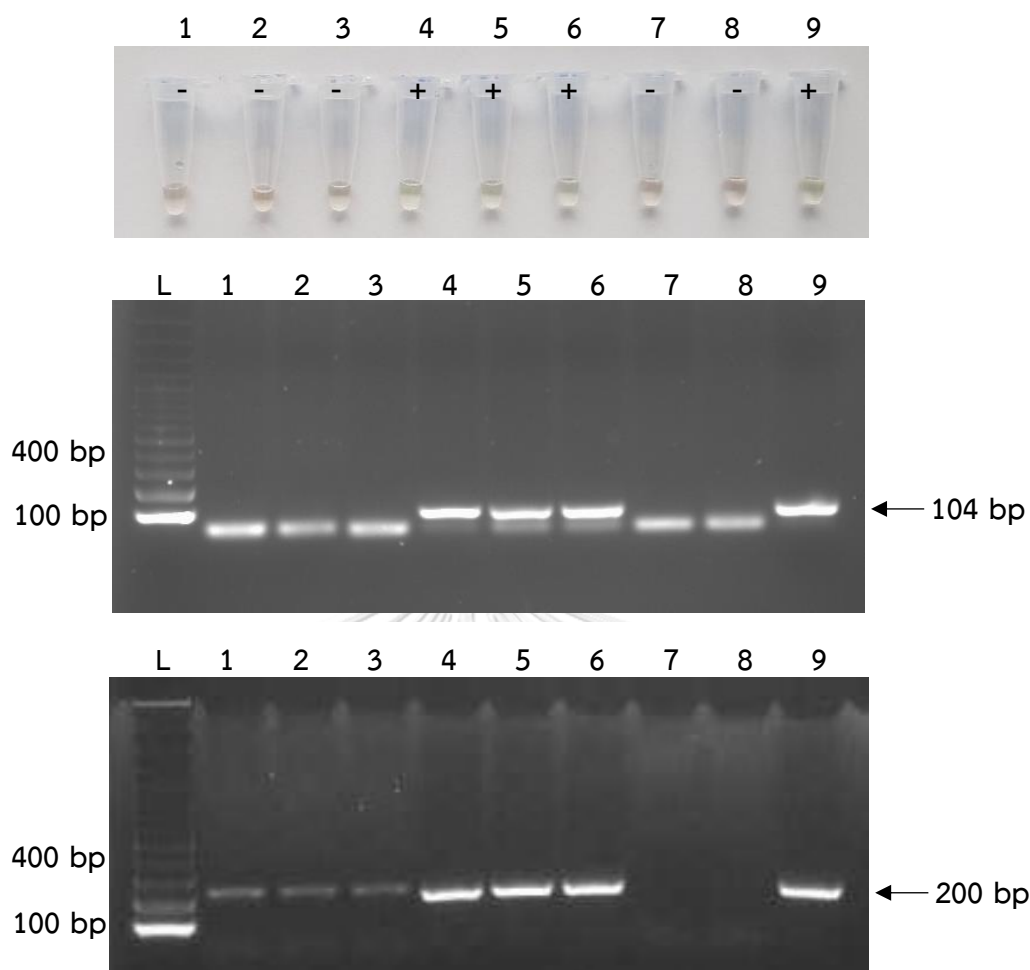




รูปที่ 58 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลहित ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. cereus* ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ตามลำดับ ปฏิริยาหลอดที่ 2 ถึง 6 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิริยาหลอดที่ 1 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถั่วผลิตภัณฑ์เกล็ดโลहितที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิริยาทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ *B. cereus* ปฏิริยาให้ผลเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. cereus* ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ แถวที่ 2 ถึง 6

พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แฉวที่ 1 ไม่พบแถบผลผลิต แฉวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แฉวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ *B. cereus* พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แฉว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แฉวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. cereus* ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ แฉวที่ 2 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp ในขณะที่แฉวที่ 1 ไม่พบแถบผลผลิต แฉวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แฉวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ *B. cereus* พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp

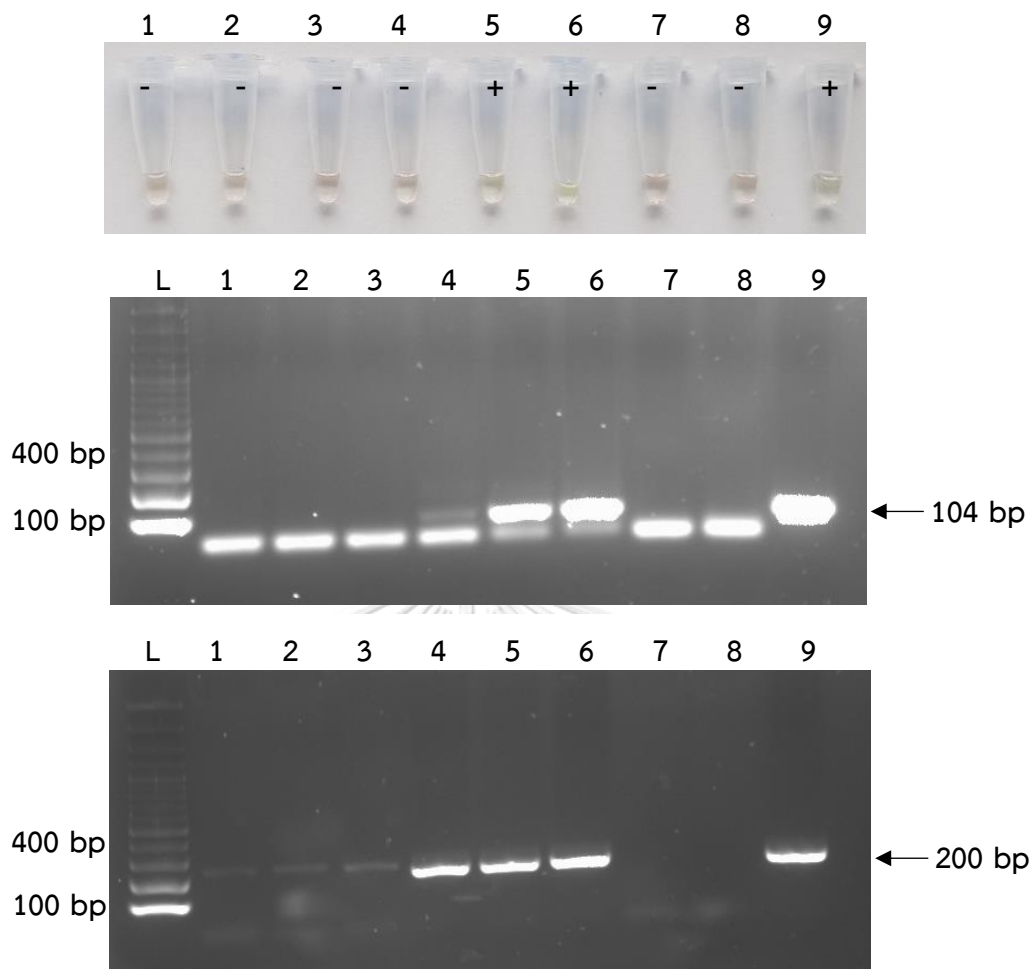




รูปที่ 59 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* (ATCC25922) ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* (ATCC25922) ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ตามลำดับ ปฏิริยาหลอดที่ 4 ถึง 6 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิริยาหลอดที่ 1 ถึง 3 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิริยาทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ *E. coli* (ATCC25922) ปฏิริยาให้ผลเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* (ATCC25922)

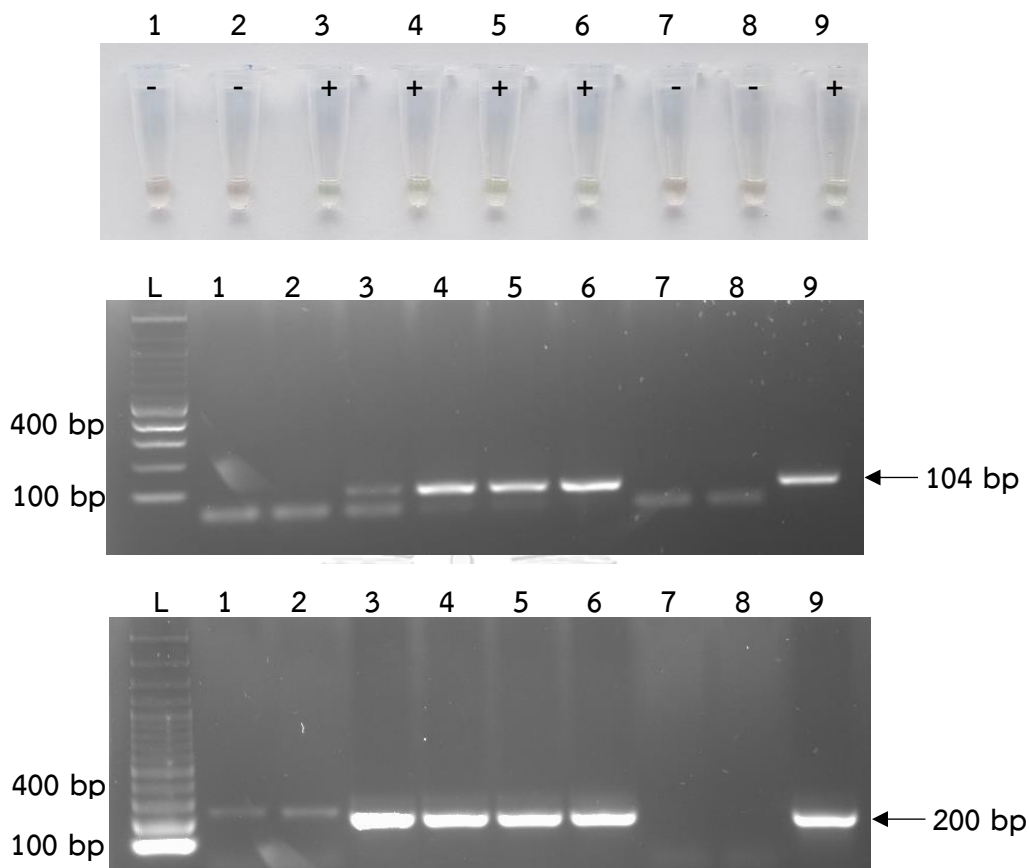
ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ แถวที่ 4 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แถวที่ 1 ถึง 3 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ *E. coli* (ATCC25922) พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* (ATCC25922) ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ *E. coli* (ATCC25922) พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp





รูปที่ 60 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ตามลำดับ ปฏิริยาหลอดที่ 5 ถึง 6 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิริยาหลอดที่ 1 ถึง 4 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิริยาทุกหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) ปฏิริยาให้ผลเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ

เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ แถวที่ 4 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แถวที่ 1 ถึง 3 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของ *P. aeruginosa* (ATCC27853) พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp



