

โครงการย่อยที่ 1

เรื่อง

การจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา
(Molecular-Based Assay for Dust Mite Identification)

และ

การประเมินประสิทธิภาพของวิธี Multiplex PCR
ในการจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น 3 สายพันธุ์
(Evaluation of Multiplex PCR for Identifying
3 Common Dust Mites)

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ญัฐ มาลัยนวล
รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดร. อัญชลี ตั้งตรงจิตร
นางสาวทรรศนีย์ เทศेम
นางสาวสุดารัตน์ บุญยง

ได้รับเงินทุนอุดหนุนการวิจัย

จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ประจำปีงบประมาณ 2553 และ 2555

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ชื่อโครงการ : การจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา
(Molecular-Based Assay for Dust Mite Identification)

รายนามหัวหน้าโครงการวิจัยและคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด โทรศัพท์และโทรสาร

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ ผศ.ดร.ณัฐ มาลัยนวล
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล
2 ถนนพหลโยธิน แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
โทรศัพท์ 02-4196468 โทรสาร 02-4112084
E-mail : nat.mal@mahidol.ac.th

คณะผู้วิจัย

ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 1 : รศ.พญ.อัญชลี ตั้งตรงจิตร
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล
2 ถนนพหลโยธิน แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
โทรศัพท์ 02-4196497 โทรสาร 02-4112084
E-mail : anchalee.tun@mahidol.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 2 : นางสาวทรงศนี เทศเฒ
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 3 : นางสาวสุภารัตน์ บุญยง
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย : จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
ประจำปีงบประมาณ 2553 และ 2555

ระยะเวลาการวิจัย : 2 ปี

บทคัดย่อ

ไรฝุ่น (House dust mite) เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคมะเร็ง โดยสายพันธุ์ที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *Dermatophagoides farinae* (DF) และ *Blomia tropicalis* (BT) การจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นเหล่านี้ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญทางด้านไรวิทยา จึงทำให้ข้อมูลเกี่ยวกับความชุกชุมและการแพร่กระจายของไรฝุ่นตามบ้านเรือนค่อนข้างจำกัด งานวิจัยนี้ได้ศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับยีนชนิดต่างๆ ของไรฝุ่น 3 สายพันธุ์ที่พบบ่อยในประเทศไทย มาออกแบบและพัฒนาวิธีตรวจจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล คณะผู้วิจัยได้นำวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มาใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นจริงที่เก็บจากที่อยู่อาศัยจำนวน 100 หลังคาเรือน (ตัวอย่าง) โดยเปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยวิธีการลอยตัวควบคู่กับการวินิจฉัยด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์

ยีนที่นำมาพัฒนาวิธีการตรวจจำแนก ได้แก่ ยีน internal transcribe spacer 2 และยีน Cytochrome oxidase subunit I โดยออกแบบคู่ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จากยีนเหล่านี้ ผลการศึกษาพบว่า วิธี multiplex PCR ตรวจพบไรฝุ่นจำนวน 46 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37.10 สามารถจำแนกได้เป็นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* จำนวน 31 ตัวอย่าง สายพันธุ์ *D. farinae* จำนวน 29 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ *B. tropicalis* จำนวน 29 ตัวอย่าง ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์สามารถพบไรฝุ่นในตัวอย่างจำนวน 24 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24.49 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 19, 10 และ 0 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำผลการตรวจสอบตัวอย่างฝุ่นมาจับคู่กันพบว่า ตัวอย่างฝุ่นที่มีข้อมูลตรงกันสำหรับการตรวจสอบทั้งสองวิธี มีจำนวน 65 ตัวอย่าง เป็นผลบวก (พบไรฝุ่น) จำนวน 14 ตัวอย่าง และเป็นผลลบ (ไม่พบไรฝุ่น) จำนวน 51 ตัวอย่าง คิดเป็นความไวของวิธีการตรวจ (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 54.17 ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 68.92 และความแม่นยำ (accuracy) เท่ากับร้อยละ 65.31 ตามลำดับ

การที่ค่าความไวและความจำเพาะของวิธี multiplex PCR ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ ทั้งนี้เนื่องจากวิธี multiplex PCR สามารถตรวจพบไรฝุ่นได้มากกว่า โดยเฉพาะในตัวอย่างที่เป็นผลลบจากวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นการตรวจหาไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR จึงเหมาะสมสำหรับการตรวจตัวอย่างฝุ่นจำนวนมาก (screening) ในขณะที่วิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ เหมาะสำหรับการยืนยันสายพันธุ์ไรฝุ่นสำหรับจำนวนตัวอย่างฝุ่นที่ไม่มาก

วิธีตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นที่คณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นนี้เป็นประโยชน์ต่อการดูแลสุขภาพผู้ป่วยภูมิแพ้ได้เป็นอย่างดี เพราะเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก บุคลากรห้องปฏิบัติการตามโรงพยาบาลหรือตามห้องปฏิบัติการอื่นๆ สามารถดำเนินการตรวจได้ ใช้เวลาสั้น ออกผลได้เร็วกว่าการจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์อย่างมาก

Summary

Dust mites have been known as an important source of inhalant allergens causing allergic rhinitis and asthma worldwide. Dust mite population in house dust samples is used to monitor the mite allergen exposure of patients. However, mite identification by their morphology requires specific expertise. Molecular technique was then developed in order to solve such this regard.

Three pairs of primers were designed for identifying common dust mite species; *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *D. farinae* (DF) and *Blomia tropicalis* (BT), from their genomic DNA by multiplex PCR technique. Total duration since the preparation of PCR reaction mix till the analysis by agarose gel electrophoresis was approximately 2 hours. Then, the assay was used to examine the species of dust mites in dust samples collected from 100 households, and compared to the combination method of flotation+microscopic examination.

Results showed that the examination by multiplex PCR gave positive results for 46 samples (37.10 %), of which could be identified as *D. pteronyssinus* in 31 samples, *D. farinae* in 29 samples and *B. tropicalis* in 29 samples, whereas the flotation+microscopic examination gave positive results in 24 dust samples (24.49 %), which were 19, 10 and 0 samples, for each species respectively. The matched results from both methods were found in 65 samples, of which 14 samples were positive and 51 samples were negative. Levels of sensitivity, specificity and accuracy of the multiplex PCR compared to the flotation+microscopy were 54.17 %, 68.92 % and 65.31 %, respectively.

Low levels of sensitivity, specificity and accuracy of the multiplex PCR were due to more positive results obtained from the multiplex PCR than those from the flotation+microscopy. Therefore, the multiplex PCR is suitable for screening the considerable number of dust specimens, whereas the flotation+microscopy is rather suitable for the confirmation of positive specimens obtained from the multiplex PCR. Moreover, the multiplex PCR is simple and can be carried out by most laboratory personnel with no special knowledge in dust mite identification.

บทนำ

ไรฝุ่น (house dust mite) เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคภูมิแพ้ เนื่องจากเป็นตัวการผลิตสารก่อภูมิแพ้ และผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แสดงปฏิกิริยาต่อน้ำยาซึ่งสกัดจากไรฝุ่นมากกว่าสารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ ภายในที่อยู่อาศัย ไรฝุ่นเป็นสัตว์ขาข้อซึ่งจัดอยู่ใน Subclass Acari, Superorder Acariformes, Order Astigmata ไรฝุ่นมีขนาดเล็กประมาณ 100-300 ไมโครเมตร ตัวเต็มวัย มีขา 4 คู่ อาศัยอยู่ตามวัสดุที่มีเส้นใย เช่น ที่นอน หมอน ผ้าห่ม แก้วอับนวม ตุ๊กตาขนสัตว์ เป็นต้น ไรฝุ่นกินสะเก็ดผิวหนัง สะเก็ดรังแค สปอร์เชื้อรา และสารอินทรีย์อื่นๆ ในฝุ่นเป็นอาหาร องค์การอนามัยโลกได้เคยประมาณการสูญเสียค่าใช้จ่ายกับโรคภูมิแพ้จากไรฝุ่นทั้งทางตรงและทางอ้อมคิดเป็นจำนวนเงินประมาณ 20,000 ล้านบาทหรือร้อยละ 8 ของจีดีพีต่อปี เป็นค่าสูงถึง 8,000 ล้านบาทหรือร้อยละ 1.5 ของจีดีพีต่อปี สำหรับประเทศไทยมีรายงานการศึกษาถึงการสูญเสียเนื่องจากการเจ็บป่วยด้วยโรคแพ้ภูมิแพ้ (Allergic rhinitis) คิดเป็นค่าการรักษาเป็นจำนวนเงิน 990 ล้านบาทในปี 2546 และเพิ่มขึ้นเป็น 1,087 ล้านบาทในปี 2547 ทั้งนี้ยังไม่รวมการสูญเสียด้านอื่นๆ เช่น การขาดงานหรือหยุดเรียน ค่าดูแลรักษาพยาบาล เป็นต้น (ฉวีวรรณ บุณนาค) ในการประเมินความรุนแรงของอาการภูมิแพ้ของผู้ป่วย นอกจากการซักประวัติและการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการแล้ว การตรวจสอบชนิดของสารก่อภูมิแพ้ที่ผู้ป่วยได้รับในที่อยู่อาศัยเป็นประจำก็เป็นประโยชน์ที่จะช่วยให้แพทย์สามารถให้การรักษาได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

รายงานการศึกษาในประเทศไทยพบว่า ผู้ป่วยโรคภูมิแพ้คนไทยแสดงปฏิกิริยาต่อไรฝุ่นประมาณ 60-70% (Daengsuwan *et al.* 2003; Kongpanichkul *et al.* 1997) สายพันธุ์ของไรฝุ่นที่พบมากทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย (Malainual *et al.*, 1995) ได้แก่ สายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP) และ *Dermatophagoides farinae* (DF) ซึ่งจัดอยู่ใน Family Pyroglyphidae รองลงมาได้แก่ สายพันธุ์ *Blomia tropicalis* (BT) ซึ่งจัดอยู่ใน Family Glycyphagidae สายพันธุ์อื่นๆ ที่พบในฝุ่นตามที่อยู่อาศัย ได้แก่ *Euroglyphus maynei*, *Lepidoglyphus destructor*, *Acarus siro*, *Tyrophagus* spp., *Suidasia* spp. เป็นต้น

จากข้อมูลความชุกและการแพร่กระจายของไรฝุ่นสายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศเพื่อนบ้าน เช่น สิงคโปร์ (Chew *et al.*, 1999) พบว่า ไรฝุ่น *Blomia tropicalis* เป็นสายพันธุ์ที่พบได้มากกว่า *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* สภาพที่อยู่อาศัยและพฤติกรรมความเป็นอยู่ของประชาชนในปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงไปซึ่งอาจทำให้การแพร่กระจายของไรฝุ่นเปลี่ยนแปลงไปด้วย การตรวจวินิจฉัยจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นในปัจจุบันอาศัยลักษณะสัณฐานภายนอกของไรฝุ่นเป็นหลัก (Colloff & Spieksma, 1992) แต่บางสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน เช่น genus เดียวกัน แต่ต่าง species กัน หรือ ไรฝุ่นที่เป็นระยะตัวอ่อน จะมีรูปร่างลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาก บุคลากรที่ไม่มีประสบการณ์และความชำนาญทางด้านอนุกรมวิธานของไรฝุ่นอาจทำการจำแนกสายพันธุ์ได้ไม่ถูกต้อง หรือแม้ว่าจะเป็นคนละ genus ก็มีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันมากเช่นกัน เช่น สายพันธุ์ *Acarus* และ *Tyrophagus* ใน Family Acaridae เป็นต้น เป็นวิธีที่ใช้เวลามากและต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญทางด้านไรวิทยาซึ่งมีอยู่ไม่มากในประเทศไทย ทำให้การตรวจสอบชนิด/สายพันธุ์ของไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นในที่อยู่อาศัยของผู้ป่วยไม่เป็นที่ยอมรับนัก นอกจากนั้นแล้ว

การเก็บตัวอย่างฝุ่นที่ไม่ถูกต้องทำให้ตัวอย่างไรฝุ่นที่ได้ชำรุดเสียหายทำให้การตรวจจำแนกสายพันธุ์ด้วยรูปร่างลักษณะภายนอกมีความคลาดเคลื่อนได้เช่นเดียวกันด้วย ปัจจุบันมีการนำความรู้ทางด้านอิมมูโนวิทยามาพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้ของไรฝุ่น ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง ไม่เหมาะสมกับการให้บริการแก่ผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ที่มีรายได้ไม่มาก อีกทั้งยังต้องใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์อีกด้วย ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นที่สะดวก รวดเร็ว และง่ายต่อบุคลากรห้องปฏิบัติการทั่วไป

ข้อมูลการศึกษาวิจัยพบว่า ปัจจุบันมีการค้นพบยีนต่างๆ ของไรฝุ่นหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งยีนเหล่านี้มีความเฉพาะเจาะจงกับไรฝุ่นแต่ละสายพันธุ์ หากนำมาพัฒนาและนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ของไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นที่มีไรฝุ่นปะปนกันหลายสายพันธุ์ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา เช่น Polymerase chain reaction (PCR) มีประโยชน์อย่างมากในการจำแนกสายพันธุ์ของแมลงและสัตว์ขาข้อ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มีรูปร่างลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกัน เช่น การใช้ยีน internal transcribed spacer 2 (ITS2) ในการจำแนกสายพันธุ์ของยุงในกลุ่ม *Anopheles annularis* (Walton *et al.*, 2007a; Alam *et al.*, 2007) กลุ่มยุง *Anopheles maculatus* (Walton *et al.*, 2007b) หรือยีน CQ11 บน microsatellite loci สำหรับการจำแนกยุงในกลุ่ม *Culex pipiens* (Bahnck CM and Fonseca DM, 2006) เป็นต้น

การนำยีนมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่น จำเป็นต้องคัดเลือกยีนที่เหมาะสม เนื่องจากยีนบางกลุ่มมีความคล้ายคลึงกันในไรฝุ่นสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน เช่น ยีน Glutathion-S-transferase (GST) ของไรฝุ่นและไรเห็ด (Fischer K, *et al.*; 2003) ยีน Tropomyosin ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus* และ *Blomia tropicalis* (Yi FC, *et al.*; 2002) เป็นต้น ยีนบน ribosomal DNA (rDNA) เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูงในการนำมาใช้จำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่น เนื่องจาก rDNA ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ค่อยมีความเปลี่ยนแปลง (highly conserved region) ได้แก่ ส่วน 18S rDNA, 5.8S rDNA และ 28S rDNA และส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงบ่อย ได้แก่ ส่วน internal transcribed spacer regions (ITS) ซึ่งมี 2 ส่วน คือ ITS1 และ ITS2 เคยมีการนำยีนบนส่วน ITS2 มาใช้ศึกษาสายพันธุ์ของไรใน Suborder Astigmata (Noge *et al.*, 2005) และนำยีนบน mitochondria 12S DNA มาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรฝุ่นสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Glycyphagus privatus*, *Aleuroglyphus ovatus* และ *Blomia tropicalis*. (Suarez-Martinez *et al.*, 2005) การศึกษาอื่นของไรฝุ่นสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus* และ *Blomia tropicalis* ด้วยเทคนิค expressed sequence tagging (EST) ทำให้ทราบถึงยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนหลายชนิด รวมทั้งสารก่อภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ของไรฝุ่นด้วย (Angus *et al.*, 2004) ซึ่งยีนที่ถูกค้นพบต่างๆ เหล่านี้ อาจจะสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ของไรฝุ่นได้ ก็จะทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างถูกต้อง สะดวกและรวดเร็วขึ้น ซึ่งจะเป็นที่ยอมรับ และจะส่งผลต่อการให้บริการผู้ป่วยโรคภูมิแพ้กว้างขวางมากขึ้น โดยเฉพาะหน่วยงานที่ขาดบุคลากรที่มีความชำนาญด้านอนุกรมวิธานของไร

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ของไรฝุ่นที่ง่ายขึ้น รวดเร็วขึ้น และมีความถูกต้อง โดยนำข้อมูลยีนที่อยู่ในฐานข้อมูลสากล เช่น ยีน Internal transcribed spacer 2 (ITS2) ยีน 12S-rRNA หรือยีน 16S-rRNA บน mitochondria genome และเทคนิคทาง

อนุชีววิทยาประยุกต์ร่วมกัน เพื่อจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นที่พบได้บ่อยตามที่อยู่อาศัยจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* และ *Blomia tropicalis* และประเมินประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ไรฝุ่นที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างฝุ่นที่เก็บจากที่อยู่อาศัยจริง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยเทคนิค multiplex PCR
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างฝุ่นที่เก็บจากที่อยู่อาศัยจริง
3. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR กับการตรวจจำแนกด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์

ขอบเขตของการวิจัย

พัฒนาวิธีตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยเทคนิค multiplex PCR กับไรฝุ่นสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* และ *Blomia tropicalis* และทดสอบประสิทธิภาพของวิธีตรวจกับตัวอย่างฝุ่นที่เก็บจากที่อยู่อาศัยจริง แล้วเปรียบเทียบกับ การตรวจจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์

ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

จากการสืบค้นยีนต่างๆ ของไรฝุ่นพบว่า ยีนบางชนิดมีความเฉพาะเจาะจงกับไรฝุ่นแต่ละสายพันธุ์ หากนำมาพัฒนาเป็นวิธีตรวจจำแนกชนิดสายพันธุ์ของไรฝุ่นด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา เช่น Polymerase chain reaction (PCR) ก็จะสามารถจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นได้สะดวกและรวดเร็ว กว่าวิธีการจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นที่ง่ายและรวดเร็วขึ้น โดยนำข้อมูลยีนที่อยู่ในฐานข้อมูลสากล และเทคนิคทางอณูชีววิทยาประยุกต์ร่วมกัน การวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ของไรฝุ่นที่ง่ายขึ้น รวดเร็วขึ้น และมีความถูกต้อง โดยนำข้อมูลยีนที่อยู่ในฐานข้อมูลสากล เช่น ยีน internal transcribed spacer 2 (ITS2) ยีน 12S-rRNA หรือยีน 16S-rRNA บน mitochondria genome และเทคนิคทางอณูชีววิทยาประยุกต์ร่วมกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

วิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ได้จากการวิจัยนี้ จะเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเป็นที่ยอมรับในการนำไปใช้ในการให้บริการแก่ผู้ป่วยโรคภูมิแพ้มากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้การรักษาอาการภูมิแพ้ของผู้ป่วยมีประสิทธิภาพดีขึ้น นอกจากนี้แล้วข้อมูลความชุกของไรฝุ่นที่ได้จะเป็นข้อมูลที่เป็นปัจจุบันซึ่งเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไป

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. ประชากรศึกษา

1.1 สายพันธุ์ไรฝุ่น

สายพันธุ์ไรฝุ่นที่ใช้ในการศึกษาทดลอง คือ ไรฝุ่นสายพันธุ์ที่พบได้บ่อย ได้แก่ สายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus*, สายพันธุ์ *Dermatophagoides farinae* และสายพันธุ์ *Blomia tropicalis* ซึ่งเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของโครงการศูนย์บริการและวิจัยไรฝุ่นศิริราช