รูปที่ 61 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ *S. marcescens* ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลहित ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR (บน) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X โดยหลอดที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. marcescens* ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ตามลำดับ ปฏิบัติหลอดที่ 3 ถึง 6 ให้ผลบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว ปฏิบัติหลอดที่ 1 ถึง 2 ให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลहितที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ปฏิบัติหลอดให้ผลลบ โดยสารละลายเป็นสีส้ม หลอดที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ *S. marcescens* ปฏิบัติให้ผลเป็นบวก โดยสารละลายเป็นสีเขียว (กลาง) ตรวจสอบผลผลิต HDA ที่เกิดขึ้นบน 2% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. marcescens* ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ แถวที่ 3 ถึง 6 พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp ในขณะที่แถวที่ 1 ถึง 2 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจาก

ถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคโลนีของเชื้อ *S. marcescens* พบแถบผลผลิตขนาด 104 bp (ล่าง) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นบน 1.5% Agarose gel electrophoresis แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 ถึง 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. marcescens* ณ วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp แถวที่ 7 และ 8 เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายจากถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแถบของผลผลิต แถวที่ 9 เป็นตัวควบคุมบวก โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากโคโลนีของเชื้อ *S. marcescens* พบแถบผลผลิตขนาด 200 bp

8. การคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของเทคนิค HDA/SYBR Green I

นำผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 0 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA ที่ถูกตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I (HDA/SYBR Green I) เปรียบเทียบเทคนิค HDA ที่อ่านผลด้วย 2% Agarose gel electrophoresis (HDA/AGE) เทคนิค PCR การนับจำนวนโคโลนี และเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System เพื่อคำนวณหาความไวและความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% โดยจำนวนตัวอย่างที่นำมาคำนวณ ได้มาจากผลการทดสอบของผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวกทั้ง 6 สายพันธุ์ (6 ตัวอย่าง) และตัวควบคุมลบที่เป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (1 ตัวอย่าง) และผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ (1 ตัวอย่าง) ซึ่งทำการทดสอบในแต่ละวัน ตั้งแต่วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 รวมทั้งหมด 6 วัน รวมจำนวนตัวอย่าง 48 ตัวอย่าง และทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 96 ตัวอย่าง ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 17 ถึง 20

ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 0 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับเทคนิค HDA/AGE

ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I	ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค HDA/AGE		ความไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	บวก	ลบ					
บวก	44	0	96%	100%	100%	96%	0.958
ลบ	2	50					

จากตารางที่ 17 เมื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษาด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับเทคนิค HDA/AGE พบว่า เทคนิค HDA/SYBR Green I ให้ผลลบปลอม 2 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 96% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 96% และค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.958 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแสดงถึงความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก

ตารางที่ 18 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 0 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลจากการทดสอบด้วยเทคนิค PCR

ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I	ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค PCR		ความไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	บวก	ลบ					
บวก	44	0	63%	100%	100%	50%	0.478
ลบ	26	26					

จากตารางที่ 18 เมื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษาด้วยเทคนิค HDA/ SYBR Green I เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR พบว่า เทคนิค HDA/ SYBR Green I ให้ผลลบปลอม 26 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 63% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 50% และค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.478 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแสดงถึงความสอดคล้องกันในเกณฑ์ปานกลาง

ตารางที่ 19 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 0 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับการนับจำนวนโคโลนี

ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I	ผลการทดสอบ ด้วยการ นับโคโลนี		ความไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	บวก	ลบ					
บวก	44	0	76%	100%	100%	73%	0.713
ลบ	14	38					

จากตารางที่ 19 เมื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษาด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับการนับโคโลนี พบว่า เทคนิค HDA/SYBR Green I ให้ผลลบปลอม 14 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 96% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 76% และค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.713 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแสดงถึงความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดี

ตารางที่ 20 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 0 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System

ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I	ผลการทดสอบ ด้วยเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System		ความไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	บวก	ลบ					
	บวก	44					
ลบ	26	26					

จากตารางที่ 20 เมื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษาด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System พบว่า เทคนิค HDA/SYBR Green I ให้ผลลบปลอม 26 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 63% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 50% และค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.478 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแสดงถึงความสอดคล้องกันในเกณฑ์ปานกลาง

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการคำนวณหาค่าความไวและความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ ของเทคนิค HDA/SYBR Green I โดยพิจารณาเฉพาะผลการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ที่มีอายุการจัดเก็บรักษาตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไป ซึ่งในงานประจำของห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด มักเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีอายุตั้งแต่ 1-2 วันขึ้นไปให้กับผู้ป่วย เนื่องจากต้องรอผลการทดสอบการปนเปื้อน (94) ดังนั้นจำนวนตัวอย่างที่นำมาคำนวณ ได้มาจากผลการทดสอบของผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวกทั้ง 6 สายพันธุ์ (6 ตัวอย่าง) และตัวควบคุมลบที่เป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (1 ตัวอย่าง) และผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปราศจากเชื้อ (1 ตัวอย่าง) ซึ่งทำการทดสอบในแต่ละวัน ตั้งแต่วันที่ 2 ถึง วันที่ 5 รวมทั้งหมด 4 วัน รวมจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 36 ตัวอย่าง และทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 72 ตัวอย่าง เปรียบเทียบเทคนิค HDA/AGE เทคนิค PCR การนับ

จำนวนโคโลนี และเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System พบว่ามีรายละเอียดดังที่แสดงในตารางที่ 21 ถึง 24

ตารางที่ 21 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 2 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับเทคนิค HDA/AGE

ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I	ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค HDA/AGE		ความไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	บวก	ลบ					
บวก	42	0	96%	100%	100%	93%	0.942
ลบ	2	28					

จากตารางที่ 21 เมื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับเทคนิค HDA/AGE พบว่า เทคนิค HDA/SYBR Green I ให้ผลลบปลอม 2 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 96% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 93% และค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.942 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแสดงถึงความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก

ตารางที่ 22 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 2 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลจากการทดสอบด้วยเทคนิค PCR

ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I	ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค PCR		ความไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	บวก	ลบ					
บวก	42	0	88%	100%	100%	80%	0.824
ลบ	6	24					

จากตารางที่ 22 เมื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษาด้วยเทคนิค HDA/ SYBR Green I เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR พบว่า เทคนิค HDA/ SYBR Green I ให้ผลลบปลอม 6 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 88% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 80% และค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.824 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแสดงถึงความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก

ตารางที่ 23 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 2 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับการนับจำนวนโคโลนี

ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I	ผลการทดสอบ ด้วยการนับ โคโลนี		ความ ไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	บวก	ลบ					
บวก	42	0	88%	100%	100%	80%	0.824
ลบ	6	24					

จากตารางที่ 23 เมื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษาด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับการนับโคโลนี พบว่า เทคนิค HDA/SYBR Green I ให้ผลลบปลอม 6 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 88% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 80% และค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.824 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแสดงถึงความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก

ตารางที่ 24 ความสัมพันธ์ของการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่าง ๆ ของการเก็บรักษา (วันที่ 2 ถึงวันที่ 5) ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System

ผลการทดสอบ ด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I	ผลการทดสอบ ด้วยเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System		ความไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	บวก	ลบ					
	บวก	42					
ลบ	6	24					

จากตารางที่ 24 เมื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียแบบจำลอง ณ วันต่างๆ ของการเก็บรักษาด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I เปรียบเทียบกับผลจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System พบว่า เทคนิค HDA/SYBR Green I ให้ผลลบปลอม 6 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 88% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 80% และค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.824 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแสดงถึงความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตยังคงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการรักษาผู้ป่วย และในประเทศไทยมีอัตราการใช้เกล็ดโลหิตเพิ่มขึ้นทุกปีจากรายงานผลการดำเนินงานประจำปีของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (95) ดังนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีความปลอดภัยจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต เนื่องจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่า ซึ่งอุณหภูมิและสภาวะดังกล่าวสามารถเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนเข้ามาในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตได้ การศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตกับระยะเวลาในการเก็บรักษา (9) ซึ่งหากผู้ป่วยได้รับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย อาจเกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิตอย่างรวดเร็วและรุนแรง นำไปสู่การเสียชีวิตได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย และสภาวะของผู้ป่วยขณะนั้น (10)

ในปี ค.ศ. 2004 สมาคมธนาคารโลหิตแห่งสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดมาตรฐานในโรงงานธนาคารโลหิต ทำการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตก่อนนำไปใช้กับผู้ป่วย เพื่อลดอาการไม่พึงประสงค์จากการติดเชื้อแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนเข้ามา และในปี ค.ศ. 2019 ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ผู้มีหน้าที่ในจัดหาและเตรียมผลิตภัณฑ์โลหิตเพื่อสำรองใช้ในประเทศไทย เริ่มมีการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตทุกยูนิต ด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ BD BECTEC ทำให้พบอัตราการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่สูงขึ้น (96) แม้ว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อยังคงเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์โลหิตต่าง ๆ แต่ด้วยข้อจำกัดของห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิต ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียภายในพื้นที่ปฏิบัติการ ประกอบกับใช้เวลาในการทดสอบเพาะเลี้ยงนาน ทำให้เทคนิคดังกล่าวไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานประจำ เนื่องจากผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตมีอายุการเก็บรักษาที่สั้นประมาณ 5 วัน และหากต้องการที่จะตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในช่วงระยะเวลาที่ใกล้กับการนำเกล็ดโลหิตไปให้ผู้ป่วยมากที่สุด จึงจำเป็นต้องใช้วิธีที่ให้ผลรวดเร็ว หรือเป็นวิธีที่สามารถอ่าน

ผลได้ในระยะเวลาสั้นและไม่ต้องทำการทดสอบนานข้ามวัน ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยา มาใช้ในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตเพิ่มมากขึ้น อาทิ เช่น เทคนิค Real-time PCR หรือเทคนิค PCR อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวยังไม่เป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในงานประจำ สำหรับการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต เนื่องจากมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายที่สูง และต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะซึ่งต้องมีการดูแลรักษาต่อเนื่อง (13) ในขณะที่เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ (Isothermal amplification) ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีจุดเด่นหลายประการ อาทิเช่น มีขั้นตอนในการทดลองไม่ซับซ้อน มีความสะดวก รวดเร็ว สามารถอ่านผลด้วยเทคนิคต่าง ๆ ได้ง่าย มีความไวในการตรวจจับและความจำเพาะต่อเป้าหมายในการตรวจสูง และไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะ โดยใช้เพียงกล่องควบคุมอุณหภูมิที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ สำหรับขั้นตอนการบ่มเพื่อดำเนินปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จึงเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์จำกัด ไม่มีเครื่องมือเฉพาะทาง (15) ดังนั้นหากสามารถประยุกต์ใช้หลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ สำหรับตรวจวินิจฉัยคัดกรองการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ก่อนนำผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตไปให้กับผู้ป่วย ซึ่งเป็นการช่วยลดความเสี่ยงของการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิตได้

การศึกษารั้วนี้เลือกเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ที่ชื่อว่า Helicase dependent amplification หรือ HDA ร่วมกับการอ่านผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยตาเปล่า ภายหลังเติมสี SYBR Green I เพื่อพัฒนาเทคนิคที่ใช้ได้ง่ายสำหรับตรวจวินิจฉัยการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ซึ่งเทคนิค HDA อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ Helicase และ Polymerase ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 65 องศาเซลเซียส ร่วมกับ Primer ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมเป้าหมาย โดยใช้หลักการออกแบบ Primer ที่ง่าย ไม่ซับซ้อน โดยขั้นตอนการทำปฏิกิริยาใช้ระยะเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามจากการศึกษานำร่องในช่วงเริ่มต้นของผู้วิจัย ได้มีการทดสอบนำเทคนิค Recombinase polymerase amplification หรือ RPA มาใช้ในการพัฒนาตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต แต่พบว่ามีข้อจำกัดที่ไม่สามารถใช้งานวิจัย เนื่องจากน้ำยา 20X core reaction mix ของชุดน้ำยา RPA มี DNA ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K12 และ BL21 ปนอยู่ ส่งผลให้ตัวควบคุมลบมีผลการทดสอบเป็นบวก เพราะ

Primer ที่ใช้ถูกออกแบบให้จำเพาะกับยีน 16s rRNA ซึ่งพบในแบคทีเรียเกือบทุกสายพันธุ์ ทำให้ไม่สามารถใช้เทคนิค RPA สำหรับการตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตได้ (97)

หนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพการทำปฏิกิริยาของเทคนิค HDA ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต คือ ขั้นตอนการสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในถุงบรรจุผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ทั้งนี้เนื่องมาจากหากมีการปนเปื้อนของ Human genomic DNA ปริมาณมากกว่า 200 ng ขึ้นไป จะยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา HDA ได้ (98) ส่งผลให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจหา ทำให้เกิดลบล้อมตามมา ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม QIAamp DNA Microbiome ซึ่งมีคุณสมบัติในการกำจัด DNA ของ Host cell และทำให้ DNA ของเชื้อแบคทีเรียมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น โดยชุดสกัดดังกล่าวอาศัยคุณลักษณะของเซลล์ที่แตกต่างกันระหว่าง host cell และเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้สารละลาย Benzonase ในการทำให้ Host cell แตกออก และใช้สารละลาย ATL เพื่อทำลายสารพันธุกรรมของ Host cell หลังจากนั้นจะทำลายเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยคุณสมบัติเชิงกล อาทิเช่น การใช้เครื่อง Tissue lyser LT เครื่อง Fast step-24 หรือการใช้เครื่อง Vortex และทำให้ DNA เชื้อแบคทีเรียมีความบริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีของสารเคมีหลายชนิด อาทิเช่น สารละลาย Proteinase K สารละลายบัฟเฟอร์ APL2 สารละลาย Ethanol สารละลายบัฟเฟอร์ AW1 สารละลายบัฟเฟอร์ AW2 และสารละลายบัฟเฟอร์ AVE จึงทำให้สารพันธุกรรมที่สกัดได้จากชุดสกัด QIAamp DNA Microbiome ไม่มีการปนเปื้อนของ Human genomic DNA หรือมีการปนเปื้อนของ Human genomic DNA ในระดับต่ำที่ไม่รบกวนปฏิกิริยา HDA จากการศึกษาของ Bjerre และคณะ พบว่าชุดสกัด QIAamp DNA Microbiome สามารถลดปริมาณ Human genomic DNA ในสิ่งส่งตรวจได้ถึง 57% และยังคงรักษาสภาพของยีน 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรียได้ถึง 95% (99)

การออกแบบ Primer สำหรับการศึกษานี้ ถูกออกแบบให้จำเพาะต่อส่วนบริเวณอนุรักษ์ (Conserved region) ของยีน 16s rRNA ซึ่งเป็นยีนที่พบในแบคทีเรียเกือบทุกสายพันธุ์ มีความผันแปรทางวิวัฒนาการต่ำและมีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่พบจากการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ อาทิเช่น เชื้อกลุ่ม coagulase-negative staphylococci (เช่น เชื้อ *S. epidermidis*) เชื้อ *S. aureus* เชื้อกลุ่ม viridans group streptococci เชื้อ *Bacillus spp.* เชื้อ *Corynebacteria spp.* เชื้อ *E. coli* เชื้อ *Salmonella spp.* เชื้อ *Serratia spp.*

เชื้อ *Enterobacter* spp. และเชื้อ *P. aeruginosa* (31, 45, 51) ทำให้จำเป็นต้องอาศัยคุณสมบัติของยีน 16s rRNA เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตให้มีความครอบคลุมมากที่สุด การศึกษาของ Tamimount และคณะ ได้ทดสอบใช้เทคนิค Real-time PCR ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจำนวน 2,146 ยูนิต โดยใช้ยีน 16S rRNA ของยูแบคทีเรีย พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียคิดเป็น 0.83% ซึ่งเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นเชื้อประจำถิ่นบริเวณผิวหนัง สามารถจำแนกชนิดได้เป็น เชื้อ *Propionibacterium* spp. จำนวน 7 ยูนิต เชื้อ *Staphylococcus* spp. จำนวน 6 ยูนิต เชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 2 ยูนิต เชื้อ *Micrococcus* spp. จำนวน 2 ยูนิต และเชื้อ *Peptostreptococcus* spp. จำนวน 1 ยูนิต (53) ดังนั้นการตรวจหายีน 16s rRNA ในการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตมีข้อดีคือสามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียได้เกือบทุกสายพันธุ์ แม้ว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะมีรูปร่างลักษณะ คุณสมบัติและความสามารถในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน นอกจากนี้การออกแบบ Primer ของปฏิกิริยา HDA ยังต้องคำนึงถึงขนาดผลผลิต ภายหลังจากเสร็จสิ้นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยขนาดของผลผลิตของปฏิกิริยา HDA ที่เหมาะสมควรมีขนาดสั้นประมาณ 80 – 120 bp เนื่องจากกระบวนการทำงานของเอนไซม์ Helicase มีความซับซ้อนและเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพและความเร็วต่ำในการแยก DNA สายคู่ จึงเหมาะสมกับการแยก DNA ต้นแบบสายสั้น (15, 100) นอกจากนี้ต้องมีปริมาณมากพอให้สัมพันธ์กับปริมาณ DNA ต้นแบบ และเอนไซม์ *Bst* DNA Polymerase ในการเพิ่มอัตราความเร็วในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ (15)

การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเทคนิค HDA สามารถทำได้หลายวิธี อาทิเช่น การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Real time ซึ่งต้องอาศัยเครื่องตรวจวิเคราะห์แบบ Real time ในการตรวจผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมระหว่างปฏิกิริยากำลังดำเนิน โดยอาศัยการตรวจวัดการเปล่งแสงของฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะ ในปัจจุบันสามารถประยุกต์ใช้เทคนิค HDA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Real time ที่อาศัยหลักการต่าง ๆ อาทิเช่น Molecular beacons และ MGB Eclipse probes จึงสามารถอ่านผลได้รวดเร็วไม่ต้องรอให้เสร็จสิ้นปฏิกิริยา แต่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะ ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง (74) การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ซึ่งต้องอาศัยอุปกรณ์จำเพาะ ได้แก่ เครื่อง Power supply สำหรับจ่ายกระแสไฟฟ้าและ Horizontal gel tray สำหรับวางแผ่นเจล การตรวจสอบ

ผลผลิตด้วยหลักการ Lateral flow ต้องอาศัยชุดตรวจวัดที่ถูกออกแบบโดยใช้หลักการ Immunoassay และการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ซึ่งสามารถอ่านผลการเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่า โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะ การศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกใช้การตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา HDA ด้วยสี SYBR Green I เนื่องจากสามารถอ่านผลปฏิกิริยาได้ทันทีภายหลังการเติมสี โดยที่ไม่ต้องมีการบ่ม จึงไม่ต้องใช้อุปกรณ์จำเพาะอื่นเพิ่มเติม และสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ จึงมีความเหมาะสมที่นำมาพัฒนาร่วมกับเทคนิค HDA เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตในห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิต ก่อนนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปใช้กับผู้ป่วย เนื่องจากสามารถใช้อุปกรณ์เพียงกล่องควบคุมอุณหภูมิ ที่ถูกใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการ ธนาคารโลหิต จึงมีความสะดวก รวดเร็วและเหมาะสมในทางปฏิบัติ

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา HDA สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ ยีน 16s rRNA ร่วมกับการตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I เพื่อใช้การตรวจหาการปนเปื้อนของ เชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต จาก DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ มักพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจากการศึกษาที่ผ่านมา (31, 45, 51) สภาวะของปฏิกิริยา HDA ที่เหมาะสมที่พัฒนาได้ในการศึกษาครั้งนี้ ประกอบด้วย ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Primer คือ 100 nmol สามารถทำปฏิกิริยากับ DNA ต้นแบบได้ที่ 20 ng ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ MgSO₄ และ NaCl ที่ 4 mM และ 40 mM ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการทำ ปฏิกิริยาที่สามารถมองเห็นผลผลิตได้ชัดเจนตั้งแต่ 60 นาทีขึ้นไป ในขณะที่การอ่านผลปฏิกิริยา ใช้ความเข้มข้นของสี SYBR Green I ที่เหมาะสม เท่ากับ 400X

ความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา HDA อยู่ที่ประมาณ 75 – 100 nmol ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยา PCR ที่มีความเข้มข้น 0.1 – 1 μ mol ทั้งนี้ เพื่อลดโอกาสเกิด Primer dimer ที่อาจพบได้ในกรณีที่มีความเข้มข้นของ Primer มากเกินไป (15) การศึกษาครั้งนี้ พบว่าความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสม เท่ากับ 100 nmol ในขณะที่ Primer ความเข้มข้นเท่ากับ 200 nmol ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ และพบ Primer dimer ในปริมาณที่มาก และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมเท่ากับ 20 ng

ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่ตรวจหายีน E7 ของ Human papilloma virus สายพันธุ์ 16 และ 18 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งปากมดลูก ด้วยเทคนิค HDA พบว่าความเข้มข้นของ Primer และ DNA ที่เหมาะสม เท่ากับ 100 nmol และ 50 ng ตามลำดับ (70)

สารละลาย $MgSO_4$ และ NaCl ในปฏิกิริยา HDA มีผลต่อการส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Helicase และ *Bst* polymerase ให้ปฏิกิริยาการสร้างสาย DNA ดำเนินต่อไปได้ (15) ความเข้มข้นของสารละลาย $MgSO_4$ และ NaCl ที่เหมาะสมตามข้อกำหนดของบริษัทผู้ผลิต เท่ากับ 3 – 4.5 mM และ 20 – 50 mM ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษารั้งนี้ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย $MgSO_4$ และ NaCl ที่เหมาะสม เท่ากับ 4 mM และ 40 mM ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พัฒนาเทคนิค HDA เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อ *C. difficile* ที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วง พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย $MgSO_4$ และ NaCl ที่เหมาะสม เท่ากับ 4 mM และ 40 mM ตามลำดับ (101)