1.2 ตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัย

ตัวอย่างที่ทำการศึกษา เป็นตัวอย่างฝุ่นตามบ้านเรือน โดยเลือกเก็บจากที่อยู่อาศัยของผู้วิจัยและเพื่อนบ้านในพื้นที่ต่างๆ โดยใช้เครื่องดูดฝุ่นและอุปกรณ์ดักเก็บฝุ่นดูดฝุ่นตามพรมนอน ผ้าห่ม และพรม แล้วเก็บตัวอย่างฝุ่นที่ได้ใส่ถุงพลาสติกปิดผนึก เก็บในตู้เย็นจนกว่าจะทำการตรวจวิเคราะห์

ตัวอย่างฝุ่นจำนวน 124 ตัวอย่าง ถูกเก็บมาจากที่อยู่อาศัยในพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ กรุงเทพมหานครจำนวน 67 ตัวอย่าง สมุทรปราการ 11 ตัวอย่าง ปทุมธานี 8 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี 4 ตัวอย่าง นครสวรรค์ 6 ตัวอย่าง อ่างทอง 18 ตัวอย่าง และขอนแก่น 10 ตัวอย่าง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น จึงพยายามเก็บตัวอย่างฝุ่นให้ได้อย่างน้อยจำนวน 100 ตัวอย่าง และไม่ได้เป็นการสำรวจความชุกชุมของไรฝุ่น จึงไม่ได้กำหนดหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกตัวอย่าง หรือการกระจายตัวของตัวอย่างฝุ่นที่นำมาใช้ศึกษา

2. วิธีการศึกษา

การพัฒนาวิธี Multiplex PCR

2.1. การออกแบบ primers

Primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จะถูกออกแบบจากยีนของไรฝุ่นสายพันธุ์ต่างๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยยีนที่ถูกคัดเลือกจะมีความเหมือนกันไม่เกินร้อยละ 10 (< 10% homology) แล้วทำการทดสอบเบื้องต้นโดยใช้ยีนของไรฝุ่นหลายๆ สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ แล้วจึงคัดเลือกคู่ primers ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ต่อไป

2.2. การทดสอบปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)

ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาจะถูกเตรียมขึ้นที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมีส่วนผสมของน้ำยาต่างๆ ตามสูตรของผู้ผลิตชุดน้ำยา PCR สำหรับการทำปฏิกิริยา PCR นั้นจะดำเนินการโดยใช้เครื่อง PCR ซึ่งตั้งโปรแกรมมาตรฐานไว้ แล้วเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing temperature ตามคู่ primers ที่ใช้ทดสอบ ซึ่งอยู่ระหว่าง 55 – 60 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบขนาดของ ผลผลิต PCR ที่ได้ เทียบกับขนาดที่คำนวณได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ด้วย Agarose electrophoresis

2.3. การทดสอบประสิทธิภาพปฏิกิริยา Multiplex PCR

คัดเลือกคู่ primers ที่เฉพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ของไรฝุ่นแต่ละชนิด แล้วนำมาผสมกันทีละ 1, 2, 3 คู่ เพื่อทำปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองเดียวกัน โดยปรับเปลี่ยนสูตรน้ำยาและอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสม จนได้ผลผลิต PCR ที่ถูกต้อง

2.4. การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยา Multiplex PCR

- เตรียมตัวอย่างทดสอบ โดยผสม genomic DNA ของไรฝุ่นแต่ละสายพันธุ์ในสัดส่วนต่างๆ เช่น DP: DF: BT เท่ากับ 2: 1: 1, 1: 2: 1, 1: 1: 2 เป็นต้น
- ทำปฏิกิริยา Multiplex PCR ตามวิธีการที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.4 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจหาสายพันธุ์ของไรฝุ่นจาก gDNA ที่อยู่ในส่วนผสมตัวอย่างนั้น
- ตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา โดยการ run agarose electrophoresis

2.5. การทดสอบประสิทธิภาพกับตัวอย่างที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ

- นำไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus*, *D. farinae* และ *B. tropicalis* มาผสมกับตัวอย่างฝุ่นที่เตรียมไว้ในห้องปฏิบัติการในสัดส่วนต่างๆ กัน
- ให้รหัสแก่ตัวอย่างแต่ละอัน เช่น A, B, C, D, E, F เป็นต้น เพื่อป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดจากความลำเอียงของผู้ทดสอบ
- ทำการแยกไรฝุ่นออกจากฝุ่นในแต่ละตัวอย่างด้วยเทคนิค floatation โดยอาศัยความถ่วงจำเพาะที่ต่างกันระหว่างสารละลายสองชนิด จากนั้นนำไรฝุ่นที่แยกได้จากตัวอย่างฝุ่นไปทำการสกัด gDNA ตามวิธีในขั้นตอนที่ 6.2.1 แล้วนำ gDNA ของไรฝุ่นผสมที่ได้ไปทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR ด้วย primers ที่ได้จากขั้นตอนที่ 6.2.5

การทดสอบประสิทธิภาพกับตัวอย่างฝุ่นจริงจากที่อยู่อาศัย

2.6. การแยกไรฝุ่นออกจากตัวอย่างฝุ่นด้วยวิธีการลอยตัวในสารละลาย (floatation)

สำหรับไรฝุ่นที่ไม่มีชีวิตซึ่งปะปนอยู่ในตัวอย่างฝุ่นจะถูกแยกออกด้วยวิธีการลอยตัวในสารละลายสองชนิดที่มีความหนาแน่นแตกต่างกัน (floatation) (Hart & Fain, 1987) โดยนำตัวอย่างฝุ่นปริมาณ 0.1 กรัม แช่ใน 80% แอลกอฮอล์ ในหลอดทดลองเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 12 ชั่วโมง แล้วดูดส่วนใสของแอลกอฮอล์ออกให้มียาระดับอยู่เหนือตะกอนเล็กน้อย จากนั้นเติมสารละลายเกลือแกงอิ่มตัวลงไปให้มีความสูงอย่างน้อย 4 เซนติเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที เพื่อให้ไรฝุ่นที่ดูดซับแอลกอฮอล์ลอยตัวขึ้นสู่ผิวของสารละลาย ส่วนฝุ่นซึ่งตกตะกอนลงสู่ก้นหลอดทดลอง ทำการกรองสารละลายส่วนบนด้วยกระดาษกรองเพื่อแยกไรที่ลอยตัวออกมาแล้วนำไปจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี floatation+กล้องจุลทรรศน์ต่อไป ฝุ่นบางตัวอย่างมีปริมาณจำกัดจึงมีเพียง 98 ตัวอย่างเท่านั้นที่สามารถทำการแยกไรจากตัวอย่างฝุ่นด้วยวิธีนี้ได้ ในจำนวนนี้บางตัวอย่างสามารถทำการแยกไรได้เพียง 1 ซ้ำเท่านั้น

2.7. การจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำไรที่ได้มาเตรียมตัวอย่างสำหรับการจำแนกสายพันธุ์ โดยใช้เข็มเย็บนำไรไปวางบนกระจกสไลด์ในน้ำยา Hoyer's mounting medium นำไปอบไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วนำไปทำการจำแนกสายพันธุ์โดยดูลักษณะภายนอกของไรฝุ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยอ้างอิงการจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นจากหนังสือ Dust Mites (Colloff, 1993) และจาก

ประสบการณ์ของหัวหน้าคณะผู้วิจัยซึ่งปฏิบัติงานในการจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นเป็นเวลานานกว่า 24 ปี (Malainual et al., 1995)

2.8. การสกัด genomic DNA (gDNA) จากไรฝุ่น

Genomic DNA ของไรฝุ่น จะถูกสกัดด้วยชุดน้ำยาสกัด โดยนำไรฝุ่นมาบดในน้ำยา lysis buffer จากนั้นหยอดลงใน spin column แล้วล้างส่วนที่ไม่ใช่ DNA ออกให้หมด จากนั้นจึงละลายสาร DNA ที่ติดอยู่ใน column ออกด้วยน้ำยา Tris-EDTA buffer แล้วนำ gDNA ที่ได้ไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ต่อไป

2.9. การวิเคราะห์ข้อมูลและการเปรียบเทียบข้อมูล

ข้อมูลจากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ และวิธี multiplex PCR ทั้ง 3 ซ้ำถูกนำมารวมกัน แม้ว่าจะพบไรฝุ่นเพียงซ้ำเดียวให้ถือว่าเป็นผลบวก สำหรับวิธีการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นวิธีนี้นั้น

สำหรับค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และค่าความแม่นยำ (precision) นั้น ทำการวิเคราะห์ดังนี้ (Lalkhen & McCluskey, 2008)

ค่าความไว (sensitivity) ของวิธี multiplex PCR หรือ สัดส่วนของการตรวจพบไรฝุ่น ในตัวอย่างที่มีไรฝุ่นจริง คำนวณโดยการเปรียบเทียบข้อมูลจากการตรวจด้วยวิธี Flotation+กล้องจุลทรรศน์ โดยนับจำนวนตัวอย่างฝุ่นที่ให้ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นที่ตรงกัน ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ค่าความไว} = \frac{\text{ร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี multiplex PCR}}{\text{จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์}}$$

ส่วนค่าความจำเพาะ (specificity) หรือ สัดส่วนของการตรวจไม่พบไรฝุ่นในตัวอย่างที่ไม่มีไรฝุ่นอยู่จริง คำนวณโดยการเปรียบเทียบข้อมูลจากการตรวจด้วยวิธี Flotation+กล้องจุลทรรศน์ โดยนับจำนวนตัวอย่างฝุ่นที่ให้ผลการตรวจเป็นลบที่ตรงกัน ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ค่าความจำเพาะ} = \frac{\text{ร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธี multiplex PCR}}{\text{จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์}}$$

สำหรับค่าความแม่นยำ (precision หรือ positive predictive value) ของวิธีการตรวจ หรือ สัดส่วนของตัวอย่างฝุ่นที่พบไรฝุ่นในตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวกด้วยวิธีการตรวจแบบเดียวกัน ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ค่าความแม่นยำ} = \frac{\text{ร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก}}{\text{จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด}}$$

ส่วนค่าความถูกต้อง (accuracy) หรือ สัดส่วนของตัวอย่างที่ให้ผลตรงกันทั้งวิธี multiplex PCR และวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ ในจำนวนตัวอย่างฝุ่นทั้งหมด ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ค่าความถูกต้อง} = \frac{\text{ร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบตรงกัน}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

3. สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

- 3.1 ที่อยู่อาศัยของประชาชนในพื้นที่กรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง
- 3.2 ห้องปฏิบัติการภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

ผลการวิจัย

การสกัด genomic DNA (gDNA) จากไรฝุ่น

ได้ทำการสกัด genomic DNA (gDNA) จากไรฝุ่นที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูป สามารถสกัด gDNA ได้ที่ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และสายพันธุ์ *D. farinae* และที่ความเข้มข้น 30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรสำหรับไรฝุ่นสายพันธุ์ *Blomia tropicalis* ซึ่งได้ทำการเก็บรักษา gDNA เหล่านี้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในปฏิกิริยา PCR ต่อไป

การออกแบบ primers สำหรับปฏิกิริยา PCR

ได้ทำการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับยีนต่างๆ ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* (DP), *D. farinae* (DF) และ *Blomia tropicalis* (BT) จากฐานข้อมูลสากล ได้แก่ ยีน Internal transcribe spacer 2 (ITS2), SID, Cytochrome C oxidase subunit I (Cox I) พบว่า ยีนของไรฝุ่นสายพันธุ์ DP และ DF มีความคล้ายคลึงกัน แต่มีบางตำแหน่งของยีนที่แตกต่างกัน ส่วนยีน Cox I ของไรฝุ่นสายพันธุ์ BT มีความแตกต่างจาก DP และ DF ดังนั้นจึงออกแบบ primers ที่จะนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้โปรแกรม Primer 3 และ Primer-Blast ในเว็บไซต์ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) แล้วนำไปทดสอบในปฏิกิริยา PCR กับ genomic DNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ พร้อมทั้งปรับเปลี่ยนสภาพของปฏิกิริยา PCR เพื่อให้ได้ผลผลิต PCR ตามที่คาดหวัง โดยภาพรวมได้ทำการออกแบบ primers ทั้งหมดจำนวน 11 คู่ ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 รายละเอียดของ primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น

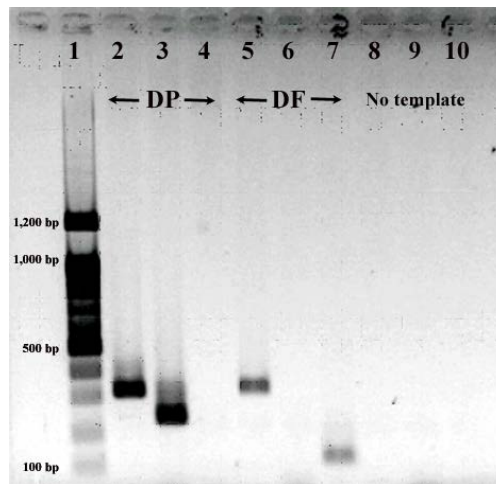
คู่ที่	ID	ลำดับเบส (5' to 3')	ขนาดของ ผลผลิต PCR (base pairs)	สายพันธุ์ไรฝุ่น ที่ถูกจำแนก
1	ITS2 F ITS2 R	CGACTTTCGAACGCATATTGC GCTTAAATTCAGGGGGTAATCTCG	320	DP, DF, BT
2	ITS2 F2 ITS2 R2	AACGCATATTGCAGCCATT GGTAATCTCGCTTGATCTGAG	320	DP, DF, BT
3	ITS2 F3 ITS2 R3	CTTTCGAACGCATATTGCAG AAATTCAGGGGGTAATCTCG	315-330	DP, DF, BT
4	ITS2-107_F ITS2_R	GGGATAGATCTGTTTCGTCGT GCTTAAATTCAGGGGGTAATCTCG	230	DP
5	ITS2-166_F ITS2_R2	CGTCAGGTCATTTCCAAACA GCTTAAATTCAGGGGGTAATCTCG	195	DP

ตารางที่ 2.1 รายละเอียดของ primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น (ต่อ)

คู่ที่	ID	ลำดับเบส (5' to 3')	ขนาดของ ผลผลิต PCR (base pairs)	สายพันธุ์ไรฝุ่น ที่ถูกจำแนก
6	ITS2-199_F ITS2_R2	GCTTTGTAGCACATTCATCACT GCTTAAATTCAGGGGGTAATCTCG	143	DF
7	ITS2-231_F ITS2_R	TTAGCGTTTCCAGCTAAACAA GCTTAAATTCAGGGGGTAATCTCG	120	DF
8	12SID_F 12SID_R	TTTTTCTGGCGGTTTATTACC CGACTTATCTATCAAAAGAGTGACC	665	DP, DF
9	Dp-Ms-F Dp-Ms-R	TGCTAAAGCAAGAGAGAACTTTT CCCCCTTCAAACCACAACACT	700	DP
10	Cox I F Cox I R	GCTGTTCTACGGGAGTTAAGG ACACGCCCTCTTCTCATACC	180	BT
11	Cox I F2 Cox I R2	GGCAGGTTGGGTATGATTTAC CGTGTCGTGTAAGCTCACATCT	306	BT
12	Cox I F3 Cox I R3	AACAGAACCTTTTGGCAGG AGCTACCACATAATACGTGTCGT	334	BT

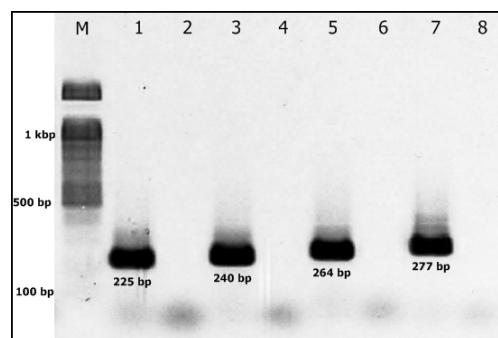
การทดสอบ primers และการปรับสภาพปฏิกิริยา PCR

หลังจากทำการทดสอบและปรับแต่งสภาพปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ที่ใช้ primer แต่ละคู่ (Singleplex PCR) ของยีน ITS2 กับ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ DP และ DF พบว่า ผลผลิต PCR ที่ได้เป็นไปตามที่คาดหวัง (รูปที่ 2.1) แต่ผล PCR กับคู่ primer ITS2_F/ITS2_R2 ให้ผลผลิต PCR ในปริมาณที่น้อยกว่าผลผลิตที่เกิดจากคู่ primer ITS2_F3/ITS2_R2 แม้กระนั้นก็ตามพบว่ามีผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นด้วย เช่นเดียวกับคู่ primer ITS2-199_F/ITS2_R และ ITS2-199_F/ITS2_R2 ที่ให้ผลในลักษณะเดียวกัน (ไม่ได้แสดงรูป) แต่ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ primer CoxI_F/ CoxI_R ซึ่งออกแบบจากยีน Cytochrome oxidase subunit I กับ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ BT ไม่ให้ผลผลิตออกมาตามที่คาดหวัง แต่ให้ผลผลิตที่ไม่จำเพาะกับ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ DP และ DF แทน จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในช่วง Annealing จาก 58 °C 20 วินาที เป็น 60 °C 30 วินาที จึงได้ผลผลิต PCR ที่จำเพาะกับ gDNA จากไรฝุ่นสายพันธุ์ *B. tropicalis* ที่ขนาด 225 bp, 240 bp, 264 bp และ 277 bp ตามลำดับ (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.1 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา Singleplex PCR กับชุด primers ที่ออกแบบจากยีน Internal transcribe spacer 2 (ITS2) โดยใช้ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae*

Lane 1: 100-bp ladder marker	Lane 6: ITS2-107 with DF gDNA
Lane 2: ITS2 with DP gDNA	Lane 7: ITS2-231 with DF gDNA
Lane 3: ITS2-107 with DP gDNA	Lane 8: ITS2 without template
Lane 4: ITS2-231 with DP gDNA	Lane 9: ITS2-107 without template
Lane 5: ITS2 with DF gDNA	Lane 10: ITS2-231 without template

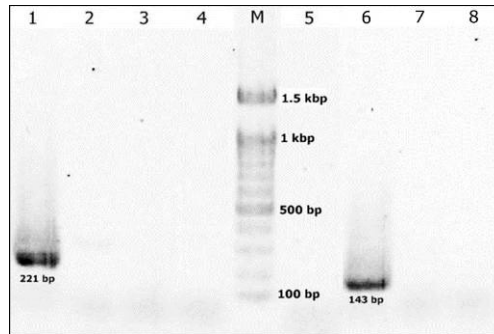


รูปที่ 2.2 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา Singleplex PCR กับชุด primers ที่ออกแบบจากยีน Cytochrome C oxidase subunit I (CoxI) โดยใช้ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *B. tropicalis*

Lane 1: CoxI_F/CoxI_R2 + BT	Lane 5: CoxI_F2/CoxI_R + BT
Lane 2: CoxI_F/CoxI_R2 Negative	Lane 6: CoxI_F2/CoxI_R Negative
Lane 3: CoxI_F/CoxI_R3 + BT	Lane 7: CoxI_F3/CoxI_R + BT
Lane 4: CoxI_F/CoxI_R3 Negative	Lane 8: CoxI_F3/CoxI_R Negative