การศึกษาก่อนหน้าพบว่าเทคนิค HDA สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน งานวิจัยของ Montre และคณะ ทำการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* โดยตรวจหายีน IS6110 ด้วยเทคนิค HDA พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 65 องศาเซลเซียส 30 นาที ตามลำดับ (102) งานวิจัยของ Barbieri และคณะ ทำการตรวจหาเชื้อ Human papilloma virus สายพันธุ์ 16 และ 18 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งปากมดลูก ด้วยเทคนิค HDA พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 65 องศาเซลเซียส 90 นาที ตามลำดับ (70) และการศึกษาของ Pooria Gill และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค HDA ร่วมกับ Gold nanoparticle probes เพื่อตรวจหายีน *ureC* ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 60 องศาเซลเซียส 45 นาที ตามลำดับ (72) อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำปฏิกิริยา HDA อยู่ระหว่าง 60 – 65 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ Helicase (15) และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยามีความแตกต่างกันขึ้นกับสัดส่วนความเหมาะสมขององค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา อาทิเช่น ความเข้มข้นของ Primer และเอนไซม์ Helicase การศึกษาของ Montre และคณะ พบว่าการปรับความเข้มข้นของ Primer และเอนไซม์ Helicase จาก 75 nmol เป็น 200 nmol และจาก 1X เป็น 3X ตามลำดับ มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถลดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาจาก 60 นาที เป็น 30 นาที (102) ทั้งนี้

ควรคำนึงถึงการเกิด Primer dimer และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบไม่จำเพาะ ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มความเข้มข้นของ Primer (103)

สี SYBR Green I มีคุณสมบัติในการจับกับร่องขนาดเล็กหรือ Minor groove ของ DNA สายคู่ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่นสูงสุด 497 nm และมีค่าการเปล่งแสงสีเขียวที่ความยาวคลื่นสูงสุด 520 nm ทำให้เมื่อเกิดผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม สี SYBR Green I จึงเข้าจับกับ DNA ที่เป็นผลผลิต และสามารถมองเห็นเป็นสีเขียวได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ หรือเกิดการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ทั้งนี้ความชัดเจนของสีที่สามารถอ่านได้ด้วยตาเปล่าขึ้นอยู่กับความเข้มของสี SYBR Green I และความเข้มข้นของผลผลิตที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามสี SYBR Green I ยังคงมีข้อจำกัดบางประการ ที่อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ เนื่องจาก สี SYBR Green I สามารถจับกับร่องขนาดเล็ก ของ DNA สายคู่ได้อย่างไม่จำเพาะ ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบไม่จำเพาะ หรือ Primer dimer ดังนั้นการลดการเกิดผลบวกปลอมอันเนื่องมาจาก สี SYBR Green I จึงจำเป็นต้องใช้ DNA ที่มีความบริสุทธิ์และควรออกแบบ Primer ให้มีความจำเพาะ รวมไปถึงการกำหนดสถานะของปฏิกิริยาที่เหมาะสมและลดโอกาสการเกิดผลผลิตที่ไม่จำเพาะต่าง ๆ (82, 104) การศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี SYBR Green I เท่ากับ 400X ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก (สารละลายสีเขียว) และลบ (สารละลายสีส้ม) ได้อย่างชัดเจน เมื่ออ่านผลด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Singpanomchai และคณะ ที่พัฒนาเทคนิค RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้สี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X (83)

เทคนิค HDA/SYBR Green I ที่ได้พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะสูงต่อส่วนบริเวณอนุรักษ์ (Conserved region) ของยีน 16s rRNA ซึ่งเป็นยีนที่พบในแบคทีเรียทุกชนิด เนื่องจากไม่พบปฏิกิริยาข้ามในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA สิ่งมีชีวิตสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีโอกาสพบการปนเปื้อนได้ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ได้แก่ เชื้อกลุ่มยีสต์ ประกอบไปด้วยเชื้อ *C. albicans* และเชื้อ *C. neoformans* เชื้อราสาย ประกอบไปด้วย เชื้อ *Aspergillus* spp. และเชื้อ *Rhizopus* spp. เชื้อไวรัสตับอักเสบบี และสารพันธุกรรมของมนุษย์ การศึกษาก่อนหน้าใช้เทคนิค HDA ร่วมกับ Lateral flow ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ พบว่ามีความจำเพาะสูง ไม่พบปฏิกิริยาข้ามในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA ของเชื้อแบคทีเรีย

สายพันธุ์อื่นที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ ประกอบไปด้วยเชื้อ *E. coli* เชื้อ *S. aureus* เชื้อ *Listeria monocytogenes* เชื้อ *Shigella* และเชื้อ *Campylobacter jejuni* (105)

การทดสอบหา Limit of detection ในการศึกษาค้างนี้ เป็นการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นน้อยที่สุดของ DNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* ที่เทคนิค HDA สามารถตรวจสอบหายีน 16s rRNA ได้ พบว่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของ DNA ต้นแบบที่เทคนิค HDA สามารถตรวจได้ด้วยการเติมสี SYBR Green I และเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% มีค่าเท่ากับ 1 และ 0.1 ng ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบปฏิกิริยา HDA ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis สามารถตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากสี UltraPower DNA/RNA safe dye ที่ใช้ในขั้นตอนของการตรวจสอบผลผลิต DNA สายคู่ มีความไวสูงกว่าสี SYBR Green I กล่าวคือ สี UltraPower DNA/RNA safe dye เมื่อใช้ร่วมกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis สามารถตรวจสอบผลผลิต DNA สายคู่ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดเท่ากับ 20 pg (106) ในขณะที่สี SYBR Green I เมื่อใช้ร่วมกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้เท่ากับ 60 pg เมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง Transilluminator (107) นอกจากนี้การอ่านผลที่ได้จากสีฟลูออเรสเซนต์ด้วยตาเปล่าโดยมีแสงสีขาวเป็นตัวกระตุ้น จะมองเห็นการเปล่งแสงของสีฟลูออเรสเซนต์ได้ยากกว่าเมื่อถูกกระตุ้นด้วยช่วงคลื่นแสงที่จำเพาะกับสีนั้น (100) จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ตรวจสอบผลผลิต HDA ด้วยสี SYBR Green I ด้วยตาเปล่า สามารถตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบได้ในปริมาณที่สูงกว่าเทคนิค Agarose gel electrophoresis

เทคนิค HDA ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้น ถูกนำมาทดสอบตรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตแบบจำลอง ใช้เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างควบคุมบวก จำนวนทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *S. aureus* (ATCC29523) เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *B. cereus* เชื้อ *E. coli* (ATCC25922) เชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) และเชื้อ *S. marcescens* ความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 1 CFU/ml ณ วันที่ 0 ซึ่งจำลองสภาพของการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นในวันแรกที่ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตถูกจัดเตรียมเสร็จและเริ่มการเก็บรักษา เนื่องจากแนวทางการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์

เกล็ดโลหิตในปัจจุบัน ต้องการวิธีการตรวจที่มีความไวสูงที่สุด ที่สามารถตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้ที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดคือ 1 CFU/ml (90) และทำการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตแบบจำลองซ้ำในทุกวัน จนถึงวันที่ 5 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเก็บรักษา เทคนิค HDA/SYBR Green I สามารถตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวกที่มักพบว่าเป็นเชื้อที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต (31, 45, 51) ได้ครอบคลุมทั้งหมด 6 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นเป็นไปได้ในการนำเทคนิค HDA/SYBR Green I ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ในห้องปฏิบัติการทางธนาคารเลือด อย่างไรก็ตามเทคนิค HDA/SYBR Green I ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียตัวควบคุมบวกได้ทุกสายพันธุ์ในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีอายุเฉลี่ยตั้งแต่ 2 วันขึ้นไป โดยตรวจพบได้ตั้งแต่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.9×10^3 CFU/ml และไม่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อส่วนใหญ่ได้ในวันแรกที่ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตถูกจัดเตรียมเสร็จและเริ่มการเก็บรักษา ในที่นี้คือวันที่ 0 จนถึงวันที่ 1 ของการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับผลของเทคนิค HDA/AGE เป็นที่น่าสนใจว่าในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC27853) HDA/SYBR Green I และเทคนิค HDA/AGE ตรวจพบเชื้อได้ในวันที่ 4 และ 3 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากข้อจำกัดของสี SYBR Green I ที่มีความไวต่ำกว่าสี UltraPower DNA/RNA safe dye ที่ถูกใช้ในเทคนิค Agarose gel electrophoresis (106, 107) และข้อจำกัดในการอ่านผลที่ได้จากสีฟลูออเรสเซนต์ด้วยตาเปล่า (108) ตามที่ได้อธิบายข้างต้น อย่างไรก็ตามทั้งเทคนิค HDA/SYBR Green I และเทคนิค HDA/AGE ใช้ระยะเวลาการทดสอบที่รวดเร็ว โดยสามารถทำการทดสอบและอ่านผลได้ภายใน 1 ชั่วโมง และ 1 ชั่วโมง 40 นาที ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาร่วมกับอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ กล่องควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งเป็นอุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิต เทคนิค HDA/SYBR Green I จึงมีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการทางธนาคารโลหิต เพื่อตรวจคัดกรองการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ที่มีอายุ 2 วันขึ้นไป ก่อนนำไปใช้กับผู้ป่วยในทันที แต่อาจมีข้อจำกัดทางด้านความไวเมื่อนำมาใช้ตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่เพิ่งจัดเตรียมเสร็จ หรือมีอายุการเก็บรักษาต่ำกว่า 2 วัน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้มีการพัฒนาเทคนิค HDA ร่วมกับ Gold nanoparticle probes เพื่อใช้ตรวจหา *ureC* ของ *Helicobacter pylori* และสามารถตรวจหาเชื้อได้ต่ำสุดเพียง 10 CFU/ml (72) ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต ในการพัฒนาเทคนิค

ตรวจวัดผลผลิตจากปฏิกิริยา HDA เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต

การเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและนับจำนวนโคโลนี แม้ว่าเป็นวิธีมาตรฐานทางพีโนไทป์ ในงานด้านจุลชีววิทยา และสามารถตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเก็บรักษา โดยตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 CFU/ml แต่ใช้ระยะเวลาในการทดสอบนาน ประมาณ 24 ชั่วโมง ซึ่งอาจไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ตรวจคัดกรองการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อนนำผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตไปใช้กับผู้ป่วยได้โดยทันที นอกจากนี้ยังต้องอาศัยการทดสอบทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกที่จำเป็นต้องแยกเป็นพื้นที่เฉพาะ ไม่สามารถรวมอยู่กับห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิตได้ รวมไปถึงเครื่องมือวิทยาศาสตร์เพื่อประกอบการวินิจฉัยหลายชนิด (54)

การตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตด้วยเทคนิค PCR ใช้เวลาทดสอบทั้งสิ้น ประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที ซึ่งมากกว่าเทคนิค HDA/SYBR Green I และเทคนิค HDA/AGE อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR มีความไวสูง สามารถตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้ตั้งแต่วันที่แรกที่ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตถูกจัดเตรียมเสร็จและเริ่มการเก็บรักษา (วันที่ 0) ที่มีเชื้อเพียง 1 CFU/ml การศึกษาก่อนหน้าใช้เทคนิค Real-time PCR ตรวจหาชิ้น 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรียที่ฉีดเข้าไปในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต โดยสามารถตรวจพบเชื้อ *Enterobacter cloacae* และ *S. marcescens* ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 CFU/ml และตรวจพบเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 CFU/ml (10⁹) เทคนิค PCR ที่สามารถตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าเทคนิค HDA การศึกษาของ Kolm และคณะ ได้ตรวจหาเชื้อ *Enterococcus* ในแหล่งน้ำด้วยเทคนิค HDA เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR พบว่า ที่ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบ เท่ากับ 10 ng ทั้ง 2 เทคนิค สามารถตรวจหาเชื้อได้ทั้งหมดเท่ากับ 100% แต่หากความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบลดลงเท่ากับ 0.0001 ng ความสามารถในการตรวจหาเชื้อของเทคนิค HDA ลดลงเท่ากับ 85% ในขณะที่เทคนิค PCR ยังคงสามารถตรวจหาเชื้อได้เท่ากับ 100% (110) เทคนิค PCR เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่มีข้อจำกัดที่ต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะ เช่น Thermocycler ร่วมกับเครื่องมือทดสอบ Agarose gel electrophoresis ซึ่งไม่ใช่เครื่องมือพื้นฐานในงานประจำทางห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด ราคาต่อการทดสอบค่อนข้างสูง จึงเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิต

การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตด้วยเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการแนะนำโดยสมาคมธนาคารโลหิตแห่งสหรัฐอเมริกา และมีความไวสูง สามารถตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้ตั้งแต่ในวันแรกที่ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ถูกจัดเตรียมเสร็จ และเริ่มการเก็บรักษา (วันที่ 0) ที่มีเชื้อเพียง 1 CFU/ml แต่ต้องใช้ระยะเวลาการทดสอบนานถึง 10 ชั่วโมง 54 นาที เป็นต้นไป จึงจะสามารถตรวจพบแบคทีเรียที่ปนเปื้อนได้ สอดคล้องการศึกษาของ Brecher และคณะ ที่ใช้เครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้ระดับต่ำที่สุดมีค่าเท่ากับ 6 CFU/ml (111) แม้ว่าเครื่อง BacT/Alert System มีความไวสูง แต่ใช้ระยะเวลาทดสอบนาน ซึ่งอาจไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ตรวจคัดกรองการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ก่อนนำผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตไปใช้กับผู้ป่วยได้ โดยทันที อย่างไรก็ตามเนื่องจากประสิทธิภาพความไวที่สูงของเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System จึงเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่เพิ่งจัดเตรียมเสร็จ ก่อนนำไปจัดเก็บรักษา นอกจากนี้จากการศึกษาของ German Evaluation of Regular Bacterial Monitoring Study พบว่าเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert ให้ผลบวกปลอมได้ระหว่าง 0.2% ถึง 3.2% (112) และในการตรวจหาการปนเปื้อนจำเป็นต้องใช้เกล็ดโลหิตปริมาตรมากถึง 5-10 ml ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตชนิด Platelet concentrates ที่มีปริมาตรรวมเพียง 60 ml/unit (53) ในขณะที่เทคนิค HDA/SYBR Green I เทคนิค HDA/AGE และเทคนิค PCR ใช้ปริมาณตัวอย่างในการตรวจหาการปนเปื้อนที่น้อยกว่า เครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System เป็นเครื่องมือที่จำเพาะนอกเหนือจากเครื่องมือประจำในห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิตและมีราคาแพง ทำให้ราคาต่อการทดสอบสูง จึงเป็นข้อจำกัดของการนำมาใช้ในงานธนาคารโลหิตของห้องปฏิบัติในหลายแห่ง

เทคนิค HDA/SYBR Green I มีความไวและความจำเพาะสูง (96% และ 100% ตามลำดับ) ในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ณ วันที่เก็บรักษาวันต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค HDA/AGE โดยพบว่ามีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก อย่างไรก็ตามพบว่า มีผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตจำลองจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่เทคนิค HDA/SYBR Green I ให้ผลลบปลอม ทั้งนี้อาจเกิดจากความไวของการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่มีความต่ำกว่าสี UltraPower DNA/RNA safe dye ที่ถูกใช้ในเทคนิค Agarose gel electrophoresis (106, 107) และข้อจำกัด

ในการอ่านผลที่ได้จากสีฟลูออเรสเซนต์ด้วยตาเปล่า (108) ตามที่ได้อธิบายข้างต้น เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR การนับจำนวนโคโลนี และเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System พบว่าเทคนิค HDA/SYBR Green I มีความจำเพาะสูงเท่ากับ 100% แต่มีความไวอยู่ในช่วงระหว่าง 63-76% จึงทำให้มีความสอดคล้องกันในระดับปานกลางถึงดี ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิค HDA/SYBR Green I ไม่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อส่วนใหญ่ได้ในวันที่ 0 ถึง 1 ของการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามในงานประจำของห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด มักเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีอายุตั้งแต่ 1-2 วันขึ้นไปให้กับผู้ป่วย เนื่องจากต้องรอผลการทดสอบการปนเปื้อน (94) ดังนั้นหากนำเทคนิค HDA/SYBR Green I มาตรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ที่ทำการเก็บรักษาตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไป พบว่ามีความไวที่สูงขึ้น โดยมีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 96% และ 100% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค HDA/AGE และมีความสอดคล้องอยู่ในระดับดีมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR การนับจำนวนโคโลนี และเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System พบว่าเทคนิค HDA/SYBR Green I มีความไวและจำเพาะเท่ากับ 88% และ 100% ตามลำดับ และมีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้ จึงแสดงให้เห็นว่าเทคนิค HDA/SYBR Green I มีประสิทธิภาพดีในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่มีอายุการจัดเก็บรักษาในระยะกลางไปจนถึงระยะท้าย เช่น ตั้งแต่วันที่ 2 ไปจนถึงวันที่ 5 ของการเก็บรักษา

ปัจจัยที่ส่งผลต่อระยะเวลาในการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I อาจขึ้นอยู่กับอัตราการแบ่งตัวของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งส่งผลให้เชื้อแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น เชื้อ *E. coli* มีอัตราการแบ่งตัวแต่ละครั้งเท่ากับ 17 นาที ในขณะที่เชื้อ *S. aureus* มีอัตราการแบ่งตัวแต่ละครั้งเท่ากับ 27-30 นาที (113) นอกจากนี้ปัจจัยที่สำคัญอีกประการ คือปริมาณ Human genomic DNA ที่สามารถรบกวนการเกิดปฏิกิริยา HDA พบว่าผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตแต่ละถุงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีปริมาณ Human genomic DNA ที่แตกต่างกัน เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต ไม่สามารถควบคุมปริมาณเม็ดโลหิตขาวให้เท่ากันได้ในแต่ละถุง อย่างไรก็ตามปริมาณเม็ดโลหิตขาวที่ปนเปื้อนเข้ามาในถุงผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต มีปริมาณไม่เกิน 2×10^8 เซลล์/ยูนิต ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานของสมาคมธนาคารโลหิตแห่งสหรัฐอเมริกา (27, 28)

ความไวของเทคนิค HDA/SYBR Green I นอกจากจะขึ้นอยู่กับสปี SYBR Green I และการอ่านผลที่ได้จากสปีฟลูออเรสเซนซ์ด้วยตาเปล่า ยังอาจขึ้นอยู่กับคุณภาพและปริมาณของ DNA ต้นแบบที่ใช้ในปฏิกิริยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA ต้นแบบที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจจากร่างกายมนุษย์ เนื่องมาจากชิ้นส่วนของ Human genomic DNA อาจเข้าแย่งจับกับเอนไซม์ Helicase ทำให้รบกวนการเกิดปฏิกิริยา HDA และอาจลดประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อ DNA ต้นแบบมีในปริมาณน้อย (98) ดังนั้นกรรมวิธีสกัด DNA ต้นแบบที่สามารถลดการปนเปื้อนของ Human genomic DNA ในสิ่งส่งตรวจจึงมีความสำคัญเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของปฏิกิริยา HDA ให้ดีขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อน ก่อนกระบวนการสกัด DNA อาจส่งผลต่อการเพิ่มความไวของเทคนิค HDA/SYBR Green I และ HDA/AGE ได้ จากการศึกษาในาร่องเพิ่มเติมโดยการสุ่มผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตในวันที่ 0 ถึง 1 ของการเก็บรักษา ที่ไม่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I และ HDA/AGE มาทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปสกัด DNA และตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียอีกครั้งด้วยเทคนิค HDA/SYBR Green I และ HDA/AGE พบว่าสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้ที่วันที่ 1 ของการเก็บรักษา ดังนั้นการนำผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่ถูกจัดเตรียมเสร็จและเริ่มการเก็บรักษา หรือที่ถูกเก็บรักษาในวันที่ 1 มาเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย อาจช่วยเพิ่มความไวของเทคนิค HDA/SYBR Green I และ HDA/AGE ได้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต มีความจำเป็นในงานธนาคารโลหิต เพื่อป้องกันการให้ผลิตภัณฑ์ที่อาจปนเปื้อนแก่ผู้รับบริจาคหรือผู้ป่วย และช่วยลดอัตราการติดเชื้อหรือเสียชีวิตที่อาจเกิดขึ้น วิธีการตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตควรเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ให้ผลรวดเร็วเนื่องจากเกล็ดเลือดมีอายุการจัดเก็บที่สั้น และราคาไม่แพง

การศึกษาครั้งนี้สามารถพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน มีระยะเวลาทดสอบที่รวดเร็ว และสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต เทคนิคที่พัฒนาขึ้น ได้แก่ เทคนิค HDA/SYBR Green I ซึ่งอาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ Helicase ภายใต้อุณหภูมิคงที่ และอาศัยเพียงกล่องควบคุมอุณหภูมิในการทดสอบและตรวจสอบผลผลิตด้วยการเติมสี SYBR Green I โดยใช้ชุดน้ำยา IsoAmp® II Universal tHDA ร่วมกับ Primer ที่ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน 16s rRNA ที่พบในเชื้อแบคทีเรียทุกชนิด โดยสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา HDA/SYBR Green I ที่ได้พัฒนาขึ้นประกอบด้วย ความเข้มข้นของ Primer 100 nmol ความเข้มข้นของ DNA 20 ng ความเข้มข้นของ MgSO₄ 4 mM ความเข้มข้นของ NaCl 40 mM บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา HDA เติมสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X และตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าทันทีโดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย หากสารละลายเป็นสีเขียว หมายถึง ปฏิกิริยา HDA เป็นบวกเนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หากสารละลายเป็นสีส้ม หมายถึง ปฏิกิริยา HDA เป็นลบเนื่องจากไม่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตที่อายุการเก็บรักษาตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 พบว่า เทคนิค HDA/SYBR Green I มีความไวเริ่มต้นเท่ากับ 63% และมีความจำเพาะ 100% โดยมีค่าสถิติ Kappa เริ่มต้นเท่ากับ 0.478 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแสดงถึงมีความสอดคล้องในตั้งแต่ระดับปานกลางขึ้นไป เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค HDA/AGE เทคนิค PCR การนับจำนวนโคโลนี และผลจากเครื่องอัตโนมัติ BacT/Alert System ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการแนะนำโดยสมาคมธนาคารโลหิตแห่งสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตาม เทคนิค

HDA/SYBR Green I มีค่าความไวที่เพิ่มขึ้น เท่ากับ 88% และมีค่าสถิติ Kappa เริ่มต้นเท่ากับ 0.824 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแสดงถึงมีความสอดคล้องในตั้งแต่ระดับดีมากขึ้นไป เมื่อทำการตรวจ การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตเฉพาะที่มีอายุตั้งแต่ 2 วันขึ้นไป

ตามเทคนิค HDA/SYBR Green I ยังมีข้อจำกัดที่พบได้บางประการ อาทิเช่น หากปริมาณ เชื้อแบคทีเรียค่อนข้างต่ำ เช่น ในระยะแรกของช่วงอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิต อาจทำให้โอกาสการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนค่อนข้างน้อย และอาจถูกรบกวนปฏิกิริยา โดยชิ้นส่วนของ Human genomic DNA ที่ปนอยู่ในสิ่งส่งตรวจ ทำให้ความไวในตรวจมีประสิทธิภาพ ที่ลดลง อย่างไรก็ตามเทคนิค HDA มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน อาศัยเพียงกล่องควบคุมอุณหภูมิที่มีอยู่ใน ห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิตทั่วไปในการทำปฏิกิริยา และให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว หากมีการพัฒนา ปรับปรุงเพิ่มความไวของเทคนิค HDA/SYBR Green I ในอนาคต อาจทำให้เทคนิค HDA/SYBR Green I มีประสิทธิภาพที่ดีมากยิ่งขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับตรวจคัดกรองหาการปนเปื้อน ของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เกล็ดโลหิตในอนาคต

บรรณานุกรม

1. พิมล เชี่ยวศิลป์. ความจำเป็นในการพัฒนางานธนาคารเลือด. วารสารโลหิตและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2535 ม.ค.-มี.ค.;2(1):73-7.
2. Ribault S, Harper K, Grave L, Lafontaine C, Nannini P, Raimondo A, et al. Rapid screening method for detection of bacteria in platelet concentrates. J Clin Microbiol. 2004 May;42(5):1903-8. doi:10.1128/jcm.42.5.1903-1908.2004 PubMed PMID: 15131147; PubMed Central PMCID: PMC404662.
3. Girgis SA, Ismail GA, Bahgat FE, Ali IK, Rashad SS, Ahmed SF. Rapid detection of bacterial contamination in platelet concentrates, by polymerase chain reaction and DNA sequencing in comparison to conventional automated culture. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014;3(4):38-52.
4. Serious Hazards of Transfusion. Annual SHOT report 2017 [Internet]. Manchester: Serious Hazards of Transfusion; 2018 [cited 2018 Jul 15]. 206 p. Available from: <https://www.shotuk.org/wp-content/uploads/myimages/SHOT-Report-2017-WEB-Final-v3-02-8-18.pdf>
5. Food and Drug Administration. Fatalities reported to FDA Following blood collection and transfusion annual summary for FY2016 [Internet]. 2016 [cited 2018 Jul 15]. 15 p. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/safetyavailability/reportapblem/transfusiondonationfatalities/ucm598243.pdf>
6. Ibáñez-Cervantes G, Bello-López JM, Fernández-Sánchez V, Domínguez-Mendoza CA, Acevedo-Alfaro LI. Prevalence of bacterial contamination in platelet concentrates at the National Center of Blood Transfusion (Mexico). Transfus Clin Biol. 2017 Jun;24(2):56-61. Epub 2017 Apr 12. doi:10.1016/j.tracli.2017.03.003 PubMed PMID: 28412024.
7. Farzad BB, Farshad B, Zahra B, Nahid A, Mahsa KB. Bacterial contamination of

platelet products in the Blood Transfusion Center of Isfahan, Iran. *GMS Hyg Infect Control*. 2016 Nov 17;11:Doc23. doi:10.3205/dgkh000283 PubMed PMID: 28066700; PubMed Central PMCID: PMC5174754.

8. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*. 2007 Sep;45(9):2761-4. Epub 2007 Jul 11. doi:10.1128/JCM.01228-07 PubMed PMID: 17626177; PubMed Central PMCID: PMC2045242.

9. Buchholz DH, Young VM, Friedman NR, Reilly JA, Mardiney MRJ. Detection and quantitation of bacteria in platelet products stored at ambient temperature. *Transfusion*. 1973 Sep-Oct;13(5):268-75. doi:10.1111/j.1537-2995.1973.tb05488.x PubMed PMID: 4584291.

10. Jacobs MR, Good CE, Lazarus HM, Yomtovian RA. Relationship between bacterial load, species virulence, and transfusion reaction with transfusion of bacterially contaminated platelets. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr 15;46(8):1214-20. doi:10.1086/529143 PubMed PMID: 18444858.

11. Blajchman MA, Beckers EA, Dickmeiss E, Lin L, Moore G, Muylle L. Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. *Transfus Med Rev*. 2005 Oct;19(4):259-72. doi:10.1016/j.tmr.2005.05.002 PubMed PMID: 16214015.

12. American Association of Blood Banks. Further guidance on methods to detect bacterial contamination of platelet components. *AABB Association Bulletin No. 03-12*. Bethesda, MD: AABB; 2003. 41 p.

13. Palavecino EL, Yomtovian RA, Jacobs MR. Bacterial contamination of platelets. *Transfus Apher Sci*. 2010 Feb;42(1):71-82. Epub 2009 Nov 24. doi:10.1016/j.transci.2009.10.009 PubMed PMID: 19939734.

14. Zanolini LM, Spoto G. Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. *Biosensors (Basel)*. 2012 Dec 27;3(1):18-43.

doi:10.3390/bios3010018 PubMed PMID: 25587397; PubMed Central PMCID: PMC4263587.

15. Barreda-García S, Miranda-Castro R, de-Los-Santos-Álvarez N, Miranda-Ordieres AJ, Lobo-Castañón MJ. Helicase-dependent isothermal amplification: A novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection. *Anal Bioanal Chem.* 2018 Jan;410(3):679-93. Epub 2017 Sep 20. doi:10.1007/s00216-017-0620-3 PubMed PMID: 28932883; PubMed Central PMCID: PMC7079856.
16. Kolm C, Martzy R, Führer M, Mach RL, Krska R, Baumgartner S, et al. Detection of a microbial source tracking marker by isothermal helicase-dependent amplification and a nucleic acid lateral-flow strip test. *Sci Rep.* 2019 Jan 23;9(1):393. doi:10.1038/s41598-018-36749-7 PubMed PMID: 30674936; PubMed Central PMCID: PMC6344534.
17. Hardwick J. Blood processing. *ISBT Sci Ser.* 2008 May 9;3(2):148-76. doi:10.1111/j.1751-2824.2008.00195.x.
18. ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. การบริจาคเกล็ดเลือด [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 20 ก.พ. 2562]. เข้าถึงได้จาก: <https://blood.redcross.or.th/content/บริจาคเกล็ดเลือด>
19. Cushing MM. Platelet products. In: Shaz BH, Hillyer CD, Roshal M, Abrams CS, editors. *Transfusion medicine and hemostasis: Clinical and laboratory aspects.* 2nd ed. London: Elsevier Science; 2013. p. 219-26.
20. พิมล เชี่ยวศิลป์. บทบรรณาธิการ: Apheresis: Regulations and rules. *วารสารโลหิตและเวชศาสตร์บริการโลหิต.* 2549 ก.ค.-ก.ย.;16(3):187-90.
21. Kaplan ZS, Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011 Dec 10;2011(1):51-61. doi:10.1182/asheducation-2011.1.51 PubMed PMID: 22160012.
22. ชัชวาลย์ ศรีสวัสดิ์. การห้ามเลือด. ใน: วรพรรณ ศิริวัฒนอักษร, ชัชวาลย์ ศรีสวัสดิ์, นีโลบล เนื่องตัน, ภัทรบุตร มาศรัตน์, สมทรง เลขะกุล, บรรณาธิการ. E-Book: *ชีวเคมีของเลือด.* พิมพ์ครั้งที่ 4 กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2555. น. 77-94.

23. Michelson AD. Platelets. 4th ed. [place unknown]: Academic press; 2019. 1268 p.
24. Chamnanchanunt S. Bleeding disorder in dengue patients. *J Trop Med Parasit.* 2012;35(1):27-36.
25. สร้อยสองรงค์ พิภุสสดี, พิมล เชี่ยวศิลป์, อุบลวัฒน์ จรุงเรืองฤทธิ์, กิตติ ต่อจรัส, อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์, ดารินทร์ ซอโสติกุล. การใช้โลหิตและส่วนประกอบโลหิตอย่างเหมาะสม. กรุงเทพฯ: ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย; 2554. 217 น.
26. พิมล เชี่ยวศิลป์. Clinical use of blood and blood products. *วารสารโลหิตและเวชศาสตร์บริการโลหิต.* 2536;3(1):69-77.
27. ตรังตรา ลีลาธรรมรงค์, ปิยวดี วิทยาวิวัฒน์, อุบลวัฒน์ จรุงเรืองฤทธิ์, พิมล เชี่ยวศิลป์. คู่มือการปฏิบัติงานเลขที่ PSP 003 ระเบียบปฏิบัติการผลิตส่วนประกอบโลหิตจากถุงชนิด Top and Bottom. กรุงเทพฯ: ฝ่ายผลิตส่วนประกอบโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย; 2559.
28. European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion (CD-P-TS). Guide to preparation, use and quality assurance of blood components. 16th ed. Germany: Druckerei C. H. Beck; 2011. 411 p.
29. Sharma RR, Marwaha N. Leukoreduced blood components: Advantages and strategies for its implementation in developing countries. *Asian J Transfus Sci.* 2010 Jan;4(1):3-8. doi:10.4103/0973-6247.59384 PubMed PMID: 20376259; PubMed Central PMCID: PMC2847337.
30. Pooled leukocyte poor platelet concentrates with platelet additive solution [เอกสารกำกับผลิตภัณฑ์]. กรุงเทพฯ: ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย; 2561.
31. Wagner SJ. Transfusion-transmitted bacterial infection: Risks, sources and interventions. *Vox Sang.* 2004 Apr;86(3):157-63. doi:10.1111/j.0042-9007.2004.00410.x PubMed PMID: 15078249.
32. ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. มาตรฐานงานธนาคารเลือดและงานบริการโลหิต. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: พิมพ์ดี การพิมพ์; 2558.
33. ลลิตา นรเศรษฐ์ธาดา. แนวทางการใช้ส่วนประกอบของเลือด รพ.มหาราชนครเชียงใหม่