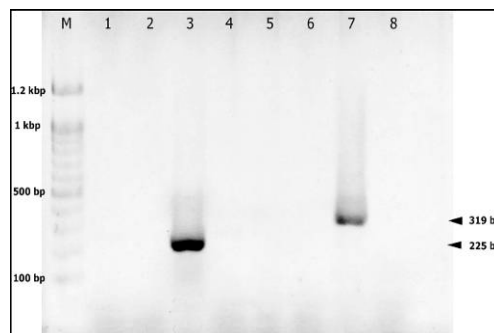
การทดสอบความจำเพาะของคู่ primers ในปฏิกิริยา Singleplex PCR ระหว่าง gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ กับคู่ primer ITS-107_F/ ITS2_R2, ITS2-199_F/ ITS2_R2, CoxI_F/

CoxI_R2 และ CoxI_F3/ CoxI_R2 พบว่าคู่ primer ที่ออกแบบมีความจำเพาะกับ gDNA ของไรฝุ่นแต่ละสายพันธุ์โดยไม่สร้างผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะกับ gDNA ของไรฝุ่นต่างสายพันธุ์ คือ คู่ primer ITS2-107_F/ITS2_R2 และ ITS2-199_F/ITS2_R2 ให้ผลผลิต PCR ที่ขนาด 221 bp, 143 bp (รูปที่ 2.3) คู่ CoxI_F/ CoxI_R2 และ CoxI_F3/ CoxI_R2 ให้ผลผลิต PCR ที่ขนาด 225 bp และ 319 bp (รูปที่ 2.4) ตามลำดับ



รูปที่ 2.3 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา Singleplex PCR กับชุด primers ITS2-107 และ ITS2-199 โดยใช้ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์

Lane 1: ITS2-107_F/ ITS2_R2 + DP	Lane 5: ITS2-199_F/ ITS2_R2 + DP
Lane 2: ITS2-107_F/ ITS2_R2 + DF	Lane 6: ITS2-199_F/ ITS2_R2 + DF
Lane 3: ITS2-107_F/ ITS2_R2 + BT	Lane 7: ITS2-199_F/ ITS2_R2 + BT
Lane 4: ITS2-107_F/ ITS2_R2 Negative	Lane 8: ITS2-199_F/ ITS2_R2 Negative



รูปที่ 2.4 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา Singleplex PCR กับชุด primers CoxI โดยใช้ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์

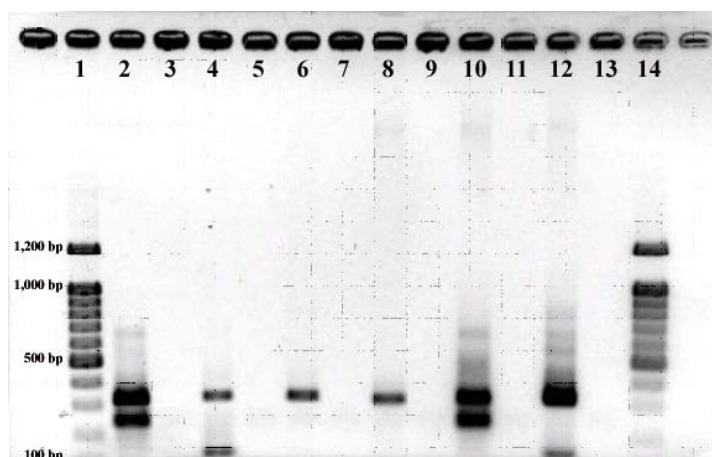
Lane 1: CoxI_F/CoxI_R2 + DP	Lane 5: CoxI_F3/CoxI_R2 + DP
Lane 2: CoxI_F/CoxI_R2 + DF	Lane 6: CoxI_F3/CoxI_R2 + DF
Lane 3: CoxI_F/CoxI_R2 + BT	Lane 7: CoxI_F3/CoxI_R2 + BT
Lane 4: CoxI_F/CoxI_R2 Negative	Lane 8: CoxI_F3/CoxI_R2 Negative

สำหรับผลของปฏิกิริยา Singleplex PCR กับ primer คู่อื่นๆ ได้สรุปผลแสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ผลสรุปของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ primers คู่ต่างๆ กับ gDNA ของไรฝุ่น 3 สายพันธุ์

คู่ที่	Primers			สายพันธุ์ไรฝุ่น		
	ID	Forward	Reverse	DP	DF	BT
1	ITS2	ITS2_F	ITS2_R	✓	✓	✓
2	ITS2_2	ITS2_F2	ITS2_R2	✓	✓	✓
3	ITS2_3	ITS2_F3	ITS2_R3	×	×	×
4	ITS2_4	ITS2_F3	ITS2_R	✓	ND	ND
5	ITS2_5	ITS2_F3	ITS2_R2	✓	✓	✓
6	ITS2-107	ITS2-107_F	ITS2_R	✓	×	×
7	ITS2-107_2	ITS2-107_F	ITS2_R2	✓	✓	×
8	ITS2-166	ITS2-166_F	ITS2_R2	✓	×	×
9	ITS2-199	ITS2-199_F	ITS2_R3	×	×	×
10	ITS2-199_2	ITS2-199_F	ITS2_R	ND	✓	ND
11	ITS2-199_3	ITS2-199_F	ITS2_R2	×	✓	×
12	ITS2_231	ITS2_231_F	ITS2_231_R	×	✓	×
13	CoxI	CoxI_F	CoxI_R	×	✓	✓
14	CoxI_2	CoxI_F2	CoxI_R2	×	×	✓
15	CoxI_3	CoxI_F3	CoxI_R3	×	×	✓
16	CoxI_4	CoxI_F	CoxI_R2	ND	ND	✓
17	CoxI_5	CoxI_F	CoxI_R3	ND	ND	✓
18	CoxI_6	CoxI_F2	CoxI_R	ND	ND	✓
19	CoxI_7	CoxI_F3	CoxI_R	ND	ND	✓
20	CoxI_8	CoxI_F3	CoxI_R2	×	×	✓
21	12SID	12SID_F	12SID_R	✓	✓	ND
22	Dp-Ms	Dp-Ms_F	Dp-Ms_R	×	×	ND

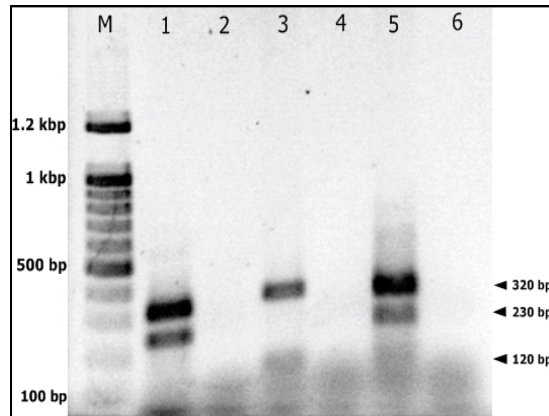
เมื่อได้คู่ primers ที่เหมาะสม จึงนำคู่ primer ไปทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer จำนวน 2 คู่ ในหลอดทดลองเดียวกัน (Duplex PCR) ผลจากปฏิกิริยา Duplex PCR กับยีน ITS2 กับ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และสายพันธุ์ *D. farinae* พบว่า ปฏิกิริยา Duplex PCR ที่ทำการทดสอบสามารถตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นทั้งสองชนิดได้ถูกต้องและจำเพาะ โดยชุด primer ITS2 สามารถจำแนกไรฝุ่นในระดับ Genus *Dermatophagoides* ขณะที่ชุด primer ITS2_107 สามารถจำแนกไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และชุด primer ITS2_231 สามารถจำแนกไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. farinae* ได้ตามลำดับ ดังแสดงผลไว้ใน รูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา Duplex PCR กับชุด primers ที่ออกแบบจากยีน Internal transcribe spacer 2 (ITS2) โดยใช้ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae*

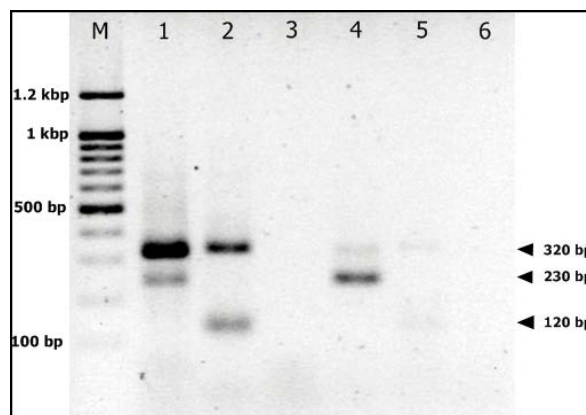
Lane1: 100-bp DNA ladder marker	Lane8: ITS2 + ITS2_231 + DP
Lane2: ITS2 + ITS2_107 + DP	Lane9: ITS2 + ITS2_231 Negative
Lane3: ITS2 + ITS2_107 Negative	Lane10: ITS2 + ITS2_107 + DP,DF
Lane4: ITS2 + ITS2_231 + DF	Lane11: ITS2 + ITS2_107 Negative
Lane5: ITS2 + ITS2_231 Negative	Lane12: ITS2 + ITS2_231 + DP,DF
Lane6: ITS2 + ITS2_107 + DF	Lane13: ITS2 + ITS2_231 Negative
Lane7: ITS2 + ITS2_107 Negative	Lane 14: 100-bp DNA ladder marker

หลังจากนั้นได้ทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer จำนวน 3 คู่ในหลอดทดลองเดียวกัน (Triplex PCR) ได้แก่ ITS2_F/ITS2_R, ITS-107_F/ITS2_R และ ITS2-231_F/ITS2_R พบว่า primer แต่ละคู่ให้ผลผลิต PCR ตามที่ความคาดหวัง แต่ผลผลิต PCR ของ ITS2-231_F/ITS2_R ในทุกตัวอย่างไม่สามารถเห็นได้ชัดเจนมีปริมาณ primer ที่เหลืออยู่จากการทำปฏิกิริยามากเกินไป (รูปที่ 2.6) จึงทำการปรับสภาพปฏิกิริยา PCR โดยลดปริมาณของ primer ลง และเพิ่มปริมาณ DNA template ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. farinae* พบว่าปริมาณ primer ที่เหลือจากปฏิกิริยาลดลง แต่ผลผลิต PCR ก็ลดลงด้วย นอกจากนั้นยังพบว่าแม้จะเพิ่มปริมาณ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. farinae* มากขึ้นแต่ผลผลิต PCR ก็ยังมีปริมาณน้อยกว่าผลผลิต PCR ที่เกิดจาก gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* กับคู่ primer ITS2-107_F/ITS2_R ซึ่งแสดงว่า ความไวของคู่ primer ITS2-231_F/ITS2_R นั้นน้อยกว่า ITS2-107_F/ITS2_R (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.6 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา Triplex PCR กับชุด primers ที่ออกแบบจากยีน Internal transcribe spacer 2 (ITS2) โดยใช้ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae*

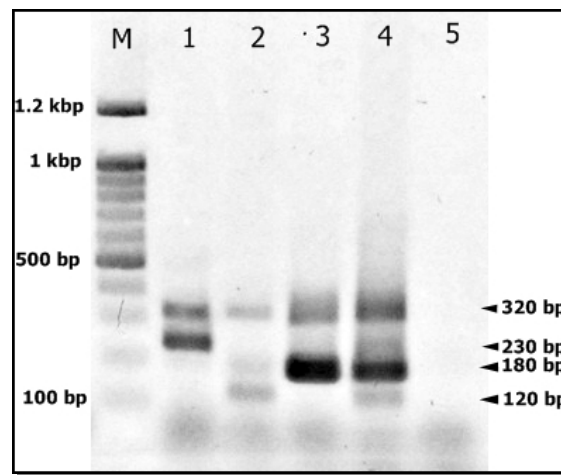
Lane 1 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R + DP
 Lane 2 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R Negative
 Lane 3 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R + DF
 Lane 4 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R Negative
 Lane 5 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R + DP,DF
 Lane 6 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R Negative



รูปที่ 2.7 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา Triplex PCR กับชุด primers ที่ออกแบบจากยีน Internal transcribe spacer 2 (ITS2) หลังจากการปรับลดปริมาณ primers และเพิ่มปริมาณ gDNA template

Lane 1 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R + DP
 Lane 2 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R + DF
 Lane 3 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R Negative
 Lane 4 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R + DP
 Lane 5 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R + DF
 Lane 6 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R Negative

หลังจากนั้นได้ทดสอบปฏิกิริยา Multiplex PCR โดยใช้ชุด primer 4 คู่ ได้แก่ ITS2_F/ITS2_R, ITS2-107_F/ITS2_R, ITS2-231_F/ITS2_R และ CoxI_F/CoxI_R พบว่า คู่ primer ที่ให้ผลตามที่คาดหวัง คือ ITS2_F/ITS2_R ให้ผลผลิต PCR ที่ 320 bp กับไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์, ITS2-107_F/ITS2_R ให้ผลผลิต PCR ที่ 230 bp กับไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus*, และ ITS2-231_F/ITS2_R ให้ผลผลิต PCR ที่ 120 bp กับไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. farinae* โดยไม่มีผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะจาก primer ทั้งสามคู่นี้ สำหรับคู่ primer CoxI_F/CoxI_R นั้นควรได้ผลผลิต PCR กับ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *B. tropicalis* เท่านั้น แต่พบว่า มีผลผลิต PCR ที่ 180 bp กับ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ด้วย (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.8 ผลของปฏิกิริยา Multiplex PCR กับชุด primers จำนวน 4 คู่ ที่ออกแบบจากยีน Internal transcribe spacer 2 (ITS2) และยีน Cytochrome oxidase subunit I (CoxI) โดยใช้ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์

Lane 1 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R, CoxI_F/CoxI_R + DP

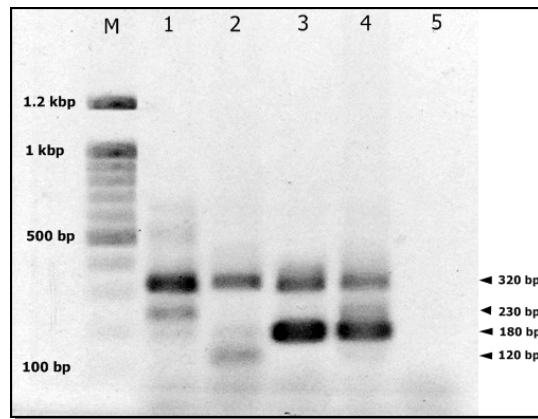
Lane 2 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R, CoxI_F/CoxI_R + DF

Lane 3 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R, CoxI_F/CoxI_R + BT

Lane 4 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R, CoxI_F/CoxI_R + DP, DF, BT

Lane 5 : ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R Negative

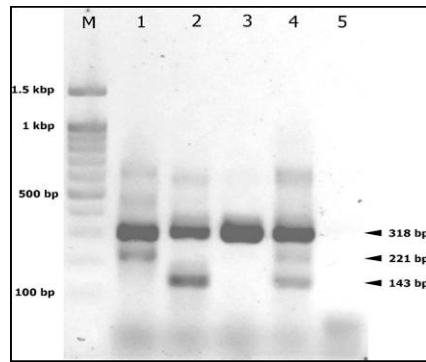
ดังนั้นจึงทดลองลดปริมาณของ primer CoxI_F/CoxI_R เป็น 5 pmole พบว่า ยังไม่สามารถขจัดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะนั้นได้ (รูปที่ 2.9) จากข้อมูลของปฏิกิริยา Singleplex PCR ของคู่ primer CoxI_F/CoxI_R นี้ หากปรับอุณหภูมิของช่วง Annealing อาจแก้ปัญหาผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะนี้ได้ แต่จะมีผลกระทบต่อความไวของคู่ primer อีกสามคู่ โดยเฉพาะคู่ primer ITS2-231_F/ITS2_R เนื่องจากมีความไวน้อยกว่าคู่ primer ITS2_F/ITS2_R และ ITS2-107_F/ITS2_R จึงลองนำเอา primer คู่อื่นมาทำการทดสอบ



รูปที่ 2.9 ผลของปฏิกิริยา Multiplex PCR หลังการปรับลดปริมาณ primers กับชุด primers จำนวน 4 คู่ ที่ออกแบบจากยีน Internal transcribe spacer 2 (ITS2) และยีน Cytochrome oxidase subunit I (CoxI) โดยใช้ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์

Lane 1: ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R, CoxI_F/CoxI_R + DP
 Lane 2: ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R, CoxI_F/CoxI_R + DF
 Lane 3: ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R, CoxI_F/CoxI_R + BT
 Lane 4: ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R, CoxI_F/CoxI_R + DP,DF,BT
 Lane 5: ITS2_F/ITS2_R, ITS2_107_F/ITS2_R, ITS2_231_F/ITS2_R Negative

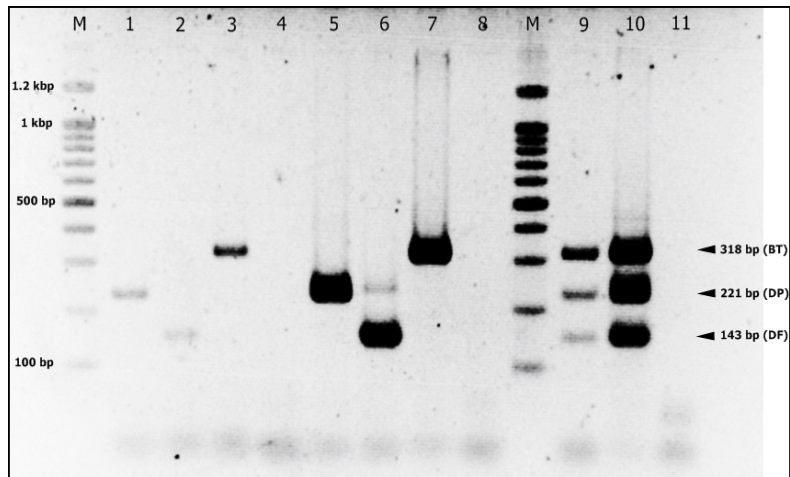
เมื่อทดสอบปฏิกิริยา Multiplex PCR โดยใช้ primer 4 คู่ ได้แก่ ITS2_F3/ITS2_R2, ITS2-107_F/ITS2_R2, ITS2-199_F/ITS2_R2 และ CoxI_F3/CoxI_R2 พบว่า ได้ผลผลิต PCR ที่เกิดจากแต่ละคู่ primer ที่ 318 bp, 221 bp และ 143 bp ตามลำดับ แต่พบผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะ ที่ประมาณ 600 bp เช่นเดียวกับตอนที่ทดสอบปฏิกิริยา Singleplex PCR ด้วย อีกทั้งผลผลิต PCR ของคู่ primer ITS2_F3/ ITS2_R2 และ CoxI_F3/ ITS2_R2 มีขนาดเท่ากันคือ 318 bp (รูปที่ 2.10) จึงพิจารณาตัดคู่ primer ITS2_F3/ITS2_R2 ออกจากปฏิกิริยา Multiplex PCR โดยให้เหลือ primer เพียง 3 คู่ คือ ITS2-107_F/ITS2_R2, ITS2-199_F/ITS2_R2 และ CoxI_F3/CoxI_R2 แล้วทำการทดสอบปฏิกิริยา Multiplex PCR ใหม่ ด้วย gDNA ของ ไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ โดยแต่ละสายพันธุ์ใช้ปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 0.4 นาโนกรัมและปริมาณมากที่สุดคือ 51.2 นาโนกรัม