[อินเทอร์เน็ต]. 2555 [เข้าถึงเมื่อ 11 ก.พ. 2562]. เข้าถึงได้จาก:

<http://www.med.cmu.ac.th/hospital/blbank/UserFiles/File/Clinical%20use%20of%20Blood%20component.doc>

34. จันทราภา ศรีสวัสดิ์, ตันตณัย นำเบญจพล, วิชัย ประยูรวิวัฒน์. Adverse effects of blood transfusion. วารสารโลหิตและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2543 ต.ค.-ธ.ค.;10(4):305-11.
35. Dasararaju R, Marques MB. Adverse effects of transfusion. Cancer Control. 2015 Jan;22(1):16-25. doi:10.1177/107327481502200104 PubMed PMID: 25504275.
36. พัทณี ภาชิตชาคริต. การให้เลือดและส่วนประกอบของเลือด [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2560 [เข้าถึงเมื่อ 20 ก.พ. 2562]. เข้าถึงได้จาก: <http://elearning-anesswu.com/anesdept/>เอกสารประกอบการเรียน
37. Zaller N, Nelson KE, Aladashvili M, Badridze N, del Rio C, Tsertsvadze T. Risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in Georgia. Eur J Epidemiol. 2004 Jan 1;19(6):547-53. doi:10.1023/b:ejep.0000032352.29173.78 PubMed PMID: 15330127.
38. Ainley LI, Hewitt PE. Haematology patients and the risk of transfusion transmitted infection. Br J Haematol. 2018 Feb;180(4):473-83. Epub 2018 Jan 24. doi:10.1111/bjh.15030 PubMed PMID: 29363748.
39. Karafin MS, Blagg L, Tobian AA, King KE, Ness PM, Savage WJ. ABO antibody titers are not predictive of hemolytic reactions due to plasma-incompatible platelet transfusions. Transfusion. 2012 Oct;52(10):2087-93. Epub 2012 Feb 17. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03574.x PubMed PMID: 22339320; PubMed Central PMCID: PMC3360137.
40. Josephson CD, Castillejo MI, Grima K, Hillyer CD. ABO-mismatched platelet transfusions: strategies to mitigate patient exposure to naturally occurring hemolytic antibodies. Transfus Apher Sci. 2010 Feb;42(1):83-8. Epub 2010 Jan 19. doi:10.1016/j.transci.2009.10.013 PubMed PMID: 20034854.

41. Zhu L, Xu J, Yang X, Shen Z, Wang Y, Zhu F, et al. Detection of bacterial contamination of apheresis platelets in a Chinese Blood Center. *Transfus Med*. 2009 Dec;19(6):357-62. Epub 2009 Aug 28. doi:10.1111/j.1365-3148.2009.00948.x PubMed PMID: 19719475.
42. Ramirez-Arcos S, Goldman M. Bacterial contamination. In: Murphy MF, Roberts DJ, Yazer MH, editors. *Practical transfusion medicine*. 5th ed. NJ: John Wiley & Sons; 2017. p. 168-75.
43. ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. คู่มือการเฝ้าระวังความปลอดภัยของโลหิต. กรุงเทพฯ: อุดมศึกษา; 2558. 69 น.
44. Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Jan;18(1):195-204. doi:10.1128/CMR.18.1.195-204.2005 PubMed PMID: 15653826; PubMed Central PMCID: PMC544173.
45. Védy D, Robert D, Gasparini D, Canellini G, Waldvogel S, Tissot JD. Bacterial contamination of platelet concentrates: Pathogen detection and inactivation methods. *Hematol Rev*. 2009 Apr 16;1(1):e5. doi:10.4081/hr.2009.e5 PubMed PMID: PMC3222246.
46. Lafeuillade B, Eb F, Ounnoughene N, Petermann R, Daurat G, Huyghe G, et al. Residual risk and retrospective analysis of transfusion-transmitted bacterial infection reported by the French National Hemovigilance Network from 2000 to 2008. *Transfusion*. 2015 Mar;55(3):636-46. Epub 2014 Sep 26. doi:10.1111/trf.12883 PubMed PMID: 25257344.
47. Gibson T, Norris W. Skin fragments removed by injection needles. *Lancet*. 1958 Nov 8;2(7054):983-5. doi:10.1016/s0140-6736(58)90475-6 PubMed PMID: 13599456.
48. Canellini G, Waldvogel S, Anderegg K, Tissot JD. Bacterial contamination of platelet concentrates: Perspectives for the future. *Lab Med*. 2010 May 1;41(5):301-5. doi:10.1309/LMQO2P2BSG1XXCSH.

49. McDonald C, Allen J, Brailsford S, Roy A, Ball J, Moule R, et al. Bacterial screening of platelet components by National Health Service Blood and Transplant, an effective risk reduction measure. *Transfusion*. 2017 May;57(5):1122-31. doi:10.1111/trf.14085 PubMed PMID: 28425610.
50. Ramirez-Arcos S, Goldman M. Bacterial contamination. In: Popovsky MA, editor. *Transfusion reactions*. 4th ed. Bethesda (MD): AABB Press; 2012. p. 153-89.
51. Yomtovian RA, Palavecino EL, Dysktra AH, Downes KA, Morrissey AM, Bajaksouzian S, et al. Evolution of surveillance methods for detection of bacterial contamination of platelets in a university hospital, 1991 through 2004. *Transfusion*. 2006 May;46(5):719-30. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00790.x PubMed PMID: 16686839.
52. McDonald CP. *Transfusion risk reduction: Testing for bacteria*. ISBT Sci Ser. 2013;8:73-9. doi:10.1111/voxs.12013.
53. Mohammadi T, Pietersz RN, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH, Reesink HW. Detection of bacteria in platelet concentrates: Comparison of broad-range real-time 16S rDNA polymerase chain reaction and automated culturing. *Transfusion*. 2005 May;45(5):731-6. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.04258.x PubMed PMID: 15847662.
54. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา. กรุงเทพฯ: เท็กซ์แอนด์เจอร์นัลพับลิเคชั่น; 2560. 115 น.
55. BacT/ALERT® BPA [package insert]. France: BioMérieux; 2010.
56. Holme S, McAlister MB, Ortolano GA, Chong C, Cortus MA, Jacobs MR, et al. Enhancement of a culture-based bacterial detection system (eBDS) for platelet products based on measurement of oxygen consumption. *Transfusion*. 2005 Jun;45(6):984-93. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.04405.x PubMed PMID: 15934998.
57. LaBombardi V, Fett D, Kamel A, Sullivan N. Comparison of the VersaTREK™ to the ESP® culture system II for blood cultures. Poster session presented at: 14th European congress of clinical microbiology and infectious diseases; 2004 May 1-4;

Prague 4, Czech Republic.

58. Verax Biomedical. Platelet PGD test [Internet]. 2018 [cited 2018 Aug 4]. Available from: <https://www.veraxbiomedical.com/products/platelet-pgd-test/>.
59. Dreier J, Vollmer T, Kleesiek K. Novel flow cytometry-based screening for bacterial contamination of donor platelet preparations compared with other rapid screening methods. *Clin Chem*. 2009 Aug;55(8):1492-502. Epub 2009 Jun 4. doi:10.1373/clinchem.2008.122515 PubMed PMID: 19498052.
60. Vollmer T, Kleesiek K, Dreier J. Detection of bacterial contamination in platelet concentrates using flow cytometry and real-time PCR methods. *Methods Mol Biol*. 2013;943:91-103. doi:10.1007/978-1-60327-353-4_5 PubMed PMID: 23104283.
61. McDonald CP, Blajchman MA. Bacterial contamination in blood and blood components. In: Barbara JA, Regan FA, Contreras MC, editors. *Transfusion microbiology*. NY: Cambridge University Press; 2008. p. 87-115.
62. Das S, Baruah A. Bacterial contamination of platelet concentrates. *J Bacteriol Mycol*. 2016;3(3):255-6. doi:10.15406/jbmoa.2016.03.00064.
63. Fakruddin M, Chowdhury A, Hossain Z. Competitiveness of polymerase chain reaction to alternate amplification methods. *Am J Biochem Mol Biol*. 2013;3(1):71-80. doi:10.3923/ajbmb.2013.71.80.
64. Zaghoul H, El-Shahat M. Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis. *World J Hepatol*. 2014 Dec 27;6(12):916-22. doi:10.4254/wjh.v6.i12.916 PubMed PMID: 25544878; PubMed Central PMCID: PMC4269910.
65. Fakruddin M, Mannan KS, Chowdhury A, Mazumdar RM, Hossain MN, Islam S, et al. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013 Oct;5(4):245-52. doi:10.4103/0975-7406.120066 PubMed PMID: 24302831; PubMed Central PMCID: PMC3831736.

66. Karami A, Gill P, Motamedi M, Saghafinia M. A review of the current isothermal amplification techniques: Applications, advantages and disadvantages. *J Glob Infect Dis.* 2011 Jul-Sep;3(3):293-302. doi:10.4103/0974-777X.83538.
67. Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chem Rev.* 2015 Nov 25;115(22):12491-545. Epub 2015 Nov 9. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00428 PubMed PMID: 26551336.
68. Li Y, Kumar N, Gopalakrishnan A, Ginocchio C, Manji R, Bythrow M, et al. Detection and species identification of malaria parasites by isothermal tHDA amplification directly from human blood without sample preparation. *J Mol Diagn.* 2013 Sep;15(5):634-41. Epub 2013 Jun 22. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.05.005 PubMed PMID: 23800575; PubMed Central PMCID: PMC5803547.
69. Mahalanabis M, Do J, ALMuayad H, Zhang JY, Klapperich CM. An integrated disposable device for DNA extraction and helicase dependent amplification. *Biomed Microdevices.* 2010 Apr;12(2):353-9. doi:10.1007/s10544-009-9391-8 PubMed PMID: 20066496; PubMed Central PMCID: PMC2998058.
70. Barbieri D, Venturoli S, Rösl F, Rincon-Orozco B. Detection of high-risk human papillomavirus type 16 and 18 using isothermal helicase-dependent amplification. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014 Jun;79(2):178-82. Epub 2014 Feb 24. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.02.012 PubMed PMID: 24666707.
71. Chow WH, McCloskey C, Tong Y, Hu L, You Q, Kelly CP, et al. Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic *Clostridium difficile*. *J Mol Diagn.* 2008 Sep;10(5):452-8. Epub 2008 Jul 31. doi:10.2353/jmoldx.2008.080008 PubMed PMID: 18669881; PubMed Central PMCID: PMC2518740.
72. Gill P, Alvandi AH, Abdul-Tehrani H, Sadeghizadeh M. Colorimetric detection of *Helicobacter pylori* DNA using isothermal helicase-dependent amplification and gold

nanoparticle probes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Oct;62(2):119-24.

Epub 2008 Jul 3. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.003 PubMed PMID: 18599249.

73. O'Neil D, Doseeva V, Rothmann T, Wolff J, Nazarenko I. Evaluation of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae detection in urine, endocervical, and vaginal specimens by a multiplexed isothermal thermophilic helicase-dependent amplification (tHDA) assay. *J Clin Microbiol*. 2011 Dec;49(12):4121-5. Epub 2011

Sep 28. doi:10.1128/JCM.00952-11 PubMed PMID: 21956990; PubMed Central PMCID: PMC3232959.