รูปที่ 2.10 ผลของปฏิกิริยา Multiplex PCR กับชุด primers จำนวน 4 คู่ ที่ออกแบบจากยีน Internal transcribe spacer 2 (ITS2) และยีน Cytochrome oxidase (CoxI) โดยใช้ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์

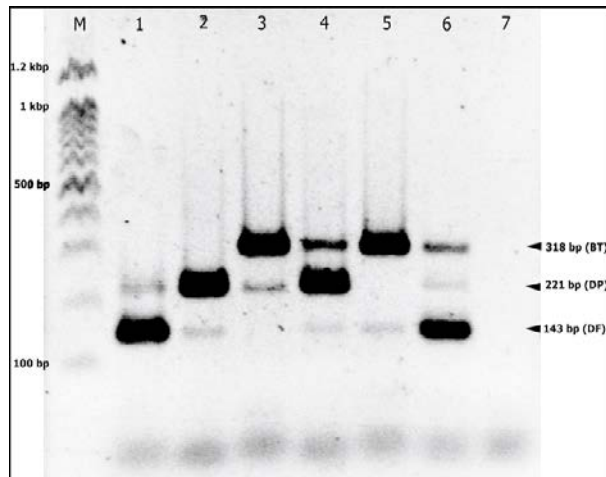
- Lane 1 : ITS2_F3/ITS2_R2, ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + DP
 Lane 2 : ITS2_F3/ITS2_R2, ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + DF
 Lane 3 : ITS2_F3/ITS2_R2, ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + BT
 Lane 4 : ITS2_F3/ITS2_R2, ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + DP,DF,BT
 Lane 5 : ITS2_F3/ITS2_R2, ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2
 Negative

ปฏิกิริยา Triplex PCR กับ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ พบว่า primer ทุกคู่ให้ผลผลิต PCR ตามที่ความหมาย (รูปที่ 2.11) รวมทั้งความไวของ primer ก็ไม่เปลี่ยนแปลงจากที่เคยทดสอบเดิมใน Singplex PCR ยกเว้นการใช้ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. farinae* เป็น template ที่ปริมาณ 51.2 ng ในปฏิกิริยา Multiplex PCR ซึ่งพบผลผลิต PCR ไม่จำเพาะที่ขนาด 221 bp เช่นเดียวกับปฏิกิริยาที่มี gDNA ของ *D. pteronyssinus* เป็น template ที่ปริมาณต่างๆ (รูปที่ 2.11 Lane 6 และ รูปที่ 2.12 Lane 6)



รูปที่ 2.11 ผลของปฏิกิริยา Triplex PCR กับชุด primers ที่ออกแบบจากยีน Internal transcribe spacer 2 (ITS2) และยีน Cytochrome oxidase (CoxI) โดยใช้ gDNA ของไรฝุ่น ที่ปริมาณแตกต่างกัน

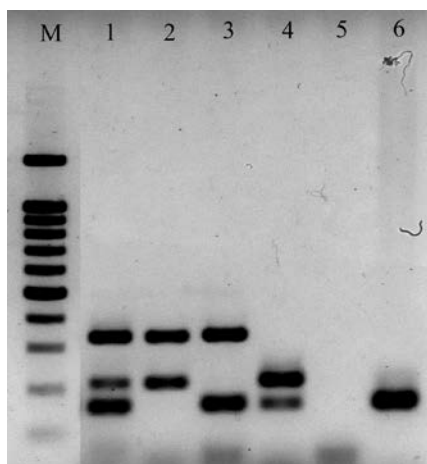
- Lane 1 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + 0.4 ng DP
 Lane 2 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + 0.4 ng DF
 Lane 3 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + 0.4 ng BT
 Lane 4 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 Negative
 Lane 5 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + 51.2 ng DP
 Lane 6 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + 51.2 ng DF
 Lane 7 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + 51.2 ng BT
 Lane 8 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 Negative
 Lane 9 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + 0.4 ng each DP,DF,BT
 Lane 10 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 + 51.2 ng each DP,DF,BT
 Lane 11 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, CoxI_F3/CoxI_R2 Negative



รูปที่ 2.12 ผลของปฏิกิริยา Triplex PCR กับชุด primers ที่ออกแบบจากยีน Internal transcribe spacer 2 (ITS2) และยีน Cytochrome oxidase (CoxI) โดยใช้ gDNA ของไรฝุ่นที่ปริมาณแตกต่างกัน

- Lane 1 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, Coxl_F3/Coxl_R2 + 0.4 ng DP + 51.2 ng DF
 Lane 2 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, Coxl_F3/Coxl_R2 + 51.2 ng DP + 0.4 ng DF
 Lane 3 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, Coxl_F3/Coxl_R2 + 0.4 ng DP + 51.2 ng BT
 Lane 4 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, Coxl_F3/Coxl_R2 + 51.2 ng DP + 0.4 ng DF, BT
 Lane 5 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, Coxl_F3/Coxl_R2 + 0.4 ng DF + 51.2 ng BT
 Lane 6 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, Coxl_F3/Coxl_R2 + 51.2 ng DF + 0.4 ng BT
 Lane 7 : ITS2_107_F/ITS2_R2, ITS2_199_F/ITS2_R2, Coxl_F3/Coxl_R2 Negative

ดังนั้นจึงทดลองเปลี่ยนคู่ primer สำหรับ DP จากเดิม ITS2_107_F เป็น ITS2_166_F โดยใช้ reverse primer ITS2_R2 เหมือนเดิม ซึ่งให้ผลผลิต PCR ที่ขนาด 195 bp กับ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* (DP) ผลการทดสอบในปฏิกิริยา Triplex PCR ด้วย primer ITS2_166_F นี้ พบว่า ได้ผลผลิต PCR ตามที่คาดหวัง และไม่เกิดผลผลิตที่ไม่จำเพาะกับ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์อื่นอีกด้วย (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.13 ผลของปฏิกิริยา Triplex PCR ซึ่งใช้ primers ที่ออกแบบจากยีน internal transcribe spacer 2 (ITS2) และยีน Cytochrome oxidase (CoxI) กับ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ หลังการเปลี่ยน primer ITS2-107_F เป็น ITS2-166_F

Lane 1: ITS2-166_F, ITS2-199_F, ITS2_R2, CoxI_F3, CoxI_R2 + DP, DF, BT

Lane 2: ITS2-166_F, ITS2-199_F, ITS2_R2, CoxI_F3, CoxI_R2 + DP, BT

Lane 3: ITS2-166_F, ITS2-199_F, ITS2_R2, CoxI_F3, CoxI_R2 + DF, BT

Lane 4: ITS2-166_F, ITS2-199_F, ITS2_R2, CoxI_F3, CoxI_R2 + DP, DF

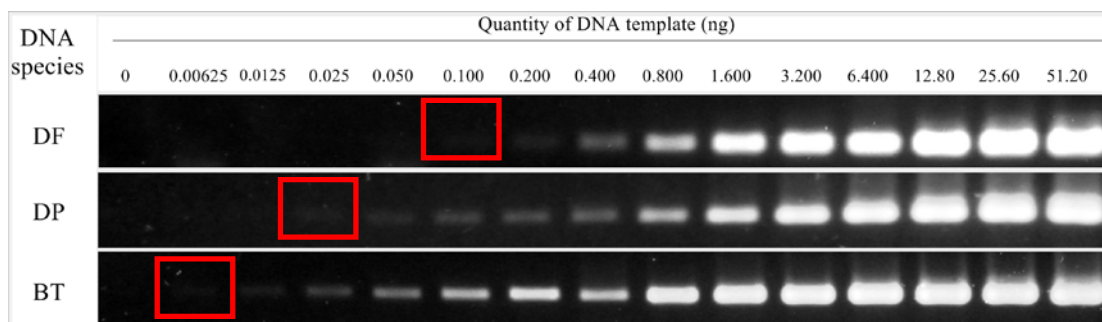
Lane 5: ITS2-166_F, ITS2-199_F, ITS2_R2, CoxI_F3, CoxI_R2 Negative

Lane 6: ITS2-166_F, ITS2-199_F, ITS2_R2, CoxI_F3, CoxI_R2 + DP

ความไว (Sensitivity) ของคู่ primer ในปฏิกิริยา Singleplex PCR

ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา Singleplex PCR โดยใช้ปริมาณของ DNA template ของไรฝุ่นแต่ละสายพันธุ์ ตั้งแต่ 102.4 นาโนกรัม จนถึง 0.00625 นาโนกรัม (รูปที่ 2.14) พบว่า

- คู่ Primer สำหรับตรวจจำแนกไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* (DP) คือ ITS2-166_F และ ITS2_R2 สามารถตรวจพบยีนกับ DNA template ที่มีปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 0.0125 นาโนกรัม
- คู่ Primer สำหรับตรวจจำแนกไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. farinae* (DF) คือ ITS2-199_F และ ITS2_R2 สามารถตรวจพบยีนกับ DNA template ที่มีปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 0.05 นาโนกรัม
- คู่ Primer สำหรับตรวจจำแนกไรฝุ่นสายพันธุ์ *B. tropicalis* (BT) คือ CoxI_F3 และ CoxI_R2 สามารถตรวจพบยีนกับ DNA template ที่มีปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 0.00625 นาโนกรัม



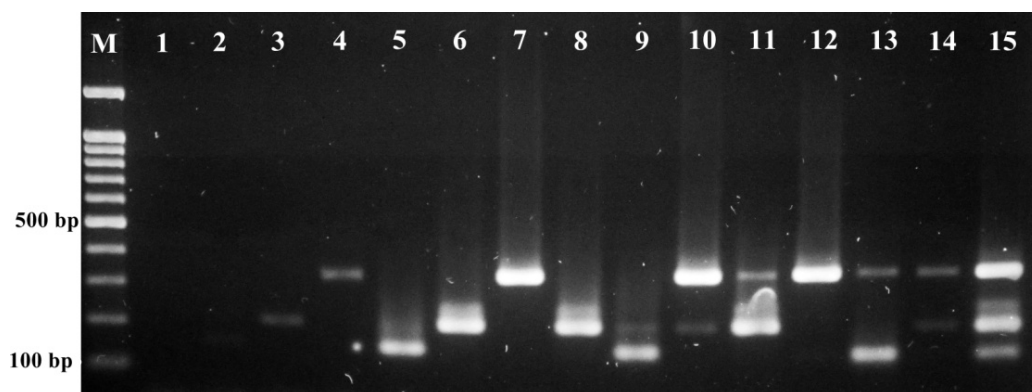
รูปที่ 2.14 ผลการทดสอบความไว (Sensitivity) ของปฏิกิริยา PCR ของ primer ITS2-199_F/ITS2_R2 (DF); ITS2-166_F/ITS2_R2 (DP); CoxI_F3/CoxI_R2 (BT) โดยการใช้ two-fold serial dilutions ของ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis*) ตั้งแต่ 0.00625 ถึง 102.4 นาโนกรัม ตามลำดับ

เมื่อกำหนดค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปร หรือ CV (Coefficient of variation) จากการทำปฏิกิริยาทดสอบความไวซ้ำจำนวนทั้งสิ้น 10 ครั้ง พบว่า ค่า CV ของปริมาณ DNA ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ เท่ากับ 0% สำหรับไรสายพันธุ์ *D. pteronyssinus*, 12.6% สำหรับไรสายพันธุ์ *D. farinae* และ 21.8% สำหรับสายพันธุ์ *B. tropicalis* ตามลำดับ

ความจำเพาะ (Specificity) ของปฏิกิริยา Multiplex PCR

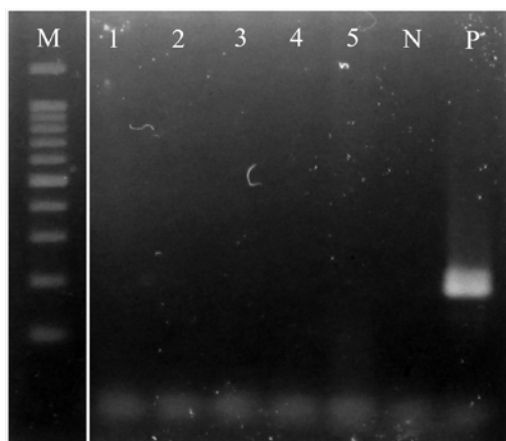
สำหรับการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนั้น ได้แบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เป็นการทดสอบปฏิกิริยาโดยใช้ส่วนผสมของชุด primers และ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis*) ที่ปริมาณ 0.1 และ 10 นาโนกรัม ซึ่งผลการทดสอบพบว่า ผลผลิต PCR ที่ได้มีความจำเพาะต่อไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ และไม่มีผลผลิต PCR อื่นเกิดขึ้นเลย แม้ว่ามีส่วนผสมของ gDNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์อื่นอยู่ในปฏิกิริยาดังก็ตาม (รูปที่ 2.15)

สำหรับส่วนที่ 2 เป็นการทดสอบปฏิกิริยากับ gDNA ของแมลงและไรชนิดอื่น ได้แก่ ยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) แมลงสาบอเมริกัน (*Periplaneta americana*) เทาหนังสือ (*Liposcelis* sp.) ไรโรงเก็บ (*Tyrophagus* sp.) และไรตัวห้ำ (*Cheyletus* sp.) ผลการทดสอบปฏิกิริยาก็ไม่พบผลผลิต PCR จากแมลงและไรชนิดอื่นเช่นเดียวกัน (รูปที่ 2.16)



รูปที่ 2.15 ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของปฏิกิริยา Multiplex PCR ซึ่งใช้ ส่วนผสมของชุด primers และ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis*) ที่ปริมาณต่างกัน

- Lane 1: Negative control
- Lane 2: gDNA ของ *D. farinae* (DF) ปริมาณ 0.1 ng
- Lane 3: gDNA ของ *D. pteronyssinus* (DP) ปริมาณ 0.1 ng
- Lane 4: gDNA ของ *B. tropicalis* (BT) ปริมาณ 0.1 ng
- Lane 5: gDNA ของ *D. farinae* (DF) ปริมาณ 10 ng
- Lane 6: gDNA ของ *D. pteronyssinus* (DP) ปริมาณ 10 ng
- Lane 7: gDNA ของ *B. tropicalis* (BT) ปริมาณ 10 ng
- Lane 8: gDNA ของ DF 0.1 ng + DP 10 ng
- Lane 9: gDNA ของ DP 0.1 ng + DF 10 ng
- Lane 10: gDNA ของ DP 0.1 ng + BT 10 ng
- Lane 11: gDNA ของ DP 10 ng + BT 0.1 ng
- Lane 12: gDNA ของ BT 10 ng + DF 0.1 ng
- Lane 13: gDNA ของ BT 0.1 ng + DF 10 ng
- Lane 14: gDNA ของ DF + DP + BT 0.1 ng each
- Lane 15: gDNA ของ DF + DP + BT 10 ng each



รูปที่ 2.16 ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของปฏิกิริยา Multiplex PCR ซึ่งใช้ส่วนผสมของชุด primers ที่จำเพาะกับไรฝุ่นสามสายพันธุ์ (DP, DF, BT) กับ gDNA ของยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus* sp.), แมลงสาบอเมริกัน (*Periplaneta americana*), เหาหนังสือ (*Liposcelis* sp.), ไรโรงเก็บ (*Tyrophagus* sp.) และไรตัวห้ำ (*Cheyletus* sp.)

Lane 1: Multiplex PCR with *Culex quinquefasciatus* gDNA

Lane 2: Multiplex PCR with *Periplaneta americana* gDNA

Lane 3: Multiplex PCR with *Liposcelis* sp. gDNA

Lane 4: Multiplex PCR with *Tyrophagus* sp. gDNA

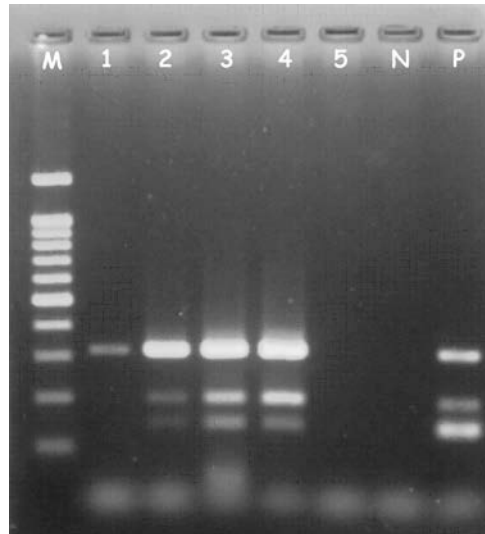
Lane 5: Multiplex PCR with *Cheyletus* sp. gDNA

Lane 6: Negative control

Lane P: Positive control (Multiplex PCR with *D. pteronyssinus* gDNA)

ประสิทธิภาพของปฏิกิริยา Multiplex PCR กับตัวอย่างฝุ่นจำลอง

ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจไรฝุ่นของปฏิกิริยา Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างฝุ่นจำลอง โดยผสมไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ที่จำนวนต่างๆ (20, 50, 100 และ 200 ตัว) กับตัวอย่างฝุ่นจริง แล้วนำไปสกัด gDNA เพื่อใช้ในปฏิกิริยา Multiplex PCR ผลการทดสอบพบว่าปฏิกิริยานี้สามารถตรวจพบไรฝุ่นสายพันธุ์ *B. tropicalis* (BT) ได้ที่จำนวนน้อยที่สุดเท่ากับ 20 ตัว และสามารถตรวจพบไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* (DP) และ *D. farinae* (DF) ได้ที่จำนวนน้อยที่สุดเท่ากับ 50 ตัว ในตัวอย่างฝุ่นหนัก 2.5 มิลลิกรัม (รูปที่ 2.17)



รูปที่ 2.17 ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของปฏิกิริยา Multiplex PCR ซึ่งใช้ส่วนผสมของชุด primers ที่จำเพาะกับ gDNA ซึ่งสกัดได้จากตัวอย่างฝุ่นจริงซึ่งผสมไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ (DP, DF, BT) ที่จำนวนต่างๆ

Lane 1: Multiplex PCR with DP+DF+BT (each 20)

Lane 2: Multiplex PCR with DP+DF+BT (each 50)+2.5 mg Dust

Lane 3: Multiplex PCR with DP+DF+BT (each 100)+2.5 mg Dust

Lane 4: Multiplex PCR with DP+DF+BT (each 200)+2.5 mg Dust

Lane 5: Multiplex PCR with *Cheyletus* sp. gDNA

Lane 6: Negative control

Lane P: Positive control (Multiplex PCR with *D. pteronyssinus* gDNA)

ประสิทธิภาพของวิธี Multiplex PCR ในการตรวจตัวอย่างฝุ่นจริงจากที่อยู่อาศัย

ตัวอย่างฝุ่นที่เก็บจากที่อยู่อาศัย

ตัวอย่างฝุ่นจำนวน 124 ตัวอย่าง ได้ถูกเก็บจากที่อยู่อาศัยในพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ กรุงเทพมหานคร 63 ตัวอย่าง สมุทรปราการ 11 ตัวอย่าง ปทุมธานี 12 ตัวอย่าง นครสวรรค์ 6 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี 4 ตัวอย่าง อ่างทอง 18 ตัวอย่าง และขอนแก่น 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างฝุ่นทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาทำการตรวจหาไรฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ และด้วยวิธี multiplex PCR

ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์

การตรวจตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่างด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ นั้น มีเพียง 98 ตัวอย่างที่มีปริมาณฝุ่นเพียงพอสำหรับการตรวจตรวจหาไรฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ บางตัวอย่างสามารถทำการตรวจได้เพียงซ้ำเดียวเท่านั้น อย่างไรก็ตามหากพบไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นแม้เพียง 1 ซ้ำ จะแปลผลเป็นบวก หมายความว่าตัวอย่างฝุ่นนั้นมีไรฝุ่น

การแยกไรฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์สามารถตรวจพบไรฝุ่นจากตัวอย่างฝุ่นจำนวน 24 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 24.49 ของฝุ่นที่นำมาตรวจจำนวน 98 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างฝุ่นที่เก็บจากพื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานครจำนวน 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.94 ของ 63 ตัวอย่าง) สมุทรปราการ 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 36.36 ของ 11 ตัวอย่าง) ปทุมธานี 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50 ของ 12 ตัวอย่าง) สุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50 ของ 4 ตัวอย่าง) อ่างทอง 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.67 ของ 18 ตัวอย่าง) และขอนแก่น 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40 ของ 10 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ดังข้อมูลแสดงไว้ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง (no sample = ตัวอย่างที่มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	flotation+กล้องจุลทรรศน์		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
13	JBR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
14	ABR	กรุงเทพมหานคร	no samples	no sample	no sample
15	APR	กรุงเทพมหานคร	DPT	no sample	no sample
16	TBR	กรุงเทพมหานคร	no samples	no sample	no sample
17	TPR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
18	PBR	กรุงเทพมหานคร	no samples	no sample	no sample
19	PLR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
20	PPH	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
21	NBR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
22	WBR	กรุงเทพมหานคร	no samples	no sample	no sample
23	WSF	กรุงเทพมหานคร	no samples	no sample	no sample
24	GBR	กรุงเทพมหานคร	no samples	no sample	no sample
25	K. Mui	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
26	K. Jom	กรุงเทพมหานคร	DPT	DF	no sample
27	PN 46	กรุงเทพมหานคร	DPT	negative	no sample
28	CHBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
29	CHSF	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
30	PN 502	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
31	KJBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
32	PSBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
33	NUWAT	กรุงเทพมหานคร	DF	no sample	no sample
34	VIIS	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample

ตารางที่ 2.3 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง (no sample = ตัวอย่างที่มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*) (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ID	จังหวัด	flotation+กล้องจุลทรรศน์		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
35	BNBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
36	AKSON	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
37	PYPUK	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
38	SUBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
39	PN 505	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
40	PN 407	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
41	AGBR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
42	PKBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
43	SUBR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
44	KMBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
45	VIBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
46	CHBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
47	SIBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
48	SOBR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
49	SUPBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
50	SABR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
51	NOKBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
52	PAT	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
53	WANDEE	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
54	JONG	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
55	CLBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
56	VOTEE	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample

ตารางที่ 2.3 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับตัวอย่างฝุ่นจาก
ที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง (no sample = ตัวอย่างที่มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการ
ตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*)
(ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	flotation+กล้องจุลทรรศน์		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
57	SUMAT	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
58	RIMBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
59	RUNU	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
60	SUWAN	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
61	TANON	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
62	KWAN	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
63	CHBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
64	SIBR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
65	NIBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
66	WABR	กรุงเทพมหานคร	DPT	no sample	no sample
67	NEBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
68	PABR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
69	ZIBR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
70	PEBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
71	SOBR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
72	ORBR	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
73	KABR-1	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	no sample
74	KABR-2	กรุงเทพมหานคร	negative	no sample	no sample
75	MOBR	กรุงเทพมหานคร	no sample	no sample	no sample
76	Nim	สมุทรปราการ	negative	no sample	no sample
77	Rod	สมุทรปราการ	DPT	no sample	no sample
78	Pel	สมุทรปราการ	negative	no sample	no sample
79	Tal	สมุทรปราการ	negative	no sample	no sample

ตารางที่ 2.3 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์โรฝุ่นด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับตัวอย่างฝุ่นจาก
ที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง (no sample = ตัวอย่างที่มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการ
ตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*)
(ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	flotation+กล้องจุลทรรศน์		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
80	Nong	สมุทรปราการ	negative	no sample	no sample
81	Pai	สมุทรปราการ	negative	no sample	no sample
82	Ack	สมุทรปราการ	negative	no sample	no sample
83	Dome	สมุทรปราการ	DPT, DF	no sample	no sample
84	Tian	สมุทรปราการ	DPT	no sample	no sample
85	Yong	สมุทรปราการ	negative	no sample	no sample
86	Aiew	สมุทรปราการ	DF	no sample	no sample
87	TONG	ปทุมธานี	DPT	no sample	no sample
88	TIP	ปทุมธานี	DF	no sample	no sample
89	SUBR	ปทุมธานี	negative	no sample	no sample
90	JANBR	ปทุมธานี	DPT, DF	no sample	no sample
91	NUBR	ปทุมธานี	negative	no sample	no sample
92	ENGBR	ปทุมธานี	negative	no sample	no sample
93	SUVIT	ปทุมธานี	DPT	no sample	no sample
94	RUNG	ปทุมธานี	negative	no sample	no sample
95	Pong	ปทุมธานี	negative	negative	no sample
96	Jun	ปทุมธานี	DPT	DPT, DF	no sample
97	Thak	ปทุมธานี	negative	DPT	no sample
98	Tip	ปทุมธานี	negative	negative	no sample
99	Kik 1	นครสวรรค์	no sample	no sample	no sample
100	Nut 1	นครสวรรค์	negative	negative	no sample
101	Nut 2	นครสวรรค์	negative	negative	no sample
102	Nut 3	นครสวรรค์	negative	negative	no sample

ตารางที่ 2.3 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับตัวอย่างฝุ่นจาก
ที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง (no sample = ตัวอย่างที่มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการ
ตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*)
(ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	flotation+กล้องจุลทรรศน์		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
103	Kik 2	นครสวรรค์	negative	negative	no sample
104	Kik 3	นครสวรรค์	no sample	no sample	no sample
105	Pratum	สุพรรณบุรี	negative	negative	no sample
106	Kon	สุพรรณบุรี	DPT	negative	no sample
107	Pikul	สุพรรณบุรี	DPT	negative	no sample
108	Gof	สุพรรณบุรี	negative	negative	no sample
109	montean	อ่างทอง	negative	No sample	no sample
110	prayong	อ่างทอง	negative	No sample	no sample
111	yong	อ่างทอง	negative	No sample	no sample
112	toy	อ่างทอง	negative	No sample	no sample
113	koy	อ่างทอง	negative	No sample	no sample
114	kob	อ่างทอง	negative	no sample	no sample
115	thonggon	อ่างทอง	negative	no sample	no sample
116	kanjana	อ่างทอง	negative	no sample	no sample
117	chalar	อ่างทอง	DPT	no sample	no sample
118	mod	อ่างทอง	DF	no sample	no sample
119	prang	อ่างทอง	negative	no sample	no sample
120	som	อ่างทอง	negative	no sample	no sample
121	paew	อ่างทอง	negative	no sample	no sample
122	malai	อ่างทอง	DF	no sample	no sample
123	turean	อ่างทอง	negative	no sample	no sample
124	tongyou	อ่างทอง	negative	no sample	no sample
125	mongkol	อ่างทอง	negative	no sample	no sample

ตารางที่ 2.3 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับตัวอย่างฝุ่นจาก
ที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง (no sample = ตัวอย่างที่มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการ
ตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*)
(ต่อ)

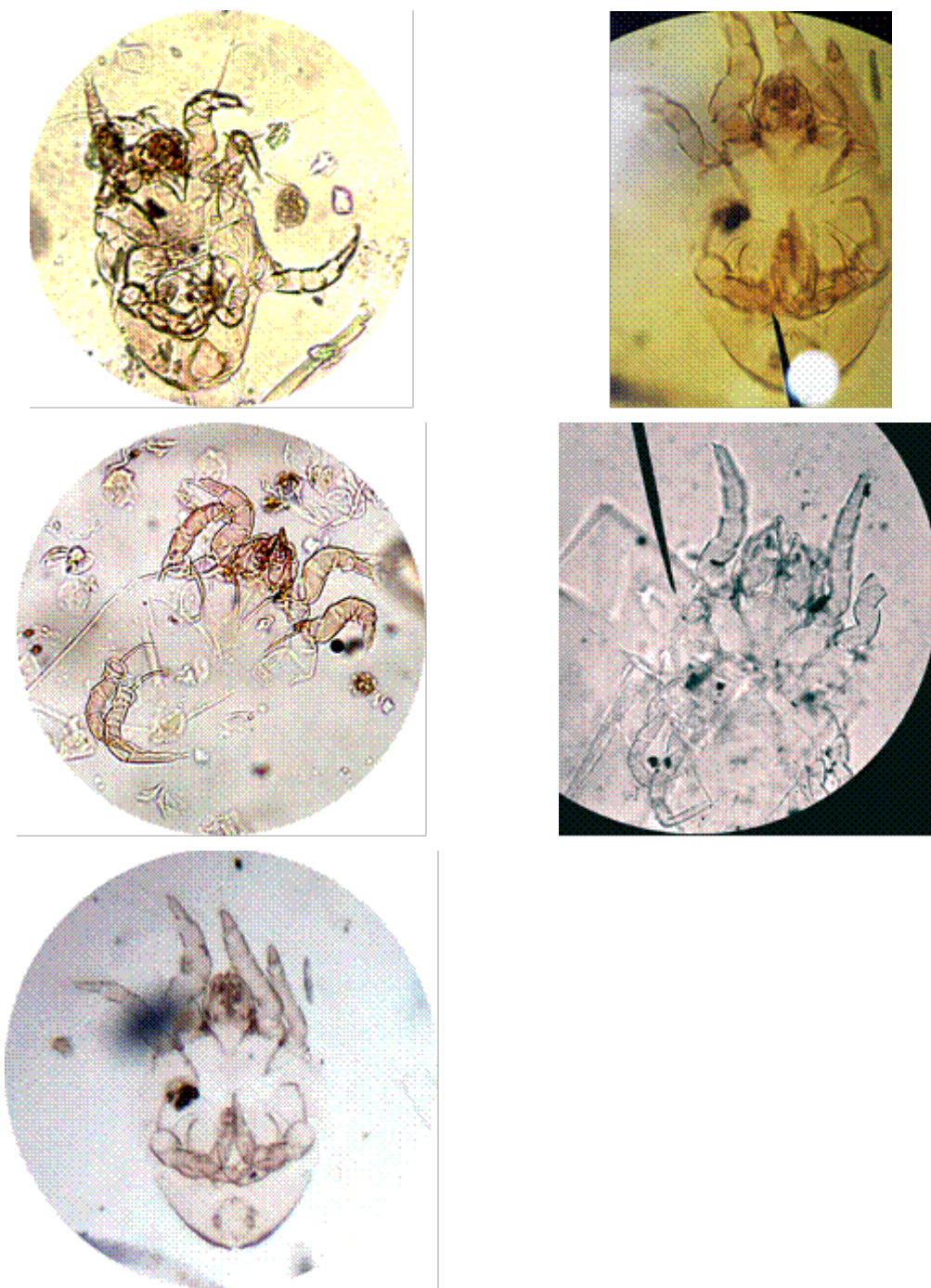
ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	flotation+กล้องจุลทรรศน์		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
126	pouw	อ่างทอง	negative	no sample	no sample
127	Wean	ขอนแก่น	DPT	negative	no sample
128	Tong	ขอนแก่น	negative	negative	no sample
129	Ja	ขอนแก่น	DPT	negative	no sample
130	Lap	ขอนแก่น	DPT	negative	no sample
131	Ball	ขอนแก่น	DF	negative	no sample
132	Pen	ขอนแก่น	negative	negative	no sample
133	Ploy	ขอนแก่น	negative	negative	no sample
134	Nong	ขอนแก่น	negative	negative	no sample
135	Mam	ขอนแก่น	negative	negative	no sample
136	Mon	ขอนแก่น	negative	negative	no sample

การจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ไรฝุ่นที่ตรวจพบเป็นไรฝุ่นสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus* (ดังแสดงในรูปที่ 2.18) จากฝุ่นจำนวน 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 82.61 ของ 23 ตัวอย่าง) และสายพันธุ์ *Dermatophagoides farinae* (ดังแสดงในรูปที่ 2.19) จากฝุ่นจำนวน 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 43.48 ของ 23 ตัวอย่าง) และไม่สามารถตรวจพบไรฝุ่นสายพันธุ์ *Blomia tropicalis* เลย นอกจากนั้นยังตรวจพบไรสายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ ไรตัวห้ำสายพันธุ์ *Cheyletus* sp. ไรสายพันธุ์ *Tarsonemus* sp. และ *Suidasia* sp. ซึ่งเป็นไรที่ไม่ได้สร้างสารก่อภูมิแพ้ และยังตรวจพบชิ้นส่วนของแมลงด้วย เช่น ไร้น มด (ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.20)

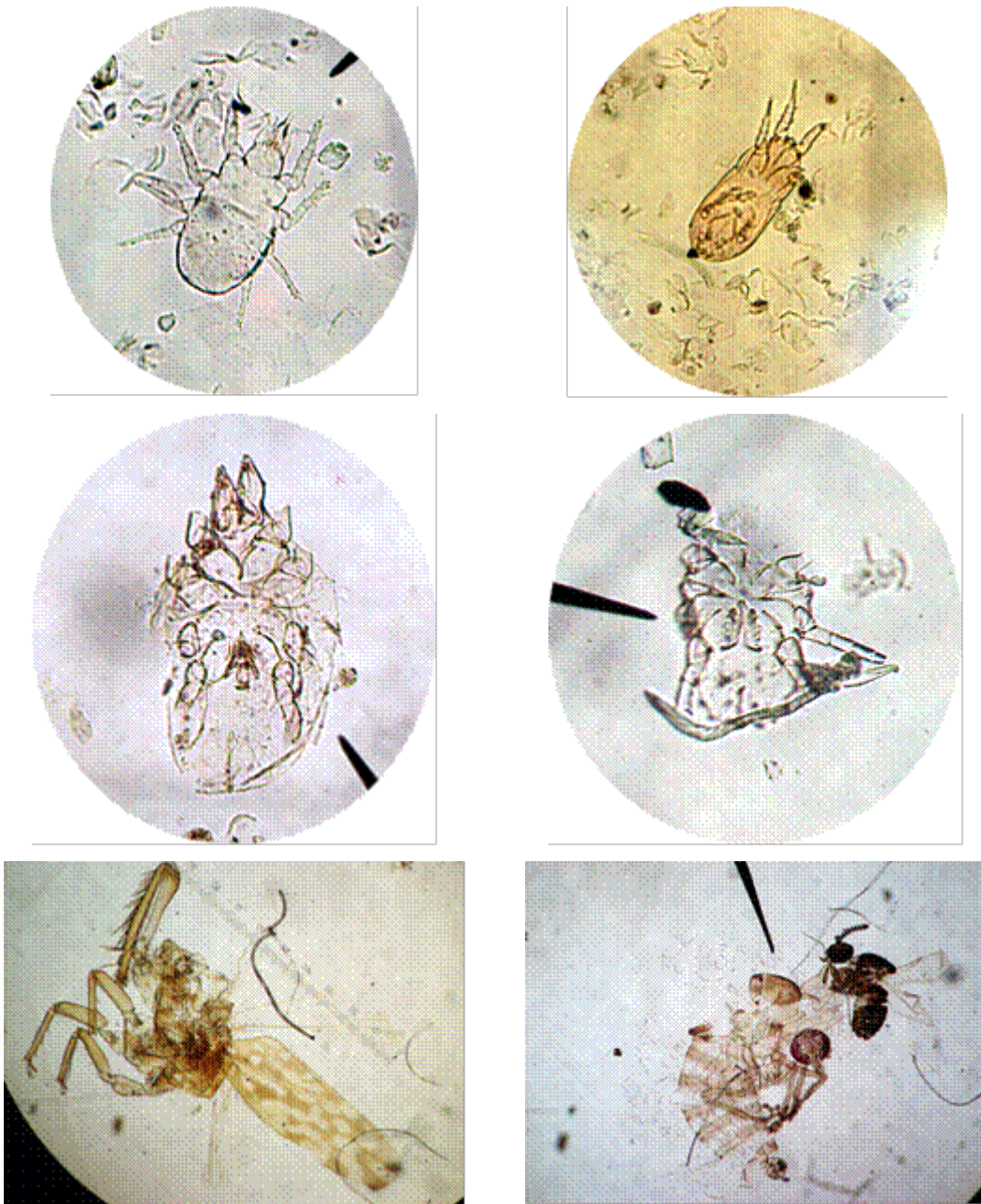
จากการสังเกตของผู้วิจัยพบว่า ไรฝุ่นส่วนใหญ่ที่ตรวจพบด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ นี้ เป็นไรฝุ่นที่อยู่ในสภาพดี ลำตัวสมบูรณ์ไม่ฉีกขาด ซึ่งสามารถดูดซับแอลกอฮอล์และลอยตัวขึ้นสู่ผิวของสารละลายเกลืออิ่มตัวได้



รูปที่ 2.18 รูปร่างลักษณะของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งตรวจพบในตัวอย่างฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 2.19 รูปร่างลักษณะของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. farinae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งตรวจพบในตัวอย่างฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 2.20 รูปร่างลักษณะของไรสายพันธุ์อื่นๆ และชิ้นส่วนของแมลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งตรวจพบในตัวอย่างฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ จากรูปบนซ้ายไปขวาแล้วลงล่าง ได้แก่ ไรตัวห้ำ *Cheyletus* sp. ระยะ nymph, ไร *Tarsonemus* sp., ไร *Suidasia* sp. เพศผู้, ไร *Suidasia* sp. เพศเมีย, และชิ้นส่วนลำตัวของริน ตามลำดับ

ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี Multiplex PCR

ฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่างสามารถทำการตรวจหาไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ได้ทั้งหมด โดยทำการตรวจตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ผลของปฏิกิริยา multiplex PCR ซึ่งตรวจสอบใน agarose electrophoresis พบว่า มีผลผลิต DNA เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา (ผลบวก) กับตัวอย่างฝุ่นจำนวน 46 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 37.10 ของตัวอย่างฝุ่นทั้งหมด 124 ตัวอย่าง ตัวอย่างฝุ่นที่ตรวจพบไรฝุ่นเป็นตัวอย่างฝุ่นที่เก็บจากพื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานครจำนวน 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 41.30 ของ 46 ตัวอย่าง) สมุทรปราการ 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 63.64 ของ 11 ตัวอย่าง) ปทุมธานี 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 33.33 ของ 12 ตัวอย่าง) นครสวรรค์ 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 83.33 ของ 6 ตัวอย่าง) สุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50 ของ 4 ตัวอย่าง) อ่างทอง 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 38.89 ของ 18 ตัวอย่าง) และขอนแก่น 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20 ของ 10 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ดังข้อมูลแสดงไว้ใน [ตารางที่ 2.4](#)

ผลการตรวจและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR พบว่า เป็นไรฝุ่นสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus* จำนวน 31 ตัวอย่าง (ร้อยละ 67.39 ของ 46 ตัวอย่าง) สายพันธุ์ *Dermatophagoides farinae* จำนวน 29 ตัวอย่าง (ร้อยละ 63.04 ของ 46 ตัวอย่าง) และสายพันธุ์ *Blomia tropicalis* จำนวน 29 ตัวอย่าง (ร้อยละ 63.04 ของ 46 ตัวอย่าง)

ผู้วิจัยสังเกตพบว่า การตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR นี้สามารถตรวจพบและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นได้มากกว่าวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 22 ตัวอย่าง และสามารถตรวจพบ DNA ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *B. tropicalis* ได้

ตารางที่ 2.4 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR สำหรับตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำการตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	Multiplex PCR		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
1	JBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
2	ABR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
3	APR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
4	TBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
5	TPR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
6	PBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
7	PLR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
8	PPH	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
9	NBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
10	WBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
11	WSF	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
12	GBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
13	K. Mui	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
14	K. Jom	กรุงเทพมหานคร	DPT	DPT	negative
15	PN 46	กรุงเทพมหานคร	DPT	DF	negative
16	CHBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
17	CHSF	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
18	PN 502	กรุงเทพมหานคร	DPT	negative	negative
19	KJBR	กรุงเทพมหานคร	DF	negative	negative
20	PSBR	กรุงเทพมหานคร	DF	negative	negative
21	NUWAT	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
22	VIIS	กรุงเทพมหานคร	DF, BT	negative	negative

ตารางที่ 2.4 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR สำหรับตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำการตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*) (ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	Multiplex PCR		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
23	BNBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
24	AKSON	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
25	PYPUK	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
26	SUBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
27	PN 505	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
28	PN 407	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
29	AGBR	กรุงเทพมหานคร	BT	BT	DPT, DF, BT
30	PKBR	กรุงเทพมหานคร	BT	negative	DPT, DF, BT
31	SUBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	Negative
32	KMBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	DPT, DF, BT
33	VIBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	DPT, DF, BT
34	CHBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
35	SIBR	กรุงเทพมหานคร	BT	BT	DPT, DF, BT
36	SOBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
37	SUPBR	กรุงเทพมหานคร	negative	DPT	DPT, DF, BT
38	SABR	กรุงเทพมหานคร	BT	negative	DPT, DF, BT
39	NOKBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
40	PAT	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
41	WANDEE	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
42	JONG	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
43	CLBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
44	VOTEE	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative

ตารางที่ 2.4 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR สำหรับตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำการตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*) (ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	Multiplex PCR		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
45	SUMAT	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
46	RIMBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
47	RUNU	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
48	SUWAN	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
49	TANON	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
50	KWAN	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
51	CHBR	กรุงเทพมหานคร	DPT, BT	DPT, DF, BT	negative
52	SIBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
53	NIBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
54	WABR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
55	NEBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	DPT, DF, BT
56	PABR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
57	ZIBR	กรุงเทพมหานคร	DF	negative	DF
58	PEBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
59	SOBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
60	ORBR	กรุงเทพมหานคร	negative	BT	negative
61	KABR-1	กรุงเทพมหานคร	DF	negative	DF
62	KABR-2	กรุงเทพมหานคร	DPT	negative	negative
63	MOBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative	negative
64	Nim	สมุทรปราการ	negative	negative	DPT
65	Rod	สมุทรปราการ	negative	negative	DPT, DF
66	Pel	สมุทรปราการ	negative	negative	negative
67	Tal	สมุทรปราการ	negative	DPT	DPT

ตารางที่ 2.4 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR สำหรับตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำการตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*) (ต่อ)

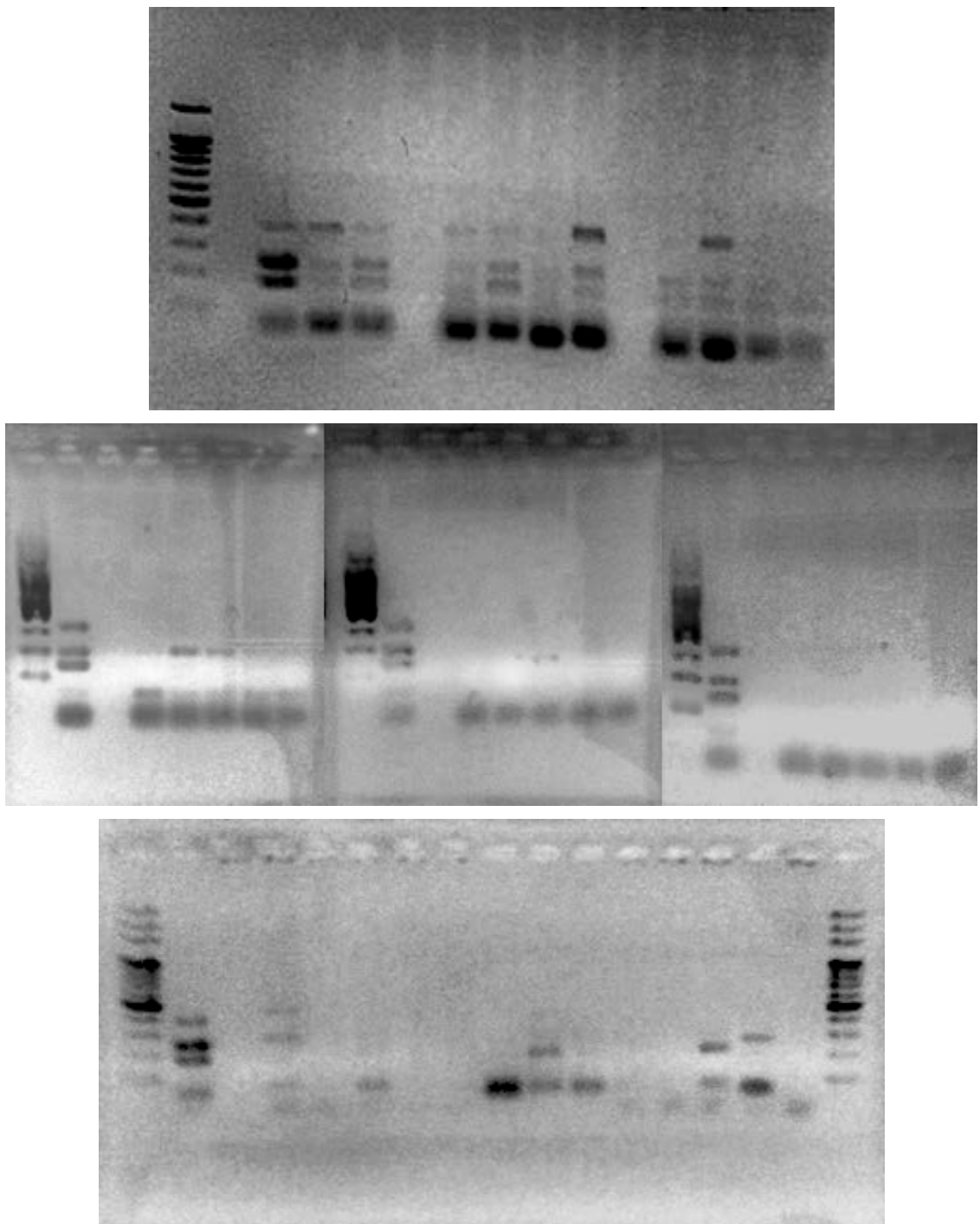
ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	Multiplex PCR		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
68	Nong	สมุทรปราการ	negative	negative	negative
69	Pai	สมุทรปราการ	negative	negative	negative
70	Ack	สมุทรปราการ	BT	BT	BT
71	Dome	สมุทรปราการ	BT	DF, BT	DF
72	Tian	สมุทรปราการ	negative	negative	negative
73	Yong	สมุทรปราการ	negative	DPT, BT	DPT, BT
74	Aiew	สมุทรปราการ	negative	negative	DF
75	TONG	ปทุมธานี	negative	negative	negative
76	TIP	ปทุมธานี	negative	negative	negative
77	SUBR	ปทุมธานี	negative	negative	negative
78	JANBR	ปทุมธานี	negative	negative	negative
79	NUBR	ปทุมธานี	negative	negative	negative
80	ENGBR	ปทุมธานี	negative	negative	negative
81	SUVIT	ปทุมธานี	negative	negative	negative
82	RUNG	ปทุมธานี	negative	negative	negative
83	Pong	ปทุมธานี	negative	negative	DPT, DF
84	Jun	ปทุมธานี	DPT, DF, BT	DPT, BT	DPT, DF, BT
85	Thak	ปทุมธานี	DPT, DF, BT	DPT, BT	DPT, DF, BT
86	Tip	ปทุมธานี	DPT, DF, BT	negative	DPT, DF
87	Kik 1	นครสวรรค์	DPT, DF, BT	negative	negative
88	Nut 1	นครสวรรค์	DPT, DF, BT	negative	DPT
89	Nut 2	นครสวรรค์	DPT, DF, BT	negative	DF
90	Nut 3	นครสวรรค์	DPT, DF, BT	negative	negative

ตารางที่ 2.4 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR สำหรับตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำการตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*) (ต่อ)

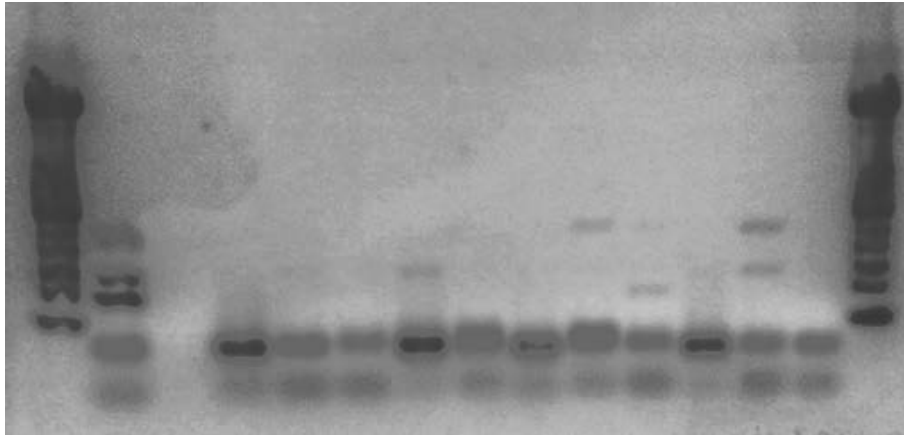
ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	Multiplex PCR		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
91	Kik 2	นครสวรรค์	negative	negative	negative
92	Kik 3	นครสวรรค์	DPT, DF, BT	negative	negative
93	Pratum	สุพรรณบุรี	negative	negative	negative
94	Kon	สุพรรณบุรี	DPT	DPT	negative
95	Pikul	สุพรรณบุรี	negative	DPT	negative
96	Gof	สุพรรณบุรี	negative	negative	negative
97	montean	อ่างทอง	negative	BT	negative
98	prayong	อ่างทอง	negative	negative	negative
99	yong	อ่างทอง	negative	negative	negative
100	toy	อ่างทอง	negative	negative	negative
101	koy	อ่างทอง	negative	BT	negative
102	kob	อ่างทอง	negative	BT	negative
103	thonggon	อ่างทอง	negative	negative	negative
104	kanjana	อ่างทอง	negative	negative	negative
105	chalar	อ่างทอง	negative	negative	negative
106	mod	อ่างทอง	negative	DF	negative
107	prang	อ่างทอง	negative	negative	negative
108	som	อ่างทอง	negative	negative	negative
109	paew	อ่างทอง	negative	DPT, BT	negative
110	malai	อ่างทอง	negative	BT	negative
111	turean	อ่างทอง	negative	negative	negative
112	tongyou	อ่างทอง	negative	negative	negative
113	mongkol	อ่างทอง	negative	negative	negative

ตารางที่ 2.4 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR สำหรับตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำการตรวจ 3 ซ้ำ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*) (ต่อ)

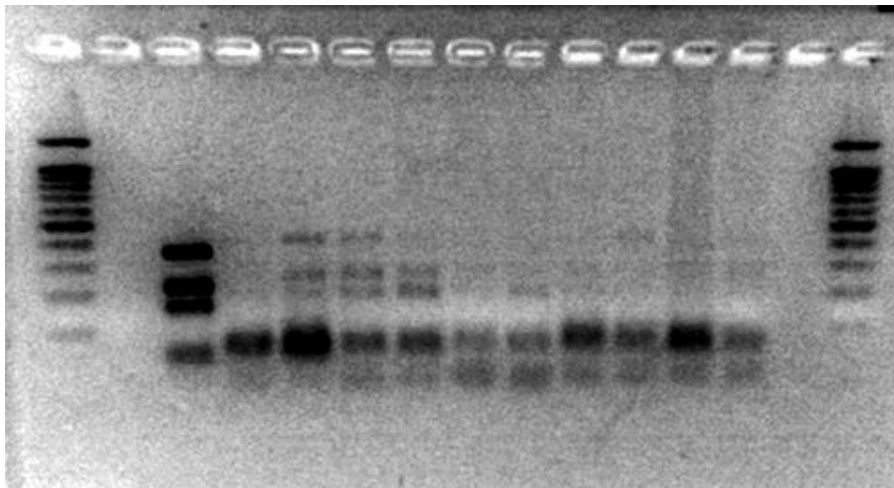
ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	Multiplex PCR		
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
114	pouw	อ่างทอง	DPT, BT	negative	negative
115	Wean	ขอนแก่น	DPT, BT	negative	BT
116	Tong	ขอนแก่น	negative	negative	negative
117	Ja	ขอนแก่น	negative	negative	negative
118	Lap	ขอนแก่น	negative	negative	negative
119	Ball	ขอนแก่น	DF	negative	negative
120	Pen	ขอนแก่น	negative	negative	negative
121	Ploy	ขอนแก่น	negative	negative	negative
122	Nong	ขอนแก่น	negative	negative	negative
123	Mam	ขอนแก่น	negative	negative	negative
124	Mon	ขอนแก่น	negative	negative	negative



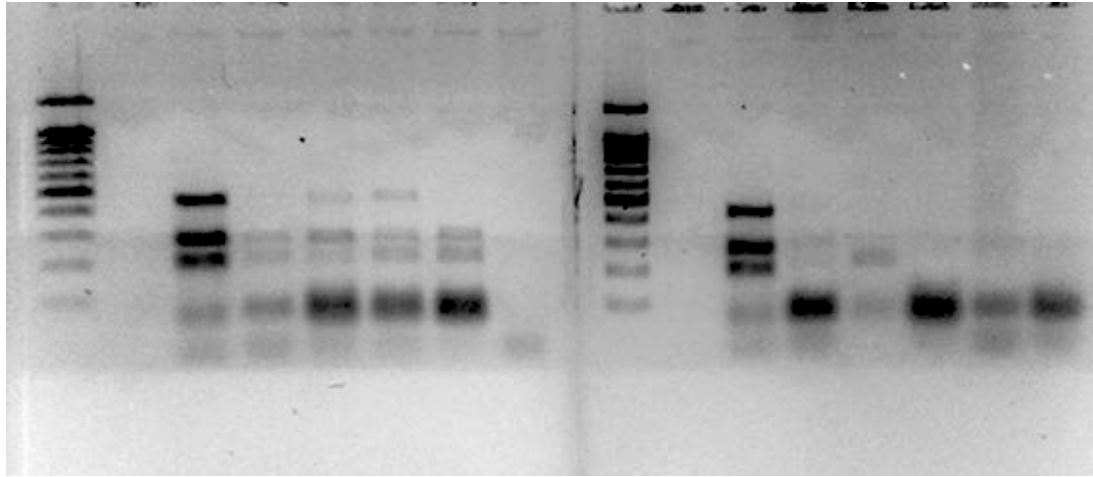
รูปที่ 2.21 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนก
 สายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร
 แถบ DNA ล่างสุด (143 bp) = สายพันธุ์ *Dermatophagoides farinae*
 แถบกลาง (221 bp) = สายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus*
 แถบ DNA บนสุด (318 bp) = สายพันธุ์ *Blomia tropicalis*



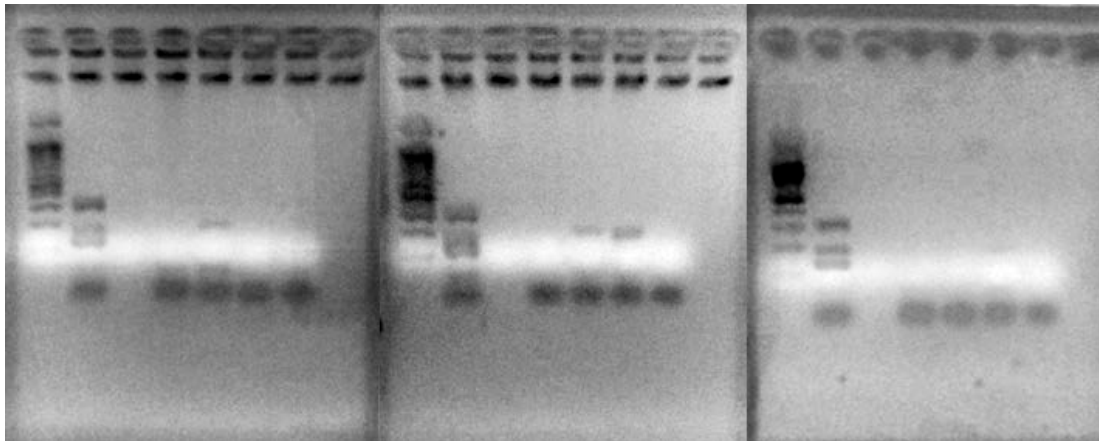
รูปที่ 2.22 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดสมุทรปราการ
 แถบ DNA ล่างสุด (143 bp) = สายพันธุ์ *Dermatomphagoides farinae*
 แถบกลาง (221 bp) = สายพันธุ์ *Dermatomphagoides pteronyssinus*
 แถบ DNA บนสุด (318 bp) = สายพันธุ์ *Blomia tropicalis*



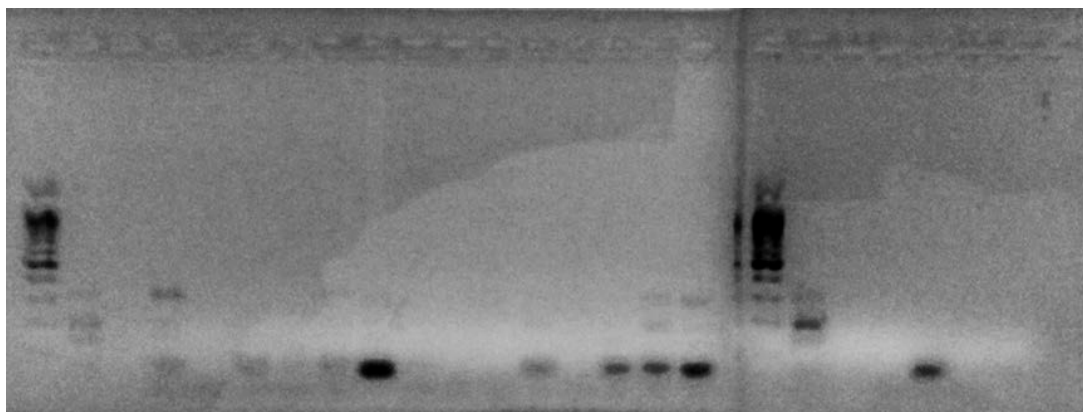
รูปที่ 2.23 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดปทุมธานี
 แถบ DNA ล่างสุด (143 bp) = สายพันธุ์ *Dermatomphagoides farinae*
 แถบกลาง (221 bp) = สายพันธุ์ *Dermatomphagoides pteronyssinus*
 แถบ DNA บนสุด (318 bp) = สายพันธุ์ *Blomia tropicalis*



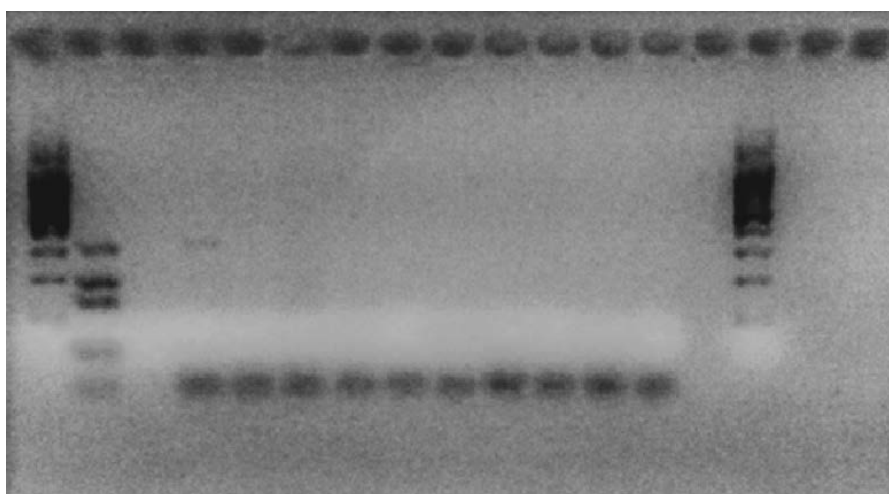
รูปที่ 2.24 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนก
 สายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดนครสวรรค์
 แถบ DNA ล่างสุด (143 bp) = สายพันธุ์ *Dermatophagoides farinae*
 แถบกลาง (221 bp) = สายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus*
 แถบ DNA บนสุด (318 bp) = สายพันธุ์ *Blomia tropicalis*



รูปที่ 2.25 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนก
 สายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดสุพรรณบุรี
 แถบ DNA ล่างสุด (143 bp) = สายพันธุ์ *Dermatophagoides farinae*
 แถบกลาง (221 bp) = สายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus*
 แถบ DNA บนสุด (318 bp) = สายพันธุ์ *Blomia tropicalis*



รูปที่ 2.26 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนก
 สายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดอ่างทอง
 แถบ DNA ล่างสุด (143 bp) = สายพันธุ์ *Dermatomphagoides farinae*
 แถบกลาง (221 bp) = สายพันธุ์ *Dermatomphagoides pteronyssinus*
 แถบ DNA บนสุด (318 bp) = สายพันธุ์ *Blomia tropicalis*



รูปที่ 2.27 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนก
 สายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดขอนแก่น
 แถบ DNA ล่างสุด (143 bp) = สายพันธุ์ *Dermatomphagoides farinae*
 แถบกลาง (221 bp) = สายพันธุ์ *Dermatomphagoides pteronyssinus*
 แถบ DNA บนสุด (318 bp) = สายพันธุ์ *Blomia tropicalis*

การเปรียบเทียบผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น

เมื่อนำข้อมูลผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นจำนวน 98 ตัวอย่าง ด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ กับ วิธี multiplex PCR มาจับคู่กัน พบว่า ให้ผลตรงกันจำนวน 65 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 66.33 โดยเป็นผลบวกตรงกัน (พบไรฝุ่น) จำนวน 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20 ของ 65 ตัวอย่าง) และเป็นผลลบ (ไม่พบไรฝุ่น) 51 ตัวอย่าง (ร้อยละ 78.46 ของ 65 ตัวอย่าง) ดังข้อมูลแสดงไว้ในตารางที่ 2.5

การจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นที่ให้ผลบวกตรงกันทั้งสองวิธีจำนวน 13 ตัวอย่าง นั้นพบว่า เป็นไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* จำนวน 8 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 14,15,65,84,85,94,95,115) และสายพันธุ์ *D. farinae* จำนวน 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 71,74,84,106,119) นอกจากนี้ ยังพบว่า ในขณะที่วิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ให้ผลลบ มีฝุ่นจำนวน 22 ตัวอย่างให้ผลบวกด้วยวิธี multiplex PCR ได้แก่ ตัวอย่างฝุ่นหมายเลข 18,29,38,51,62,64,67,73,83,86,88,89,90,109,114 ซึ่งพบไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ตัวอย่างฝุ่นหมายเลข 22,29,38,51,57,61,83,86,88,89,90 ซึ่งพบไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. farinae* และตัวอย่างหมายเลข 22,29,38,51,60,73,86,88,89,90,97,101,102,109 ซึ่งพบไรฝุ่นสายพันธุ์ *B. tropicalis* อย่างไรก็ตามก็ยังพบว่าฝุ่นบางตัวอย่างก็ให้ผลบวกจากการตรวจหาไรฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ในขณะที่วิธี multiplex PCR ให้ผลลบ (ไม่พบไรฝุ่น) จำนวน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างฝุ่นหมายเลข 3,21,54,72,75,76,78,81,105,117,118

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบข้อมูลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น ระหว่างวิธี flotation+ กล้องจุลทรรศน์ กับ วิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นที่จับคู่ได้จำนวน 98 ตัวอย่าง (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	flotation+กล้องจุลทรรศน์	Multiplex PCR
1	JBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
3	APR	กรุงเทพมหานคร	DPT	negative
5	TPR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
7	PLR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
8	PPH	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
9	NBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
13	K. Mui	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
14	K. Jom	กรุงเทพมหานคร	DPT, DF	DPT
15	PN 46	กรุงเทพมหานคร	DPT	DPT, DF
16	CHBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
17	CHSF	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
18	PN 502	กรุงเทพมหานคร	negative	DPT
21	NUWAT	กรุงเทพมหานคร	DF	negative
22	VIIS	กรุงเทพมหานคร	negative	DF, BT
24	AKSON	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
25	PYPUK	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
26	SUBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
27	PN 505	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
28	PN 407	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
29	AGBR	กรุงเทพมหานคร	negative	DPT, DF, BT
31	SUBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
36	SOBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบข้อมูลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น ระหว่างวิธี flotation+ กล้องจุลทรรศน์ กับ วิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นที่จับคู่ได้จำนวน 98 ตัวอย่าง (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*) (ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	flotation+กล้องจุลทรรศน์	Multiplex PCR
38	SABR	กรุงเทพมหานคร	negative	DPT, DF, BT
39	NOKBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
40	PAT	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
41	WANDEE	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
42	JONG	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
44	VOTEE	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
45	SUMAT	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
46	RIMBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
50	KWAN	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
51	CHBR	กรุงเทพมหานคร	negative	DPT, DF, BT
52	SIBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
54	WABR	กรุงเทพมหานคร	DPT	negative
57	ZIBR	กรุงเทพมหานคร	negative	DF
59	SOBR	กรุงเทพมหานคร	negative	negative
60	ORBR	กรุงเทพมหานคร	negative	BT
61	KABR-1	กรุงเทพมหานคร	negative	DF
62	KABR-2	กรุงเทพมหานคร	negative	DPT
64	Nim	สมุทรปราการ	negative	DPT
65	Rod	สมุทรปราการ	DPT	DPT, DF
66	Pel	สมุทรปราการ	negative	negative
67	Tal	สมุทรปราการ	negative	DPT
68	Nong	สมุทรปราการ	negative	negative

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบข้อมูลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น ระหว่างวิธี flotation+ กล้องจุลทรรศน์ กับ วิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นที่จับคู่ได้จำนวน 98 ตัวอย่าง (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*) (ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	flotation+กล้องจุลทรรศน์	Multiplex PCR
69	Pai	สมุทรปราการ	negative	negative
70	Ack	สมุทรปราการ	negative	BT
71	Dome	สมุทรปราการ	DPT, DF	DF, BT
72	Tian	สมุทรปราการ	DPT	negative
73	Yong	สมุทรปราการ	negative	DPT, BT
74	Aiew	สมุทรปราการ	DF	DF
75	TONG	ปทุมธานี	DPT	negative
76	TIP	ปทุมธานี	DF	negative
77	SUBR	ปทุมธานี	negative	negative
78	JANBR	ปทุมธานี	DPT, DF	negative
79	NUBR	ปทุมธานี	negative	negative
80	ENGBR	ปทุมธานี	negative	negative
81	SUVIT	ปทุมธานี	DPT	negative
82	RUNG	ปทุมธานี	negative	negative
83	Pong	ปทุมธานี	negative	DPT, DF, BT
84	Jun	ปทุมธานี	DPT, DF	DPT, DF, BT
85	Thak	ปทุมธานี	DPT	DPT, DF, BT
86	Tip	ปทุมธานี	negative	DPT, DF, BT
88	Nut 1	นครสวรรค์	negative	DPT, DF, BT
89	Nut 2	นครสวรรค์	negative	DPT, DF, BT
90	Nut 3	นครสวรรค์	negative	DPT, DF, BT
91	Kik 2	นครสวรรค์	negative	negative
93	Pratum	สุพรรณบุรี	negative	negative

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบข้อมูลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น ระหว่างวิธี flotation+ กล้องจุลทรรศน์ กับ วิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นที่จับคู่ได้จำนวน 98 ตัวอย่าง (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*) (ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	flotation+กล้องจุลทรรศน์	Multiplex PCR
94	Kon	สุพรรณบุรี	DPT	DPT
95	Pikul	สุพรรณบุรี	DPT	DPT
96	Gof	สุพรรณบุรี	negative	negative
97	Montean	อ่างทอง	negative	BT
98	Prayong	อ่างทอง	negative	negative
99	Yong	อ่างทอง	negative	negative
100	Toy	อ่างทอง	negative	negative
101	Koy	อ่างทอง	negative	BT
102	Kob	อ่างทอง	negative	BT
103	Thonggon	อ่างทอง	negative	negative
104	Kanjana	อ่างทอง	negative	negative
105	Chalor	อ่างทอง	DPT	negative
106	Mod	อ่างทอง	DF	DF
107	Prang	อ่างทอง	negative	negative
108	Som	อ่างทอง	negative	negative
109	Paew	อ่างทอง	negative	DPT, BT
110	Malai	อ่างทอง	DF	BT
111	Turean	อ่างทอง	negative	negative
112	Tongyou	อ่างทอง	negative	negative
113	Mongkol	อ่างทอง	negative	negative
114	Pouw	อ่างทอง	negative	DPT, BT
115	Wean	ขอนแก่น	DPT	DPT, BT
116	Tong	ขอนแก่น	negative	negative

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบข้อมูลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น ระหว่างวิธี flotation+ กล้องจุลทรรศน์ กับ วิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นที่จับคู่ได้จำนวน 98 ตัวอย่าง (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*) (ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	ID	จังหวัด	flotation+กล้องจุลทรรศน์	Multiplex PCR
117	Ja	ขอนแก่น	DPT	negative
118	Lap	ขอนแก่น	DPT	negative
119	Ball	ขอนแก่น	DF	DF
120	Pen	ขอนแก่น	negative	negative
121	Ploy	ขอนแก่น	negative	negative
122	Nong	ขอนแก่น	negative	negative
123	Mam	ขอนแก่น	negative	negative
124	Mon	ขอนแก่น	negative	negative

เมื่อนำข้อมูลผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นของทั้งสองวิธีการมาจับคู่กันดังแสดงในตารางที่ 2.6 และตารางที่ 2.7 พบว่า วิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ และวิธี multiplex PCR จำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นได้ตรงกันจำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่ง 5 ตัวอย่างตรวจพบไรฝุ่นเพียงหนึ่งสายพันธุ์ ได้แก่ *D. pteronyssinus* (2 ตัวอย่าง) และ *D. farinae* (3 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ส่วนอีก 7 ตัวอย่างพบไรฝุ่นมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ นอกจากนั้นยังพบว่า ตัวอย่างฝุ่นจำนวน 18 ตัวอย่างมีไรฝุ่นมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์จากการตรวจด้วยวิธี multiplex PCR ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ ตรวจพบไรฝุ่นมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ได้เพียง 4 ตัวอย่างซึ่งตรงกับผลการตรวจด้วยวิธี multiplex PCR จำนวน 2 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2.6 จำนวนตัวอย่างฝุ่นที่ให้ผลต่างๆ จากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ และวิธี multiplex PCR
(DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*;
(-) ve = ไม่พบไรฝุ่น)

Flotation +กล้องจุลทรรศน์	Multiplex PCR								รวม
	DPT	DF	BT	DPT+DF	DPT+BT	DF+BT	DPT	(-) ve	
							+DF +BT		
DPT	2	0	0	2	1	0	1	8	14
DF	0	3	1	0	0	0	0	2	6
BT	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DPT+DF	1	0	0	0	0	1	1	1	4
DPT+BT	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DF+BT	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DPT+DF+BT	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(-) ve	4	2	5	1	2	1	8	51	74
รวม	7	5	6	3	3	2	10	62	98

ตารางที่ 2.7 ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR และ วิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ (DPT = *D. pteronyssinus*; DF = *D. farinae*; BT = *B. tropicalis*; (-) ve = ไม่พบไรฝุ่น)

Flotation +กล้องจุลทรรศน์	Multiplex PCR			รวม
	(+) ve		(-) ve	
	สายพันธุ์ ตรงกัน	สายพันธุ์ ไม่ตรงกัน		
(+) ve	12	1	11	24
(-) ve		23	51	74
รวม		36	62	98

จากข้อมูลรวมในตารางที่ 2.7 นี้ สามารถคำนวณค่าความไวของการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR เท่ากับร้อยละ 54.17 (13/24) ในขณะที่ค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 68.92 (51/74)

ในทางกลับกัน เมื่อให้วิธี multiplex PCR เป็นวิธีอ้างอิง สามารถคำนวณค่าความไวของการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ ได้เพียงร้อยละ 36.12 (13/36) แต่มีค่าความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 82.26 (51/62)

สำหรับค่าความแม่นยำของการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ เท่ากับร้อยละ 65.31 (13+51/98)

อภิปรายและวิจารณ์ผล

การตรวจวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้ในบ้านเรือนของผู้ป่วย เป็นมาตรการสำคัญในการป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยสัมผัสสารก่อภูมิแพ้ โดยถาลดปริมาณสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นในที่พักอาศัยได้ ผู้ป่วยก็จะลดการสัมผัสสารก่อภูมิแพ้ ลดการกระตุ้นและมีผลให้เกิดโรคหรืออาการทางคลินิกลดลง ในความเป็นจริงผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่ทราบว่ามีการก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นในบ้านพักอาศัย เพราะไม่สามารถมองเห็นได้ ดังนั้นการตรวจพบปริมาณสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นด้วยชุดตรวจหาและวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้ จะเป็นตัวบ่งชี้ให้ผู้ป่วยตระหนักถึงสภาพแวดล้อมของบ้านพักอาศัย ให้ความร่วมมือและพร้อมที่จะทำตามคำแนะนำจากแพทย์มากขึ้น

การตรวจจำแนกสายพันธุ์ของแมลงและสัตว์ขาข้อหลายชนิดที่มีขนาดเล็ก และ/หรือ มีรูปร่างลักษณะใกล้เคียงกันมากระหว่างสายพันธุ์ มีความยากลำบากเพราะต้องอาศัยกระบวนการเตรียมตัวอย่างและต้องอาศัยความชำนาญของบุคลากรเฉพาะด้านกีฏวิทยา ทำให้ข้อมูลเกี่ยวกับแมลงและสัตว์ขาข้อเหล่านี้มีอยู่จำกัด การจำแนกสายพันธุ์ของแมลงด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาจึงถูกนำไปประยุกต์ใช้ วิธีเหล่านี้ได้แก่ RAPD (Random amplified polymorphic DNA), RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism เป็นต้น ในการศึกษาวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาวิธีตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นที่พบบ่อยในประเทศไทยด้วยเทคนิค Multiplex PCR แม้ว่าวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้นจะสามารถตรวจจำแนกไรฝุ่นได้เพียง 3 สายพันธุ์เท่านั้น แต่ก็ทำให้มุมมองของการตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นไม่ยุ่งยากอีกต่อไป

วิธีการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นแบบดั้งเดิมด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์นั้นเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และต้องใช้ผู้ที่มีความรู้ความชำนาญเฉพาะทางด้านกีฏวิทยาหรือด้านไรวิทยา ในช่วงต้นๆ ของการตรวจหาไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นโดยชาวเนเธอร์แลนด์ (ประมาณปี ค.ศ. 1960) (Voorhorst *et al.*, 1962) จะเป็นการตรวจดูตัวอย่างฝุ่นทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (absolute amount) ซึ่งต้องใช้ความพยายามและความมุ่งมั่นในการตรวจอย่างมาก ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อช่วยให้การตรวจหาไรฝุ่นง่ายขึ้น เช่น การสุมตัวอย่าง การใช้สีย้อม การลอยตัวในสารละลาย (flotation) จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1987 Hart & Fain (1987) ได้พัฒนาเทคนิคการลอยตัวในสารละลายเกลืออิ่มตัวจนดีและทดลองกับไรฝุ่น พบว่า สามารถแยกไรฝุ่นได้ถึงร้อยละ 98 ของไรฝุ่นที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ต่อมาจึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการสำรวจไรฝุ่นในธรรมชาติ ญัฐ มาลัยนวล และคณะ (Malainual *et al.*, 1995) ได้ใช้วิธี flotation นี้ในการสำรวจการแพร่กระจายของไรฝุ่นตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2534-2537 อย่างไรก็ตามวิธี flotation นี้ยังมีข้อด้อยในการแยกไรฝุ่นออกจากตัวอย่างฝุ่นอยู่บ้าง เนื่องจากวิธีนี้เหมาะสำหรับไรฝุ่นที่มีชีวิต ลำตัวยังอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์จึงสามารถเก็บคืน (recovery) จากฝุ่นได้ง่าย แต่หากเป็นเศษซากของไรฝุ่นที่ตายแล้วเช่นเดียวกับเศษผงต่างๆ ในฝุ่น การแยกตัวออกจากฝุ่นนั้นเป็นไปได้ยาก ดังนั้นการตรวจหาไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นด้วยวิธี Flotation นี้จะมีความผิดพลาดเกี่ยวกับปริมาณไรฝุ่นที่แท้จริงในธรรมชาติได้ นอกจากนั้นแล้วการจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต้องใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างบนกระจกสไลด์ ดังนั้นการตรวจหาไรฝุ่นในตัวอย่างจำนวนมากๆ เช่น การสำรวจการแพร่กระจายของไรฝุ่นในชุมชน จะสิ้นเปลืองเวลาและงบประมาณ

เป็นอย่างมาก ดังที่ผู้วิจัยได้เคยประสบมาแล้วในการดำเนินการวิจัยก่อนหน้านี้ (Malainual *et al.*, 1995)

การศึกษานี้ คณะผู้วิจัยได้คัดเลือกคู่ primer ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ ได้แก่ *D. pteronyssinus*, *D. farinae* และ *B. tropicalis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบได้บ่อยตามที่อยู่อาศัยในประเทศไทย เมื่อทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR แล้วสามารถตรวจหา DNA ของไรฝุ่นได้ดีแม้ว่าจะมีปริมาณ DNA ในปริมาณที่น้อย จากผลการทดสอบประสิทธิภาพโดยใช้สารพันธุกรรม DNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ พบว่า วิธีนี้มีความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 100 และมีความสามารถในการตรวจหา DNA ของไรฝุ่นได้น้อยถึง 0.1 นาโนกรัม (ไรฝุ่น 1 ตัวมีปริมาณสารพันธุกรรม DNA ประมาณ 10 นาโนกรัม) ดังนั้นแม้ว่าตัวอย่างฝุ่นจะมีเพียงเศษซากของไรฝุ่นที่ตายไปแล้วก็ยังสามารถตรวจพบได้ ซึ่งปริมาณตัวอย่างฝุ่นที่ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม DNA แต่ละครั้งเพียง 3-4 มิลลิกรัมจะได้ปริมาณสารพันธุกรรม DNA ระหว่าง 0 ถึง 7,200 นาโนกรัม (ไม่ได้แสดงข้อมูล) อย่างไรก็ตามการสุ่มตัวอย่างฝุ่นเพียงเล็กน้อยจากตัวอย่างฝุ่นปริมาณมากที่เก็บจากที่อยู่อาศัยเพียง 3 ซ้ำอาจจะได้ข้อมูลที่ผิดพลาดเช่นกันในกรณีที่ตัวอย่างฝุ่นนั้นมีไรฝุ่นในปริมาณน้อย ดังจะเห็นได้จากผลการตรวจไม่พบไรฝุ่นใน 11 ตัวอย่างซึ่งตรวจพบด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นการตรวจซ้ำเพิ่มสำหรับตัวอย่างฝุ่นที่ให้ผลลบ (ไม่มีผลผลิต PCR เกิดขึ้น) จะช่วยให้ได้ข้อมูลใกล้เคียงความเป็นจริงมากขึ้น แม้ว่าจะต้องทำการตรวจซ้ำเพิ่มแต่ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธี multiplex PCR ก็ไม่เพิ่มมากนัก เมื่อเทียบเคียงกับการตรวจด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์

ยีน Internal transcribe spacer 2 (ITS2) ที่นำมาใช้พัฒนาวิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นนี้ เป็น DNA ที่อยู่ระหว่าง 5.8s และ 28s rDNA ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิดรวมทั้งแมลง ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้แปรผันตามแต่ละสปีชีส์ และยังมี ความคล้ายคลึงกันระหว่างสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกัน ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจจำแนกไรฝุ่นในระดับ Order ได้ เช่น primer ITS2_F/ITS2_R สามารถตรวจจำแนกไรฝุ่นได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถนำไปใช้เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ของการทดสอบได้ อย่างไรก็ตามความคล้ายคลึงกันของยีน ITS2 นี้ ทำให้การออกแบบ primer ยุ่งยากขึ้นเนื่องจากสามารถทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้นได้ ดังเช่นการใช้ primer ITS2-107 หรือ ITS2-231 เป็นต้น ชุด primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา Multiplex PCR ที่สำเร็จนี้ สามารถจำแนกไรฝุ่นสายพันธุ์ DP, DF และ BT ได้อย่างจำเพาะ และไม่ผลผลิตที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นด้วย ผลการทดลองยืนยันได้ว่า ตัวอย่างไรฝุ่น และกระบวนการต่างๆ ตั้งแต่การสกัด gDNA จนถึงการเตรียมส่วนผสมน้ำยาของปฏิกิริยา PCR เป็นไปอย่างถูกต้อง สำหรับยีน *CoxI* สำหรับการตรวจจำแนกไรฝุ่นสายพันธุ์ BT นั้นมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ BT อย่างมาก แต่จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิ Annealing ให้สอดคล้องด้วย มิฉะนั้นจะทำให้เกิดผลผลิตที่ไม่จำเพาะได้เช่นกัน

ผลการทดสอบปฏิกิริยากับตัวอย่างฝุ่นจำลองที่ผสมขึ้นคล้ายกับตัวอย่างฝุ่นจริงตามบ้านเรือนแสดงค่าความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยาในการตรวจไรฝุ่นด้อยกว่าการใส่ gDNA บริสุทธิ์ลงในปฏิกิริยา การที่ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาด้อยลงนั้นไม่ได้เกิดจากประสิทธิภาพของปฏิกิริยาเองดังจะเห็นได้จากผลการทดสอบที่ผ่านมาหลายๆ การทดลอง แท้จริงแล้วมีสาเหตุมาจากปริมาณ gDNA ของไรฝุ่นที่ได้จากขั้นตอนการสกัดน้อยกว่าปริมาณที่ได้จากการสกัดจากไรฝุ่นบริสุทธิ์ เนื่องจากมีเศษตัวอย่างฝุ่นละเอียดติดมาในขั้นตอนการสกัดด้วย อย่างไรก็ตามหากนำเทคนิควิธีการแยก

ไรฝุ่นด้วยการลอยตัวในสารละลายสองชนิดที่มีความถ่วงจำเพาะต่างกัน (Floatation technique) มาประยุกต์ใช้ ก็จะช่วยให้ได้ไรฝุ่นบริสุทธิ์สำหรับการสกัด gDNA มากขึ้น แม้กระนั้นก็ตาม การใช้วิธีการลอยตัวในสารละลายนี้มีขั้นตอนเพิ่มขึ้นและใช้เวลามากขึ้นด้วย หากมีจำนวนตัวอย่างมาก ดังเช่นการสำรวจการแพร่ระบาดของไรฝุ่น ควรต้องกำหนดเวลาในการดำเนินการเก็บข้อมูลให้นานขึ้นด้วย

ไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ซึ่งเป็นไรฝุ่นใน Family Pyroglyphidae เดียวกัน มีรูปร่างลักษณะทั่วไปคล้ายคลึงกันมาก สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ด้วยลักษณะเฉพาะ เช่น ลักษณะของขา และลักษณะของ dorsal shield cuticle ในเพศผู้ ลักษณะของช่องเปิดสำหรับออกไข่ (Epigynium) และถุงเก็บสเปิร์ม (spermatheca) ในเพศเมีย ซึ่งไรฝุ่นทั้งสองสายพันธุ์มีขนาดประมาณ 300 ไมโครมิเตอร์ ขนน้อยและสั้น ในขณะที่ไรฝุ่นสายพันธุ์ *B. tropicalis* เป็นไรฝุ่นใน Family Glycyphagidae ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า (ประมาณ 200 ไมโครมิเตอร์) ขาเรียวยาว และมีขนจำนวนมากปกคลุมลำตัว รูปร่างลักษณะที่แตกต่างกันเช่นนี้อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้การตรวจพบไรฝุ่นสายพันธุ์นี้เพียงเล็กน้อย ดังจะเห็นได้จากข้อมูลที่ไม่พบไรฝุ่นสายพันธุ์ *B. tropicalis* จากการตรวจตัวอย่างฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์เลย หรือจากข้อมูลรายงานการสำรวจไรฝุ่นในประเทศไทยเมื่อ 20 กว่าปีที่แล้ว (Malainual et al., 1995) ซึ่งพบปริมาณของไรฝุ่นสายพันธุ์ *B. tropicalis* น้อยมาก วิธี Floatation + กล้องจุลทรรศน์จึงไม่เหมาะสมในการตรวจหาไรฝุ่นบางสายพันธุ์ เช่น *B. tropicalis* ตามที่กล่าวมา ดังนั้นวิธี multiplex PCR สามารถแก้ไขปัญหาและอุปสรรคนี้ได้ เพราะเป็นเพียงการตรวจสอบสารพันธุกรรม DNA ของไรฝุ่นเท่านั้น

วิธีการเก็บรักษาตัวอย่างฝุ่นก่อนนำมาทำการตรวจหาไรฝุ่นก็เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ทำให้โอกาสในการตรวจพบไรฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์น้อยลง เนื่องจากในธรรมชาติมีไรและแมลงหลากหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในฝุ่นซึ่งบางชนิดเป็นตัวห้ำ (predator) ที่กินไรฝุ่นเป็นอาหาร เช่น ไรสายพันธุ์ *Cheyletus* sp. และมด ซึ่งพบในการศึกษาครั้งนี้ด้วย (รูปที่ 2.20) การเก็บตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยอาจมีตัวห้ำเหล่านี้ปะปนมาด้วย หากเก็บรักษาตัวอย่างฝุ่นไว้ในอุณหภูมิต่ำหรือแช่แข็งตัวห้ำเหล่านี้จะกินไรฝุ่นจนหมดไปทำให้ตรวจพบไรฝุ่นได้น้อยลง ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้เก็บรักษาตัวอย่างฝุ่นหลังจากที่เก็บมาจากที่อยู่อาศัยไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดในตัวอย่างฝุ่น

ค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความแม่นยำ (accuracy) ของวิธี multiplex PCR ที่ค่อนข้างต่ำซึ่งได้จากการเปรียบเทียบกับวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างวิธีการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นทั้งสองวิธีอย่างชัดเจน ดังจะสังเกตเห็นได้จากการนำไปใช้งาน แม้ว่าวิธี Flotation+กล้องจุลทรรศน์ จะเป็นวิธีอ้างอิงดั้งเดิม (gold standard) แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสมกับการนำไปใช้สำหรับการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก (screening) ได้ดีเท่ากับวิธี multiplex PCR หากแต่สามารถใช้เป็นวิธียืนยันผลการจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นในตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี multiplex PCR แล้ว ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจตัวอย่างฝุ่นจำนวนมากได้โดยใช้เวลาไม่นาน ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจเพื่อเฝ้าระวัง หรือ ติดตามผลการรักษาอาการภูมิแพ้ของผู้ป่วยได้ ห้องปฏิบัติการต่างๆ ไปสามารถพัฒนาวิธีการตรวจ multiplex PCR นี้ได้เอง หรือ สั่งซื้อชุดน้ำยาที่คณะผู้วิจัยกำลังพัฒนาขึ้นเพื่อให้ใช้งานได้สะดวกขึ้นและมีราคาถูกกว่าการตรวจวัดสารก่อภูมิแพ้ด้วยวิธี enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งมีราคาตัวอย่างละ 1,250 บาท (อ้างอิงอัตราค่าบริการของศูนย์บริการและวิจัยโรฝุ่นศิริราช)

ข้อดีข้อเสียระหว่างการตรวจจำแนกสายพันธุ์โรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR และวิธี flotation + กล้องจุลทรรศน์ ในประเด็นต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.8 ได้แก่ ขั้นตอนที่เป็น ระยะเวลาที่ใช้ เครื่องมือที่เป็น ความสามารถในการตรวจพบ ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy) และการนำไปใช้ เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วจะเห็นได้ว่า วิธีตรวจแบบ multiplex PCR และแบบ flotation+กล้องจุลทรรศน์ มีข้อดีคนละด้านกัน การนำไปใช้จึงควรประยุกต์ใช้วิธีการตรวจที่เหมาะสมสำหรับงานนั้นๆ เช่น หากมีจำนวนตัวอย่างมาก ควรเลือกใช้วิธี multiplex PCR เพื่อ screen ตัวอย่าง หากพบตัวอย่างที่ให้ผลบวก จึงตรวจด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ เพื่อยืนยันสายพันธุ์ของโรฝุ่นอีกครั้งก็ได้

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นนี้มีประสิทธิภาพที่ดีในการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์โรฝุ่นที่พบบ่อยในประเทศไทย วิธีการใช้งานเป็นมาตรฐานทั่วไป ไม่ยุ่งยาก อีกทั้งยังใช้ระยะเวลาในการตรวจน้อยกว่า สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่มีเครื่องเพิ่มจำนวนพันธุกรรมโดยไม่จำเป็นต้องมีความชำนาญในการจำแนกสายพันธุ์โรฝุ่นด้วยรูปร่างลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลย

ตารางที่ 2.8 เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียระหว่างการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์โรฝุ่นด้วยวิธี Multiplex PCR และวิธี Flotation+กล้องจุลทรรศน์ โดยวิเคราะห์ข้อมูลจากการตรวจตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 98 ตัวอย่าง

	Multiplex PCR	Flotation+กล้องจุลทรรศน์
ขั้นตอนที่เป็น	DNA extraction, PCR, gel electrophoresis	flotation, slide mounting, microscopic identification
ระยะเวลาที่ใช้	3 ชั่วโมง	อย่างน้อย 1 สัปดาห์
เครื่องมือที่เป็น	เครื่อง Thermocycler	กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound
ความสามารถในการตรวจพบ	0.1 นาโนกรัม ของ DNA (Thet-Em <i>et al.</i> , 2012)	ร้อยละ 3% - 88% (Colloff, 2009)
ความไว (sensitivity)	ร้อยละ 54.17	ร้อยละ 36.11
ความจำเพาะ (specificity)	ร้อยละ 68.92	ร้อยละ 82.26
ความแม่นยำ (precision)	ร้อยละ 36.11	ร้อยละ 54.17
ความถูกต้อง (accuracy)	ร้อยละ 65.31	ร้อยละ 65.31
การนำไปใช้	การสำรวจการแพร่กระจายของโรฝุ่น / screening ตัวอย่างจำนวนมาก / มีเวลาจำกัด	การตรวจยืนยันสายพันธุ์โรฝุ่น / ตัวอย่างจำนวนน้อย / รอผลนานได้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้นำวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นจริงซึ่งเก็บจากที่อยู่อาศัย โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ พบว่า แม้วิธี multiplex PCR จะให้ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ไม่สูงนัก แต่วิธี multiplex PCR สามารถตรวจพบไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นได้มากกว่าวิธีอ้างอิงดั้งเดิมนั้น นอกจากนี้วิธี multiplex PCR ยังปฏิบัติได้ง่ายและใช้เวลาไม่นาน จึงเหมาะสมกับการตรวจตัวอย่างฝุ่นจำนวนมาก (screening) ส่วนวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ นั้นเหมาะสำหรับการตรวจยืนยันสายพันธุ์ไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี multiplex PCR ซึ่งห้องปฏิบัติการมาตรฐานทั่วไปสามารถปฏิบัติได้อย่างง่ายดาย

อย่างไรก็ตาม วิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการตรวจและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นในเชิงคุณภาพ (บวก หรือ ลบ) เท่านั้น ไม่สามารถบอกปริมาณของไรฝุ่นที่มีอยู่ในตัวอย่างฝุ่นได้ จึงทำให้เกิดคำถามต่อไปว่า ที่อยู่อาศัยแต่ละแห่งมีปริมาณไรฝุ่นมากน้อยแตกต่างกันอย่างไร คณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงประเด็นนี้ จึงได้เริ่มพัฒนาวิธีการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี quantitative PCR ขึ้น ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการพัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพ ซึ่งคาดว่าเมื่อแล้วเสร็จจะสามารถนำไปใช้งานบริการตรวจหาไรฝุ่นต่อไปได้ นอกจากนี้การพัฒนาวิธีการตรวจนี้ให้เป็นชุดน้ำยาตรวจสำเร็จรูปก็จะเป็นการต่อยอดผลงานวิจัยไปสู่เชิงพาณิชย์ได้อีกประการหนึ่งด้วย

วิธีตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยเทคนิค multiplex PCR ที่คณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นนี้ เป็นประโยชน์ต่อการดูแลรักษาผู้ป่วยภูมิแพ้ได้เป็นอย่างดี เพราะเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก บุคลากรห้องปฏิบัติการตามโรงพยาบาลหรือตามห้องปฏิบัติการอื่นๆ สามารถดำเนินการตรวจได้ ใช้เวลาสั้น ออกผลได้เร็วกว่าการจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์อย่างมาก

บรรณานุกรม

- ฉวีวรรณ บุณนาค. สถิติจากคลินิกโรคภูมิแพ้ ภาควิชาโสต นาสิก ลาริงซ์วิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ปี 2002-2004.
- Alam MT, Das MK, Dev V, Ansari MA, Sharma YD. PCR-RFLP method for the identification of four members of the *Anopheles annularis* group of mosquitoes (Diptera: Culicidae). Trans Royal Soc Trop Med Hygiene 2007; 101: 239-44.
- Angus AC, Ong ST, Chew FT. Sequence Tag Catalogs of Dust Mite-Expressed Genomes. Am J Pharmacogenomics 2004; 4(6): 357-69.
- Bahnck CM, Fonseca DM. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. Am J Trop Med Hyg 2006; 75: 251-55.
- Chew FT, Zhang L, Ho TM, Lee BW. House dust mite fauna of tropical Singapore. Clin Exp Allergy 1999; 29: 201-6.
- Colloff MJ. Dust mites. CSIRO Publishing and Springer, Australia and Netherlands. 2009. 448 pp.
- Colloff MJ, Spieksma FThM. Pictorial keys for the identification of domestic mites. Clin Exp Allergy 1992; 22: 823-30.
- Daengsuwan T, Lee BW, Visitsunthorn N, et al. Allergen sensitization to aeroallergens including *Blomia tropicalis* among adult and childhood asthmatic in Thailand. Asian Pac Allergy Immunol 2003; 21: 199-204.
- Fischer K, Holt DC, Harumal P, Currie BJ, Walton SF, Kemp DJ. Generation and characterization of cDNA clones from *Sarcoptes scabiei* var. *hominis* for an expressed sequence tag library: identification of homologues of house dust mite allergens. Am J Trop Med Hyg. 2003; 68: 61-64.
- Hart BJ, Fain A. A new technique for the isolation of mites exploiting the differences in density between ethanol and saturated NaCl, Qualitative and quantitative studies. Acarologia 1987; 28: 251-54.
- Kongpanichkul A, Vichayanond P, Tuchinda M. Allergen skin test reactivities among asthmatic Thai children. J Med Assoc Thai 1997; 80: 69-75.
- Lalkhen AG, McCluskey A. Clinical tests: sensitivity and specificity. Cont Ed Anaesthesia, Critical Care Pain J. 2008(8); 6: 221-23.
- Malainual N, Vichayanond P, Phan-urai P. House dust mite fauna in Thailand. Clin Exp Allergy 1995; 25: 554-60.
- Noge K, Mori N, Tanaka C, Nishida R, Tsuda M, Kuwahara Y. Identification of astigmatid mites using the second internal transcribed spacer (ITS2) region and its application for phylogenetic study. Exp Applied Acarol 2005; 35: 29-46.

- Suarez-Martinez EB, Montealegre F, Sierra-Montes JM, Herrera RJ. Molecular identification of pathogenic house dust mites using 12S rRNA sequences. *Electrophoresis* 2005; 26: 2927–2934.
- Walton C, Somboon P, Harbach RE, Zhang S, Weerasinghe I, O’loughlin SM, Phompida S, Sochantha T, Tun-lin W, Chen B, Butlin RK. Molecular identification of mosquito species in the *Anopheles annularis* group in southern Asia. *Med Vet Entomol* 2007a; 21: 30–5.
- Walton C, Somboon P, O’loughlin SM, Zhang S, Harbach RE, Linton YM, *et al.* Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. *Infection, Genetics Evolution* 2007b; 7: 93–102.
- Yi FC, Cheong N, Shek PC, Wang DY, Chua KY, Lee BW. Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly conserved tropomyosins in *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy*. 2002; 32: 1203-10.