74. Tong Y, Tang W, Kim H, Pan X, Ranalli TA, Kong H. Development of isothermal TaqMan assays for detection of biothreat organisms. *Biotechniques*. 2008;45(5):543-57. doi:10.2144/000112959.

75. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012 Apr 20;62:3923. doi:10.3791/3923 PubMed PMID: 22546956; PubMed Central PMCID: PMC4846332.

76. Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*. 1972 May 10;269(2):192-200. doi:10.1016/0005-2787(72)90426-1 PubMed PMID: 5063906.

77. White HW, Vartak NB, Burland TG, Curtis FP, Kusakawa N. GelStar nucleic acid gel stain: High sensitivity detection in gels. *Biotechniques*. 1999 May;26(5):984-8. doi:10337492.

78. ภัทธสุดา รักทอง, รินา ภัทธมานนท์. การพัฒนาไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษสู่ระบบการวินิจฉัยโรคใกล้ชิดผู้ป่วย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 2556;41(4):873-84.

79. Ramalingam N, San TC, Kai TJ, Mak MY, Gong HQ. Microfluidic devices harboring unsealed reactors for real-time isothermal helicase-dependent amplification. *Microfluid Nanofluidics*. 2009;7(3):325-36. Epub 2009 Jan 9. doi:10.1007/s10404-008-0378-1 PubMed PMID: 32214955; PubMed Central PMCID: PMC7087983.

80. Gorgannezhad L, Stratton H, Nguyen NT. Microfluidic-based nucleic acid

amplification systems in microbiology. *Micromachines (Basel)*. 2019 Jun 19;10(6):408.

doi:10.3390/mi10060408 PubMed PMID: 31248141; PubMed Central PMCID:

PMC6630468.

81. Ng BY, Wee EJ, West NP, Trau M. Rapid DNA detection of *Mycobacterium tuberculosis*-towards single cell sensitivity in point-of-care diagnosis. *Sci Rep*. 2015 Oct 13;5:15027. doi:10.1038/srep15027; PubMed Central PMCID: PMC4602229.

82. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta*. 2015 Jan 15;439:231-50. Epub 2014 Oct 22.

doi:10.1016/j.cca.2014.10.017 PubMed PMID: 25451956.

83. Singpanomchai N, Akeda Y, Tomono K, Tamaru A, Santanirand P, Rattawongjirakul P. Naked eye detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by recombinase polymerase amplification-SYBR green I assays. *J Clin Lab Anal*. 2019 Feb;33(2):e22655. Epub 2018 Aug 20. doi:10.1002/jcla.22655 PubMed PMID: 30129085; PubMed Central PMCID: PMC6818612.

84. Singh R, Singh DP, Savargaonkar D, Singh OP, Bhatt RM, Valecha N. Evaluation of SYBR green I based visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for genus and species-specific diagnosis of malaria in *P. vivax* and *P. falciparum* endemic regions. *J Vector Borne Dis*. 2017 Jan-Mar;54(1):54-60. PubMed PMID: 28352046.

85. Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 2009 Oct 9;4(10):e7401. doi:10.1371/journal.pone.0007401 PubMed PMID: 19816594; PubMed Central PMCID: PMC2754607.

86. IsoAmp® II Universal tHDA kit [package insert]. UK: BioLabs Inc; 2019.

87. Debode F, Marien A, Janssen E, Bragard C, Berben G. The influence of amplicon length on real-time PCR results. *Biotechnol Agron Soc Environ*. 2017 Mar;21(1):3-11.

88. Prediger E. Calculations: Converting from nanograms to copy number [Internet].

Integrated DNA Technologies; 2013 Oct 21 [updated 2017 Mar 16; cited 2020 Sep 02].

Available from: <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/calculations-converting-from-nanograms-to-copy-number/>.

89. Vetrovský T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. PLoS One.

2013;8(2):e57923. Epub 2013 Feb 27. doi:10.1371/journal.pone.0057923 PubMed PMID: 23460914; PubMed Central PMCID: PMC3583900.

90. นฤมล มาแทน. วิธีการเทคนิคสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์และสารพิษ [อินเทอร์เน็ต]. 2561 [เข้าถึงเมื่อ 14 มี.ค. 2562]. 21 น. เข้าถึงได้จาก:

https://essentialoil.wu.ac.th/wp-content/uploads/2018/01/72909_วิธีการตรวจวิเคราะห์.pdf

91. Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. Indian J Ophthalmol. 2008

Jan-Feb;56(1):45-50. doi:10.4103/0301-4738.37595 PubMed PMID: 18158403; PubMed Central PMCID: PMC2636062.

92. McHugh ML. Interrater reliability: The kappa statistic. Biochem Med (Zagreb). 2012;22(3):276-82. PubMed PMID: 23092060; PubMed Central PMCID: PMC3900052.

93. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977 Mar;33(1):159-74. PubMed PMID: 843571.

94. จูติพร ภาคภูมิพงศ์, สร้อยสอางค์ พิกุลสด, พิมล เชี่ยวศิลป์. คู่มือการปฏิบัติงานเลขที่ QSP 015 ระเบียบปฏิบัติการควบคุมคุณภาพโลหิตและส่วนประกอบโลหิต. กรุงเทพฯ: ฝ่ายควบคุมคุณภาพ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย; 2556. (อัดสำเนา).

95. ดุจใจ ชัยวานิชศิริ, ภาวิณี คุปตวินทุ, สนิธนาฏ อุทา, นรินทร์ กิจเกรียงไกรกุล, สันติ สุนทรกิจ เสนีย์, วิเชียร ลักษณะมีเลิศ, และคณะ, บรรณาธิการ. รายงานการปฏิบัติงานและผลงาน ประจำปี 2562. กรุงเทพฯ: ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย; 2563.

96. เอกสารประกอบการประชุมระบบคุณภาพ ครั้งที่ 5/2563. กรุงเทพฯ: ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย; 2563 ก.ค. 10.

97. TwistAmp® Basic quick guide [package insert]. UK: Abbott; 2019.
98. Doseeva V, Forbes T, Wolff J, Khripin Y, O'Neil D, Rothmann T, et al. Multiplex isothermal helicase-dependent amplification assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Dec;71(4):354-65. Epub 2011 Oct 14. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.021 PubMed PMID: 22000085.
99. Bjerre RD, Hugerth LW, Boulund F, Seifert M, Johansen JD, Engstrand L. Effects of sampling strategy and DNA extraction on human skin microbiome investigations. *Sci Rep*. 2019 Nov 21;9(1):1-11. doi:10.1038/s41598-019-53599-z PubMed PMID: 31754146; PubMed Central PMCID: PMC6872721.
100. Ali JA, Maluf NK, Lohman TM. An oligomeric form of *E. coli* UvrD is required for optimal helicase activity. *J Mol Biol*. 1999 Nov 5;293(4):815-34. doi:10.1006/jmbi.1999.3185 PubMed PMID: 10543970.
101. Huang S, Do J, Mahalanabis M, Fan A, Zhao L, Jepeal L, et al. Low cost extraction and isothermal amplification of DNA for infectious diarrhea diagnosis. *PLoS One*. 2013;8(3):e60059. Epub 2013 Mar 28. doi:10.1371/journal.pone.0060059 PubMed PMID: 23555883; PubMed Central PMCID: PMC3610934.
102. Motré A, Kong R, Li Y. Improving isothermal DNA amplification speed for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*. 2011 Feb;84(2):343-5. Epub 2010 Dec 16. doi:10.1016/j.mimet.2010.12.002 PubMed PMID: 21167881.
103. Tong Y, Lemieux B, Kong H. Multiple strategies to improve sensitivity, speed and robustness of isothermal nucleic acid amplification for rapid pathogen detection. *BMC Biotechnol*. 2011 May 11;11:50. doi:10.1186/1472-6750-11-50 PubMed PMID: 21569347; PubMed Central PMCID: PMC3104364.
104. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, et al.

- SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *J Fluoresc.* 2012 Jul;22(4):1189-99. Epub 2012 Apr 26. doi:10.1007/s10895-012-1059-8 PubMed PMID: 22534954.
105. Du XJ, Zhou TJ, Li P, Wang S. A rapid Salmonella detection method involving thermophilic helicase-dependent amplification and a lateral flow assay. *Mol Cell Probes.* 2017 Aug;34:37-44. Epub 2017 May 16. doi:10.1016/j.mcp.2017.05.004 PubMed PMID: 28526589.
106. Gallex. UltraPower DNA/RNA safedye [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: http://www.gellex.jp/item/ultrapower_safedye/.
107. Cambrex Bio Science Rockland. SYBR Green I nucleic acid gel stain. 2005 [cited 2018 Feb 26]. Available from: <http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/50513.pdf>
108. Seville M. A whole new way of looking at things: the use of Dark Reader technology to detect fluorophors. *Electrophoresis.* 2001 Mar;22(5):814-28. doi:10.1002/1522-2683(200103)22:5<814::AID-ELPS814>3.0.CO;2-H PubMed PMID: 11332748.
109. Viana JD, Ferreira SC, Matana SR, Rossi F, Patel P, Garson JA, et al. Detection of bacterial contamination in platelet concentrates from Brazilian donors by molecular amplification of the ribosomal 16S gene. *Transfus Med.* 2018 Dec;28(6):420-6. Epub 2018 Oct 10. doi:10.1111/tme.12561 PubMed PMID: 30304760.
110. Kolm C, Martzy R, Brunner K, Mach RL, Krska R, Heinze G, et al. A complementary isothermal amplification method to the U.S. EPA quantitative polymerase chain reaction approach for the detection of enterococci in environmental waters. *Environ Sci Technol.* 2017 Jun 20;51(12):7028-35. Epub 2017 Jun 9. doi:10.1021/acs.est.7b01074 PubMed PMID: 28541661; PubMed Central PMCID: PMC5573901.
111. Brecher ME, Hay SN, Rose AD, Rothenberg SJ. Evaluation of BacT/ALERT plastic culture bottles for use in testing pooled whole blood-derived leukoreduced platelet-

rich plasma platelets with a single contaminated unit. *Transfusion*. 2005 Sep;45(9):1512-7. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.00563.x PubMed PMID: 16131385.

112. Hundhausen T, Müller TH, GERMS Group. False-positive alarms for bacterial screening of platelet concentrates with BacT/ALERT new-generation plastic bottles: A multicenter pilot study. *Transfusion*. 2005 Aug;45(8):1267-74. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.00194.x PubMed PMID: 16078911.

113. Todar K. The Growth of Bacterial Populations [Internet]. [cited 2020 Sep 02]. Available from: http://textbookofbacteriology.net/growth_3.html/.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	วรางคณา แยมเกต
วัน เดือน ปี เกิด	24 กรกฎาคม 2528
สถานที่เกิด	ราชบุรี
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล
ที่อยู่ปัจจุบัน	185 หมู่ 3 ต.คลองตากต อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70120



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY