

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

การจัดสร้างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพื่อการตรวจหาการติดเชื้อใน
โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ

(Establishment of Gold Nanoparticle Technology for Detection of Infection in Fever
of Unknown Origin)

นายแพทย์ ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์
ดร. โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ
แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล
ดร. ณัฐพร พิมพะ
สัตวแพทย์หญิง ดวงพร พูลสุขสมบัติ
นายแพทย์ วันลา กุลวิจิต
นายแพทย์ ธเนศ สิ้นส่งสุข
นายแพทย์ จักรวาล สังฆพรหม
แพทย์หญิง มาลี เตชพรุ่ง

หน่วยงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล
ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๒

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

การจัดสร้างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพื่อการตรวจหาการติดเชื้อใน
โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ

(Establishment of Gold Nanoparticle Technology for Detection of Infection in Fever
of Unknown Origin)

นายแพทย์ ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์
ดร. โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ
แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล
ดร. ณัฏฐพร พิมพะ
สัตวแพทย์หญิง ดวงพร พูลสุขสมบัติ
นายแพทย์ วันล่ำ กุลวิจิต
นายแพทย์ ธเนศ สิ้นส่งสุข
นายแพทย์ จักรวาล สังฆพรหม
แพทย์หญิง มาลี เตชพรุ่ง

หน่วยงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล
ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๒

บทคัดย่อ

การจัดสร้างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพื่อการตรวจหาการติดเชื้อในโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ

อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์, โรจน์ฤทธิ โรจนธเนศ, กนิษฐา ภัทรกุล, ณัฐพร พิมพะ,
ดวงพร พูลสุขสมบัติ, วันลา กุลวิจิต, ธเนศ ลินสังสุข, จักรวาล สังฆพรหม, มาลี เตชพรุ่ง

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นอนุภาคของโลหะในระดับนาโนเมตรที่มีความเสถียรสูงชนิดหนึ่ง ในปัจจุบันอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสารทางชีวภาพที่มีความจำเพาะสูง อุปกรณ์นำส่งยาหรือยีน และ สารให้คอนทราสต์ เป็นต้น โดยอาศัยความสามารถในการปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรด้วยสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ดีเอ็นเอ, โปรตีน, คาร์โบไฮเดรต, ยา หรือ สีเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เป็นต้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตอนุภาคทองคำนาโนเมตรขึ้นมาเพื่อใช้เองในประเทศไทยโดยไม่ต้องสั่งซื้อจากต่างชาติ โดยตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่เหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้งาน รวมถึงได้ตรวจหาความเป็นพิษของอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรต่อเซลล์เยื่อเนื้อผิว และทำการจัดสร้างแผ่นตรวจโรคแลทเทอรัลโฟลว์เพื่อตรวจหาการติดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ โดยใช้อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรเป็นตัวให้สัญญาณนำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอและแอนติบอดี จากผลการทดลองพบว่าอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ขึ้นมามีคุณภาพดีมาก มีความเสถียรสูง ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ รวมทั้งสามารถประยุกต์ใช้งานในแผ่นตรวจโรคได้ทั้งในระบบการตรวจดีเอ็นเอและการตรวจแอนติบอดี องค์ความรู้จากงานวิจัยนี้เป็นต้นแบบในการนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรไปตรวจหาการติดเชื้อในโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุในผู้ป่วยจริงของประเทศไทย

Abstracts

Establishment of Gold Nanoparticle Technology for Detection of Infection in Fever of Unknown Origin

Amornpun Sereemasapun, Rojrit Rojanathanes, Kanitha Patarakul, Nuttaporn Pimpha,
Duangporn Phulsuksombati, Wanla kulwichit, Chakrawan Sangkaprom, Thanee Sinsongsuk,
Malee Techapornroong

Gold nanoparticle (AuNP) is a stable and inert metal nanoparticle. AuNP has been used as biosensors, drug/gene delivery devices and contrast agents because of its surface functionalization. AuNP can be tailored with biomolecules such as DNA, protein, carbohydrate, drug and fluorescent dye. This research aims to study and establish gold nanoparticles for medical application in Thailand. The physicochemical properties, nanoparticle characterization, and cellular cytotoxicity were evaluated for further use. Moreover, both of DNA-based and antibody-based lateral flow test strips were fabricated to detect bacterial infection that causes fever of unknown origin. Results showed that the synthesized nanogolds are in good quality, stable, cellular nontoxic and are capable of being applied as biosensor for both DNA and antibody system. The knowledge from this study is a core template for further application in detection of infection that causes fever of unknown origin in Thailand.

สารบัญเรื่อง

1. บทนำ (Introduction)

โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ (Fever of Unknown origin)	1-6
การประยุกต์ใช้นาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการแพทย์	6-8
การพัฒนาและผลต่อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตร	6-12
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	12
ขอบเขตของการวิจัยในเชิงปริมาณ/เชิงคุณภาพ	12
ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิด (Conceptual framework)	13
ความคาดหมาย แนวทางที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	14

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

Gold Nanoparticle Synthesis and characterization	15-17
Evaluation of in vitro gold nanoparticle cytotoxicity	18-20
Physiochemical Effects of DNA-coated goldnanoparticles	20-23
Fabrication of Lateral Flow test Strip	23-24
Optimization of influencing parameters for fabrication of gold - nanoparticle-based nucleic acid lateral flow strip test	25-26
Preparation, modification, and testing of antibody-conjugated AuNPs	27-36
Detection of Leptospira in urine using anti-Leptospira-coated AuNPs	37-38

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการทดลอง (Results and Discussions)

Characterization of metal nanoparticles	39-42
Effects of gold nanoparticles on cell morphology	42-49
<i>In Vitro</i> Cytotoxicity and intra-cellular localization	49-54
Aggregation of metal nanoparticles	55-62
Optimization of influencing parameters for fabrication of gold nanoparticle-based nucleic acid lateral flow strip test	63-68

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

Preparation, modification, and testing of antibody-conjugated AuNPs	68-86
Detection of <i>Leptospira</i> in urine using anti- <i>Leptospira</i> -coated gold nanoparticles	86-90
4. บทสรุป (Conclusion)	91
5. ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยในขั้นต่อไป (Suggestion for further work)	92
6. เอกสารอ้างอิง (Bibliography)	93-97
7. ภาคผนวกท้ายเล่ม ประวัติคณะผู้วิจัย	98-120

สารบัญตาราง

Table	Page
Table 1.1 : สาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุ ที่เกิดจากโรคติดเชื้อ.....	3
Table 1.2 : สาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุในคนสูงอายุและคนหนุ่มสาว.....	3
Table 1.3 : สาเหตุของไข้ที่ตรวจพบในผู้ป่วย 471 ราย.....	4
Table 1.4 : การประยุกต์ใช้นาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการแพทย์	7
Table 2.3.1 : Oligonucleotide sequences.....	21
Table 2.3.2 : DNA mixture composition.....	21
Table 3.1: Experimental protocols studying the effects of reductants and sonication on the conjugation of thiolated probes and AuNPs.....	64
Table 3.2 : Effect of amount of thiolated probes on AuNPs conjugation.....	67

สารบัญภาพ

Figure		Page
Figure 1.1	จำนวนผู้ป่วยที่ได้รับรายงานว่าเป็นไข้ไม่ทราบสาเหตุในประเทศไทย	2
Figure 1. 2	อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เตรียมได้	10
Figure 1. 3	สเปกตรัมแสงของคอลลอยด์ของ AuNPs ขนาด 15 nm ที่เตรียมได้	11
Figure 1. 4	การเปลี่ยนสีของคอลลอยด์ของ AuNPs	12
Figure 1. 5	Conceptual framework	13
Figure 2.1	12.7 mM tetrachloroauric acid	15
Figure 1.2	38.8 mM trisodium citrate	15
Figure 2.3	Diluted tetrachloroauric acid during boiling on the hot plate	17
Figure 2.4	Final 100 ppm gold nanoparticles colloid with a clear orange-red color	17
Figure 2.5	UV/Vis spectrophotometer	17
Figure 2.6	The morphology of HeLa cells.	18
Figure 2.7	Model of components of Lateral flow strip test	24
Figure 2.8	Processes of Lateral flow strip test assembly	24
Figure 2.9	Whole process of antibody-conjugated gold nanoparticles	32
Figure 2.10	Preparation of antigen on nitrocellulose membrane	33
Figure 2.11	Usage of silver solution to enhance signal from gold nanoparticles	36
Figure 3.1	The characterization of AuNPs using spectrophotometer	39
Figure 3.2	The characterization of metal nanoparticles using TEM	40
Figure 3.3	Zeta potential of gold nanoparticles is measured by nanosizer	41
Figure 3.4	Size distribution of gold nanoparticles is characterized by nanosizer	41
Figure 3.5	General cell morphology in negative control	43
Figure 3.6	HeLa cells morphology in positive control.	44
Figure 3.7	HeLa cells morphology in the presence of citrate.	45
Figure 3.8	HeLa cells morphology in the presence of 10 ug/mL gold nanoparticles.	46
Figure 3.9	HeLa cells morphology in the presence of 50 ug/mL gold nanoparticles.	47
Figure 3.10	HeLa cells morphology in the exposure to 100 ug/mL gold nanoparticles.	48
Figure 3.11	The influence of gold nanoparticles on cell viability.	50
Figure 3.12	Cellular uptake of 10-15 nm gold nanoparticles via the endocytosis.	51

สารบัญภาพ

Figure		Page
Figure 3.13	Internalization of gold nanoparticles.	52
Figure 3.14	Intracellular organelles morphology.	53
Figure 3.15	The effect of different amount of buffer to the aggregation of AuNPs.	55
Figure 3.16	The effect of different amount of NaCl to the aggregation of AuNPs	56
Figure 3.17	The effect of different amount of mixture1 to the aggregation of AuNPs.	57
Figure 3.18	The effect of different amount of mixture2 to the aggregation of AuNPs	58
Figure 3.19	The effect of different amount of mixture3 to the aggregation of AuNPs	59
Figure 3.20	Comparison of effect of mixture1-3 on the aggregation of AuNPs	60
Figure 3.21	Comparison between non-complementary DNA and complementary DNA on AuNP stabilization	61
Figure 3.22	Comparison between 1-mismatched -complementary DNA and complementary DNA on AuNP stabilization	62
Figure 3.23	Deconjugation profile after DTT treatment on the conjugates.	66
Figure 3.24	(A) The color changes of conjugates after adding DTT.	67
Figure 3.24	(B) Positive results of lateral flow strip test with DNA targets	67
Figure 3.25	Result of stabilization of gold nanoparticles that are conjugated with different concentration of antibody	69
Figure 3.26	Schematic representation of functionalization procedure by conjugating antibody onto gold nanoparticles	70
Figure 3.27	Schematic representation of placing antigen onto nitrocellulose membrane and membrane blocking process	70
Figure 3.28	Result of general antigen detection using <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles.	72
Figure 3.29	Sequences of major outer membrane proteins of bacteria <i>Leptospira pomona</i>	73
Figure 3.30	Final <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles.	74

สารบัญภาพ

Figure		Page
Figure 3.31	Effect of antibody incubation time upon the final signal intensity in antigen detection	74
Figure 3.32	Effect of centrifuge temperature upon the final detecting signal of <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles probe.	76
Figure 3.33	Effect of PEG upon the final signal intensity when conjugated gold nanoparticles probes were used to detect antigen.	78
Figure 3.34	Effect of concentration of antigen to the sensitivity of <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles	79
Figure 3.35	Effect of blocking agent to the function of <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles.	81
Figure 3.36	Effect of <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles sensing time upon the signal intensity	82
Figure 3.37	schematic representation of silver enhancing process	84
Figure 3.38	Effect of silver enhance upon the signal from different detection time of <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles	85
Figure 3.39	Optimum antibody dilution for preparing antibody-coated gold particles.	87
Figure 3.40	Detection of <i>Leptospira</i> in urine.	88
Figure 3.41	Specificity of <i>Leptospira</i> -coated gold nanoparticles.	89

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย
(List of Abreviation)

%	Percentage
C	Degree Celsius
µg	Microgram
µL	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
ATP	Adenosine triphosphate
AuNP	Gold nanoparticle
bp	Base pair
cDNA	Complementary DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
g (centrifugation speed)	Gravity
h.	Hour
M	Molar
mM	Millimolar
mg	Milligram
MgCl ₂	Magnesium Chloride
mL	Milliliter
mtDNA	Mitochondrial DNA
nM	Nanomolar
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer saline

PCR

rRNA

RNA

rpm

RT

tRNA

u.

α

Polymerase chain reaction

Ribosomal RNA

Ribonucleic acid

Round per minute

Reverse transcription

Transfer RNA

unit

Alpha

1. บทนำ (Introduction)

โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ (Fever of Unknown origin)

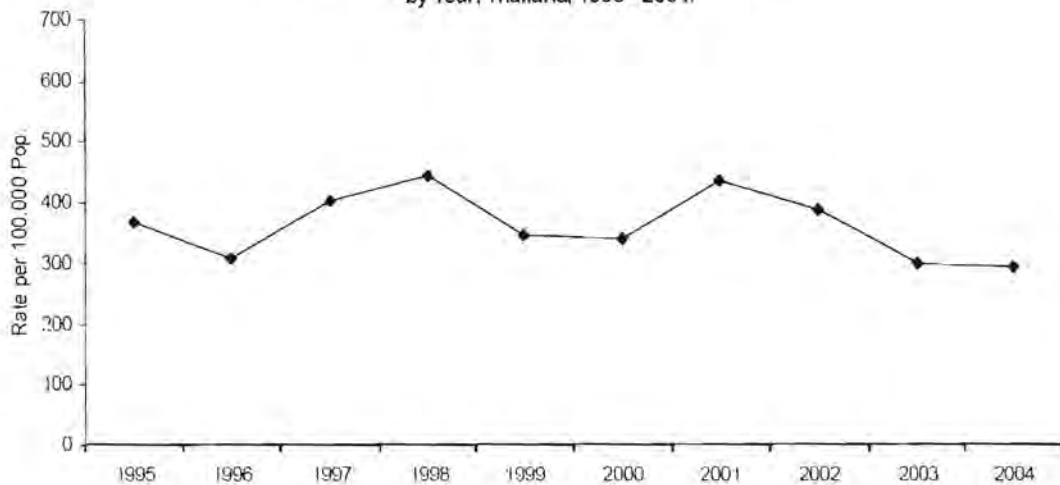
โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ (Fever of Unknown Origin, FUO) เป็นกลุ่มอาการของ โรคที่มาจากไข้ ไม่สามารถวินิจฉัยได้ในเวลาอันสั้น ไข้ชนิดนี้มักเป็นอยู่นานและไม่หายเอง การวินิจฉัยโรคนี้ ต้องเข้าเกณฑ์ตามคำจำกัดความของไข้ไม่ทราบสาเหตุ ครบทั้งสามข้อ [1] คือ

- 1) วัดอุณหภูมิร่างกายได้สูงกว่า 38.3° เซลเซียส (101° ฟาเรนไฮต์) หลายๆ ครั้ง
- 2) มีระยะเวลาของการมีไข้ยาวนานกว่า 3 สัปดาห์
- 3) ไม่สามารถให้การวินิจฉัยโรคได้ทั้งหมดที่อยู่ในโรงพยาบาล

สำหรับในประเทศไทยพบผู้ป่วยในกลุ่มโรคนี้ได้ทั่วทั้งประเทศ ซึ่งข้อมูลล่าสุดในปี พ.ศ. 2547 สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้รับรายงานผู้ป่วยโรค ไข้ไม่ทราบสาเหตุ จำนวน 184,066 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 294.38 ต่อประชากรแสนคน แนวโน้มอัตราป่วย ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2538 – 2547 พบว่า ในปี พ.ศ. 2541 มีอัตราป่วยสูงสุด คือ 444.01 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2546 มีอัตราป่วย 299.88 ต่อประชากรแสนคน (รูปที่ 1) อัตราป่วยมีลักษณะ เพิ่มขึ้น แล้วลดลงใน 1 – 2 ปี [2]

พบผู้ป่วยได้ตลอดทั้งปี ในทุกภาคของประเทศไทย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมี อัตราป่วย สูงสุดอย่างต่อเนื่อง เป็นเพศชายและเพศหญิงมีจำนวนใกล้เคียงกัน อัตราส่วนเพศชาย ต่อเพศหญิง เท่ากับ 1.1 : 1 ผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในเขตองค์การบริหารส่วนตำบล อาชีพที่พบผู้ป่วย มากที่สุด คือ เกษตรกรรม (ร้อยละ 27.6) รองลงมา 2 อันดับแรกคือ นักเรียน (ร้อยละ 14.1) และ รับจ้าง (ร้อยละ 8.7) โดยสรุป โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ ถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ เรื่องหนึ่งในประเทศไทย

Fig. 1 Reported Cases of P.U.O per 100,000 Population, by Year, Thailand, 1995 - 2004.



รูปที่ 1.1: จำนวนผู้ป่วยที่ได้รับรายงานว่าเป็นไข้ไม่ทราบสาเหตุ ในประเทศไทย (คิดเป็นอัตราป่วยต่อประชากรแสนคน) ระหว่างปี พ.ศ. 2538 - 2547

[ข้อมูลจาก สำนักโรคระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค : <http://epid.moph.go.th/>]

เป็นที่ทราบดีอยู่แล้วว่าโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุนี้เกิดได้จากหลายสาเหตุ ทำให้ผู้ป่วยมา รักษาตัวที่โรงพยาบาลด้วยอาการหลักคือมีไข้ สาเหตุทั่วไปชนิดที่พบบ่อยคือ 1) โรคติดเชื้อ 2) โรคมะเร็ง 3) โรคเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue diseases) 4) โรคต่างๆ (miscellaneous) 5) สาเหตุของโรคไม่พบ ความมากน้อยของสาเหตุแต่ละกลุ่ม จะมีแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสภาพทางภูมิศาสตร์ อายุผู้ป่วย ชนิดของโรงพยาบาล และปัจจัยอื่นๆ [3]

ในด้านของโรคติดเชื้อ ซึ่งเป็นสาเหตุที่พบบ่อยสุดที่ทำให้เกิดโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ มีการสำรวจ ในต่างประเทศ มักพบเป็นฝี/หนองในช่องท้อง การติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ชนิดมีโรคแทรกซ้อน (complicated urinary tract infection) เป็นปัญหาที่สำคัญ [4] (ตารางที่ 1.1) อุดบัติการณของโรคติดเชื้อเหล่านี้จะเปลี่ยนไปตามสถานที่ต่างๆ นอกจากนั้น สาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุ ที่พบในผู้สูงอายุก็ไม่เหมือนกับในคนหนุ่มสาว [5] มักจะมีอาการและ อาการแสดงไม่เป็นแบบฉบับ (atypical nonclassic) ไข้ในผู้สูงอายุมักสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัส หรือแบคทีเรีย มีความรุนแรงกว่าใน ผู้ป่วยเด็ก อาการและอาการแสดงไม่ชัดเจน ไข้ไม่ทราบสาเหตุ ในผู้สูงอายุมักจะวินิจฉัยได้ร้อยละ 87-95 [6, 7] เกิดจากโรคติดเชื้อร้อยละ 25-35 พบว่าวัณโรค เป็นโรคที่พบได้บ่อยมากกว่าในคนหนุ่มสาว ดัง ตารางที่ 1.2

Infection

Intraabdominal abscess (eg, periappendiceal, diverticular, subphrenic); liver, splenic, pancreatic, perinephric, psoas, or placental abscess

Appendicitis, cholecystitis, cholangitis, aortoenteric fistula, mesenteric lymphadenitis, tubo-ovarian abscess, pyometra

Intracranial abscess, sinusitis, mastoiditis, otitis media, dental abscess

Chronic pharyngitis, tracheobronchitis, lung abscess

Septic jugular phlebitis, mycotic aneurysm, endocarditis, intravenous catheter infection, vascular graft infection

Wound infection, osteomyelitis, infected joint prosthesis, pyelonephritis, prostatitis

Tuberculosis, *Mycobacterium avium* complex, leprosy, Lyme disease, relapsing fever (*Borrelia recurrentis*), syphilis, Q fever,

legionellosis, yersiniosis

Salmonellosis (including typhoid fever), listeriosis, *Campylobacter*, brucellosis, tularemia, bartonellosis, ehrlichiosis, psittacosis, *Chlamydia pneumoniae*, murine typhus, scrub typhus

Gonococcaemia, meningococcaemia

Actinomycosis, nocardiosis, melioidosis, Whipple's disease (*Tropheryma whippelii*)

Candidaemia, cryptococcosis, histoplasmosis, coccidioidomycosis, blastomycosis, sporotrichosis, aspergillosis, mucormycosis, *Malassezia furfur*, *Pneumocystis carinii*

Visceral leishmaniasis, malaria, babesiosis, toxoplasmosis, schistosomiasis, fascioliasis, toxocarosis, amoebiasis, infected hyaline cyst, trichinosis, trypanosomiasis

Cytomegalovirus, HIV, herpes simplex, Epstein-Barr virus, parvovirus B19

ตารางที่ 1.1 : สาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุ ที่เกิดจากโรคติดเชื้อ

ดัดแปลงจาก: Arnow PM, Flaherty JP. Fever of unknown origin. Lancet. 1997;350:575-80.

Etiology	Elderly (n = 204)	Young (n = 152)
Infection	72 (35)	33 (21)
Viral	1 (0.5)	8 (5)
Tuberculosis	20 (10)	4 (3)
Abscess	25 (12)	6 (4)
Endocarditis	14 (7)	2 (1)
Other	12 (6)	13 (9)
Multisystem disease ^a	57 (28)	27 (17)
Tumor	38 (19)	8 (5)

NOTE. Data are no. (%) of patients. This table is adapted from the comparative study in [41].

^a In descending order of frequency [41]: temporal arteritis, polymyalgia rheumatica, Wegener's granulomatosis, polyarteritis nodosa, rheumatoid arthritis, and sarcoidosis.

ตารางที่ 1.2 : สาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุในคนสูงอายุและคนหนุ่มสาว

ดัดแปลงจาก : Norman DC. Fever in the elderly. Clin Infect Dis 2000; 31: 148-51

สำหรับในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2533 มีการศึกษาสาเหตุของไข้ในผู้ป่วย 1,218 ราย ที่มีอายุมากกว่า 2 ปี และไม่สามารถวินิจฉัยโรคจากข้อมูลที่ได้จากประวัติและ การตรวจร่างกาย การตรวจนับเม็ดเลือด (complete blood count) การตรวจปัสสาวะ และการ ถ่ายภาพรังสีทรวงอก และยังไม่ทราบผลจากการเพาะเชื้อหรือการเพาะเชื้อจากเลือดให้ผลเป็นลบ [8] พบสาเหตุของไข้ในผู้ป่วยร้อยละ 38.7 ในบรรดากลุ่มที่พบสาเหตุนี้ scrub typhus เป็นโรคที่พบ บ่อยที่สุด คือพบ 91 ราย (ร้อยละ 7.5) รองลงมาได้แก่ ไข้หวัดใหญ่ 73 ราย (ร้อยละ 6) ไข้เลือด ออกแดงก็ 70 ราย (ร้อยละ 5.7) murine typhus 65 ราย (ร้อยละ 5.3) bacteremia 36 ราย(ร้อยละ 3.0) ไข้รากสาดน้อย 23 ราย (ร้อยละ 1.9) โรคฉี่หนู 14 ราย (ร้อยละ 1.1) melioidosis 11 ราย (ร้อยละ 0.9) ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 61.3 ตรวจไม่พบสาเหตุของไข้ แต่สันนิษฐานว่า กลุ่มนี้บาง ส่วนมีสาเหตุจากโรคติดเชื้อไวรัสในทางเดินหายใจส่วนบน (ตารางที่ 1. 3)

โรคที่ตรวจพบ	จำนวน	ร้อยละ
Scrub typhus	91	7.5
Influenza	73	6
Dengue hemorrhagic fever	70	5.7
Murine typhus	65	5.3
Bacteremia	36	3
Typhoid fever	23	1.9
Chikunkunya viral infection	14	1.1
Leptospirosis	14	1.1
Melioidosis	11	0.9
JE viral infection	7	0.6
EB viral infection	2	0.2
ให้ผลบวก 2 โรค	58	4.8
ให้ผลบวก 3 โรค	7	0.6

ตารางที่ 1. 3 : สาเหตุของไข้ที่ตรวจพบในผู้ป่วย 471 ราย (ร้อยละ 38.7)

[ดัดแปลงจาก : เอกสารอ้างอิงหมายเลข 8]

การวินิจฉัยถึงสาเหตุได้รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ ในสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค ไข้ไม่ทราบสาเหตุ จะเป็นประโยชน์ต่อทั้งทางด้านสุขภาพ ด้านเศรษฐกิจ คือการช่วยลดการใช้จ่าย และอุปสรรคในการวินิจฉัยและรักษาโรค และเป็นประโยชน์ด้านสังคมและความมั่นคงของประเทศชาติด้วย การประเมินผู้ป่วยจะเริ่มตั้งแต่ซักประวัติอย่างละเอียด ตรวจร่างกายซ้ำๆทุกวัน การสืบค้นทางห้องปฏิบัติการและการเอกซเรย์ [9]

ในแง่การสืบค้นทางห้องปฏิบัติการนั้น ถือเป็นหัวใจในการตรวจหาสาเหตุของไข้ และการวัดระดับความรุนแรงของโรคซึ่งใช้ในการติดตามผลการรักษาด้วย [10] โดยส่วนใหญ่แล้ว การตรวจที่ถือว่าเป็นมาตรฐาน(gold standard) คือการตรวจโดยการเพาะเชื้อในกรณีที่เชื้อ สามารถ ทำการเพาะเชื้อได้ การเพาะเชื้อช่วยวินิจฉัยหรือวินิจฉัยแยกโรคได้มาก แต่ต้องเป็น ห้องปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพพอ การเพาะเชื้อจากเลือดต้องใช้วิธีที่ถูกต้องเหมาะสม และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อที่สงสัยว่าก่อโรค[11] ในกรณีที่การเพาะเชื้อได้ผลไม่ดี การดู standard serologic assay เป็นที่ยอมรับว่าเป็นการตรวจมาตรฐานในการวินิจฉัย เชื้อก่อโรคที่ เพาะเชื้อยาก เช่น การใช้เทคนิค indirect immunofluorescent assay (IFA) ในการวินิจฉัยเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* ที่ก่อโรค scrub typhus[12, 13] หรือการตรวจ Microscopic Agglutination Assay (MAT) เพื่อตรวจหาเชื้อ *Leptospira interrogans* ที่ก่อโรคฉี่หนู [14] เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วย serodiagnosis นี้ ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ บุคลากรที่มีความชำนาญในการตรวจสอบ และต้องรอเวลาที่จะตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ antibody titer ซึ่งส่วนใหญ่ ต้องใช้เวลานานหลังตรวจพบว่าการป่วย ผลบวกของ antibody titer มักตรวจพบ หลังการป่วยรุนแรงในระยะแรกหายไปแล้ว โดยสรุป การตรวจหาสาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุ ทำได้ในขอบเขตที่จำกัด และไม่สามารถตรวจค้นหาสาเหตุของไข้ได้ในทุกโรคจากห้องปฏิบัติการ บางครั้งยังไม่สามารถวินิจฉัยสาเหตุของไข้แม้ผู้ป่วยจะถึงแก่กรรมแล้ว [15]

จากข้อมูลข้างต้นและปัญหาเกี่ยวกับการวินิจฉัยสาเหตุของไข้ข้างต้น โครงการวิจัยนี้จึงสนใจจะศึกษาและพัฒนาวิธีวินิจฉัยสาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุในส่วที่เกิดจากโรคติดเชื้อ โดยนำความรู้ด้านนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้กับเทคนิคทางอณูชีววิทยา อาศัยหลักการคือ เตรียม DNAสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเหมือนที่พบในเชื้อก่อโรคทำเป็น probe มาเชื่อมต่อกับ ทองคำอนุภาคขนาดนาโนเมตร (gold nanoparticles) และอาศัยคุณสมบัติที่ว่า DNA probe ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น กับ ดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคในสิ่งส่งตรวจ จะสามารถจับกันได้ (hybridization) ถ้ามีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน (complementary) เมื่อนำสาย DNA มาต่อกับอนุภาค ทองคำขนาดเล็กระดับนาโนเมตร อนุภาคทองคำจะเป็นเสมือน marker ช่วยบอกได้ว่ามี DNA ของเชื้อก่อโรคหรือไม่ โดยไม่ต้องตรวจด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของDNAเพื่อตรวจสอบดังที่ ต้อง ทำในการตรวจ Polymerase Chain Reaction (PCR) ชุดตรวจเชื้อก่อโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่ถูกผลิตขึ้นนี้ จะถูกนำมาวัดค่าความไวและความจำเพาะ โดยใช้ เชื้อก่อโรคที่เพาะเลี้ยงไว้ หรือ จากDNA ของ

เชื้อก่อโรคที่เก็บไว้ (in vitro) ก่อนจะนำมาใช้ ทดสอบกับเลือดของผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่ได้จากโรงพยาบาล/สถาบันร่วมวิจัยที่กระจายอยู่ในส่วนต่างๆของประเทศรวมทั้งในรพ. จุฬาลงกรณ์

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะผลิต ท้องคำอนุภาคขนาดนาโนเมตร มาต่อกับสาย DNA ของเชื้อก่อโรคลากหลายชนิดที่พบเป็นสาเหตุโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุให้อยู่ในชุดตรวจเดียวกัน และให้ออกมาในรูปแบบของ dipstick เป้าหมายและเป้าหมายในระยะยาว (long-term goal) ของโครงการวิจัยนี้คือ พัฒนาชุดตรวจหาโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุ เพื่อนำไปใช้งานได้ครอบคลุมทุกพื้นที่ของประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การประยุกต์ใช้นาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการแพทย์

นาโนเทคโนโลยี คือเทคโนโลยี และ วิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม สังเคราะห์ และศึกษา โครงสร้างที่มีขนาดช่วงนาโนเมตร ซึ่งมีความหมายกว้างขวางมากโยงไปถึง หลายศาสตร์ด้วยกัน เช่น คอลลอยด์ เคมีโมเลกุล (supramolecular chemistry) พอลิเมอร์ หรือรวมไปถึงชีวโมเลกุล ในหลายกลุ่ม ในการศึกษา นาโนเทคโนโลยีอาจจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ Top-down ซึ่งหมายถึงใช้การบด กัดกร่อน เลียดสี ให้วัตถุขนาดใหญ่เล็กลงเป็น ขนาดในระดับนาโนเมตร และ bottom-up ซึ่งใช้เทคโนโลยีที่สูงกว่า ในการจัดเรียงอะตอมหรือ โมเลกุลอย่างเป็นระเบียบให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นระดับนาโนเมตร ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเอา นาโนเทคโนโลยีไปประยุกต์ใช้ในหลายด้าน เพราะขนาดของอนุภาคในระดับนาโนเมตรนั้น มีสมบัติพิเศษที่แตกต่างจากขนาดอนุภาคระดับอื่นมากมาย ที่เห็นได้ชัดเจนคือ อนุภาคในระดับ นาโนเมตรนั้นใกล้เคียงกับความยาวคลื่นแสงในช่วงที่ตามองเห็น ทำให้เกิดการกระเจิงของแสง เมื่อกระทบอนุภาคได้ดี นอกจากนั้นอนุภาคที่เล็กขนาดนาโนเมตรนั้นจะมีพื้นที่ผิวที่มาก ทำให้ประยุกต์ใช้กับเคมีพื้นผิวเช่นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ดีด้วย นอกจากนั้นสมบัติทางกายภาพต่างๆ ของอนุภาคก็จะเปลี่ยนไปด้วย เช่นสมบัติการนำไฟฟ้า ความเหนียว

การประยุกต์ใช้นาโนเทคโนโลยีทางการแพทย์ในปัจจุบันมีการศึกษาอย่างกว้าง ขวางในหลายแขนง เช่น ในระบบการขนส่งยาด้วยอนุภาคระดับนาโนเมตร การนำอนุภาคระดับ นาโนเมตรเพื่อช่วยในการผ่าตัด หรือการวินิจฉัยโรคโดยอาศัยอนุภาคที่มีขนาดระดับนาโนเมตร เป็นต้น

ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับนาโนเทคโนโลยีทางการแพทย์มากมาย ดังแสดงได้จากตารางที่ 1.4 [16]

Nano-Applications	References
Bio-detection of pathogens	15
Detection of proteins	16
Probing of DNA structure	17
Tissue engineering	18
Heat destruction of tumour (hyperthermia)	20
Phagokinetic studies	21
MRI Contrast enhancement	22
Separation and purification of biomolecules and cells	23
Fluorescent biological markers	24
Drug and gene delivery	26
Artificial cells and their assemblies	28
Design of proteins for efficient electron transport or with mechanical features	29
Using dip pen technology	30
Formation and growth of nanostructures in living biosystems (e.g by alfalfa plants)	32
Biosensors	33
Nanobiomotors	34
Biomineralization	37
Nanorobotics	14
Nanocomputers	39
Nanorods for vaccination applications	40

ตารางที่ 1. 4 : การประยุกต์นำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการแพทย์

(ข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 16)

ได้มีการนำเอาพอลิเมอร์แคปซูลระดับนาโนเมตรมาใช้เพื่อปลดปล่อยโมเลกุลของยาออกมาในอัตราที่ต้องการในสภาวะต่างๆ [17] นอกจากนี้ยังมีการนำ DNA มายึดติดกับพอลิเมอร์ หรือลิโปโซม เพื่อใช้ในการขนส่งยีนด้วย [18] นอกจากนี้ยานาโนบางชนิดมีข้อจำกัดในการส่งผ่านไปยัง เซลล์เป้าหมายอันเนื่องมาจากปัญหาหลายประการ เช่น ความสามารถในการละลายต่ำ ความเสถียรทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* การเกิดผลข้างเคียงที่รุนแรง ซึ่งทำให้ต้องขนส่งไปยังเซลล์เป้าหมายได้แม่นยำขึ้น ซึ่งนาโนเทคโนโลยีได้ถูกนำมาแก้ปัญหานี้อย่างกว้างขวาง เช่น การนำยาไป เกาะยึดกับไขมันโครงสร้างขนาดใหญ่ในรูปแบบต่างๆ [19] เป็นต้น

ตัวกรองระดับนาโนเมตรได้ถูกพัฒนาขึ้นในปี 1995 โดยอาศัยอนุภาคทองคำใน ลักษณะที่เป็นท่อกลวง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.6 นาโนเมตรติดประจุบวก กรองผ่านเลือกเฉพาะ โมเลกุลประจุลบ ที่มีขนาดเล็กเท่านั้นได้ ทำให้ช่วยในการส่งผ่านไอออนได้ [20]

และเมื่อไม่นานมานี้ Baker และคณะได้ทำการสังเคราะห์เดนไดรเมอร์ (dendrimer) ขนาดเล็กกว่า 5 นาโนเมตร ยึดกับกรดโฟลิก (folic acid) และ methotrexate เมื่อฉีดเข้าไปในหนูทดลองที่มีเซลล์ human KB tumor อยู่ จะพบได้ว่ามีเดนไดรเมอร์หนาแน่น ในเซลล์มะเร็งดังกล่าว และเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของ methotrexate ได้ดี ซึ่งยืนยัน ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ confocal [21]

อนุภาคระดับนาโนเมตรบางชนิด มีสีชัดเจน และสามารถเปลี่ยนสีได้ง่ายเมื่อถูก กระตุ้นด้วยแสงเข้าภายนอก จึงมีการนำมาพัฒนาเป็นอุปกรณ์รับรู้สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อต่างๆ ได้ และได้มีการ

วิจัยกันในวงกว้าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาปรับ ประสิทธิภาพให้เกาะยึดกับสารชีวโมเลกุลเป้าหมาย เช่น DNA [22] หรือ โปรตีน [23] หรือ สายคาร์โบไฮเดรต [24]

เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุยังให้การวินิจฉัยสาเหตุที่ทำให้เกิด โรคได้ยาก ในการวิจัยนี้จะเอาสมบัติที่ดีของอนุภาคทองคำมาสร้างเป็นอุปกรณ์ตรวจหาโรคติดเชื้อ บางชนิดที่เป็นที่มาของโรคไข้ที่ไม่ทราบสาเหตุเช่นกัน

การพัฒนาและผลิตอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตร

ทองคำเป็นสิ่งที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่สมัยโบราณ ทำให้งานวิจัยทางด้าน ทองคำอันรวมไปถึงการเตรียมทองคำให้อยู่ในลักษณะต่างๆ นั้นได้พัฒนาขึ้นในหลากหลายรูปแบบ ทั้งในลักษณะการทำเป็นฟิล์มบาง (thin film) [25] การเตรียมให้เป็นคอลลอยด์ของทองคำที่มี ขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร (colloidal gold nanoparticle) ซึ่งมีหลักฐานการเตรียมคอลลอยด์ ของทองคำเพื่อใช้ในทางการแพทย์มาตั้งแต่ศตวรรษที่ 17 โดย Antonii [26] และปัจจุบันยังมีการ ทำการจัดเรียงอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นชั้นเดียว (self-assembled monolayer or SAM) บนวัสดุรองรับด้วย [27]

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (gold nanoparticles, AuNPs) เป็นอนุภาคของ โลหะในระดับนาโนเมตรที่มีความเสถียรสูงสุดชนิดหนึ่ง [28] ซึ่งสามารถเตรียมได้ในลักษณะของ คอลลอยด์ทั้งในน้ำ [29] และในตัวทำละลายอินทรีย์ [30] โดยการเตรียมคอลลอยด์ของ AuNPs ในน้ำนั้นได้เริ่มมีมาตั้งแต่ก่อนคริสตวรรษที่ 4 หรือ 5 ในประเทศจีน และ อียิปต์ [31] และได้รับการ ศึกษาพัฒนาต่อมา ทำให้ได้ AuNPs ที่มีขนาดต่างๆ กันไป และเป็นคอลลอยด์ในตัวทำละลายชนิด ต่างๆ หลากหลายชนิด

AuNPs นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ได้มากมาย เช่น การนำไป ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีต่างๆ โดย Schimpf และคณะพบว่าอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร สามารถใช้เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (hydrogenation) และปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) [32] ได้ และ Haruta ได้พบว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาร์บอนมอนอกไซด์สามารถ เกิดได้ที่อุณหภูมิห้องถ้ามีอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตรเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา[33] แต่ประโยชน์ด้านหนึ่งที่มีการนำเอา AuNPs ไปใช้กันอย่างแพร่หลายก็คือ การนำไปใช้เป็นเครื่องมือตรวจวัดทางชีวภาพ (biosensor)[34] และเป็นเครื่องมือตรวจวัดในระดับโมเลกุลได้ (molecular sensor)[35] นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในการถ่ายภาพทางการแพทย์ (medical imaging)[36] ได้อีกด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจากสมบัติเชิงแสงของอนุภาค AuNPs ที่เรียกว่าปรากฏการณ์พลาสมอนเรโซแนนซ์ที่พื้นผิวของอนุภาค (surface plasmon resonance, SPR)[37]

ที่พื้นผิวของโลหะซึ่งสัมผัสกับสารไดอิเล็กทริก เช่นอากาศ หรือ น้ำ เมื่อมีแสงที่มีความยาวเหมาะสมค่าหนึ่ง ที่มีระนาบของสนามไฟฟ้าในทิศทางเดียวกับการตกกระทบในมุมที่เกิดการสะท้อนกลับ

หมด กระแทบเข้ากับพื้นผิว จะทำให้อิเล็กตรอนที่อยู่พื้นผิวเกิดการสั่นพ้อง และมีการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นนั้นๆ ไปบางส่วน ทำให้แสงที่สะท้อนออกมามีความเข้มที่ลดลง ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้เองที่เรียกว่า ปรากฏการณ์พลาสมอนเรโซแนนซ์ที่พื้นผิวของอนุภาค (SPR)[37] และด้วยปรากฏการณ์เช่นนี้เองที่ทำให้ AuNPs มีการดูดกลืนแสงในช่วงประมาณ 520 นาโนเมตร คอลลอยด์ของ AuNPs จึงมีสีแดง ซึ่งปัจจัยที่ผลกระทบต่อความยาวคลื่นของแสงที่จะเกิดปรากฏการณ์ SPR นั้น มีหลายปัจจัย ปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งก็คือ ขนาดของอนุภาคโลหะ ซึ่งสามารถคำนวณหาความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงได้จากทฤษฎีของ Mie[38] คือ

$$E(\lambda) = \frac{24\pi N_A a^3 \epsilon^{3/2} m}{\lambda \ln 10} \left[\frac{\epsilon_i(\lambda)}{\{\epsilon_r(\lambda) + 2\epsilon_m\}^2 + \epsilon_i^2(\lambda)} \right]$$

เมื่อ

N_A	คือรัศมีของอนุภาค
ϵ_m	คือค่าคงที่ไดอิเล็กตริกของตัวกลาง
λ	คือความยาวคลื่น
ϵ_r	คือส่วนจำนวนจริงในฟังก์ชันไดอิเล็กตริก
ϵ_i	คือส่วนจำนวนจินตภาพในฟังก์ชันไดอิเล็กตริก

จากสมการพบว่า AuNPs ที่มีพื้นฐานเป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 10–40 นาโนเมตร จะมีสีแดง ส่วน AuNPs ที่มีขนาดใหญ่ หรือ มีพื้นฐานไม่เป็นทรงกลม จะมีสีน้ำเงิน

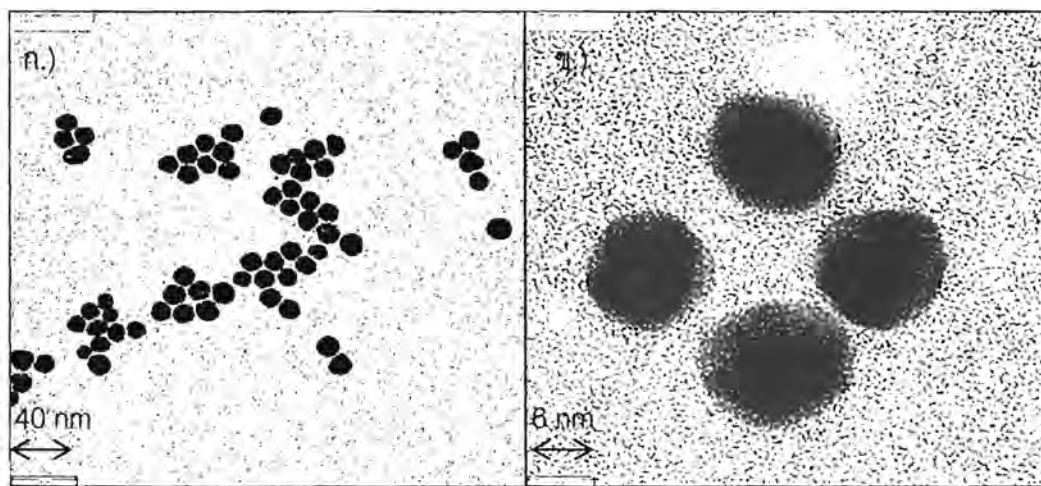
นอกจากนั้นความยาวคลื่นแสงที่ถูกดูดกลืนด้วยปรากฏการณ์ SPR นั้นยังขึ้นอยู่กับ ค่าดัชนีหักเหของสารไดอิเล็กตริกที่ผิวของอนุภาคโลหะด้วย [39] ด้วยคุณสมบัตินี้จึงสามารถนำเอา AuNPs ไปประยุกต์ใช้ในการเป็นเครื่องมือตรวจวัดโมเลกุลที่ผิวหน้าของอนุภาคได้ต่อไป โดยอาศัยการปรับปรุงผิวหน้าของ AuNPs ให้มีความสามารถในการเลือกจับกับโมเลกุลเป้าหมาย หรือสารชีวโมเลกุลที่สนใจ ได้อย่างเฉพาะเจาะจง[40]

การสังเคราะห์ AuNPs ในรูปคอลลอยด์นั้น สามารถทำได้ทั้งในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ และ ในน้ำ โดยอาศัยสารช่วยทำให้เสถียร (stabiliser) ที่แตกต่างกันไป ซึ่งมักจะเป็นสารประกอบอินทรีย์ โมเลกุลเล็กๆ หรืออาจจะเป็นสายพอลิเมอร์[41] ในปี 1994 นั้น Brust และคณะ[42] ได้รายงานการ

สังเคราะห์ AuNPs ในตัวทำละลายอินทรีย์จากปฏิกิริยารีดักชันของสารละลาย Au^{3+} ด้วย $NaBH_4$ โดยอาศัยสารประกอบในกลุ่มไทออล (thiol) เป็นสารช่วยให้เสถียร การสังเคราะห์นี้ทำในระบบ 2 เฟส คือปฏิกิริยารีดักชันจะเกิดในชั้นน้ำ เมื่อได้ AuNPs แล้ว อนุภาค AuNPs จะถูกดึงเข้าไปในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยสารประกอบไทออล ทำให้ได้คอลลอยด์ของ AuNPs ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และปรากฏเป็นสีแดงเข้ม

ส่วนการสังเคราะห์ในน้ำนั้นสามารถทำได้โดยอาศัยสารช่วยให้เสถียรได้หลายชนิดเช่นกัน เช่นในปี 1999 นั้น Yonezawa และ Kunitake ได้ทำการสังเคราะห์ AuNPs โดยอาศัยเกลือ sodium 3-mercaptopropionate เป็นสารช่วยให้เสถียร[43] แต่สารช่วยให้เสถียรที่นิยมใช้กันมากก็ sodium citrate ซึ่งสามารถเตรียมได้ในหลายสภาวะ และได้อนุภาค AuNPs ที่มีขนาดแตกต่างกันออกไป ข้อดีประการหนึ่งก็คือ sodium citrate นั้นจะทำหน้าที่เป็นได้ทั้งสารช่วยให้เสถียร และเป็นตัวรีดิวซ์ไปด้วย [44] โดยสภาวะของปฏิกิริยาไม่รุนแรงเหมือนกับการใช้ $NaBH_4$

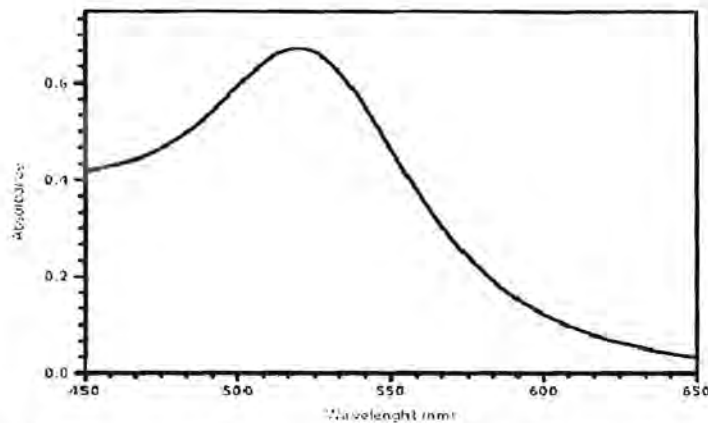
ในปัจจุบันคณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาวิธีการเตรียมคอลลอยด์ของ AuNPs ในน้ำจากการรีดิวซ์ Au^{3+} ด้วยเกลือ citrate ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นาโนเมตร (รูปที่ 1. 2) ซึ่งมีการกระจายตัวของอนุภาคต่ำ และเหมาะกับการนำมาทำเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดได้ดี โดรนคอลลอยด์ที่ได้นั้นมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 520 nm (รูปที่ 1. 3) ปรากฏเป็นสีแดง จากรายงานการตรึงอนุภาคทองคำบนผิวหน้าของวัสดุ [45] คณะผู้วิจัยจึงพยายามพัฒนาการตรึงอนุภาคทองคำลงบนผิวหน้าของวัสดุ เพื่อให้สามารถนำไปใช้งานในการวิเคราะห์ได้ง่ายขึ้นต่อไปด้วย



รูปที่ 1. 2 : อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เตรียมได้

ก.) กำลังขยาย 60000 เท่า

ข.) กำลังขยาย 400000 เท่า



รูปที่ 1.3 : สเปกตรัมแสงของคอลลอยด์ของ AuNPs ขนาด 9 nm ที่เตรียมได้

AuNPs นั้น เมื่อมีสารช่วยให้เสถียรเข้ามาล้อมรอบ จะทำให้ AuNPs ไม่รวมตัวกันหรือเกาะตัวกันจนตกตะกอน เพราะสารช่วยให้เสถียรจะเกาะที่ผิวของ AuNPs และทำให้ผิวของ AuNPs แต่ละอนุภาคไม่สามารถเชื่อมต่อกันได้ อย่างไรก็ตาม สารช่วยให้เสถียรเหล่านี้สามารถจะทำการแลกเปลี่ยนเข้าออกจากผิวของ AuNPs ได้[46] ทำให้เราสามารถปรับปรุงผิวหน้าของ AuNPs ให้มีโมเลกุลที่ต้องการมาเคลือบผิวได้ด้วย ด้วยเหตุนี้เองจึงสามารถนำ AuNPs มาสร้างเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสารทางชีวภาพที่มีความจำเพาะเจาะจงได้อย่างหลากหลาย [47] โดยการปรับปรุงผิวหน้าของ AuNPs ด้วยสารที่มีความสามารถในการเลือกจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ต้องการจะวิเคราะห์ตรวจหา จึงเปรียบได้ว่า AuNPs ทำหน้าที่เป็นหน่วยรายงานผล (reporter) สำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดระดับโมเลกุล

โดยการตรวจวัดการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารที่วิเคราะห์กับอนุภาค AuNPs นั้น สามารถทำได้โดยใช้แสง เนื่องจากเมื่อผิวหน้าของ AuNPs เกิดการเปลี่ยนแปลง จะทำให้ SPR เปลี่ยนแปลงตามไปด้วยซึ่งการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปสามารถตรวจวัดได้ง่ายด้วยสเปกโตรมิเตอร์ (UV-vis spectrometer)[48] ซึ่งอาจจะเห็นการเปลี่ยนแปลงสีได้ด้วยตาเปล่าในบางสภาวะ[49] ซึ่งคอลลอยด์ของ AuNPs ที่ผู้วิจัยเตรียมได้จะมีสีแดง และสามารถเปลี่ยนสีได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าที่เหมาะสมบางชนิดเช่นกัน (รูปที่ 1.4)



รูปที่ 1.4 : การเปลี่ยนสีของคอลลอยด์ของ AuNPs จากแดง (ก) เป็นสีน้ำเงิน (ข)

ก.) คอลลอยด์ของ AuNPs ก่อนถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนสี

ข.) คอลลอยด์ของ AuNPs หลังถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนสีแล้ว

นอกจากนั้น ยังอาจตรวจวัดได้ด้วยวิธีอื่นๆ อีก เช่นการทำ electrophoretic migration[50] หรืออาจจะตรวจวัดโดยตรงได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) ที่มีกำลังขยายสูงก็ได้ [51]

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ชุดตรวจโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่เกิดจากโรคติดเชื้อบางชนิดซึ่งพบบ่อยในประเทศไทย โดยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เพื่อใช้เป็นชุดตรวจวินิจฉัยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุในโรงพยาบาลต่อไปในอนาคต
2. เพื่อศึกษาโรคติดเชื้อในประเทศไทย อันเป็นสาเหตุก่อโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุในน้ำเลือดของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ โดยศึกษาเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของเทคนิคใหม่ซึ่งพัฒนาขึ้นมา เทียบกับวิธี polymerase chain reaction (PCR) จากยีนของเชื้อก่อโรค และศึกษาเทียบกับวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อต่างๆ เช่นแอนติเจนจำเพาะต่อเชื้อซึ่งก่อโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ

ขอบเขตของการวิจัยในเชิงปริมาณ/เชิงคุณภาพ

1. พัฒนาเทคนิคใหม่มาตรวจหาเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุโดยอาศัย gold nanoparticles
2. ศึกษาความไว ความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิคใหม่นี้เทียบกับวิธี PCR และ วิธีมาตรฐานเดิมของการหาเชื้อก่อโรคแต่ละชนิด ในเชื้อโรคที่ได้จากการเพาะเชื้อในหลอดทดลอง

ทฤษฎี สมมุติฐานหรือกรอบแนวความคิด (Conceptual framework)

ถ้าเชื้อแบคทีเรียต่างๆ เป็นปัจจัยหลักในการก่อโรคใช้ไม่ทราบสาเหตุ ต้องสามารถตรวจหา DNA ของเชื้อโรคต่างๆได้ ในตัวอย่างเลือดที่นำมาตรวจ อาศัยหลักการ DNA hybridization ที่ใช้ DNA probe ไปจับกับ DNA ของเชื้อโรคที่มีลำดับเบสเป็นสายคู่สมกัน (complimentary)

ถ้าหาก gold nanoparticles สามารถใช้ติดฉลากกับ DNA probe และนำมาตรวจหาเชื้อก่อโรคได้ เมื่อมีการ hybridization ระหว่าง DNA ของเชื้อโรคในตัวอย่างที่นำมาตรวจกับ DNA probe ที่ติดอยู่กับ gold nanoparticle ต้องพบการเปลี่ยนแปลงของ UV emission light เมื่อตรวจด้วย UV spectrophotometer ซึ่งสามารถนำคุณสมบัติที่มีการเปลี่ยนแปลงของ UV absorbance

Conceptual framework

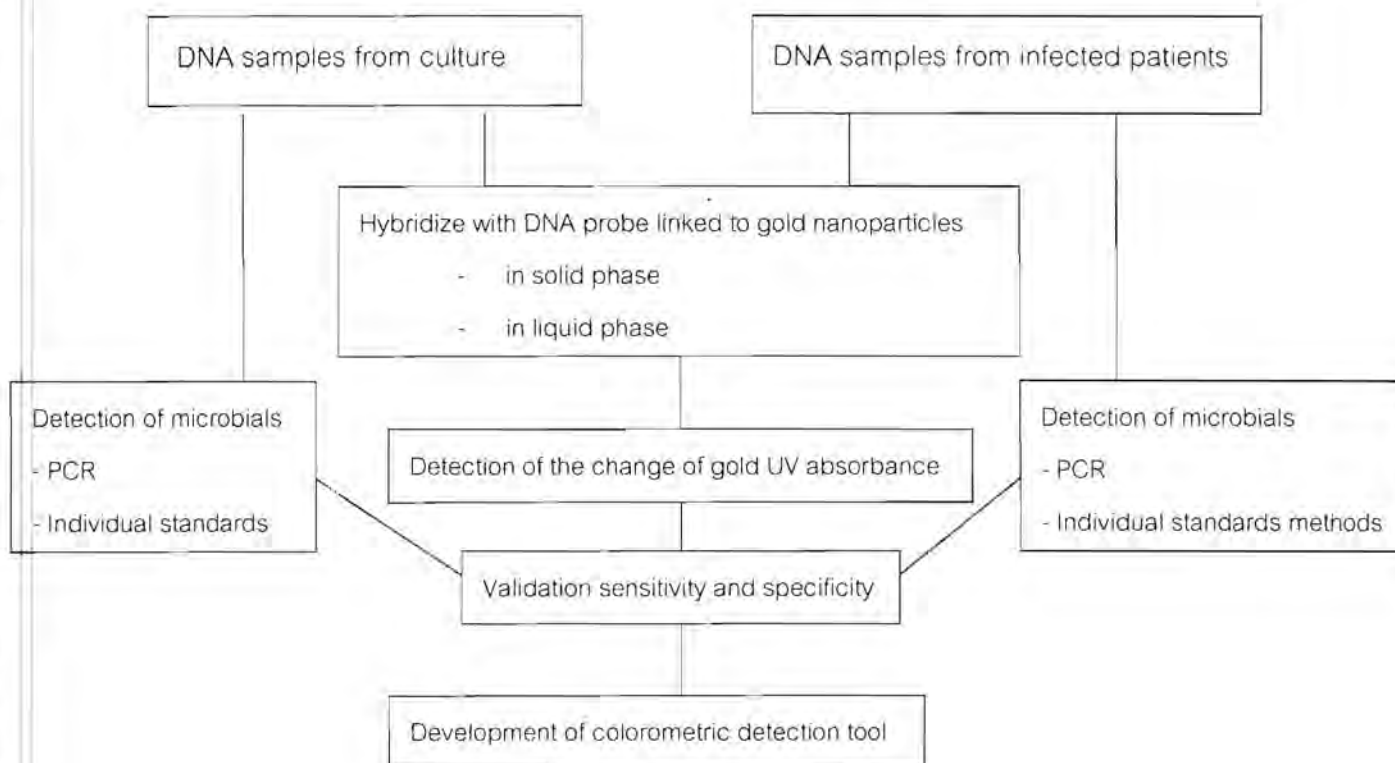


Figure 1.5 Conceptual framework

ความคาดหวัง แนวทางที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 1) ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการปรับปรุงผิวหน้าของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
- 2) คอลลอยด์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีความสามารถในการตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ
- 3) พัฒนาชุดตรวจโรคติดเชื้อจากคอลลอยด์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ซึ่งมีราคาที่ถูกกว่าการตรวจด้วยวิธีดั้งเดิม และมีศักยภาพที่จะพัฒนานำไปใช้ได้จริงในโรงพยาบาลต่างๆทั่วประเทศ
- 4) ความรู้จากการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่จะบอกสาเหตุของไข้จากการติดเชื้อในโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ เป็นองค์ความรู้ในการทำวิจัยต่อไป
- 5) เป็นการพัฒนางานวิจัยระดับคณะ/มหาวิทยาลัย และเป็นการบูรณาการความรู้จากความร่วมมือของหลายสถาบันต่างๆเพื่อประโยชน์ต่อสาธารณสุขของประเทศ
- 6) เป็นประโยชน์ต่อการเรียนการสอน และการผลิตบัณฑิตระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อเป็นนักวิจัยรุ่นใหม่ที่จะเป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาประเทศต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

2.1 Gold Nanoparticle Synthesis and characterization

- Preparation of gold nanoparticles

Gold nanoparticles (AuNPs) that was used throughout the project is citrate-reduced gold nanoparticles with concentration equal to 100 ppm when calculated based on amount of HAuCl_4 (equivalent to 50 ppm when calculated based on amount of Au^{3+}). From previous study, spherical-shape gold nanoparticles with size approximately 10 nm in diameter were the most appropriate characteristics to be used in biosensing technology. Hence, we chose the modified Turkevich *et al.* method to be used in gold nanoparticles preparation due to the fact that gold nanoparticles from the method would meet the conditions stated above.

- Reagents

1. 12.7 mM tetrachloroauric acid ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
 - Dilute 1.5 mL of 1% w/v $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (prepared from gold (III) chloride trihydrate (Sigma, cat. No. G4022)) in 1.5 mL of DI H_2O
2. 38.8 mM trisodium citrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 - Dissolve 34.2 mg of trisodium citrate (Merck, cat. No. A661048) in 3 mL of DI H_2O
3. Deionized water (DI H_2O)



Figure 2.1 - 12.7 mM tetrachloroauric acid



Figure 1.2 - 38.8 mM trisodium citrate

- Equipments

1. 50-mL glass flask
2. 100-mL glass flask
3. Hot plate with magnetic stirring function
4. Reflux column
5. Magnetic stirrer bar
6. 1-mL auto-pipette and pipette tips

Synthesis procedure

Step 1 – Add 2 mL of 12.7 mM tetrachloroauric acid solution into 49 mL of DI H₂O in clean 50-mL glass flask with magnetic stirrer bar. Place the apparatus on hot plate and boil while stirring.

Step 2 – Add 1.84 mL of 38.8 mM trisodium citrate solution to 49 mL of DI H₂O in clean 100-mL glass flask with magnetic stirrer bar. Set reflux column on the flask with hot plate temperature controller on top of the flask. Put the intact apparatus on hot plate and boil while stirring.

Step 3 – When the solutions in both flasks are boiled, slowly pour the diluted tetrachloroauric acid solution into diluted trisodium citrate solution. Reaffirm that the reflux column is firmly located and set the controlled temperature to 70°C. Stir vigorously.

Step 4 – Remain the controlled temperature until red-coral colored solution of gold nanoparticles is acquired. Then, continue to boil for 5 minutes and let it to cool down to room temperature. Leave the solution overnight while stirring.

Step 5 – Disassemble the apparatus and transfer gold nanoparticles colloid to a clean covered glass container and keep away from light.

Step 6 – Some of gold nanoparticles colloid are characterized by UV-visible spectrophotometer, nanosizer, and transmission electron microscope (TEM).



Figure 2.3 - Flaming the flask and boiling
during boiling of the hot plate



Figure 2.4 - 1 liter 100 ppm gold nanoparticles
colloid with a clear orange-red color



Figure 2.5 : UV/Vis spectrophotometer

2.2 Evaluation of in vitro gold nanoparticle cytotoxicity

2.2.1 HeLa cell culture

This study used HeLa cell lines (cervical cancer cells) which were kindly provided by Prof. Dr. Apiwat Mutirangura. See figure 10 for the morphology of HeLa cells. HeLa cell lines were maintained in DMEM medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics. Cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ atmosphere. The cells were subcultured and fed as needed. For the experiment, cells were seeded in 24 well plate at a density of 1x10⁵ cells per well in 500 µL of complete medium, triplicate samples. The cells were incubated for 24 hours at 37 °C with 5 % CO₂. After 24 hours incubation, the cells were added with DMSO as positive control and various concentrations gold nanoparticles (10, 50, and 100 µg/mL respectively). After that, cells were further incubated for 1, 2, and 3 days at 37 °C with 5 % CO₂.

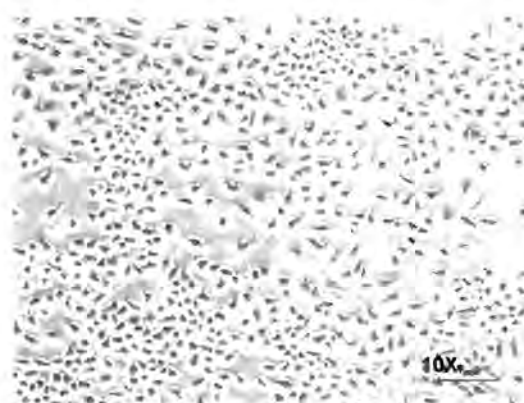


Figure 2.6 The morphology of HeLa cells.

2.2.2 Determination of cell morphology by Light Microscope (LM)

The effect of gold nanoparticles on cell morphology was determined using light microscope. After incubation cells with gold nanoparticles, cells were monitored and taken the picture by light microscope. The morphology of gold nanoparticles treated groups was compared with negative and positive control.

2.2.3 Determination of intracellular morphology and fate of gold nanoparticles by Transmission Electron Microscope (TEM)

The effect of gold nanoparticles on intracellular morphology as well as gold nanoparticles trafficking was determined using Transmission Electron Microscope (TEM). Cells were prepared as follows: after incubation with gold nanoparticles, cells were trypsinized and washed with PBS 2 times (10 minutes), followed by centrifugation at 2000 rpm for 5 minutes. The precipitate was prefixed in 2% glutaraldehyde for 2 hours and washed with PBS 3 times (10 minutes). Then, the precipitate was postfixed in 2% osmium tetroxide for 1 hour, centrifuged at 14000 rpm for 5 minutes and washed with PBS 1 time (10 minutes). After that, the precipitate was dehydrated in ethanol series (50%, 70%, 80%, 95%-2 times and 100%-3 times, respectively). The precipitate was infiltrated in 100% propylene oxide for 2 hours, propylene oxide: epoxy resin (1: 1) for 3 hours and 100% epoxy resin for 18 hours. Finally, the precipitate was embedded in epoxy resin at 60°C overnight. Epoxy resin blocks were cut as ultra thin section (~ 60-90 nm), laid on the grid and stained with uranyl acetate and lead citrate. Samples were taken to monitor and take pictures by transmission electron microscope. The intracellular morphology of gold nanoparticles treated groups were compared with control groups.

2.2.4 *In vitro* Cytotoxicity assay (MTT)

In vitro Cytotoxicity was determined by MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). MTT assay is a colorimetric assay according to a tetrazolium-based compound is reduced to formazan by mitochondrial dehydrogenase in the living cells. Whereas, dead cells can not reduce tetrazolium-based compound to formazan because of lacking of mitochondrial dehydrogenase. The amount of formazan is directly proportional to the number of living cells in the culture. Formazan was measured with a spectrophotometer at 570 nm.

For the experiment, cells were seeded in 24 well plate at a density of 1×10^5 cells per well in 500 μ l of complete medium, triplicate samples. The cells were incubated for 24 hours at 37 °C with 5 % CO₂. After 24 hours incubation, cells were exposed to various concentrations of gold nanoparticles. Then, cells were further incubated for 1, 2 and 3 days. After 1, 2 and 3 days incubation, cells were washed with PBS 2 times, followed by added 350 μ L of the tetrazolium-based compound to each well. Cells were incubated in the incubator for 30 minutes. Cells were removed the tetrazolium-based compound and dissolved formazan with 1 ml of DMSO: glycine buffer (9: 1). The formazan solution was pipetted into cuvettes and measured optical density by spectrophotometer at 570 nm. The relative cell viability (%) relates to control wells containing cell culture without gold nanoparticles was calculated by using the following equation.

$$[A]_{\text{test}} / [A]_{\text{control}} \times 100$$

Where $[A]_{\text{test}}$ is the absorbance of the test sample and $[A]_{\text{control}}$ is the absorbance of control sample(39).

2.3 Physiochemical Effects of DNA-coated goldnanoparticles

2.3.1 Preparation of DNAs

All oligonucleotides were prepared by diluting a 200 μ M oligonuclotide stock solution to 20 μ M. The oligonucleotide sequences used in this experiment are shown in Table 2.3.1.

Table 2.3.1 Oligonucleotide sequences

Oligonucleotides	Sequence (5' to 3')
Oligo1 (target leptospirosis)	TTTATTCGTCGTTACACTAC
Oligo2 (leptospirosis probe)	GTAGTGTAACGACGAATAAA
Oligo3 (non-complementary to target)	CCGAGCAATAAATCTTTACC
Oligo4 (1 mismatched complementary to target)	CTAGTGTAACGACGAATAAA

A stock DNA was prepared by adding an oligonucleotide into the hybridization buffer (0.2xSSC containing 5% formamide and 1% dextran sulfate) at room temperature for 30 min prior to use. Ratios of the oligonucleotide and the hybridization buffer are shown in table 3-2.

Table 2.3.2 DNA mixture composition (Oligo1 : Oligo2 : Oligo3 : Oligo4 : hybridization buffer)

DNA mixture	Oligo1 (μL)	Oligo2 (μL)	Oligo3 (μL)	Oligo4 (μL)	Hybridization buffer (μL)
mixture1 (ssDNA)	6	-	-	-	2
mixture2 (ssDNA)	-	6	-	-	2

mixture3 (dsDNA)	3	3	-	-	2
mixture4 (ssDNA)	3	-	3	-	2
mixture5 (1 mismatched dsDNA)	3	-	-	3	2

2.3.2 Aggregation of gold nanoparticles

2.3.2.1 Effect of buffer on aggregation

Into 5 eppendorf tubes contrary, 250 μ l of 100 ppm AuNPs, 10, 50, 100, 150 and 200 μ l of hybridization buffer were added. The solutions were *occasionally shaken* and allowed to stand for at least 30 mins at room temperature. Then, the colours of solution mixtures were observed. Finally, the solutions were mixed with 250 μ l of milli-Q water and the absorbances were measured by UV-VIS spectrophotometer.

2.3.2.2 Effect of salt on aggregation

Into 5 eppendorf tubes contrary, 250 μ l of 100 ppm AuNPs, 1, 2, 3, 4, and 5 μ l of 2M NaCl were added. The solutions were *occasionally shaken* and allowed to stand for at least 30 mins at room temperature. Then, the colours of solution mixtures were observed. Finally, the solutions were mixed with 250 μ l of milli-Q water and the absorbances were measured by UV-VIS spectrophotometer.

2.3.2.3 Effect of DNA on aggregation

Into 15 eppendorf tubes contrary, 250 μl of 100 ppm AuNPs, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 μl of mixture1-3 were added. Subsequently, 4 μl of 2M NaCl was added. The solutions were *occasionally shaken* and allowed to stand for at least 30 mins at room temperature. Then, the colours of solution mixtures were observed. Finally, the solutions were mixed with 250 μl of milli-Q water and the absorbances were measured by UV-VIS spectrophotometer.

2.3.2.4 Colorimetric detection of non-complementary DNA, complementary DNA and 1-mismatched complementary DNA

Into 3 eppendorf tubes contrary, 250 μl of 100 ppm AuNPs, 0.3 μl of mixture3-5 were added. Subsequently, 4 μl of 2M NaCl was added. The solutions were *occasionally shaken* and allowed to stand for at least 30 mins at room temperature. Then, the colours of solution mixtures were observed. Finally, the solutions were mixed with 250 μl of milli-Q water and the absorbances were measured by UV-VIS spectrophotometer.

2.4 Fabrication of Lateral Flow test Strip

The basic principle of AuNPs-based NALF detection system involves the design of thiol-modified specific oligonucleotide probes on AuNPs. If there are complementary targets that can form sandwich hybridization with both thiolated probes on AuNPs and

another target-specific probes on test line of the NALF test strip, the functionalized-AuNPs will accumulate at the test line revealing a distinct red color. Previous study reported the utilization of NALF to detect human genomic DNA samples without PCR amplification. Their research group found that the AuNPs based-NALF assay on a test strip had enabled naked eye detection of the target DNA with a very high sensitivity.

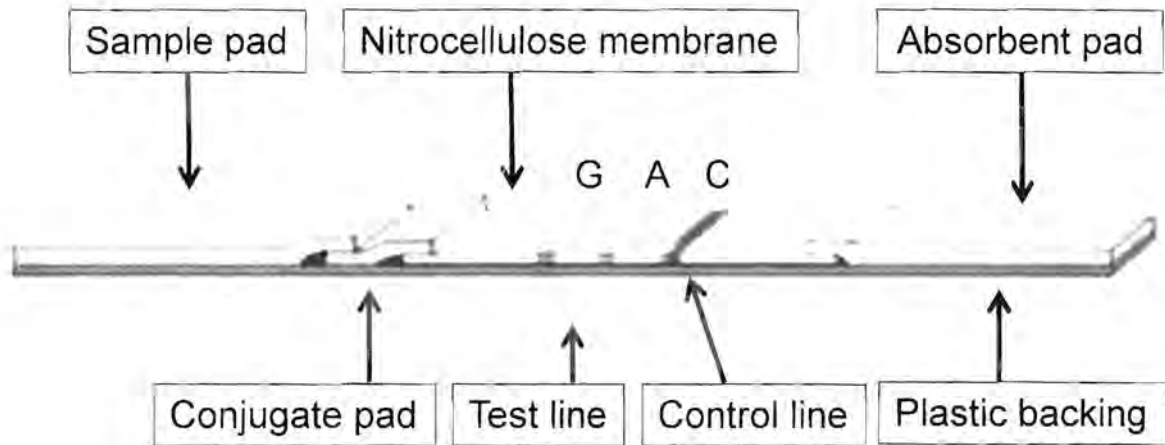


Figure 2.7 Model of components of Lateral flow strip test

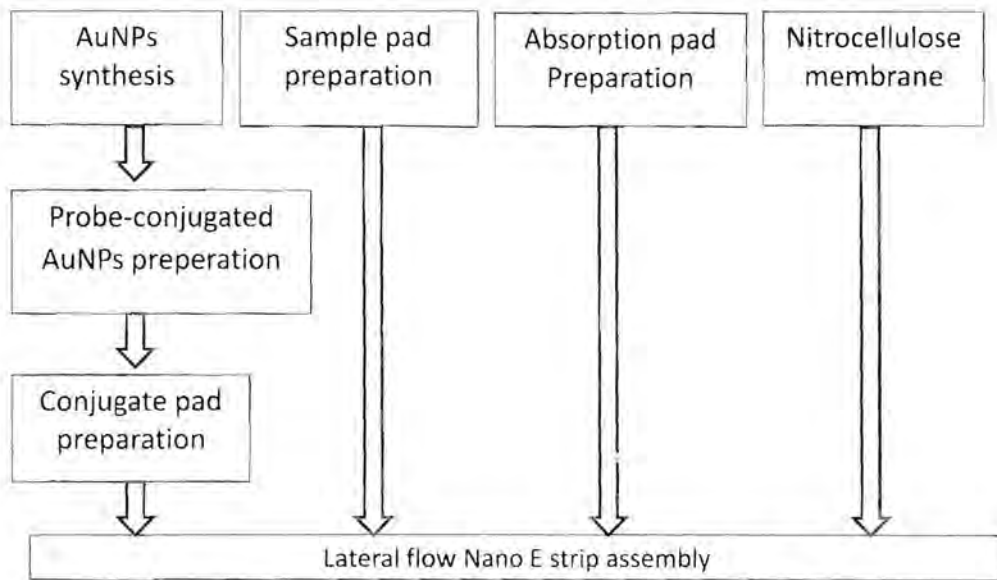


Figure 2.8 Processes of Lateral flow strip test assembly

2.5 Optimization of influencing parameters for fabrication of gold nanoparticle-based nucleic acid lateral flow strip test

2.5.1. Chemical used

- DL-Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, Canada)
- Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP, Sigma-Aldrich, USA)
- Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, USA)
- Trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, Germany)
- NAP-5 columns (GE Healthcare, UK)
- Glass microfiber (Ahlstrom; grade 8964, USA)
- Absorbent pad (Ahlstrom; grade 319, USA)
- Nitrocellulose membrane (Millipore; Hiflow plus HFB24004, Millipore, UK)
- Milli-Q water ($> 18 \text{ M}\Omega$, Labconco : Water Pro PS, USA)

2.5.2 Materials

The experimental probe sequences were 5' GGT AAA GAT TTA TTG CTC GGT TTT TTT TTT- $(\text{CH}_2)_3$ -Thiol 3' [probe#1 : detection probes], 5' GCA CTT GGT GTA GCA ATT AAT GCT G- $(\text{CH}_2)_3$ -Thiol 3' [probe#2 : detection probes], 5' (biotin)-GGC CAA GTT AAA CTC TAT GCT GAC 3'[probe#3 : capture probes on the test line] and 5' CAG CAT TAA TTG CTA CAC CAA GTG C-(biotin) 3' [probe#4 : complementary sequence with probe#2 on the control line]. Synthetic target sequence was 5' AGC AGC ATT AAT TGC TAC ACC AAG TGC TCC TTA AGT CAG CAT AGA GTT TAA CTT GGC CGA 3'. All reagents were prepared with Milli-Q water ($> 18 \text{ M}\Omega$).

2.5.3 Gold nanoparticles synthesis

Gold nanoparticles (AuNPs) were synthesized by adding 38.8 mM trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in boiling 0.02%w/v hydrogen tetracholoaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) in Milli Q water with vigorous stirring. The solution turned deep-red within 2 min after which it was boiled for additional 15 min and then stored at 4°C away from light. The AuNPs were characterized by UV/Vis spectroscopy (Beckman coulter DU @ 800; maximum absorption at 520 nm) and transmission electron microscope (TEM; HITACHI Model H-7650 : 100 kV). Their absorption spectrum and TEM micrograph are shown in Fig. 1A and Fig. 1B respectively.

2.5.4 Conjugation of thiolated probes on AuNPs

DL-dithiothreitol (DTT) and tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) were used separately as a sulfhydryl reductant to reduce the disulfide linkages of the probes to the thiol forms before conjugated to AuNPs. The conjugation was done in a conventional way as described in previously reported protocols with a slight modification. Briefly, 100 μM probe#1 (supplied form) were reduced with DTT. The probes were then purified with a NAP-5 column before added to AuNPs and finally incubated overnight under a gentle shaking. After the incubation, the shaking was continued while a salting buffer was periodically added every 8 hours to obtain a final NaCl concentration of 0.7 M. After the first and the last 3 times of the salting additions, the conjugates were sonicated for 10 sec. The final solution was centrifuged at 12,000 rpm for 15 min and the sediment (AuNPs-probes) was washed with a washing buffer twice. The supernatants (excess thiolated probes) from all three centrifugations were analyzed under UV/Vis spectroscopy and calculated for

$$\% \text{ probe loss} = [\text{OD}_{260\text{nm}} \times 33\mu\text{l/ng} \times \text{Volumn} (\mu\text{l})] / \text{initial thiolated probes (ng)} \times 100.$$

The functionalized AuNPs were stored at 4°C . For the TCEP treatment, the procedures were similar to the DTT protocol as mentioned above. TCEP was added up to a final concentration of 0.1 mM and no column purification needed.

2.6 Preparation, modification, and testing of antibody-conjugated AuNPs

Gold nanoparticles were attached by antibody which has ability to identify and specifically bind with antigen. After attachment, the nanoparticles received capability to locate themselves onto the place where specific antigen was presenting. Then, when many of gold nanoparticles were biologically gathered together in close space (e.g. around antigen protein on nitrocellulose membrane), the nanoparticles did spontaneously aggregate and solidify – which will appear as a red/black dot on the membrane.

Our project has focused on developing gold nanoparticles to detect Leptospirosis or Weil's disease. Major antibody which had been used throughout the project was polyclonal antibody of *Leptospira pomona* in laboratory grade. However, a set of antibodies, which included monoclonal and polyclonal antibody of *Leptospira pyrogenase*, were borrowed from microbiology laboratory in faculty of medicine. Meanwhile, set of antigens that had been employed during this project were agitated bacterial cell fracture taken from bacterial cell culture plates. List of available antigens were *Leptospira pomona*, *Leptospira pyrogenase*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* while the blank solution was 1X Phosphate Buffer Saline or PBS.

Many conditions and factors were adapted and adjusted to get the most optimistic sensitivity and specificity of antibody-conjugated gold nanoparticles when compared to conventional detection method. The conditions that had been modified did take place in many of different step depended on pertinence.

- Reagents
 1. 100 ppm gold nanoparticles (AuNPs) from the first part of this project
 2. 0.5 mg/mL polyclonal antibody of *Leptospira pomona* as stock antibody
 3. Blended cell fractures of *Leptospira pomona*
 - Agitate 10^8 cells of *Leptospira pomona* bacteria in 1 mL of sterile DI H₂O by sonicator
 4. Blended cell fractures of *Leptospira pyrogenase*
 - Agitate 10^8 cells of *Leptospira pyrogenase* bacteria in 1 mL of sterile DI H₂O by sonicator

5. Blended cell fractures of *Staphylococcus aureus*
 - Agitate 10^8 cells of *Staphylococcus aureus* bacteria in 1 mL of sterile DI H₂O by sonicator
 6. Blended cell fractures of *Escherichia coli*
 - Agitate 10^3 cells of *Escherichia coli* bacteria in 1 mL of sterile DI H₂O by sonicator
 7. 1X Phosphate Buffer Saline (PBS)
 - Prepared from protocol in Appendix A1.7 of Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3rd edition, Volume 3.
 8. 0.4 M sodium carbonate (Na₂CO₃)
 - Dissolve 2.76 g of Potassium Carbonate (Sigma, cat. No. P1472) in 50 mL of DI H₂O.
 9. 2% polyethylene glycol in 1X PBS (PEG in PBS)
 - Dissolve 10 g of polyethylene glycol (Sigma, cat. No. P2263) in 500 mL of 1X PBS.
 10. 10% w/v bovine serum albumin (BSA) in 1X PBS
 - Dissolve 5 g of albumin from bovine serum (Sigma, cat. No. A4503) in 50 mL of 1X PBS.
 11. 10% w/v dairy milk in 1X PBS
 - Dissolve 5 g of dairy milk (Carnation®) in 50 mL of 1X PBS.
 12. 0.05% Tween-20 in 1X PBS (T-PBS)
 - Dilute 25 µL of TWEEN® 20 (Sigma, cat. No. P5927) in 50 mL of 1X PBS.
- Equipments
1. Sterile 1.5 mL micro-centrifuge tubes
 2. Sterile 15 mL centrifuge tubes
 3. Sterile 24 well cell culture cluster with flat bottom and lid
 4. 10 µL, 200 µL, 1000 µL auto-pipette and sterile pipette tips
 5. Temperature controllable centrifuge machine
 6. Heidolph Duomax 1030 inclining horizontal rotator for solution mixing
 7. Vortex-genie 2 vortex rotator for solution mixing

Procedures

2.6.1 Find the optimal amount of antibody to be conjugated onto gold nanoparticles

Step 1 – Pipette 5 mL of 100 ppm gold nanoparticles into 15 mL micro-centrifuge tube.

Step 2 – Add 0.4 M K_2CO_3 to gold nanoparticles colloid until the colloid becomes basic (require approx. 50 μ L of 0.4 M K_2CO_3). Check the final pH of gold nanoparticles.

Step 3 – Distribute the pH-modified gold nanoparticles into micro-centrifuge tubes.

Step 3 – Prepare varied diluted antibody by *serial dilution* method. 1:2, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 v/v diluted ratio of antibody to final solution are received.

Step 4 – Pipette 2 μ L of each diluted antibody solutions and add into pH-modified gold nanoparticles. Put them on horizontal rotator and let them to mix continuously for 15 minutes.

Step 5 – pipette 20 μ L of 10% NaCl in DI H_2O and add into each micro-centrifuge tube.

Step 6 – observe color change of antibody-conjugated gold nanoparticles. For the tube which antibody is not enough to cover entire surface gold nanoparticles, its color will change from red to blue.

2.6.2. Functionalization of gold nanoparticles by conjugating specific antibody

(All following steps are completed in low temperature and ice with container is required)

Step 1 – Pipette 1 mL of 100 ppm gold nanoparticles into 1.5 mL micro-centrifuge tube.

Step 2 – Add 10 μ L of 0.4 M K_2CO_3 into gold nanoparticles colloid and let the solution to be mixed on vertex rotator.

Step 3 – Pipette 2 μ L of optimal diluted antibody into pH-modified gold nanoparticles and leave it to be mixed on horizontal rotator for 15 minutes.

Step 4 – Add 20 μ L of 2% PEG in 1X PBS to the tube and continuously mixed for 30 minutes more.

Step 5 – Add 100 μ L of 5% BSA in 1X PBS to the tube and mixed for another 15 minutes.

- Step 6 – Put the conjugated gold nanoparticles into centrifuge machine and centrifuge for 45 minutes with speed equal to 13000 rpm at 4 °C.
- Step 7 – When soft gold pellets settle at the bottom and the supernatant solution becomes clear enough, supernatant will be removed until only soft gold pellets left in the micro-centrifuge tube. Then, resuspend antibody-conjugated gold nanoparticles by adds 1 mL of 2% PEG in 1x PBS and mix well using auto-pipette and vortex rotator.
- Step 8 – Add 100 µL of 10% BSA in 1X PBS into conjugated gold nanoparticles and let it stand on horizontal rotator to be continuously mixed until used.

Functionalization of gold nanoparticles by conjugating specific antibody

2.6.3 Preparation of antigen on nitrocellulose base to be the testers of conjugated gold nanoparticles.

(All following steps are completed in low temperature and ice with container is required)

- Step 1 – Cut small pieces of nitrocellulose membrane (approx. 0.8 x 0.8 cm.) and place them into sterile 24 well cell culture plate.
- Step 2 – Dilute antigen as required and well mixed again by vortex rotator.
- Step 3 – Pipette 2 µL of diluted antigen and drop onto nitrocellulose base, try to drop uniformly for all antigen.
- Step 4 – Let the membrane to dry for a period of time.
- Step 5 – Pipette 200 µL of 10% BSA in 1x PBS to block naked surface of the membrane and to stabilize antigen protein for 1 hour at least.
- Step 6 – Discard the blocking agent and wash the membrane by 200 µL of 0.05% Tween20-PBS for 15 minutes. Repeat washing for three times at least.
- Step 7 – Keep in ice box until used.

2.6.4 Antigen detecting procedure.

Step 1 – Pipette 200 μL of antibody-conjugated gold nanoparticles and fill into each well which antigen on nitrocellulose membrane is presenting.

Step 2 – Put the 24 well on horizontal rotator and continuously move the wells.

Step 3 – When requires time is achieves, remove the conjugated gold nanoparticles out of each wells.

Step 4 – Wash the membrane by adding 500 μL of 0.05% Tween20-PBS to each wells and let it continuously move on the rotator. Repeat washing for three times.

Step 5 – Observe the result on the membrane – red/black dot will appear in case that specific antigen is presenting on the membrane.

However, the experimental results are unsatisfied in some circumstances and the better results are aimed to be pointed out. Thus, we have changed and modified each important condition as much as possible during the project life. For the sake of simplicity, the modified conditions are normally physical or chemical factors rather than biological factors which are harder to find some rare reagents. Physical factors which have been adjusted are centrifuge temperature, length of detecting period, and length of antibody-gold nanoparticles incubation period. While the chemical factors are concentration of antigen, concentration of PEG for resuspending step, and type of chemical substance for blocking reagent to block the naked surface of nitrocellulose membrane and prevent unspecific binding.

The following diagram illustrates the whole process of antibody-conjugated gold nanoparticles includes the variable factors to be adjusted.

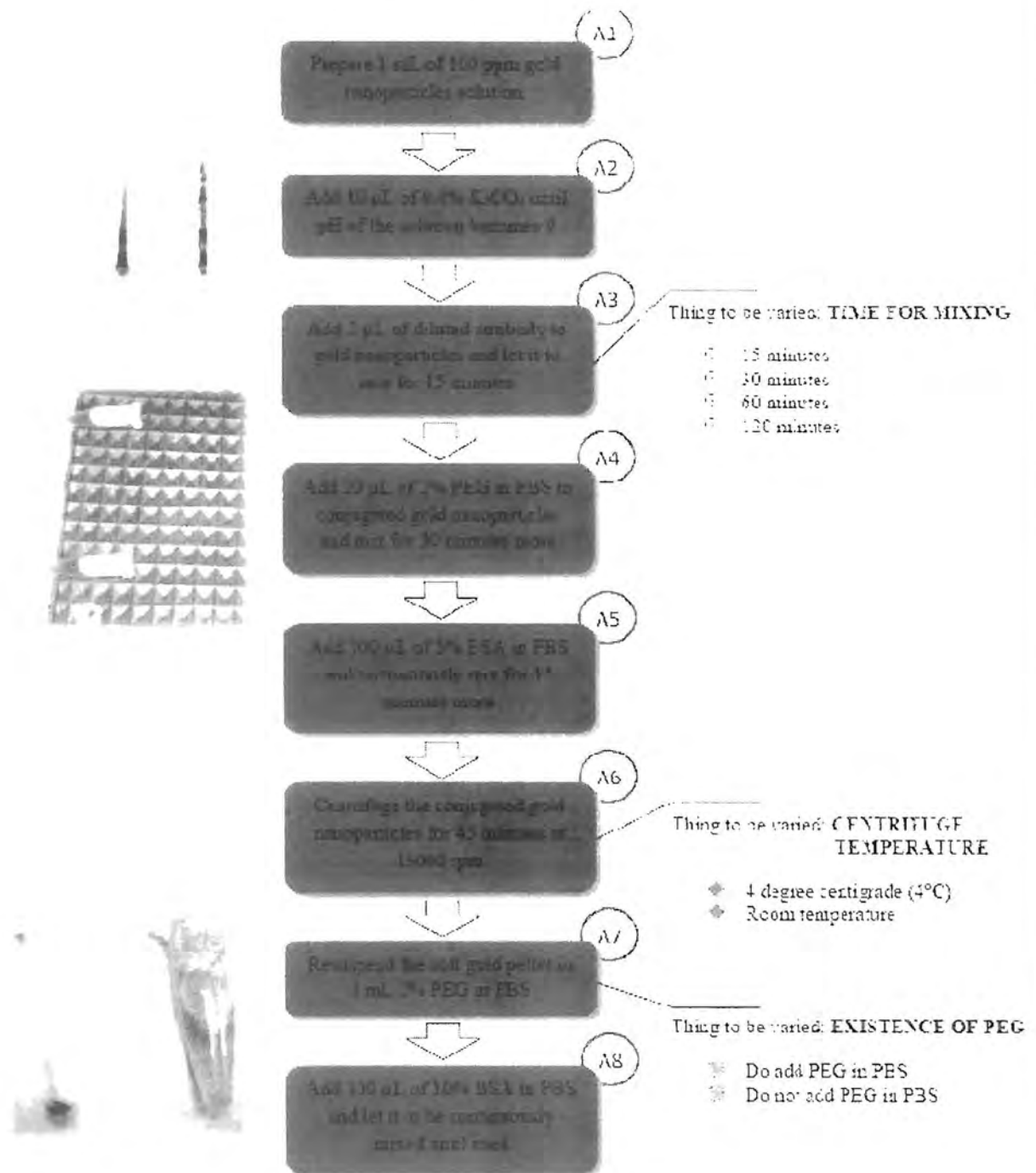


Figure 2.9 : Whole process of antibody-conjugated gold nanoparticles

The following diagram illustrates the whole process of preparation of antigen on nitrocellulose membrane to be used as tester kit in this project. The diagram also includes the variable factors to be adjusted.

Preparation of antigen on nitrocellulose base

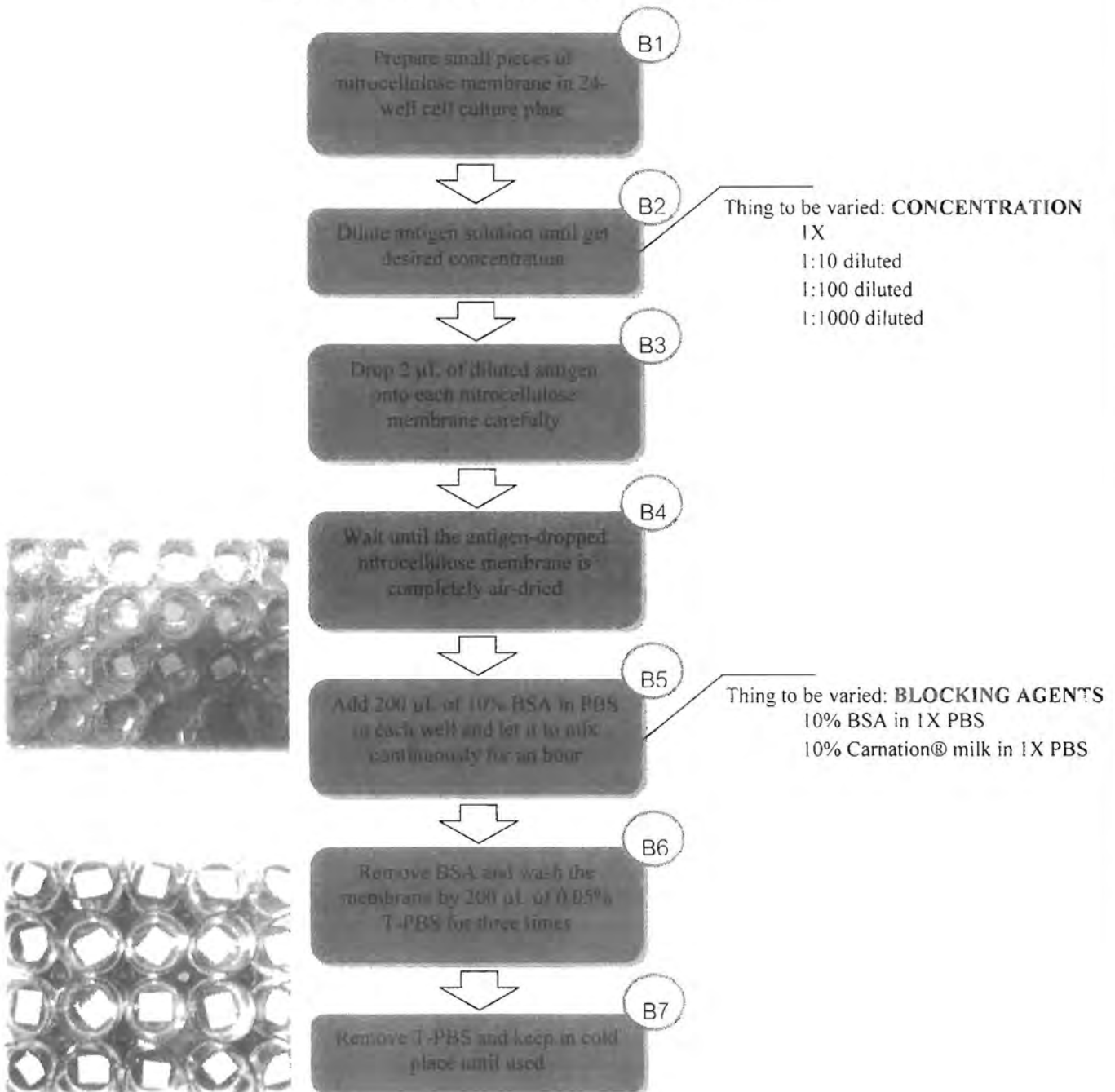
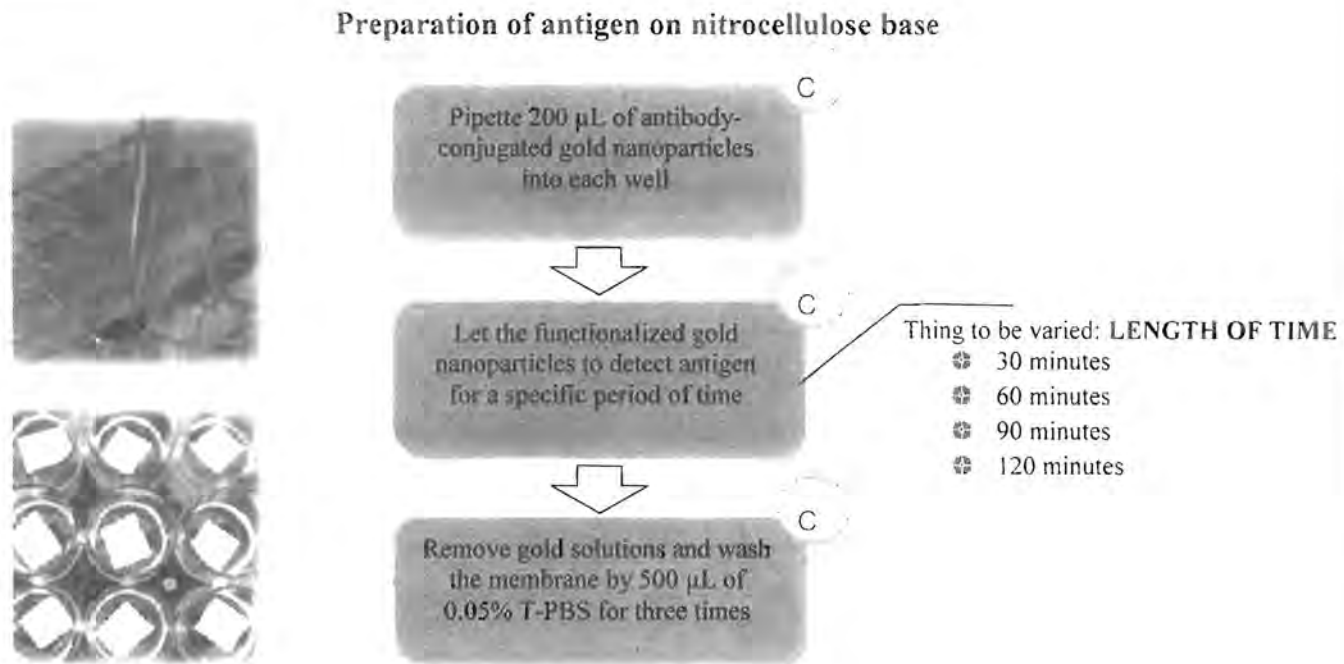


Figure 2.10 : Preparation of antigen on nitrocellulose membrane

The following diagram illustrates the whole process of antigen detecting by using antibody-conjugated gold nanoparticles and washing technique. It also includes the variable factors to be adjusted.



2.6.5 Silver-enhancing to improve signal intensity of conjugated gold nanoparticles

Silver ion with enough light energy source can increase the signal intensity derived from aggregation of gold nanoparticles. Free silver ion in solution can attach onto the dense gold nanoparticles which is locating around specific detectable antigen on nitrocellulose membrane. Attachment of silver ion makes the dot of gold nanoparticles to become darker and easier to be observed by human naked eyes.

Silver solution is synthesized follow the method reported by Chu *et al.*^[3] Silver nitrate (AgNO_3) is reduced by hydroquinone and precipitate onto gold nanoparticles. The mechanism is explained in physiochemical sense - silver nitrate can be spontaneously reduced by hydroquinone, however, it takes long induction period for reaction to take place. But when gold

nanoparticles is presenting, induction period will be decreased because gold nanoparticles can function as catalyst, so, reduced silver (Ag^{\ominus}) can become precipitate cover the area where gold nanoparticles is locating and make the dot from gold nanoparticles to become darker.

- Reagents

1. 35 mg of silver nitrate (AgNO_3)
 - Taken from pure p. a. grade of silver nitrate (POCH S.A., cat. No. 814322777)
2. 1 g of hydroquinone
 - Taken from highly purified grade of hydroquinone (Sigma-Aldrich, cat. No. H9003)
3. 100 mL of citrate buffer solution (0.243 M $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and 0.163 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 - Dissolve 4.2 g of citric acid - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma, cat. No. C1857) and 2.94 g of trisodium citrate - $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, cat. No. A661048) in 100 mL of DI H_2O
4. Deionized water (DI H_2O)

- Equipments

1. 250 mL Beaker
2. Hot plate with magnetic stirring function
3. Magnetic stirrer bar

- Procedure

Step 1 - Mix 50 mL of citrate buffer with 50 mL of DI H_2O in beaker, continuously stirred.

Step 2 - Dissolve 1 g of hydroquinone in the solution from step 1 and stir well until all solid form of hydroquinone is totally dissolved. Then, dissolve 35 mg of silver nitrate in the solution from step 2 and observe the color change of the solution.

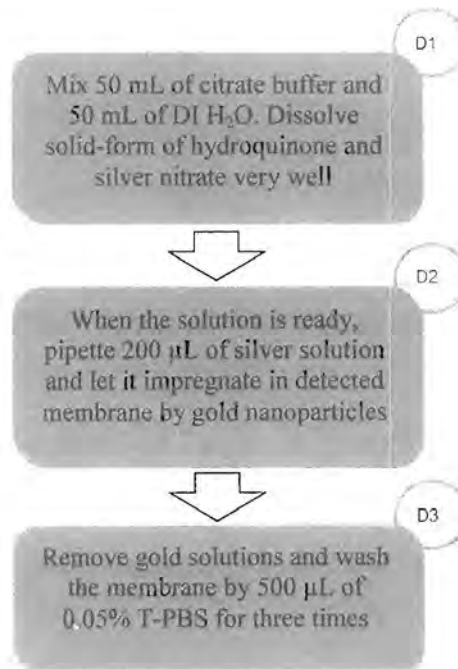
Step 3 - When the solution turn to be grey, pipette 200 μL of silver enhance solution and add to the nitrocellulose membrane where gold nanoparticles have already attached to antigen and the pink dot of gold nanoparticles is appearing.

Step 4 - Let the silver to impregnate in dark for a period of time.

Step 5 · Remove the silver solution and wash the membrane by 0.05% T-PBS solution for 3 times.

Step 6 · Observe the result on the membrane.

Figure 2.11: Usage of silver solution to enhance signal from gold nanoparticles



2.7 Detection of Leptospira in urine using anti-Leptospira-coated AuNPs

Recently, nanoparticle-based assay has been introduced as a tool for both disease therapy and laboratory diagnosis. The detection of Salmonella spp. Using antibody-coated gold nanoparticles and dielectrophoretic impedance measurement has been reported [17]. Here we demonstrate that Leptospira antibody-coated gold nanoparticles can be used for urine Leptospira detection as a model for using antibody-coated AuNPs for FUO diagnosis

2.7.1 Bacteria and antibody

The reference Leptospira interrogans serovar Bratislava was kindly provided by WHO/FAO/OIE Collaborating Centre for Reference & Research on Leptospirosis, Brisbane, Australia. Rabbit polyclonal antibody specific to Leptospira interrogans serovar Bratislava was purchased from Royal Tropical Institute, Amsterdam, Netherlands. Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Enterococcus faecalis were obtained from the Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital.

2.7.2 Preparation of gold nanoparticles

The 9-nm gold particle suspension was prepared according to Turkevich citrate reduction method. Briefly, 1ml of 12.7mM HAuCl₄ (Sigma, MO) was mixed with 49 ml deionized distilled water. The solution was then heated at 100 °C on the magnetic stirrer until boiling. 0.94 ml of 38.8mM sodium citrate was added until the color of gold suspension turned red. The solution was boiled for 5 min further, left to cool down at room temperature and kept for future use at 4 °C.

2.7.3 Preparation of Leptospira antibody-coated gold nanoparticles

Antibody-coated gold nanoparticles were prepared according to previous reports [19,20]. Briefly, the pH of gold nanoparticle solution was adjusted by adding 0.2 mol/L Na₂CO₃. Five microliters of antibody specific to Leptospira interrogans serovar Bratislava was incubated with 45 ml gold nanoparticle suspension at room temperature for 30 min. The mixture was then treated with 16.7ml of 10% bovine serum albumin (Sigma) at room temperature for 10 min and

washed with washing solution (1% bovine serum albumin, 0.1% NaN₃ in 0.02M sodium borate) by centrifugation at 25,000 \times g for 30 min. The pellet was resuspended in 50ml of washing solution. Antibodycoated gold particles can be kept at 4 \pm 8C for further use.

2.7.4. Detection of urine Leptospira by antibody-coated gold nanoparticles

Two hundred microliters of urine containing Leptospira was centrifuged at 20,000 \times g for 15 min at 4 \pm 8C. The sediment was resuspended in 20ml deionized distilled water and then mixed with 50ml antibody-coated nanoparticles. Agglutination of red gold particles indicates positive result.

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการทดลอง (Results and Discussions)

3.1 Characterization of metal nanoparticles

The metal nanoparticles were characterized by UV-Vis spectrophotometer and Transmission Electron Microscopy (TEM). A typical absorption spectrum of metal nanoparticles was shown in Figure 3.1. The plasmon wavelength maxima (λ_{max}) indicate the size of metal nanoparticles. The λ_{max} of gold and silver nanoparticles used in this research are approximately at 520 nm and 400 nm, respectively.

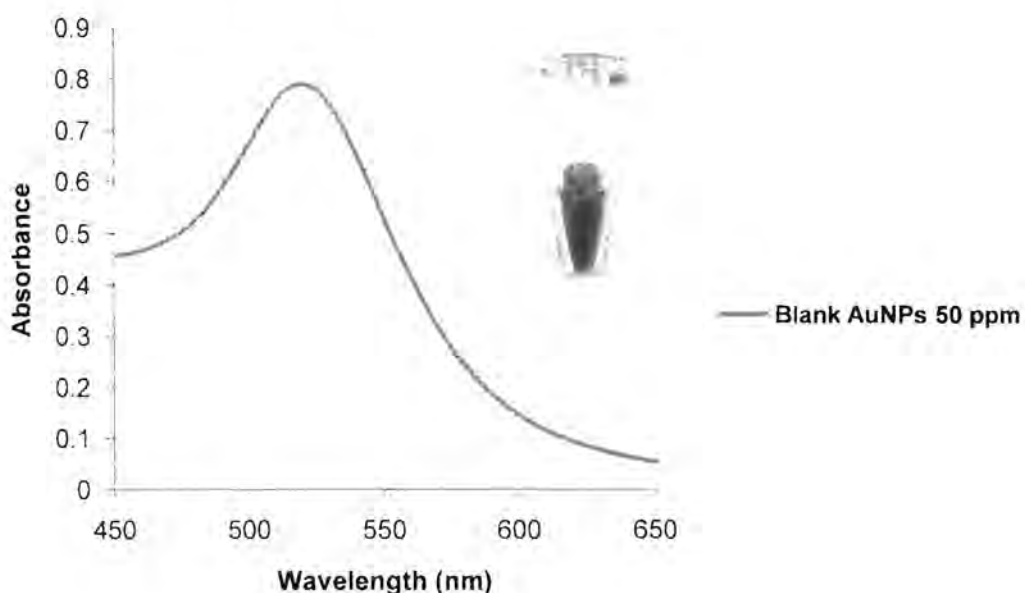


Figure 3.1 The characterization of AuNPs using spectrophotometer

These values of citrate-stabilized gold nanoparticles are similar with other different synthetic methods, reviewed by Daniel (25). The red shift in λ_{max} is associated with an increase in the mean size of the gold nanoparticles or modification in the surrounding media. Moreover,

any change in $\Delta\lambda$ indicates an aggregation of gold nanoparticles or modification in the surrounding media. The size and size distribution of metal nanoparticles are shown in Figure 3.1.

Further characterization of gold nanoparticles, a Transmission Electron Microscope (TEM) was used for determining the size and size distribution of citrate-stabilized gold nanoparticles. The size and size distribution of citrate-stabilized gold nanoparticles are shown in Figure 3.2. TEM images show that the diameter of spherical gold nanoparticles range from 10 to 15 nm with monodisperse size distribution.

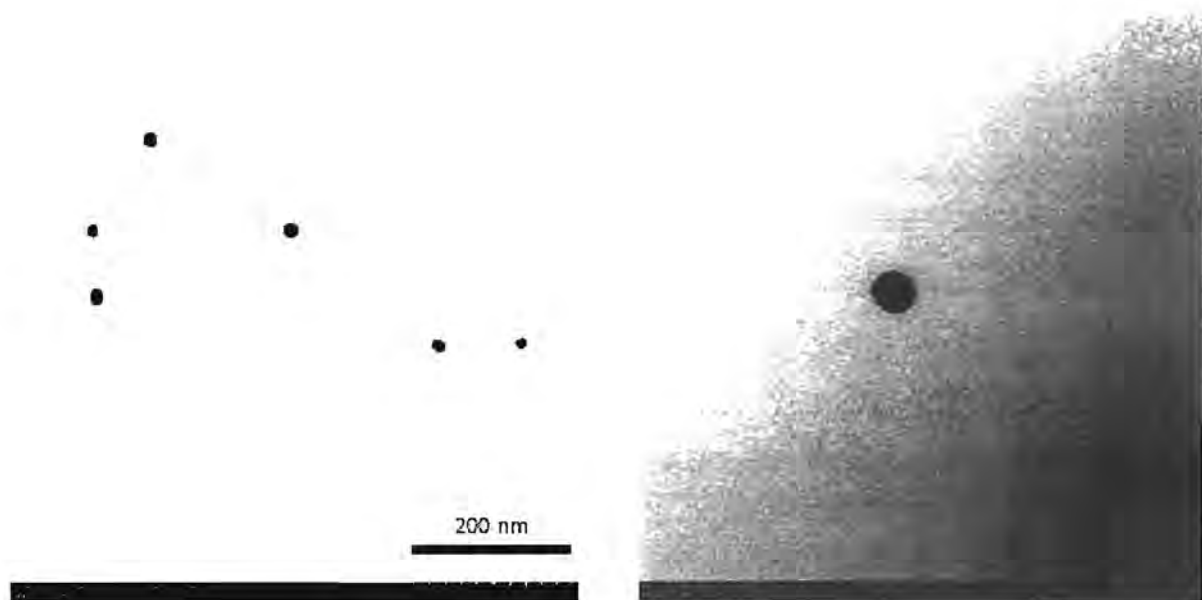


Figure 3.2 The characterization of metal nanoparticles using TEM. (A) Shows a spherical gold nanoparticles with diameter around ≈ 15 nm.

The size and shape of synthesized gold nanoparticles are similar to the citrate reduction of HAuCl_4 in water, which was introduced by Turkevitch (26). This method leads to 10-20 nm spherical gold nanoparticles with monodisperse size distribution.

The AuNPs were further tested by using zeta potential and zeta sizer instrument. The results are shown as below. 3.3 is value of zeta potential of gold nanoparticles. The result of zeta potential shows that the surface of gold nanoparticles has negative potential and the value is

equal to -44 mV. Figure 3.4 illustrates size distribution of gold nanoparticles colloid; average size of nanoparticles is equal to 15 nm in diameter.

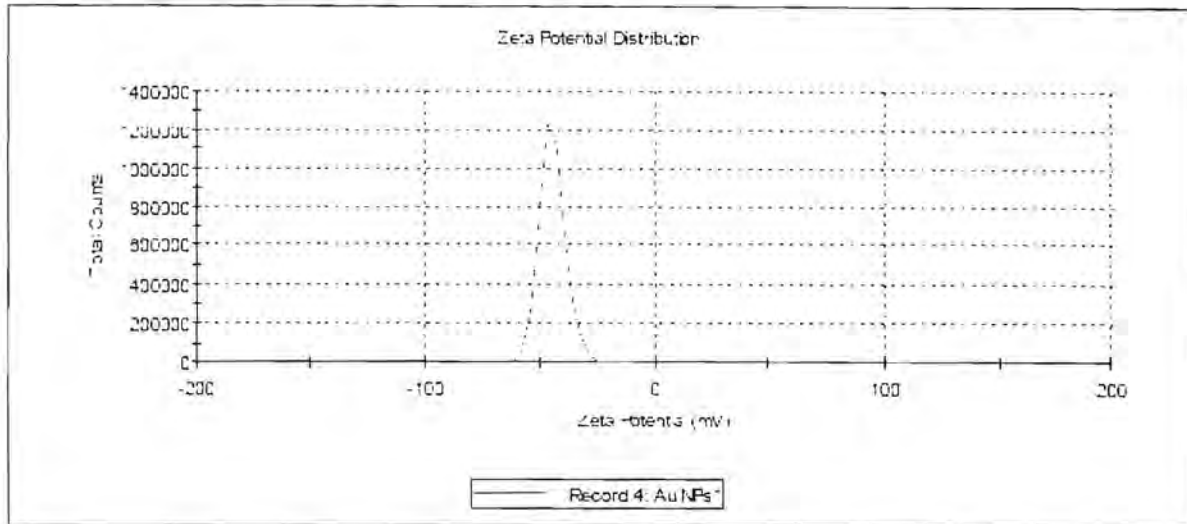


Figure 3.3 – Zeta potential of gold nanoparticles is measured by nanosizer. Zeta potential is around -44 mV.

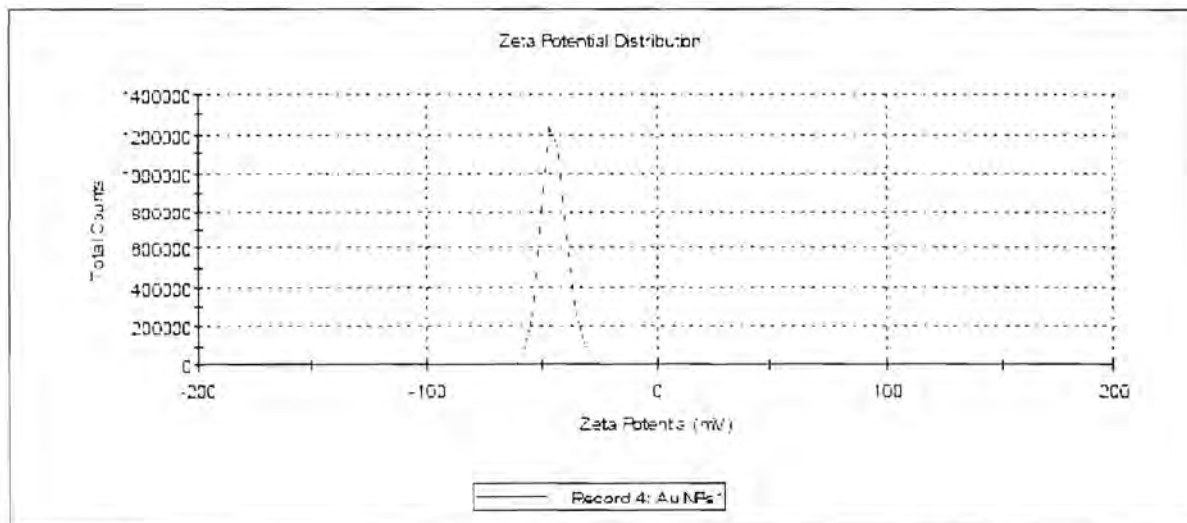


Figure 3.4 - Size distribution of gold nanoparticles is characterized by nanosizer. Maximum peak is about 15 nm in diameter

Citrate reduction has been found to be a very suitable method for gold nanoparticles synthesis. In this project, the synthesized gold nanoparticles have uniformly spherical shape. From TEM image, size of the nanoparticles is approximately 15 nm in diameter which is

confirmed again by result from nanosizer. This size and shape of gold nanoparticles are comparable to previous experiment from Kumar *et al* (2008) and it is appropriate to be used as sensing materials. For zeta potential of gold nanoparticles which is -44 mV, this negative potential is result of negative charge from citrate which is acting as stabilizer around the nanoparticles. From zeta potential result, it can refer that gold nanoparticles inside will has partial positive charge which is a proper potential for electrostatic conjugation of antibody onto gold nanoparticles.

3.2 Effects of gold nanoparticles on cell morphology

The cell morphology of HeLa cells in the presence of gold nanoparticles was investigated using Light Microscope (LM). After incubation of gold nanoparticles with various concentrations of citrate-stabilized gold nanoparticles, cell morphology of HeLa cells was observed and photographs were taken. Cell morphology of HeLa cells in gold nanoparticles treated groups was compared with negative and positive control groups, as shown in figure 3.5 and 3.6. In negative control groups, HeLa cells were cultured in the media for 1, 2 and 3 days, whereas positive control groups, HeLa cells were incubated with DMSO.

In the negative control, cells were able to continuously grow until the third day with increasing cell proliferation. The HeLa cells morphology is well spread and attach on the plate, as shown in figure 3.5.

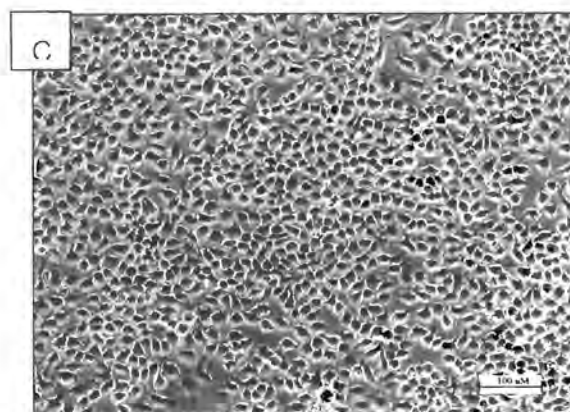
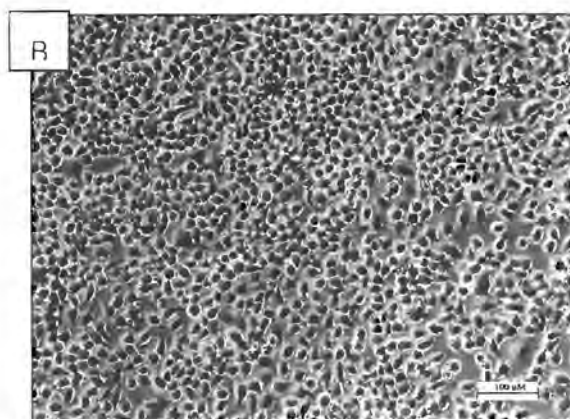
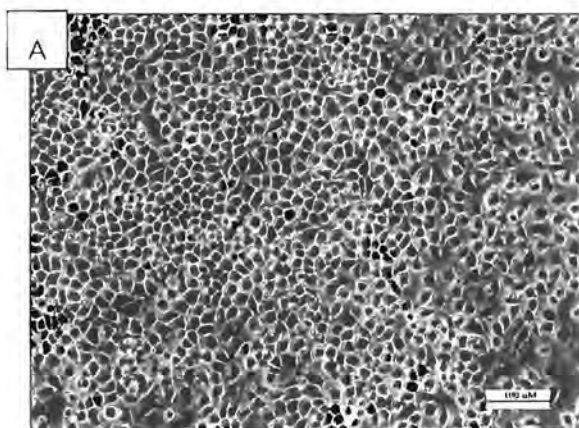


Figure 3.5 General cell morphology in negative control. The cultivation of HeLa cells alone for 1, 2 and 3 days (A-C).

HeLa cells morphology in positive groups is shown in figure 3.6. The decreasing cell proliferation and cell adhesion were obviously observed. These results indicated the characteristic of cell death.

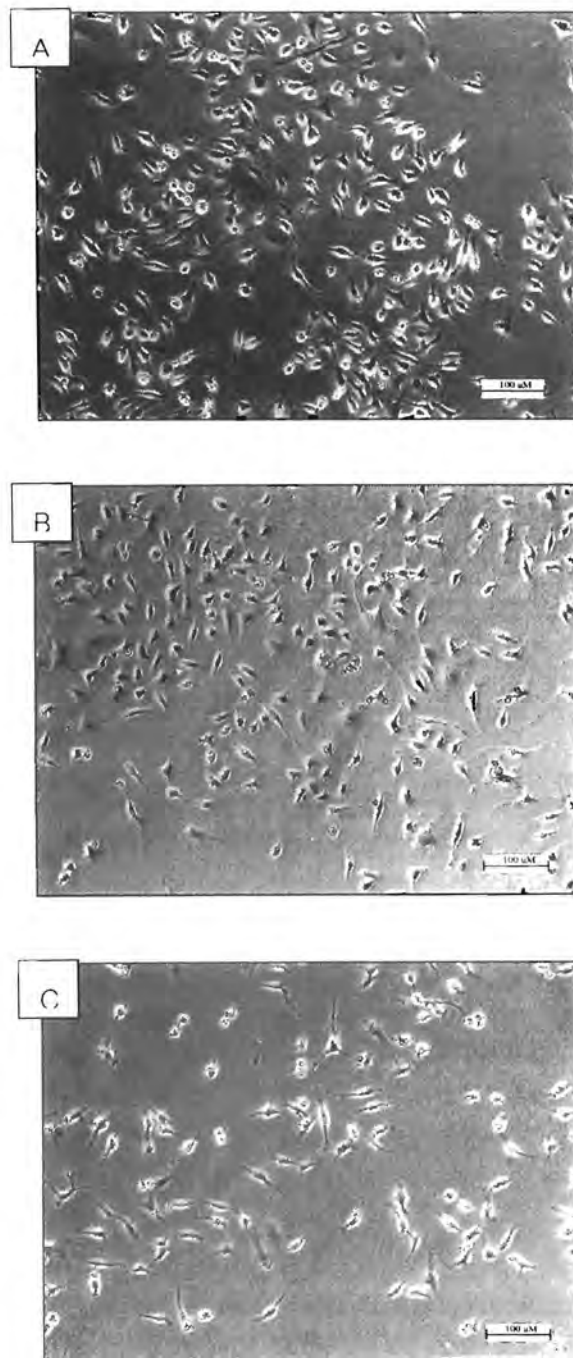


Figure 3.6 HeLa cells morphology in positive control. The incubation of HeLa cells with DMSO for 1, 2 and 3 days (A-C).

HeLa cells morphology in the presence of citrate is shown in figure 3.7, there was no distinct change in morphology could be observed.

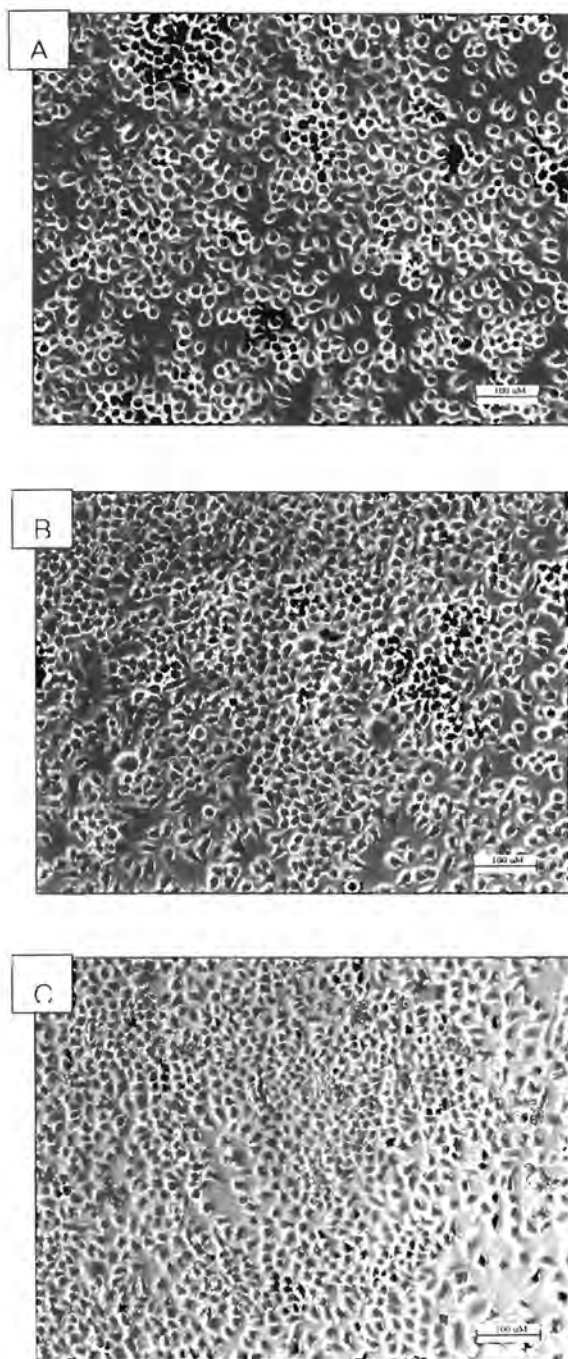


Figure 3.7 HeLa cells morphology in the presence of citrate. The incubation of HeLa cells with citrate for 1, 2 and 3 days (A-C).

HeLa cells morphology in the presence of 10 ug/mL gold nanoparticles is shown in figure 3.8, morphological changes were not observed after incubation for 1, 2 and 3 days.

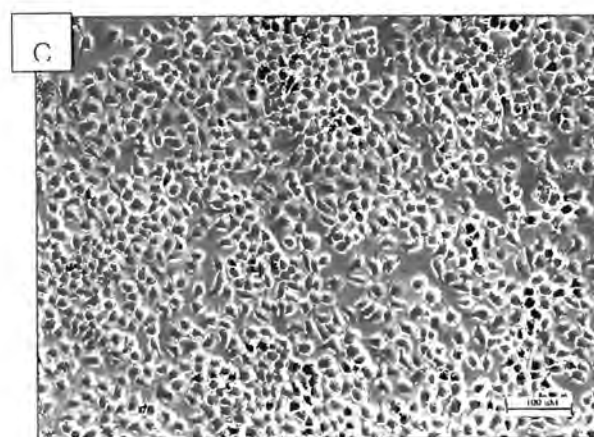
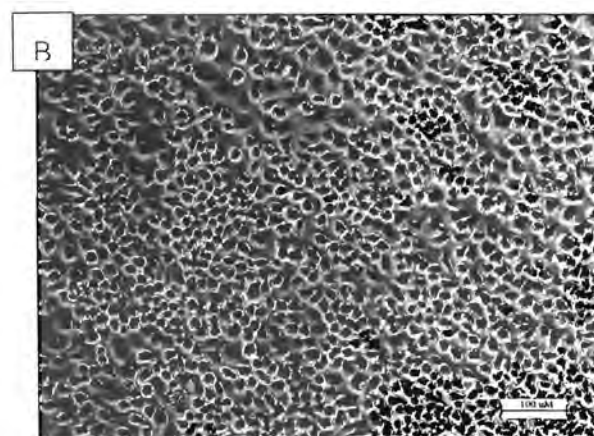
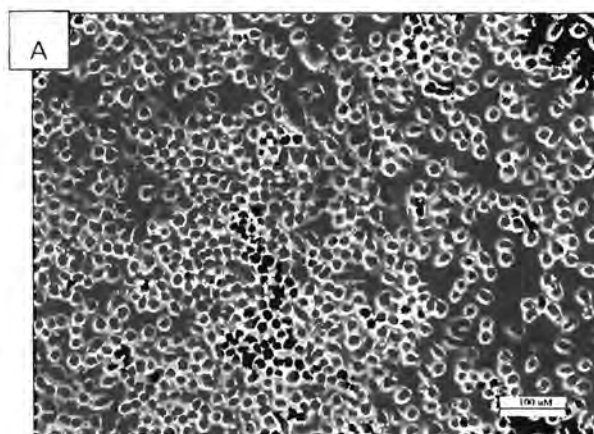


Figure 3.8 HeLa cells morphology in the presence of 10 ug/mL gold nanoparticles. The incubation of HeLa cells with 10 ug/mL gold nanoparticles for 1, 2 and 3 days (A-C).

HeLa cells morphology in the presence of 50 ug/mL gold nanoparticles is shown in figure 3.9, morphological changes were not found.

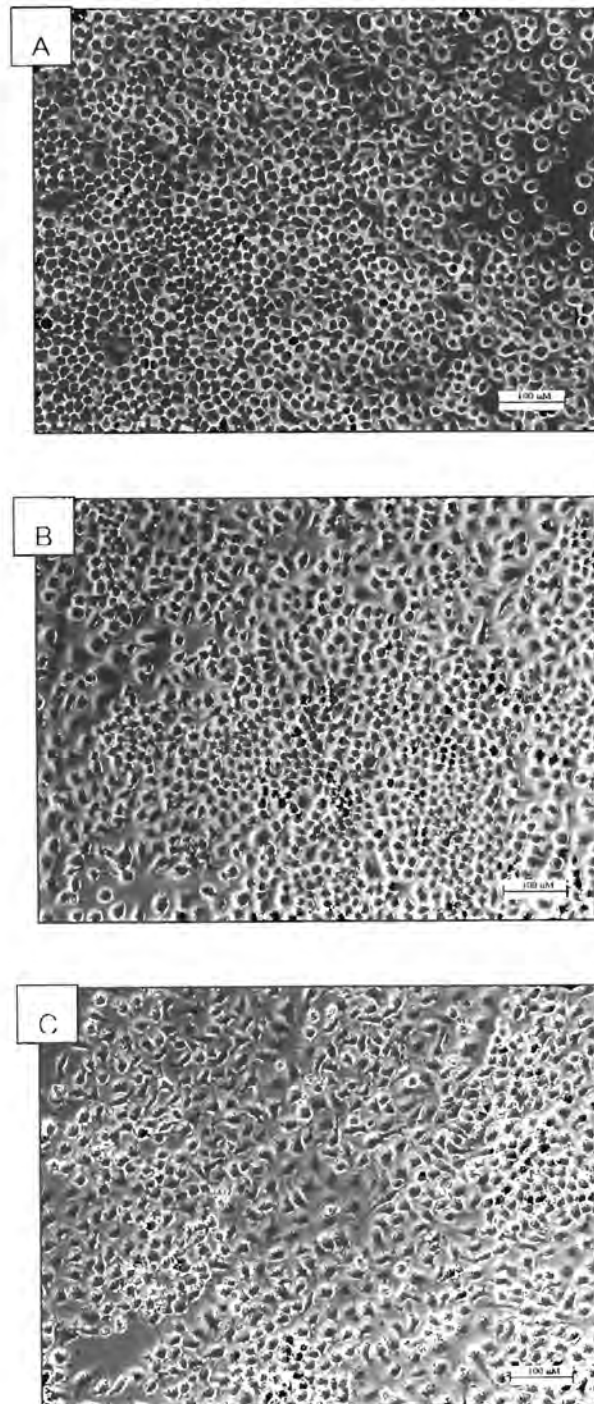


Figure 3.9 HeLa cells morphology in the presence of 50 ug/mL gold nanoparticles. The incubation of HeLa cells with 50 ug/mL gold nanoparticles for 1, 2 and 3 days (A-C).

HeLa cells morphology in the presence of 100 ug/mL gold nanoparticles is shown in figure 3.10, morphological changes were observed. The cells become shrink and irregular after third day incubation with gold nanoparticles.

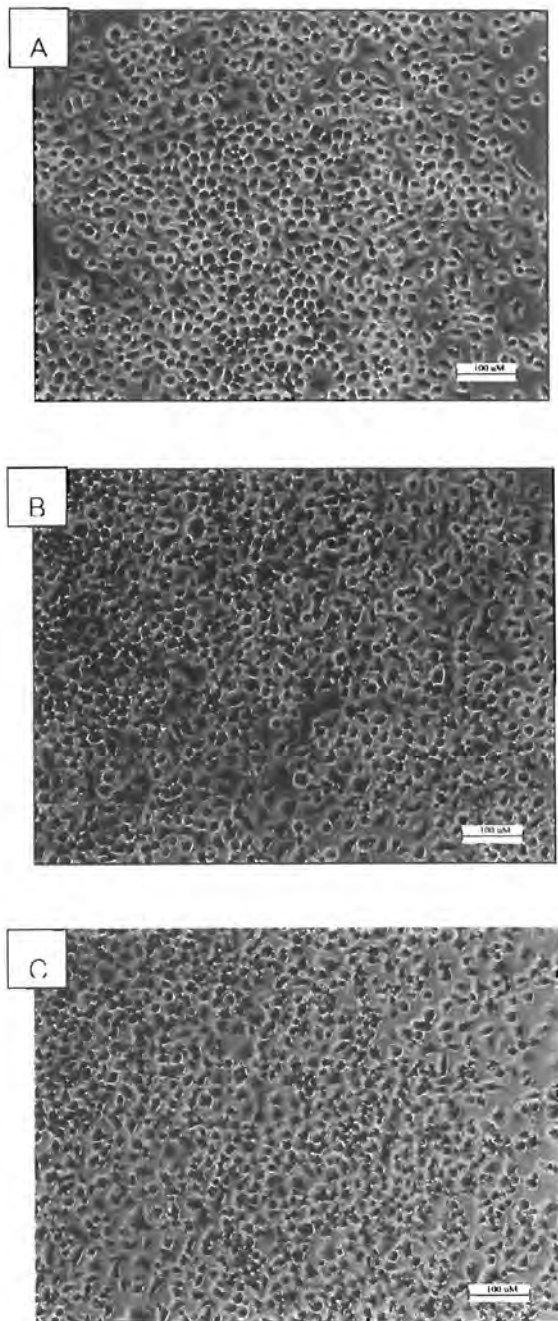


Figure 3.10 HeLa cells morphology in the exposure to 100 ug/mL gold nanoparticles. The incubation of HeLa cells with 100 ug/mL gold nanoparticles for 1, 2 and 3 days (A-C).

These experiments show that the cells were well spread and there was no distinct change in morphology after the incubation with 10 and 50 ug/mL of gold nanoparticles relative to untreated cells. However, dramatic changes occurred with 100 ug/mL gold nanoparticles treated group in the third day. The cells become irregular, contract and detach. Thus, 100 ug/mL gold nanoparticles is considered as the toxic concentration for cells. It could be concluded that the dramatic changes induced by an increasing gold nanoparticles concentration and incubation time. This information should be considered for further in vivo application of gold nanoparticles.

These findings are in agreement with Pernodet (35) who reported the dose-dependent cytotoxicity. The contracted fibroblast cells and decreasing cell proliferation were observed. They suggested that cytoskeleton is affected in the presence of citrate-stabilized gold nanoparticles.

3.3 In Vitro Cytotoxicity and intra-cellular localization

The effect of various concentrations of citrate-stabilized gold nanoparticles on HeLa cell viability was examined using MTT assay. After 1, 2 and 3 days incubation, no effect on 10 and 50 ug/mL gold nanoparticles treated groups could be observed. In contrast, the 100 ug/mL gold nanoparticles treated groups in the third day exhibited significantly toxicity. These results were compared to the control groups, as shown in figure 19. Moreover, the survival of the HeLa cells also decreased in the presence of citrate. The results show that 10 and 50 ug/mL concentration of gold nanoparticles exhibit non-toxic, except the concentrations of 100 ug/mL. It was observed that cell viability following exposure to gold nanoparticles was dependent on concentration and time incubation.

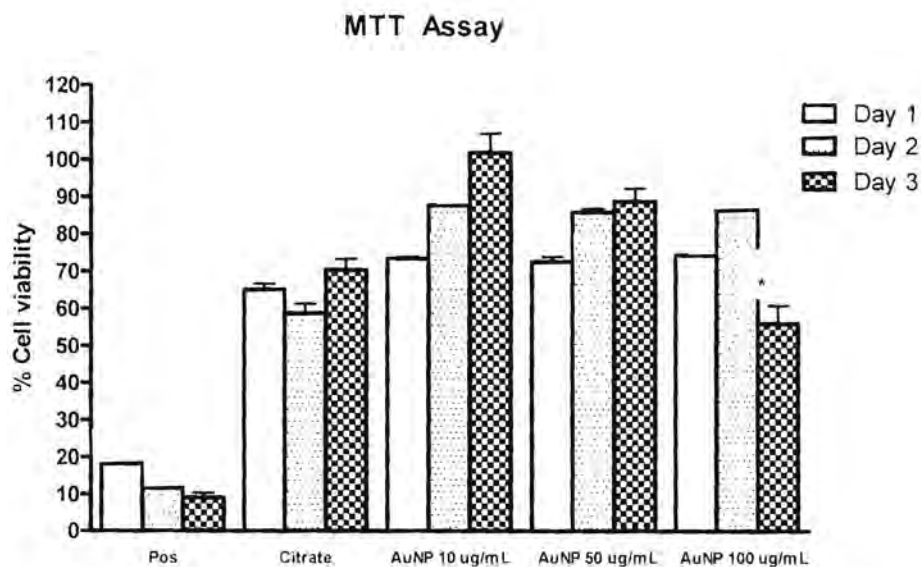


Figure 3.11 The influence of gold nanoparticles on cell viability. HeLa cells were exposed to DMSO, citrate and 10, 50, 100 ug/mL gold nanoparticles for 1, 2 and 3 days. The values reported in this graphs are the average of triplicate samples. Vertical lines denote \pm 1SD (n=3). Significant of differences between dose and time: *, p-value<0.05).

Gold nanoparticles at the concentration of 10 and 50 ug/mL do not affect on HeLa cells, whereas 100 ug/mL gold nanoparticles exhibit cytotoxicity. These findings are in agreement with many recent previous results which reported that increasing concentration lead to increase in cytotoxicity. Our results implied that longer than 3 days incubation with 100 ug/mL gold nanoparticles can further decrease cell viability. Interestingly the HeLa cell showed greater sensitivity to 9.7 mM trisodium citrate than gold nanoparticles, which suggests that surface modification can generate cytotoxicity on HeLa cells. However, in the case of Connor(15) and Khan(16) and Tkachenko(32), they found that there are no significant differences in viability levels for gold nanoparticles at various concentrations, times and cell lines.

Localization of gold nanoparticles

The fate and localization of gold nanoparticles were investigated using TEM. Moreover, the influence of gold nanoparticles on morphological intracellular organelles was also examined. It was found that gold nanoparticles were readily taken up by the HeLa cells and ended up in the endosome, as shown in Figure 3.12.

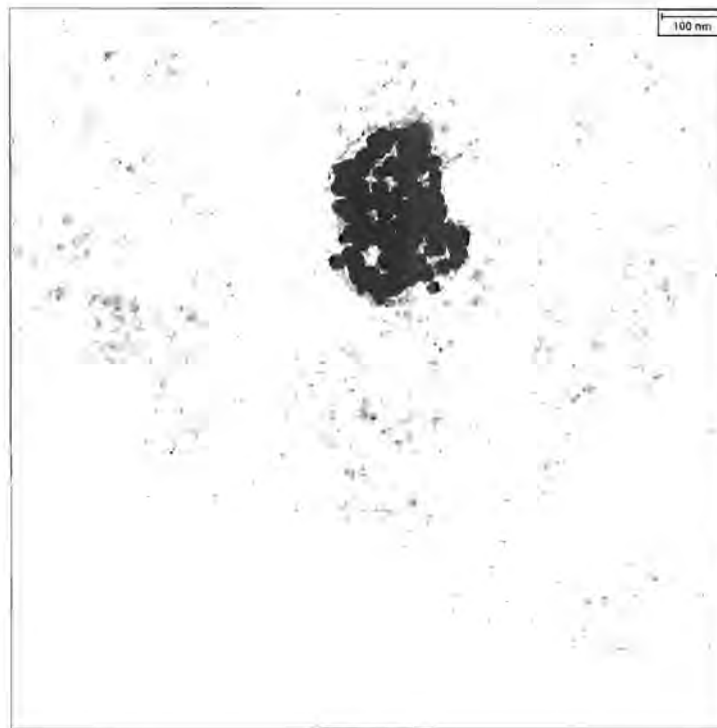


Figure 3.12 Cellular uptake of 10-15 nm gold nanoparticles via the endocytosis.

Inside the cell, most of gold nanoparticles are found in the endosomes, but gold nanoparticles are also observed freely dispersed in the cytosol. In addition, gold nanoparticles were aggregated close to but not in the mitochondria or nucleus, as illustrated in Figure 3.13. The results demonstrate that gold nanoparticles are indeed in the cytosol.

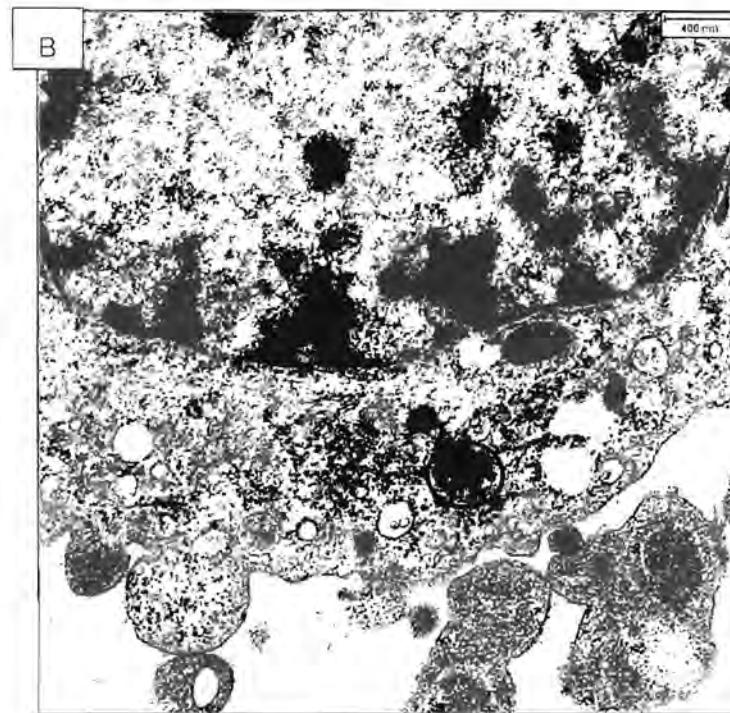
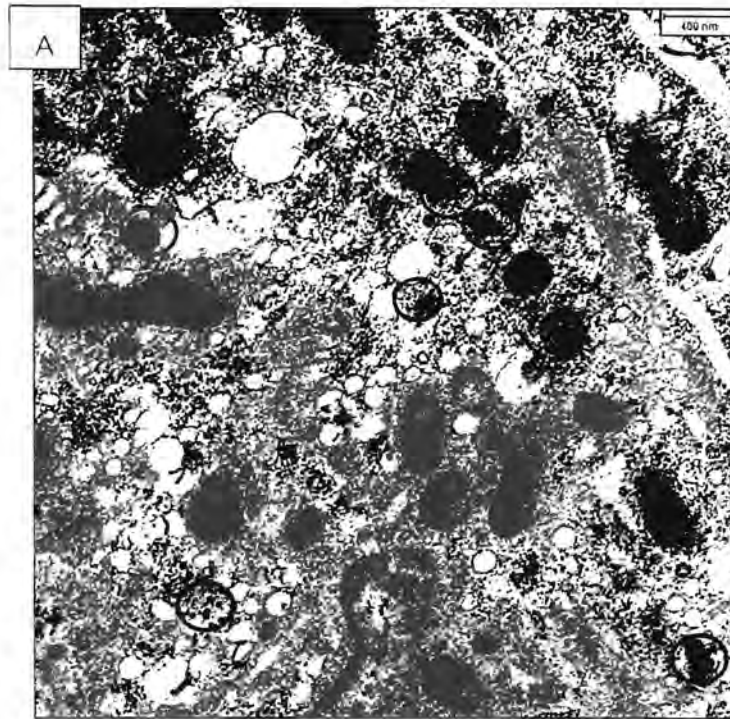


Figure 3.13 Internalization of gold nanoparticles. Fig A demonstrates that gold nanoparticles were freely dispersed in the cytosol. Fig B shows gold nanoparticles were aggregated close to but not in the mitochondria or nucleus.

The results of cells exposed to gold nanoparticles showed that nucleus, mitochondria and ER were not affected morphologically (figure 3.14).

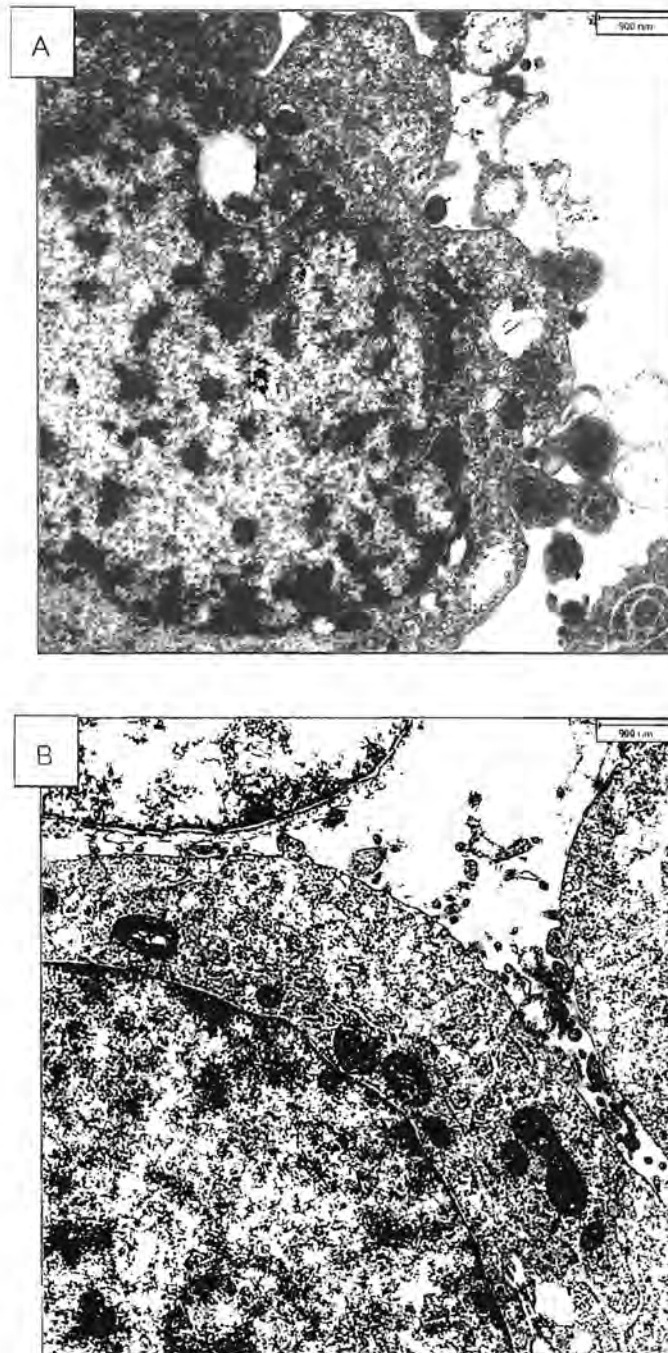


Figure 3.14 Intracellular organelles morphology. Fig A shows the nuclei, mitochondria and ER were not altered in the exposure to gold nanoparticles. Fig B indicates the general morphology of intracellular organelles.

Finally, gold nanoparticles cannot penetrate nuclear membranes and attach to DNA consequently; gold nanoparticles can not cause toxicity. These findings confirm the nontoxic nature of gold nanoparticles, which enter the cells but do not affect nucleus, mitochondria and ER. Cellular uptake of gold nanoparticles is similar to previous studies. Connor *et al.* report 18 nm citrate-stabilized gold nanoparticles are taken up by K562 cells but do not cause cytotoxicity after 24 hours incubation(15). Moreover, Khan *et al.* reported 18 nm gold nanoparticles (2 nM) were trapped in vesicles and internalized inside HeLa cells after 6 hours incubation. Even after a longer incubation time, the nanoparticles did not enter the nucleus. They localized within the cytoplasm, but were not closely associated with organelles.

3.4 Aggregation of metal nanoparticles

Effect of buffer on aggregation

Due to the charge screening effect, addition of buffer or electrolyte into a solution containing metal nanoparticles resulted in a decreasing of interparticle distance and caused nanoparticles aggregation. The more electrolytes added, the more aggregation can be observed. Therefore, to make the most efficient stabilization, buffer in hybridization step should not cause aggregation of metal nanoparticles. The effect of different buffer quantity in aggregation of MNPs was shown in figure 3.15

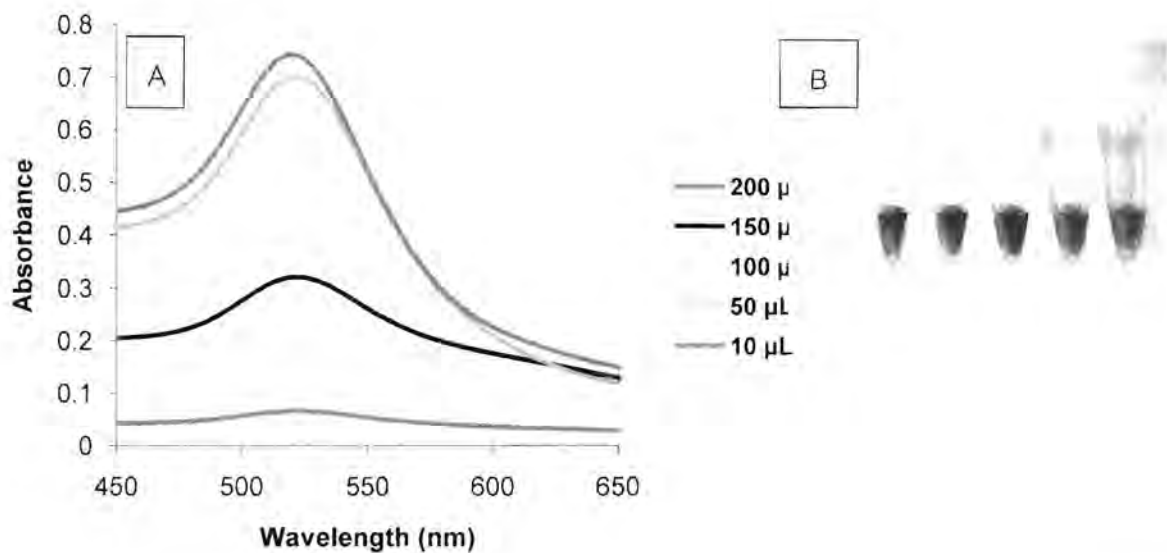


Figure 3.15 The effect of different amount of buffer to the aggregation of AuNPs. (A) UV-vis spectra of unmodified AuNPs mixing with buffer. (B) the colour changing after adding buffer, 10, 50, 100, 150 and 200 μL , from left to right, respectively.

The decreasing in absorbance at λ_{max} and a concomitant red shift in the nanoparticles plasmon band indicated an aggregation of metal nanoparticles. When high amount of buffer was added into a solution of metal nanoparticles, the nanoparticles aggregated and the solution colour turned from red to blue in AuNPs solution

According to the experiment, if the buffer used in hybridization was over 100 μL , the colour changing in aggregation can be observed with naked eye and the decreasing of absorbance at λ_{max} of nanoparticles can also be detected. While in 10-50 μL of buffer, less aggregation can be observed and the colour changing of solution cannot be detected with the naked eye. Thus, the amount of buffer using in the hybridization process should not reach 50 μL .

Effect of salt on aggregation

The addition of NaCl into solution increased total ionic charge in solution as in the addition of buffer. Thus, the result was similar. The higher amount of salt added, the more aggregation can be observed. UV-vis spectra of mixture were shown in figure 3.16

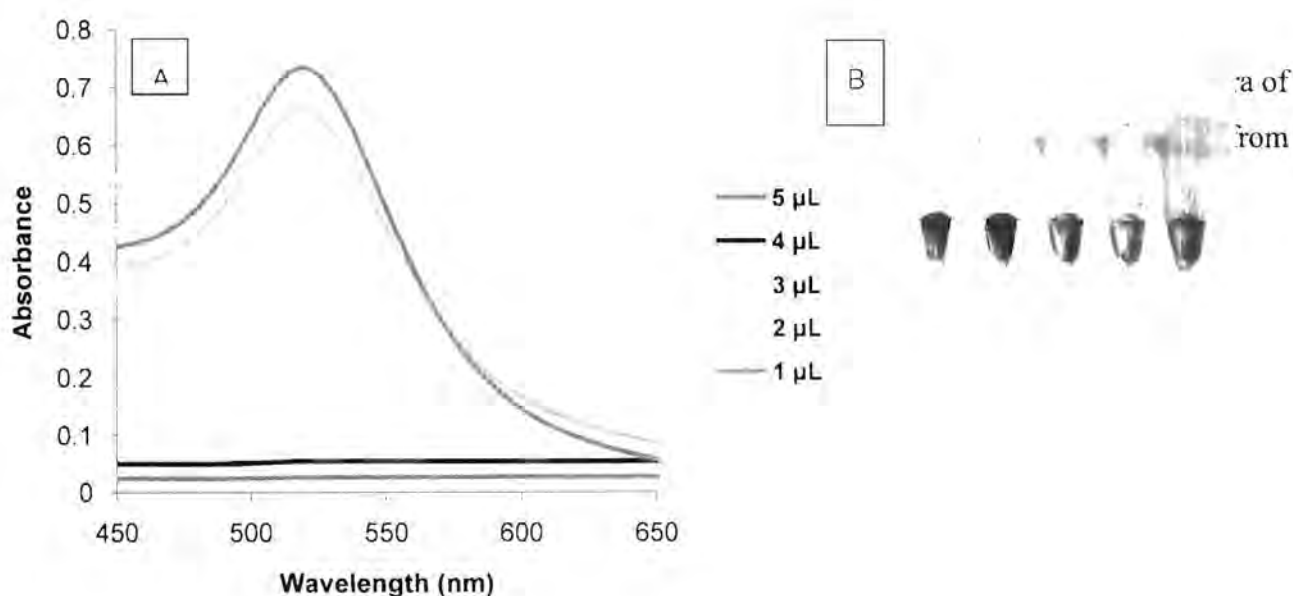


Figure 3.16 The effect of different amount of NaCl to the aggregation of AuNPs. (A) UV-vis spectra of unmodified AuNPs mixing with NaCl. (B) the colour changing after adding 2M NaCl, 1, 2, 3, 4 and 5 μL , from left to right, respectively

UV-vis spectra showed that aggregation, which was caused by charge screening effects, suppressed the absorption intensity. This is a slow process and the size of nanoparticle gradually growing bigger. The small red shift of the λ_{max} indicated that the size of nanoparticles

was slightly increased. Moreover the band width of absorption was barely changed. This indicated that size distribution remained constant.

The minimum amount of salt that caused significant changing of absorption spectra was about 3-4 μL . The following experiments used this optimum volume of salt solution.

Effect of DNA on aggregation

Metal nanoparticles in solution are typically stabilized by adsorbed negative ions (e.g. citrate ion) or molecule containing lone pair electron which cause negative charge on the surface. Repulsion from negative charge prevents van der Waals attraction among metal nanoparticles and thus prevents aggregation. Although the ssDNA has negative charges on the backbone causing electrostatic repulsion to the nanoparticles surface, the ssDNA is flexible and partially uncoil its structure. Under these conditions, the negative charge on the backbone is able to avert from metal nanoparticles to avoid repulsion. On the other hand, attractive van der Waals forces between the bases of ssDNA and the metal nanoparticles causes stronger ssDNA to metal interaction. The effect of DNA on AuNPs aggregation was shown in figure 3.17 (mixture1) and 3.18 (mixture2).

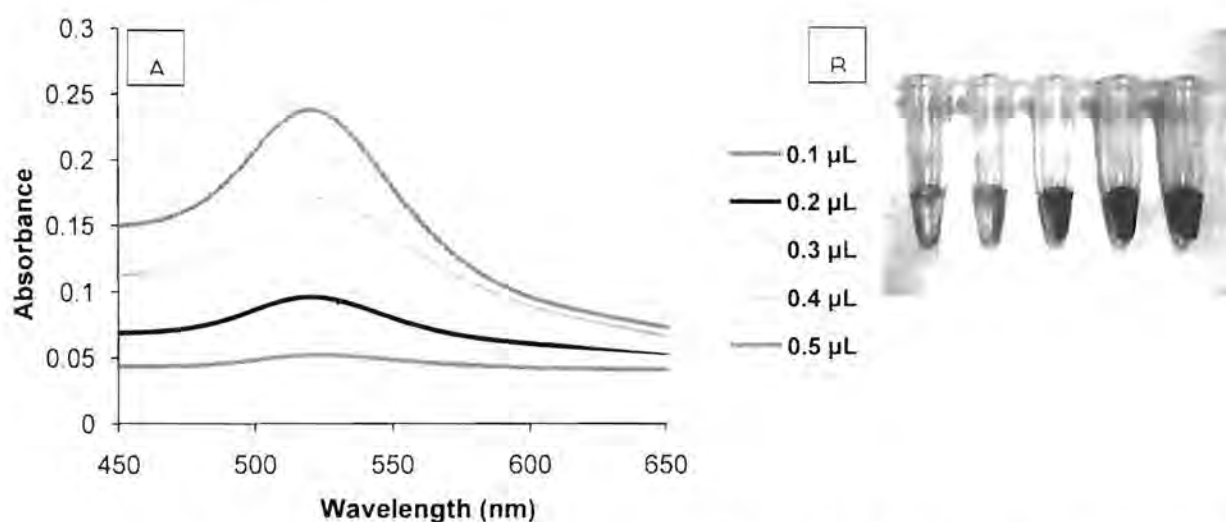


Figure 3.17 The effect of different amount of mixture1 to the aggregation of AuNPs. (A) UV-vis spectra of unmodified AuNPs stabilized by mixture1 after mixing with NaCl. (B) the colour changing of AuNPs solution stabilized by 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 μL mixture1, from left to right, respectively.

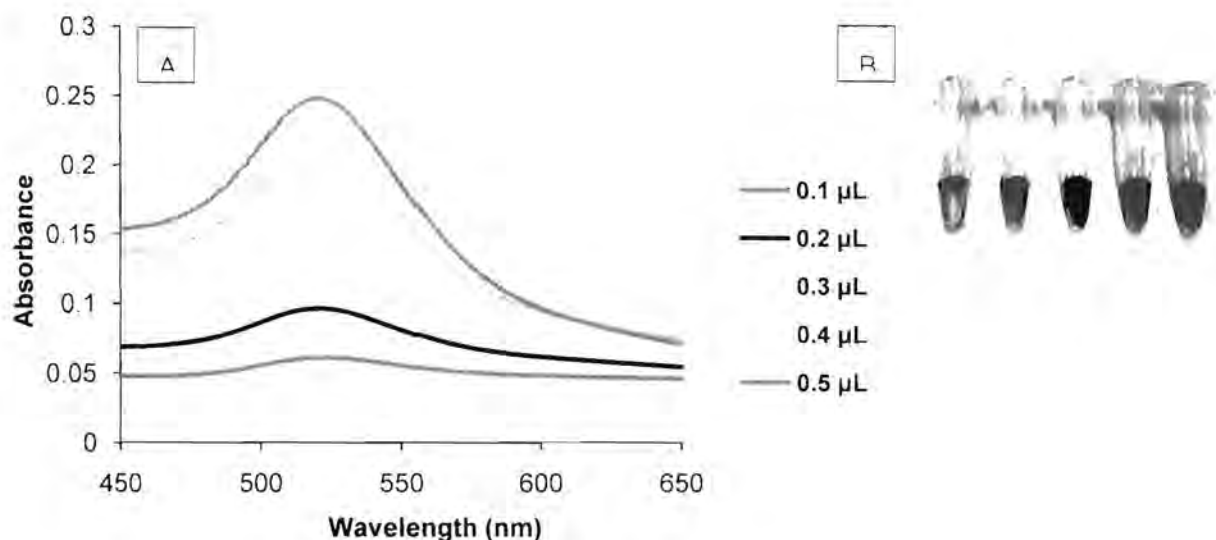


Figure 3.18 The effect of different amount of mixture2 to the aggregation of AuNPs. (A) UV-vis spectra of unmodified AuNPs stabilized by mixture2 after mixing with NaCl. (B) the colour changing of AuNPs solution stabilized by 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 μL mixture2, from left to right, respectively.

According to the experiment, at an equal amount of mixture1 and mixture2 used to stabilize metal nanoparticles, the measured absorption intensity values were varied. The absorbance of MNPs/mixture2 mixture was higher than that of MNPs/mixture1 mixture. It indicated that the metal nanoparticles stabilization efficiency of mixture2 is higher than mixture1. Since mixture2 sequence contain more adenine base. Among four nucleobases, Adenine exhibits stronger base stacking due to its high aromaticity. Thus it promoted uncoil of DNA and caused adsorption faster and more efficiently than mixture1.

Although the colour of solution was depended on the amount of ssDNA, the addition of excess ssDNA cannot improve stability because the limited amount of nanosurface. As in AgNPs aggregation, more than 2 μL of DNA was over excess and causes insignificantly changing in colour of solution. On the other hand, solutions with only a few ssDNA had distinctly different in absorption spectra and colloid colour.

In contrast, dsDNA has different electrostatic properties due to the double-helix geometry that always turn the negatively charged phosphate backbone out. Therefore, repulsion between the charged phosphate backbone of dsDNA and the negative charge of stabilizer

dominated the electrostatic interaction between the metal nanoparticles and dsDNA. As a consequence, dsDNA is not adsorbed onto the nanoparticles surface. The result of dsDNA stabilized metal nanoparticles was shown in figure 3.19

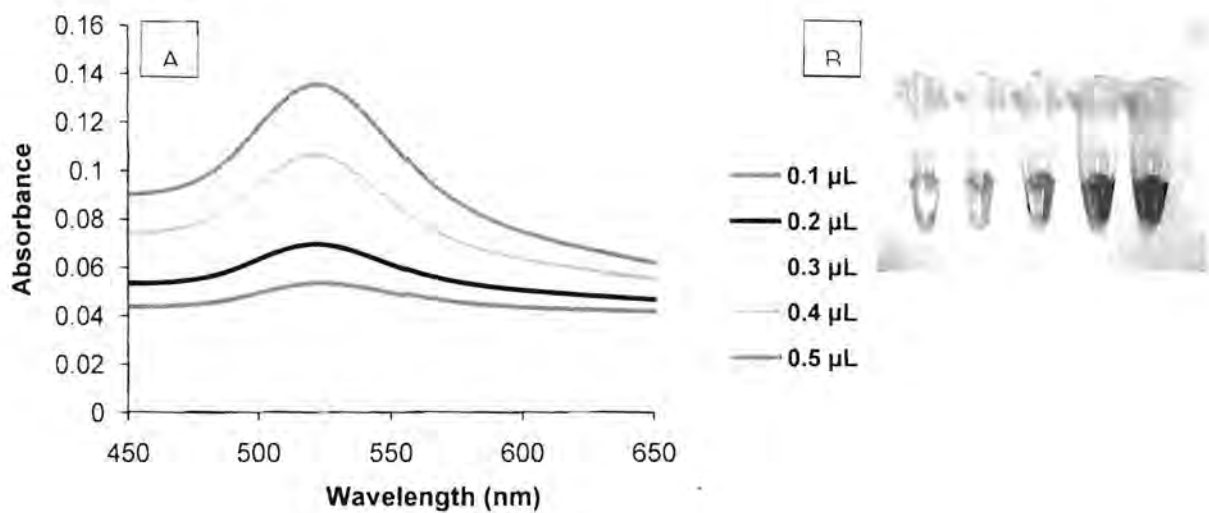


Figure 3.19 The effect of different amount of mixture3 to the aggregation of AuNPs. (A) UV-vis spectra of unmodified AuNPs stabilized by mixture3 after mixing with NaCl. (B) the colour changing of AuNPs solution stabilized by 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 μL mixture3, from left to right, respectively.

With the increasing of mixture3, absorbance intensity was also increased though dsDNA cannot stabilize the MNPs, because hybridization was a reversible process and some of ssDNA still remained which able to stabilize metal nanoparticles.

The Experiment condition that make the aggregation of metal nanoparticles stabilized by mixture1-3 clearly detected with naked eye was shown in figure 3.20

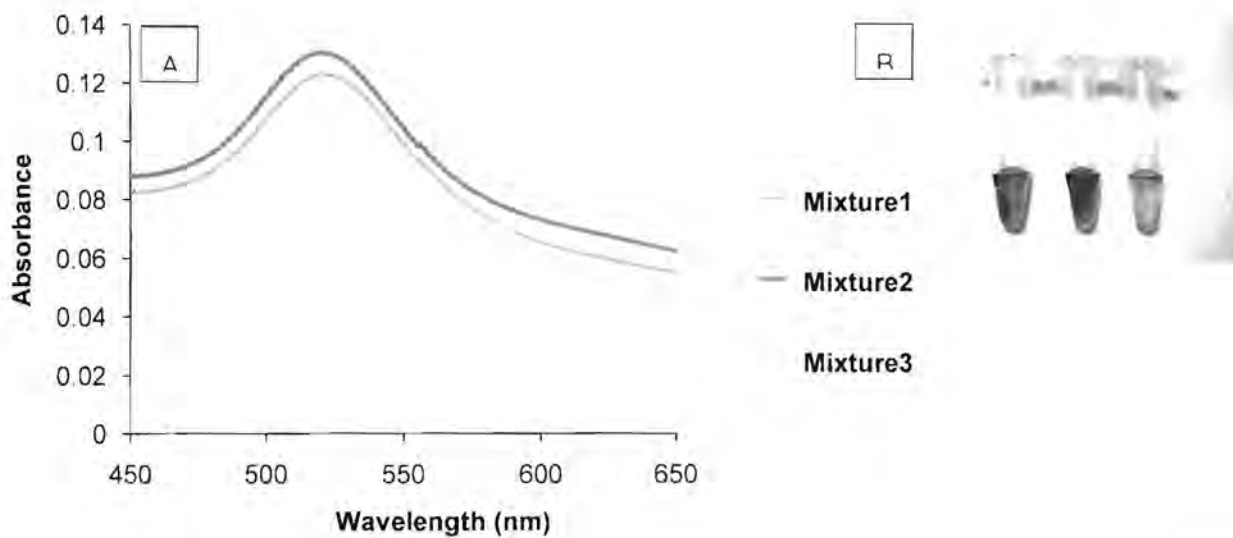


Figure 3.20 Comparison of effect of mixture1-3 on the aggregation of AuNPs. (A) The UV-vis spectra and (B) the colour changing of unmodified AuNPs stabilized by 0.3 μL mixture1-3 from left to right, respectively.

Colorimetric detection of non-complementary DNA, complementary DNA and 1-mismatched complementary DNA

Non-complementary DNA is the mixture between two non-hybridizable ssDNA. It can be absorbed onto the metal nanoparticles and thus stabilizes the MNPs against the aggregation from the induction of ionic salts. Solutions with adequate quantities of non-complementary DNA prevent aggregation, whereas solutions with complementary DNA (dsDNA) do not affect the aggregation. The comparison between non-complementary DNA and complementary DNA stabilized metal nanoparticles was shown in figure 3.21

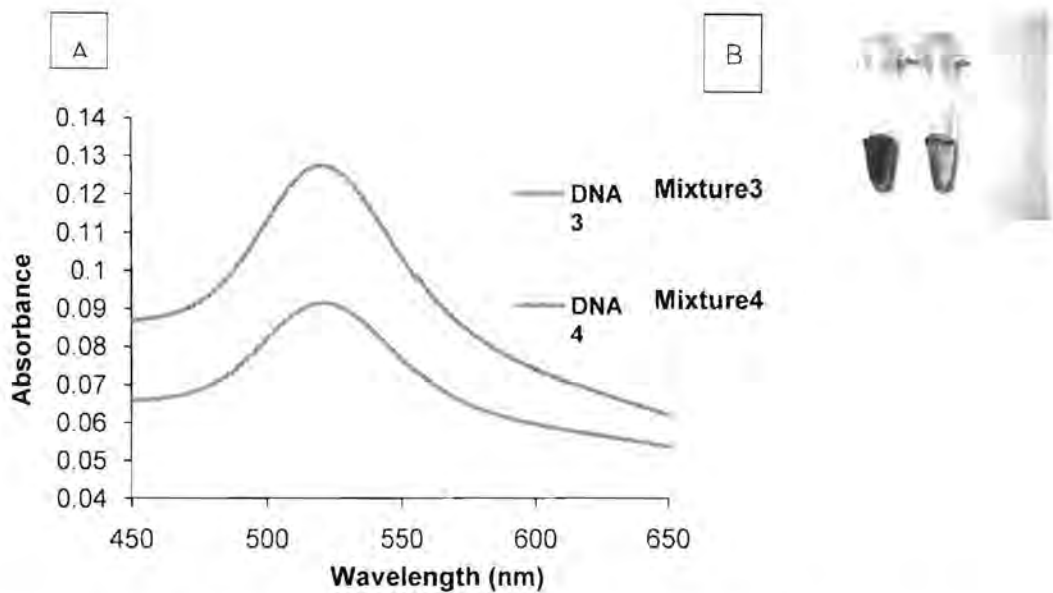


Figure 3.21 Comparison between non-complementary DNA (mixture4) and complementary DNA (mixture3) on DNA stabilization. (A) The UV-vis spectra and (B) the colour changing of unmodified AuNPs stabilized by mixture4 (left eppendorf) and mixture3 (right eppendorf).

Typically, 1-mismatched complementary DNA containing a few base pairs always has lower melting temperature than a perfect complementary DNA for 6-7 °C. Thus, a solution of 1-mismatched complementary DNA contains higher number of ssDNA than those in a perfect matched DNA. As a consequence, 1-mismatched complementary DNA is a better stabilizer for metal nanoparticles than a perfect matched DNA but not as a non-complementary DNA. The comparison between 1-mismatched complementary DNA and complementary DNA stabilized metal nanoparticles was shown in figure 3.22

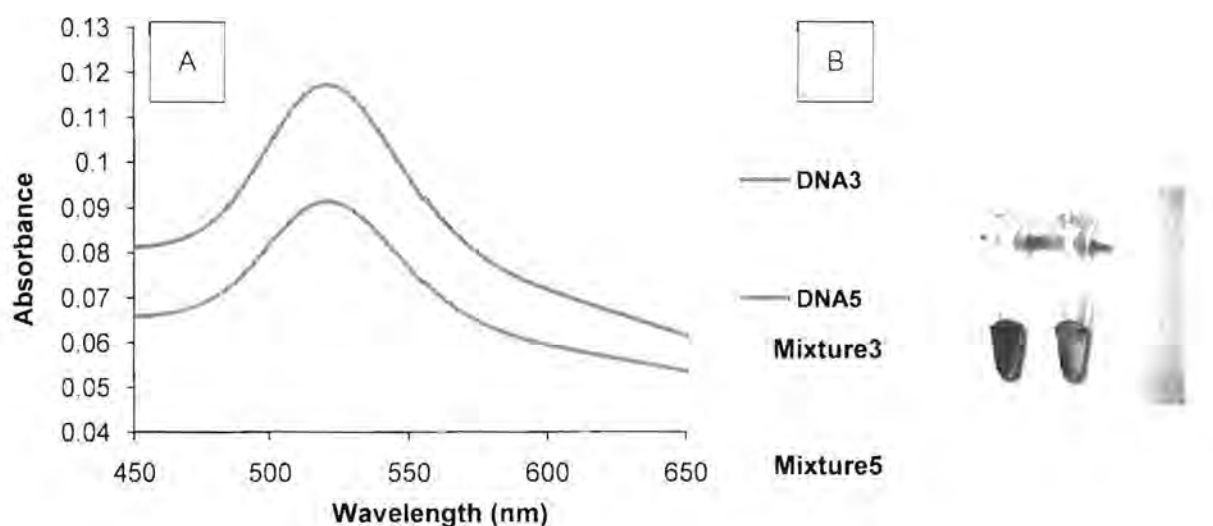


Figure 3.22 Comparison between 1-mismatched complementary DNA (mixture5) and complementary DNA (mixture3) stabilized AuNPs. (A) The UV-vis spectra and (B) the colour changing of unmodified AuNPs stabilized by mixture5 (left eppendorf) and mixture3 (right eppendorf).

3.5 Optimization of influencing parameters for fabrication of gold nanoparticle-based nucleic acid lateral flow strip test

The basic principle of AuNPs-based NALF detection system involves the design of thiol-modified specific oligonucleotide probes on AuNPs. If there are complementary targets that can form sandwich hybridization with both thiolated probes on AuNPs and another target-specific probes on test line of the NALF test strip, the functionalized-AuNPs will accumulate at the test line revealing a distinct red color. Previous study reported the utilization of NALF to detect human genomic DNA samples without PCR amplification. Their research group found that the AuNPs based-NALF assay on a test strip had enabled naked eye detection of the target DNA with a very high sensitivity.

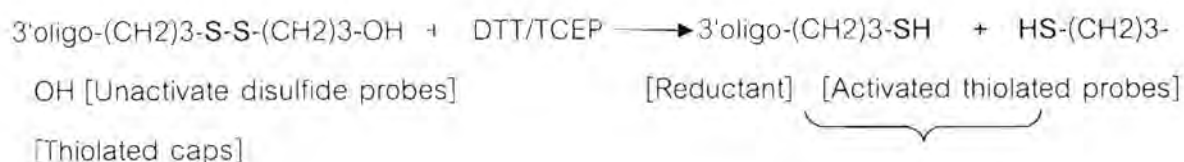
Nonetheless, sensitivity and specificity of the test strip depend on the target-probe hybridization process. The stringency of a buffer system is one of the key determinants of the test result. Changes in ionic concentration in the buffer system can cause AuNPs aggregations and non-specific binding of the nucleic acids. Here in this study, we aimed to improve the processes of AuNPs- thiolated DNA probes conjugation

3.5.1 Effect of reductants on conjugation efficiency

Results from Table 3.1 indicate that all of the DTT-treated groups had % probe loss lower than those from the TCEP-treated groups. Although the use of TCEP has many advantages, our study revealed that DTT- treated groups have higher conjugation efficiency. The purification of DTT-treated probes with the NAP-5 column removes the thiolated protecting caps which may otherwise compete with the activated thiolated probes for the covalent adsorption on the AuNPs surface as shown below.

Experimental conditions				Results	
Amount of thiolated probes* (nmole)	100 ppm AuNPs (μl)	Type of reductants	Sonication	% Probe loss	Average half-life** (min) (n=2)
1.6	400	DTT	Yes	86.72	16
1.6	400	DTT	No	84.80	8.75
1.6	400	TCEP	Yes	97.45	11.25
1.6	400	TCEP	No	98.08	7.5
0.8	200	-	Yes	68.80	N/A
0.8	200	-	No	70.59	7.5

Table 3.1. Experimental protocols studying the effects of reductants and sonication on the conjugation of thiolated probes and AuNPs. (* The thiolated probes used in this experiment step is probe#1., ** Half-life : The time duration taken for half of complete AuNPs aggregation)



"Competitive absorption on Au

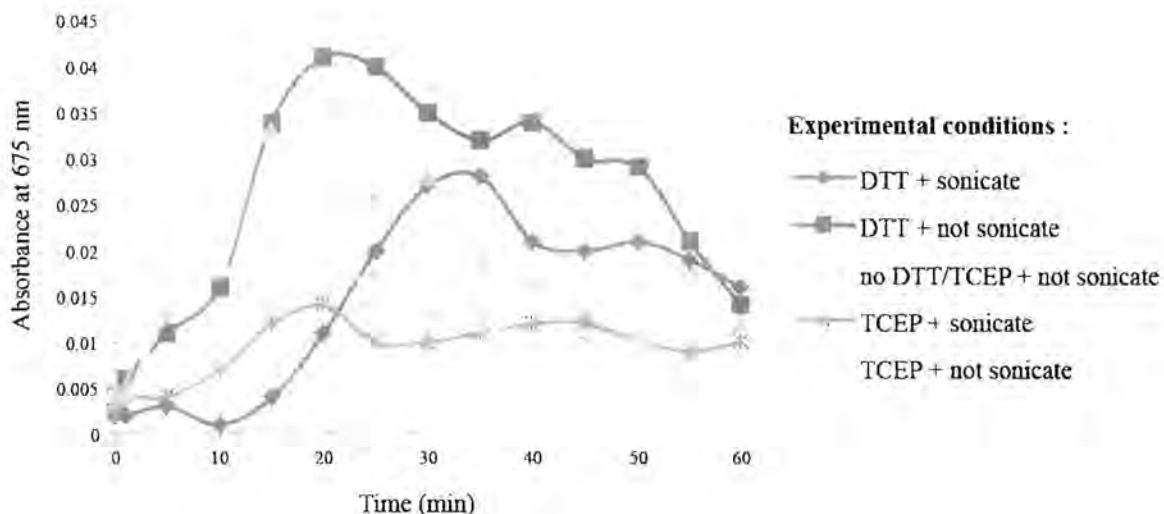


Figure 3.23 Deconjugation profile after DTT treatment on the conjugates.

3.5.3 Validation of thiolated probe quantity

The conjugated gold colloid was dispersed in 10 mM phosphate buffer and 150 nM NaCl as the final buffer. After adding DTT to conjugates at 40 °C, the 0.1 and 0.3 nmole samples suddenly turned from red to purple (Table 3.2 and Fig. 3.24). This suggests that these 2 conditions had too few thiolated probes to reach a proper AuNPs stability. Centrifugation of AuNPs was later performed for detecting free thiolated probes in supernatant. The % probe loss was calculated as in Table 3.2. Results showed that the % probe loss were in accordance with amount of thiolated probes used in this study. Moreover, amount of conjugated probes on AuNPs surface are very similar among the 0.3, 0.5, 0.8 nmole samples, whereas the changes of AuNPs color seen by naked eye was observed at 0.3 nmole (Fig. 3.24 (A)). Therefore, this experiment indicates that the optimal quantity for thiolated probe conjugation on AuNPs (20-25-nm size) is approximately 0.5-0.8 nmole.

Experimental conditions			Results		
Amount of thiolated probes* (nmole)	Type of reductants	Sonication	% Probe loss	Amount of conjugated probes on AuNPs (ng/ μ l)	Color after DTT added
1.0	DTT	Yes	83.05	6.18 \pm 1.17	Red
0.8	DTT	Yes	89.48	4.35 \pm 0.30	Red
0.5	DTT	Yes	76.52	4.68 \pm 0.40	Red
0.3	DTT	Yes	71.43	4.64 \pm 0.31	Purple
0.1	DTT	Yes	45.26	2.76 \pm 0.19	Purple

Table 3. 2. Effect of amount of thiolated probes on AuNPs conjugation.

(* The thiolated probes used in this experiment is probe#1.)

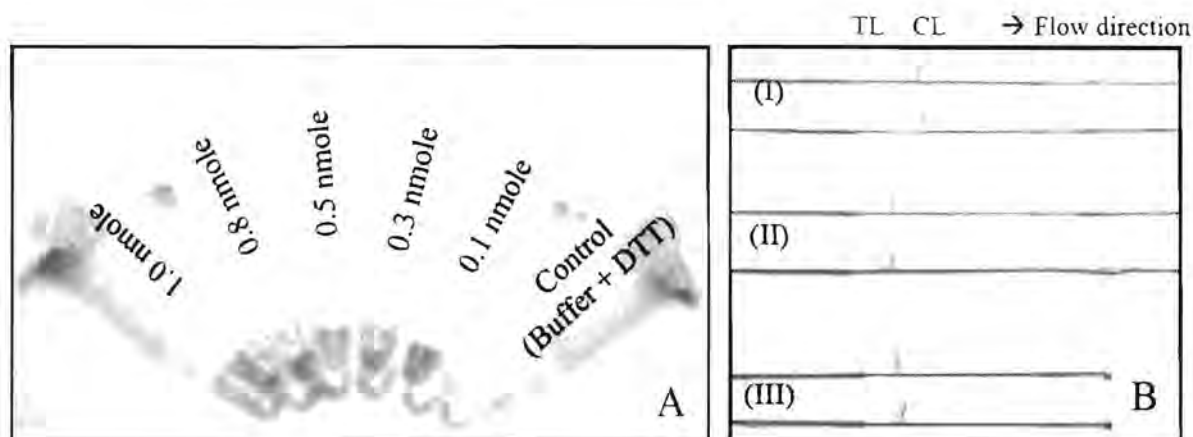


Figure 3.24 (A) The color changes of conjugates after adding DTT. (B) Positive results of lateral flow strip test with DNA targets at (I) 125 fmole, (II) 12.5 nmole and (III) 1.25 fmole (TL = Test line, CL = Control line).

3.5.4. Detection of synthetic DNA targets with lateral flow strip test

We used another set of probes (probe#2, 3 and 4) to fabricate the lateral flow test strips as the method described in Mao *et al.* (2009). Synthetic DNA targets at different concentrations were tested on lateral flow platform in order to evaluate the sensitivity of detection limit. The outcome revealed that these test strips could detect the DNA target as low as 1.25 fmole (Fig. 3.24 (B)). To our knowledge, using our modified protocol results in the highest sensitivity of DNA detection by lateral flow test.

Conclusions

In summary, although TCEP has many advantages over DTT, DTT treatment combined with gel filtration column to remove the thiolated protecting caps is more effective than TCEP treatment in the thiolated probe-AuNPs functionalization. This work showed that the sonication promotes conjugation stability by enhancing the covalent bond formation of thiol moiety and AuNPs surface. The initial amount of thiolated probes used is also critical to obtain the conjugation stability. Finally, we applied this conjugation protocol to construct lateral flow strip tests, results revealed that as low as 1.25 fmole of DNA target is detectable by naked eye detection

3.6. Preparation, modification, and testing of antibody-conjugated AuNPs

3.6.1 Optimal amount of antibody to cover and stabilize gold nanoparticles

This project expects that majority part of surface area of gold nanoparticles should be covered by antibody protein. This expectation is aimed to get highest detecting sensitivity and diminish the possibility of unspecific binding that can take place by protein-free area on gold nanoparticles surface. Optimal amount also optimize usage of antibody to be the most effective amount.

Antibody protein has been found to be able to replace citrate around gold nanoparticles and make the nanoparticles to survive in ionic strength solution. Hence, different concentrations of antibody were electrostatically bind to gold nanoparticles surface. After binding, each gold nanoparticles colloids were tested by adding of 10% NaCl. If antibody protein can cover major area of the nanoparticles – which means gold nanoparticles are stabilized by antibody protein instead of citrate, ionic strength solution will not affect to stabilization of gold nanoparticles and the colloid will remain its ruby-red color.

For this project, antibody of *Leptospira pomona* was employed and the result in following part was assumed to be applicable with this antibody only. The antibody was serial diluted in DI H₂O to have following concentration: 1:2 - 1:10 - 1:50 - 1:100 - 1:500 - 1:1000 volume by volume .

- Raw data

The gold nanoparticles which were admixed with antibody solutions that have concentration equal to 1:2 and 1:10 remain their bright red color while the gold nanoparticles which were blended with lower concentration of antibody (1:50, 1:100, 1:500, 1:1000) were aggregated and their color were altered.

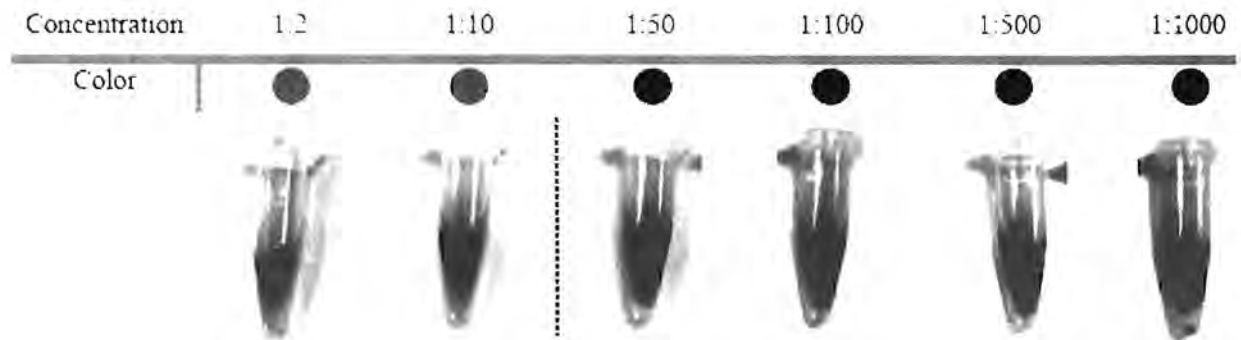


Figure 3.25 Result of stabilization of gold nanoparticles that are conjugated with different concentration of antibody to find the most optimistic concentration to be used in following step. The first two tubes remain their color while the others tubes are agglomerating.

- Discussion

The color of gold nanoparticles changed significantly since 1:50 diluted antibody solution, lower concentration (1:50, 1:100, 1:500, 1:1000) led to less nanoparticles surface covering while higher concentration solutions (1:2, 1:10) did cover the gold nanoparticles very well.

Hence, 1:10 diluted antibody is seem to be the most optimistic amount which satisfy both experimental way and economical way.

❖ Functionalization, tester preparation, and detecting process

Common procedure of antibody-conjugated gold nanoparticles preparation is illustrated in Fig 3.27 which consists of eight major steps (A1-A8) while Figure represents preparation process of antigen on nitrocellulose membrane (B1-B7) including usage of antibody-conjugated gold nanoparticles to detect antigen on the membrane ()

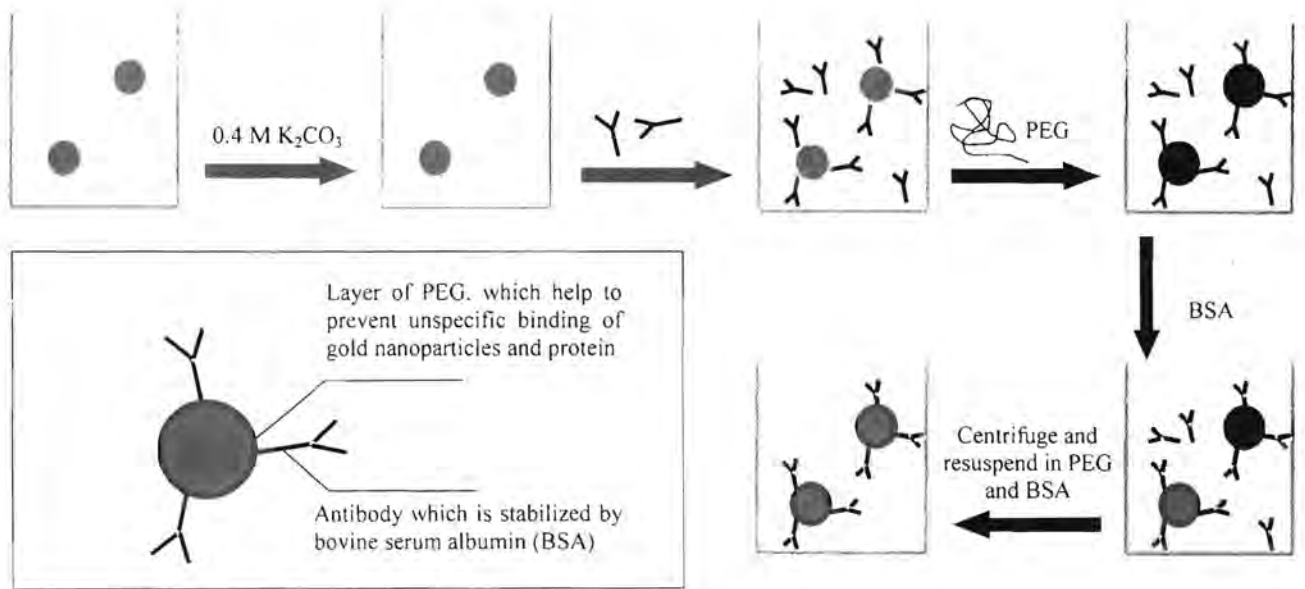


Figure 3.26 - Schematic representation of functionalization procedure by conjugating antibody onto gold nanoparticles.

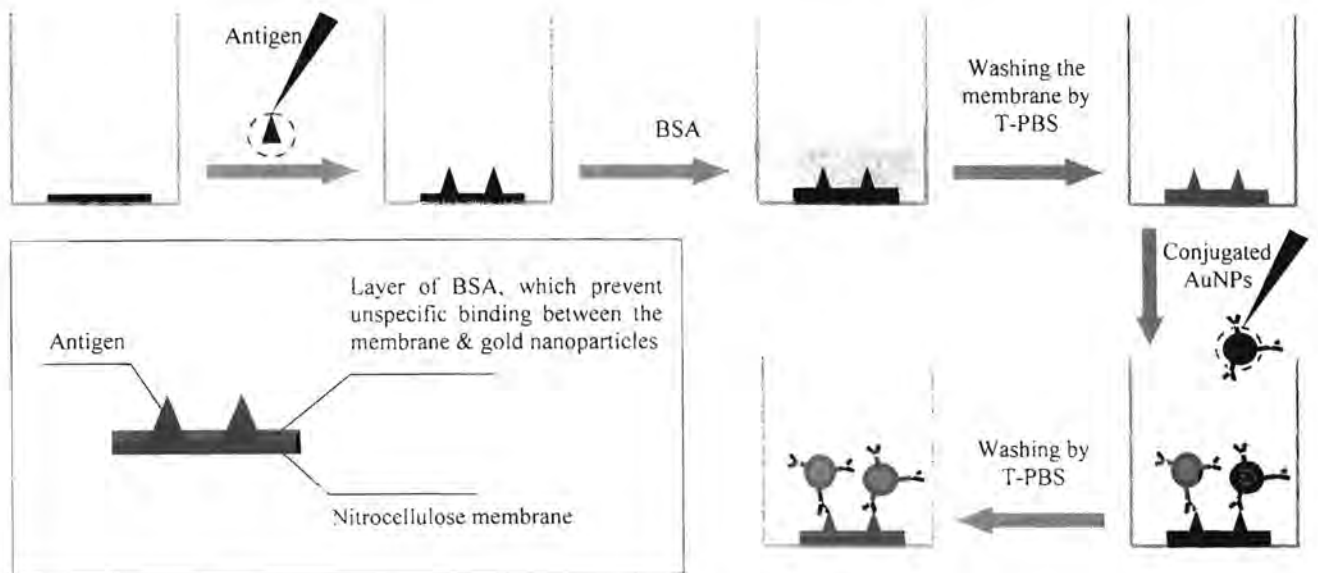


Figure 3.27 - Schematic representation of placing antigen onto nitrocellulose membrane and membrane blocking process. Include the process of antigen detection using *T. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles and washing process.

3.6.2 General detection of antigen by antibody-conjugated gold nanoparticles

Antibody-conjugated gold nanoparticles has been examined to be a sensitive and easy method for detect specific antigen protein. In this project, antibody of *Leptospira pomona* was employed to be conjugated on gold nanoparticles surface using the procedure described above.

In the meantime, nitrocellulose membrane was cut into 5 pieces and put into well number A1-A5. The antibodies which had been dropped on those nitrocellulose membranes were *Leptospira pomona*, *Leptospira pyrogenase*, *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and 1X PBS in well A1-A5 respectively.

In this general detection, all conditions were set for the most convenient aspect. Thus, we set the antibody-gold nanoparticles incubation time to be 15 minutes, added PEG and BSA in PBS to mix with conjugated gold nanoparticles before centrifuge. The solution was centrifuged in 4°C using speed and time stated above. The experiment was carried out with antigens that had concentration equal to 10^5 cells per 1 mL agitated without diluted. The membranes were blocked by BSA in PBS and the length of sensing period was 30 minutes precisely.

- Raw data

When *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles was impregnation in the well that contained antigen-bound nitrocellulose membrane, antibody on gold nanoparticles surface would spontaneously bind to antigen protein that conserved some matching part. For here, the red dot of gold nanoparticles noticeably appeared on nitrocellulose membrane in well A1 which *Leptospira pomona* antigen was dropped. Meanwhile, vague signals of gold nanoparticles were observable in well A2 and A3. However, there was no signal can be detected in well A4 and A5.

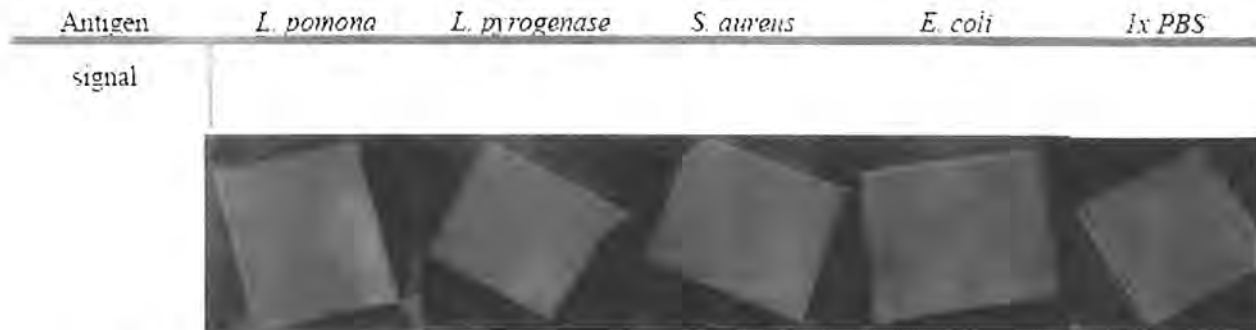


Figure 3.28 Result of general antigen detection using *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles. This experiment was expected to express the fundamental capability of functionalized gold nanoparticles for biosensing application. The signal was fully detectable in the case that type of antigen and antibody was matching. However, some signals from cross-reaction of antigen-antibody could happen due to the fact that bacteria themselves also conserve some interference sequences of protein. [Remark: the figures are tuned for better contrast while the experimental result is still unaffected.]

- Discussion

The ability of *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles was satisfied because it can detect the existence of *Leptospira pomona* antigen as we can see from Figure 3.29. However, the incident of signals in well number A2 and A3 which are not *L. pomona* are concluded to be the problem of antigen-antibody interaction. Due to the fact that antigen proteins of *Leptospira pyrogenase* which is being in the same genus with *Leptospira pomona* also contain some interfering sequences. Meanwhile, the major outer membrane protein sequences of *Leptospira pomona* which contains specific antigens are also matching with some sequences of *Staphylococcus aureus*' proteins as Pubmed's BLAST software can examine out in Figure 3.29. Both two cases are called cross-reaction of antigen-antibody protein which is drawback of this technique, thus, more purified antibody should be employed if better result is expected.

GenBank: AAT45362.1

major outer membrane protein [Leptospira noguchii serovar Pomona]

```
>gi_48526308 gb|AAT45362.1| major outer membrane protein [Leptospira noguchii serovar Pomona]
MKKLSILAI SVALFASITACGAFGGLPSLKSSFVISEDTIPGTNETVKILLPYGVSVINYYGYVXPGQAPD
GLVDGNKXAYYL YVWIFAVIAEMGVRMISPTGEIGEPGDGLVSDAFKAATPEEKSMPHWFDTWIRVERM
SAIMPQIAKAAKAKPVQKLDLDDDDGDDTYKEERHNKYNLSLRIKIPNPKSFDDLKNIDIKKLLVRGLY
RISFTTYKPGEVKGSFVASVGLLFPFGIPGVSPILHSNPEELQXQAIAAEESLKKAASDATK
```

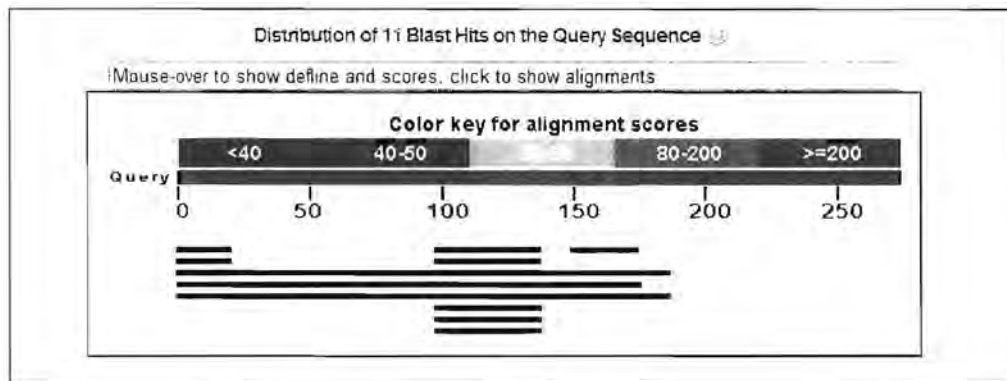


Figure 3.29 (Upper) Sequences of major outer membrane proteins of bacteria *Leptospira pomona*. The format of sequences is FASTA that is brought from National Center of Biotechnology Information (NCBI)'s Pubmed protein databases (cited on 13th April 2009). (Lower) schematic diagram of blast hits between major outer membrane protein sequences and proteins presenting in bacteria *Staphylococcus aureus*. The black line is showing the estimated region that protein sequences are interfering.

For the last two wells, antibody-conjugated gold nanoparticles cannot detect any signals due to the facts that *Escherichia coli* antigen proteins and 1X PBS which is the negative control is unmatched with our biosensing material.

Selectivity of our *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles is satisfied because it can detect existence of *Leptospira pomona* antigen and express out the distinguishable signal from the others unexpected signal which is the result from cross-reaction.

From this general detection, although gold nanoparticles can function well to diagnose the presence of antigen, sensitivity of detection still low. Hence, the following experiments were anticipated to get better sensitivity of detection and the most appropriate conditions were examined.

3.6.3 Effect of antibody-gold nanoparticles incubation time

The functionalization of gold nanoparticles by attaching of antibody protein is electrostatic reaction which is a reversible reaction that antibody can attach and detach alternatively all the time. To complete the attachment, it requires just enough length of time for conjugation process. For here, we examined the effect of incubation time that affect to the final signal intensity of gold nanoparticles to detect antigen. Four tubes of conjugating gold nanoparticles were incubated for 15 minutes, 30 minutes, 60 minutes, and 120 minutes while continuously mixed.

- Raw data

It was observed that all conjugated gold nanoparticles which antibody incubation time was different did not show any obvious physical dissimilarity. Their colors after preparation were comparable as shown in Figure . The sensitivity of all gold nanoparticles was also the same in intensity which is visible for human naked eyes observation, Figure 3.30.



Figure 3.30 - final *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles. They had different antibody incubation time as (Left to Right) 15 mins, 30 mins, 60 mins, and 120 mins, respectively.

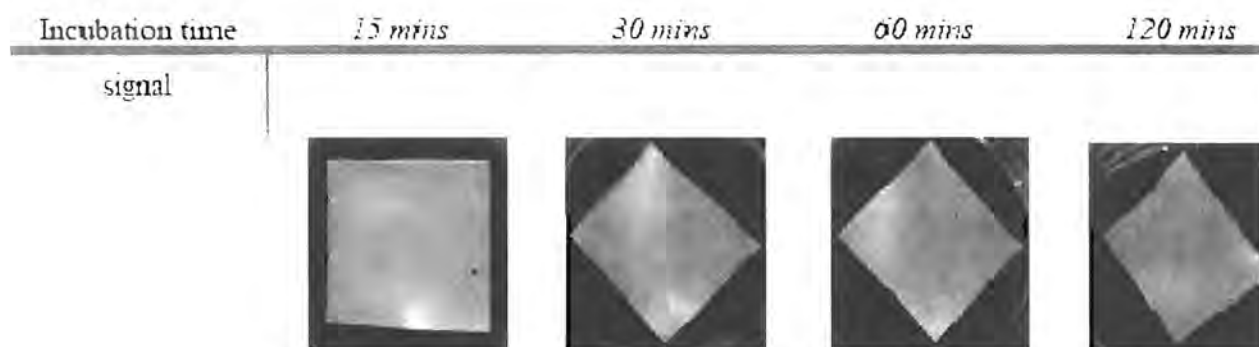


Figure 3.31 - Effect of antibody incubation time upon the final signal intensity in antigen detection process

- Discussion

As the result showed that there is no significant difference in signal intensity, it means 15 minutes is enough length of time for antibody protein to attach onto surface of gold nanoparticles. Longer time after 15 minutes which the attachment has already reached its limitation is not necessary. It also tells that different incubation time does not affect to stability of antibody-conjugated gold nanoparticles as their color remain the same for all tubes.

3.6.4 Effect of centrifuge temperature

Protein is the biomaterial that is very sensitive to the environment. Basically, proteins have to be kept in low temperature to prevent them from denature. This fact is also applicable to our project, since we expected that all steps of antibody-conjugated gold nanoparticles preparation process should be conducted in cold temperature especially during step of centrifuge which antibody protein have to face with crucial conditions and easily to be denatured. Two tubes of antibody-conjugated gold nanoparticles probe were prepared in the same manner except temperature that was set for centrifuge, the probe which was centrifuged at 4 degree centigrade (4°C) was used to detect antigen on raw A while the other was centrifuged at room temperature and was used with antigen on raw B.

- Raw data

There were observable signals in well A1-A3 which 4 °C centrifuged gold nanoparticles probe was employed to detect antigen while no signal appeared in all wells on raw B, which room temperature probe was used whether there is the nitrocellulose membrane that contained antigen of *L. pomona* in well B1.



Figure 3.32 – Effect of centrifuge temperature upon the final detecting signal of *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles probe. It seems like antibody had detached from surface of gold nanoparticles during room temperature centrifuge which make the gold nanoparticles lose their sensing capability

- Discussion

Centrifuge temperature seems to affect the functional ability of conjugated gold nanoparticles significantly. As the signals from the probe that were centrifuged in room temperature were very low in intensity and were not visible for naked eyes which should be result of detachment of antibody during centrifuge. While the signals from 4°C centrifuged probe still expressed satisfied detectable signal of presenting of *L. pomona* antigen. Thus, centrifuge has to be conducted in cold conditions to maintain attachment of antibody and maintain sensitivity of the gold nanoparticles probe.

3.6.5 Effect of existence of PEG in conjugated gold nanoparticles solution

Polyethylene glycol or PEG is the polymer that has enough affinity to spontaneously attach on gold nanoparticles surface. It has higher affinity than citrate and normally used as gold nanoparticles polymeric stabilizer in many cases. In this project, PEG was used as blocking substance to cover on antibody-free region on gold nanoparticles surface and prevent unspecific binding between gold nanoparticles and antigen protein during sensing. However, it shows some possibility that PEG can diminish signal intensity - that means it can reduce sensitivity of our *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles probe. Two antibody-conjugated gold nanoparticles are prepared with and without PEG and tested with the tester membrane of all antigen types that we have. The conjugated gold nanoparticles with PEG were tested with antigen on raw A while PEG-free probe was tested on raw B.

- Raw data

There were noticeable signals of gold nanoparticles in well A1 and B1 which contained antigen of *L. pomona*. The signal intensity in well B1 was also significantly bold when compared to signal in well A1. However, antibody-conjugated gold nanoparticles probe with PEG on raw A showed up signal only in well A1-A3 but the PEG-free probe on raw B generated signal in well B1-B4. The result is shown in Figure 3.33.

Antigen	<i>L. pomona</i>	<i>L. pyrogenase</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	1x PBS
Probe with PEG					
Probe without PEG					



Figure 3.33 – Effect of PEG upon the final signal intensity when conjugated gold nanoparticles probes were used to detect antigen. (Upper) The sensing signal of *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles with PEG (Lower) Sensing signal of PEG-free conjugated gold nanoparticles.

- Discussion

Polyethylene glycol is obviously affect to sensitivity of gold nanoparticles probe, it can act as spacer or mask that reduce the binding of antigen-antibody and make the strength of sensing signal to be lower than actual. However, when PEG is lack, some region on gold nanoparticles surface are naked and make them to be able to unspecifically bind to antigen protein.

3.6.6 Effect of concentration of antigen protein and minimal amount of antigen to be detectable

The amount of antigen presenting on nitrocellulose membrane is directly related to the observable signals. For here, minimal amount of antigen to be detectable by our prepared antibody-conjugated gold nanoparticles was examined. The concentrations of stock solution of our antigens are 10^9 *Leptospira pomona* cells per 1 milliliter of sterile DI H₂O agitated well by sonicator machine. We took those stock solutions and diluted them by 1X, 0.1X, 0.01X, and 0.001X in sterile DI H₂O. The diluted antigen solutions were assumed to be equivalent to 10^8 , 10^7 , 10^6 , and 10^5 bacterial cells per 1 mL of sterile DI H₂O.

- Raw data

There was just one visible signal of gold nanoparticles that appeared only in well A1. The signal was relatively low but still observable by naked eyes. Meanwhile, there was no signal occurred in the others wells, said, well B1, C1, and D1 which contained 0.1X, 0.01X, and 0.001X diluted antigen as shown in Figure 3.34.





Diluting factor	1X	0.1X	0.01X	0.001X
signal				

Figure 3.34 Effect of concentration of antigen to the sensitivity of *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles and experiment to examine the minimal amount of antigen that our gold nanoparticles can detect. From picture, we can detect the antigen with 1X diluting factor which equivalent to 10^8 bacterial cells per 1 ml, and this is the minimal amount that can be detected by our probe.

- Discussion

From this experiment, we can know the lowest limit of our antibody-conjugated gold nanoparticles probe which is 10^5 agitated bacterial cells per 1 milliliter. Hence, lower

concentration of antigen that this minimal point is undetectable by our conjugated gold nanoparticles. However, this limitation also depends on types and quality of antigen and antibody which were employed here. With antibody that has higher quality can express higher sensitivity and lower concentration of antigen may be diagnosable.

3.6.7 Effect of blocking agent upon the detecting signal by antibody-conjugated gold nanoparticles

Blocking agent plays an important role in blotting diagnostic process. Because blocking process is the step that can prevent unspecific binding between proteins on the probe, such as antibody protein of the conjugated gold nanoparticles, with the mismatch region of antigen protein or even some part of nitrocellulose membrane. Generally, milk (e.g. skim milk) which contains protein named casein is used as blocking agent in conventional blotting process such as western blotting. However, from previous study about nanoparticles, bovine serum albumin (BSA) which is holding protein called albumin was normally employed as blocking agent instead of milk. Albumin will cover antigen-free region on the membrane and inhibit agglutination between antibody protein and the membrane which will generate wrong positive signal. The different between using BSA and milk as blocking agent was studied by prepare two rows of antigens which were blocked differently. Membranes on row A were blocked by BSA while the membranes on row B were blocked by Carnation® milk. Both of them were tested by a set of antibody-conjugated gold nanoparticles.

- Raw data

Detectable signal on well A1 was obvious for human eyes while weak signals on the well A2 and A3 were fairly noticeable. There was also a very weak signal took place on the membrane in well B1. However, the others well had no sign of signal.

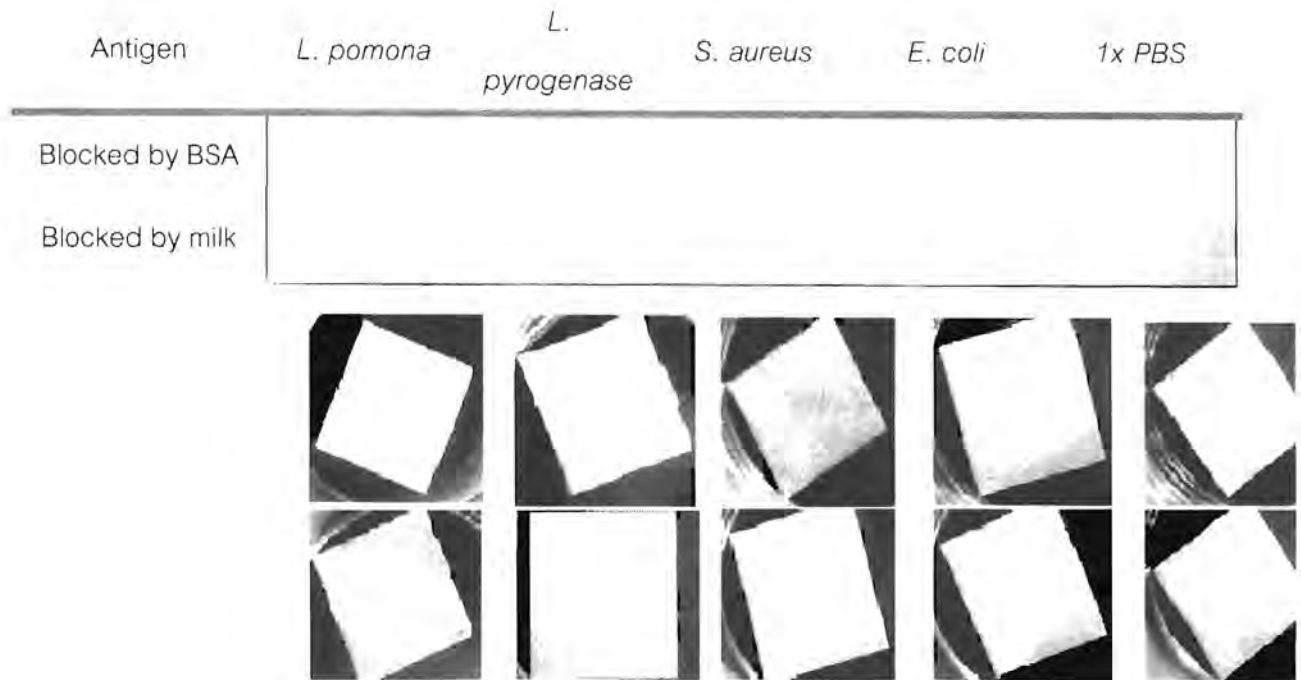


Figure 3.35 – Effect of blocking agent to the function of *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles (Upper) Membranes were blocked by bovine serum albumin and the signals appeared on well A1-A3. (Lower) Membranes were blocked by milk. Very low signal which nearly invisible for human naked eyes appeared on B1.

- Discussion

There was a weak signal appeared on the membrane in well B1 while no signal was observable in well B2-B5. These may be concluded that milk is a better blocking agent than BSA in the sense of selectivity; it may deduce the signals caused by weak bonding of cross-reaction very well. However, for the sake of sensitivity, BSA is better blocking agent because its signal is easier to be observed during screening diagnosis.

3.6.8 Effect of impregnation time for conjugated gold nanoparticles to detect existence of antigen

Antibody-conjugated gold nanoparticles are spontaneously bound onto specific antigen that can match very well with the antibody on the nanoparticles. When the nanoparticles probe was impregnated with antigen-dropped nitrocellulose membrane by antigen-antibody interaction would be strongly influenced by the length of time. Actually, the effect of impregnation time was studied in the following experiment which the same set of antibody-conjugated gold nanoparticles and antigen-bound nitrocellulose membrane were used. The difference among each wells were the length of time for impregnation; 15 minutes, 30 minutes, 60 minutes, 90 minutes, and 120 minutes were set up for the wells number A1-A5 respectively. The antibody used in this case was *L. pomona* while the antigen dropped onto the membrane was also the cell fragment of bacteria *L. pomona* only.

- Raw data

There were weak signals showed up on the membrane in well A1 and A2 which impregnation time were 15 minutes and 30 minutes correspondingly. The signals became obviously by human naked eyes since the well A3-A5 which impregnation equal to 60 minutes and longer. Figure shows the signal from different impregnation time for conjugated gold nanoparticles to detect antigen.

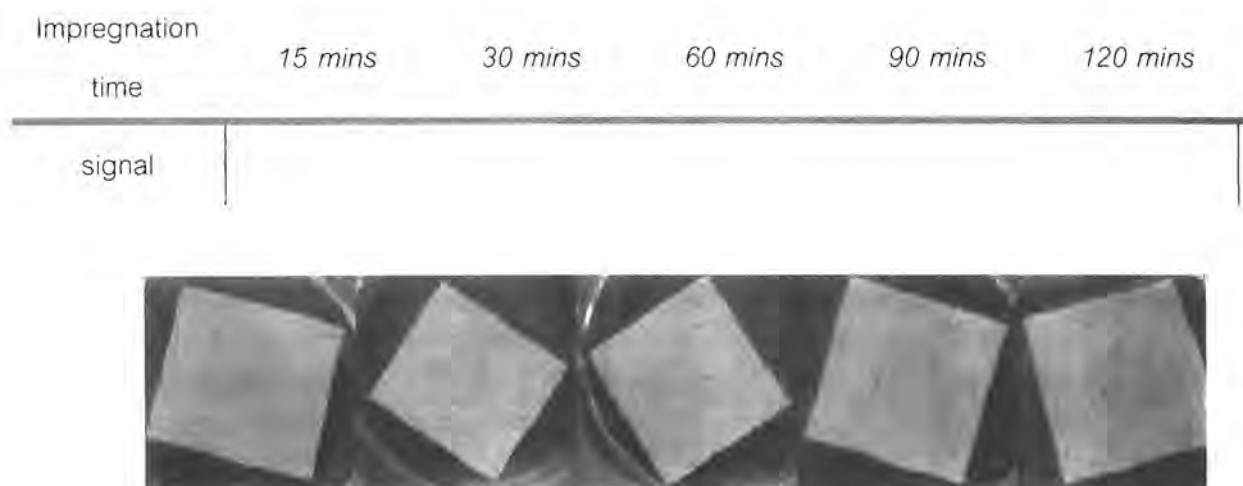


Figure 3.36 Effect of *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles sensing time upon the signal intensity that can be observed by human naked eyes

- Discussion

From the result, it is clearly that antigen-antibody binding and deposition of gold nanoparticles onto specific nitrocellulose membrane was utilized by impregnation time. The signal was strong enough to observe when impregnation time is equal or longer than one hour or 60 minutes which can be assumed as the most appropriate length of time. We also can conclude that all results from variation of the others factors reported above which is normally keep in detecting for 30 minutes will show stronger signal intensity or higher sensitivity if it was incubated for longer time (e.g. 60 minutes).

3.6.9 Silver-enhancing to improve signal intensity of conjugated gold nanoparticles

- Using of silver to enhance the signal received from detection by gold nanoparticles probe.

The schematic procedure of silver enhancement is illustrated in Figure 3.37 below.

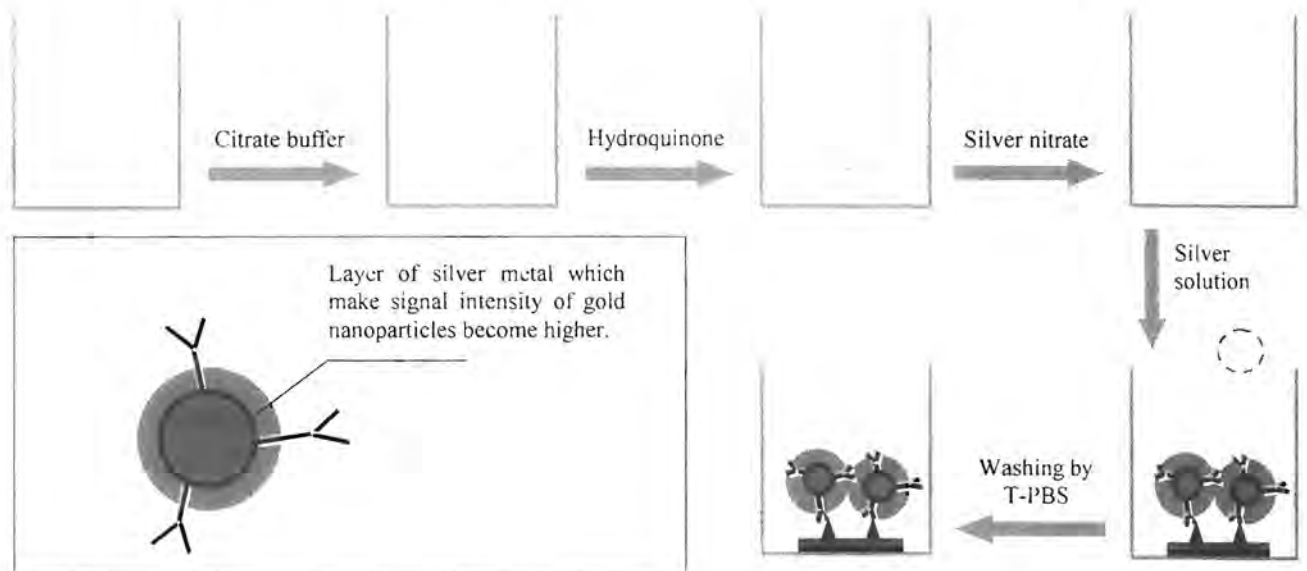


Figure 3.37 schematic representation of silver enhancing process

Effect of silver enhance upon the signal from different impregnation time of gold nanoparticles probe

This experiment is the continue part from the experiment labeled '*Length of impregnation time for conjugated gold nanoparticles to detect existence of antigen*'. The silver solution was freshly prepared and added into the well A1-A5. The incubation time for silver solution to enhance the signal of gold nanoparticles is 10 minutes long for this experiment in dark. However, the signal was increased sophisticatedly after the membranes with silver solution had already been washed out were exposed to light for 5 minutes more.

- Raw data

From previous experiment, the signals from conjugated gold nanoparticles were obviously noticeable since the well A3-A5 which impregnation times were 60 minutes, 90 minutes, and 120 minutes. Meanwhile, the signals in well A1 and A2 which were 15 minutes and 30 minutes impregnation were almost invisible. After enhanced by silver solution, all signal intensities in every well were increased. The signals in well A1 and A2 become easily detectable while the signals in others wells become more apparent.

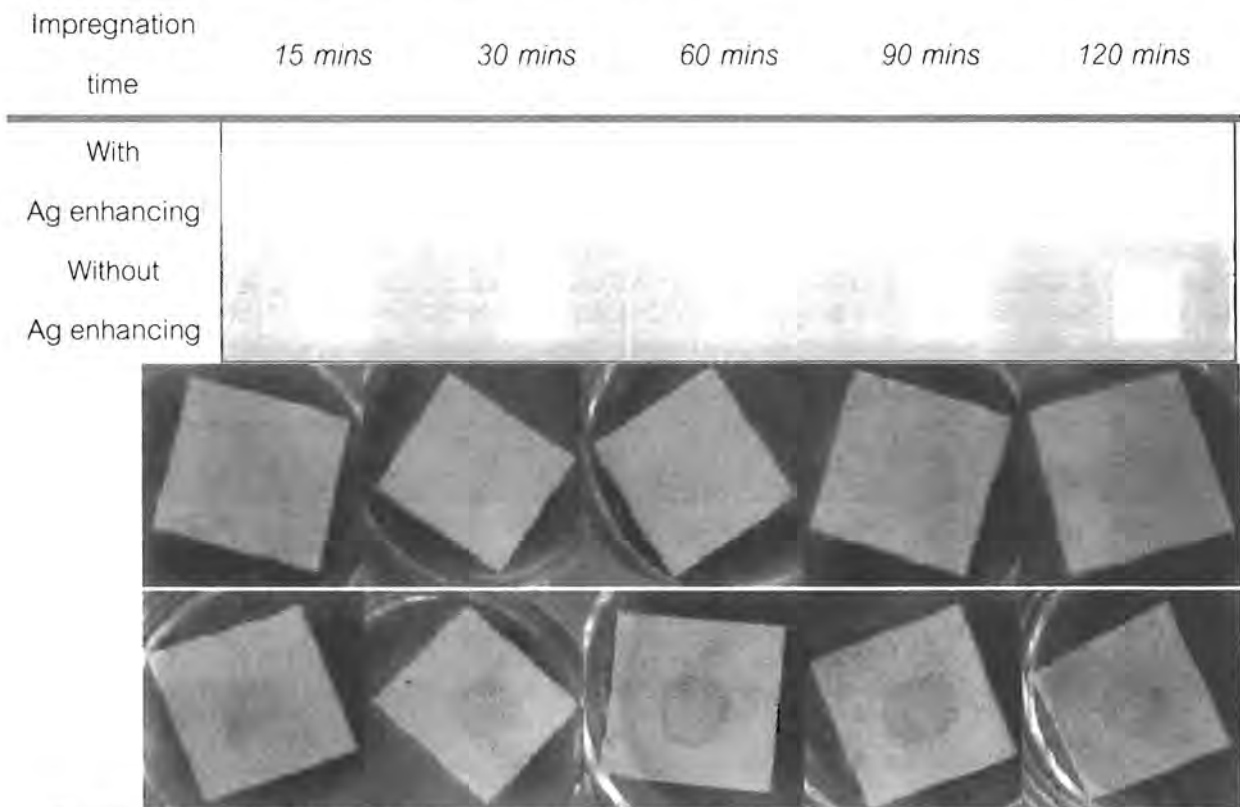


Figure 3.38 - Effect of silver enhance upon the signal from different detection time of *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles to detect antigen from bacteria *Leptospira pomona*. (Upper) From left to right, the detected signal from gold nanoparticles for 15, 30, 60, and 120 mins, respectively without silver enhancement.

Discussion

Silver enhancement seems to have the ability to increase the signal intensity from detection by *L. pomona* antibody-conjugated gold nanoparticles. Generally, biosensing materials are aimed to diagnose rapidly with shorter than one hour long, so, the gold nanoparticles probe itself cannot meet this condition. However, silver enhanced gold nanoparticles can show up a clear visible signal within 15 minutes of gold nanoparticles impregnation with enhancing process that takes just another 15 minutes more. Thus, the signal can be received within 30 minutes for the whole process of detection and it is more appropriate for screening diagnosis purpose

3.7 Detection of Leptospira in urine using anti-Leptospira-coated gold nanoparticles

3.7.1 Preparation of antibody-coated gold nanoparticles

Preparation of antibody-coated gold nanoparticles *Leptospira interrogans* serovar Bratislava was used in this study because it is a representative of the most common serogroup reported in Thailand. According to the report of Zhao et al, the pH of gold nanoparticle suspension was adjusted to 9.0 prior to antibody coating. In this study, optimum pH of gold solution was also determined (data not shown) and gold particle suspension adjusted to pH 9.0 was used for antibody coating in further experiments. Various amounts of antibodies were tested for gold particle coating. Anti-*Leptospira* antibody was diluted to 1:2, 1:10, 1:20 and 1:100. Diluted antibodies were incubated with gold nanoparticles for 15 min at room temperature before adding 100 ml of 10% NaCl. Gold nanoparticles coupled with antibody dilution 1:2, 1:10 and 1:20 (Fig. 3.39, Tubes # 1, 2 and 3, respectively) gave red color solution after NaCl was added whereas the color of gold suspension with antibody dilution 1:100 (Tube # 4) turned blue. This suggested that the amount of antibody in 1:100- dilution tube was not enough to couple gold particles used. The 1:10 antibody dilution was used in further experiments.

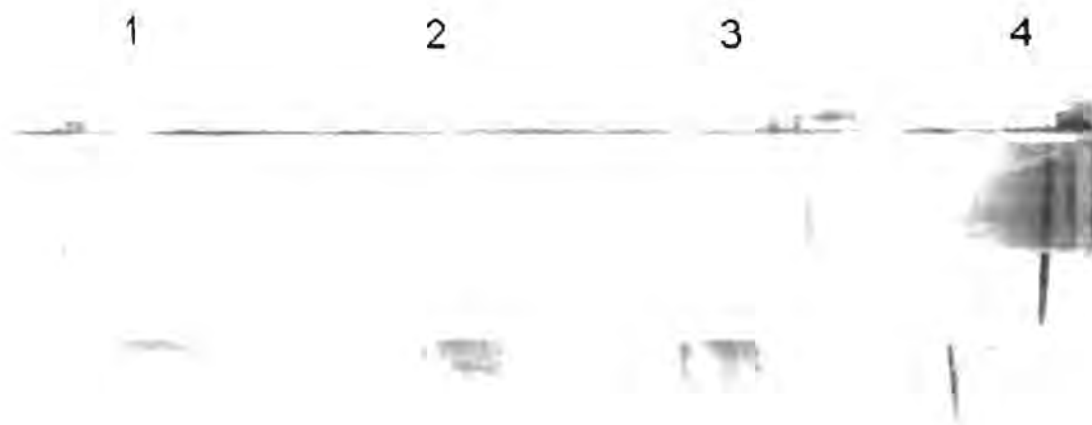


Figure 3.39 Optimum antibody dilution for preparing antibody-coated gold particles. Gold nanoparticle suspension pH 9.0 was incubated with antibody diluted to 1:2, 1:10, 1:20 or 1:100 as described in Section 2. After adding NaCl solution, the suspension with antibody dilution 1:2, 1:10, 1:20 gave red color (Tubes # 1-3). The blue color of suspension in Tube # 4 indicated that the amount of antibody used was inappropriate.

3.7.2 Detection of *Leptospira* in urine using *Leptospira* antibody-coated gold nanoparticles

Leptospira interrogans serovar Bratislava was spiked into urine from a normal individual to the final concentrations of 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 leptospire/ml. Two hundred microliters of urine containing various amounts of *Leptospira* was centrifuged and the sediment was resuspended in 20ml of deionized distilled water, pH 9.0 before testing with anti-*Leptospira*-coated gold particles. Agglutination of red gold nanoparticles indicates the positive result. No agglutination was observed when antibody-coated gold particles were tested with urine without *Leptospira* added or when uncoated gold particles were tested with urine containing *Leptospira* (data not shown). Agglutination of gold particles was seen when urine containing 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 leptospire/ml was tested (Fig. 3.40, Tubes # 2-9). There was no agglutination in tube containing one leptospire/ml (Tube # 1). These data suggested that the sensitivity of detection was 10 leptospire/ml. Since only 200ml of urine was used, our assay could detect *Leptospira* even there was as few as 2 leptospire presence.

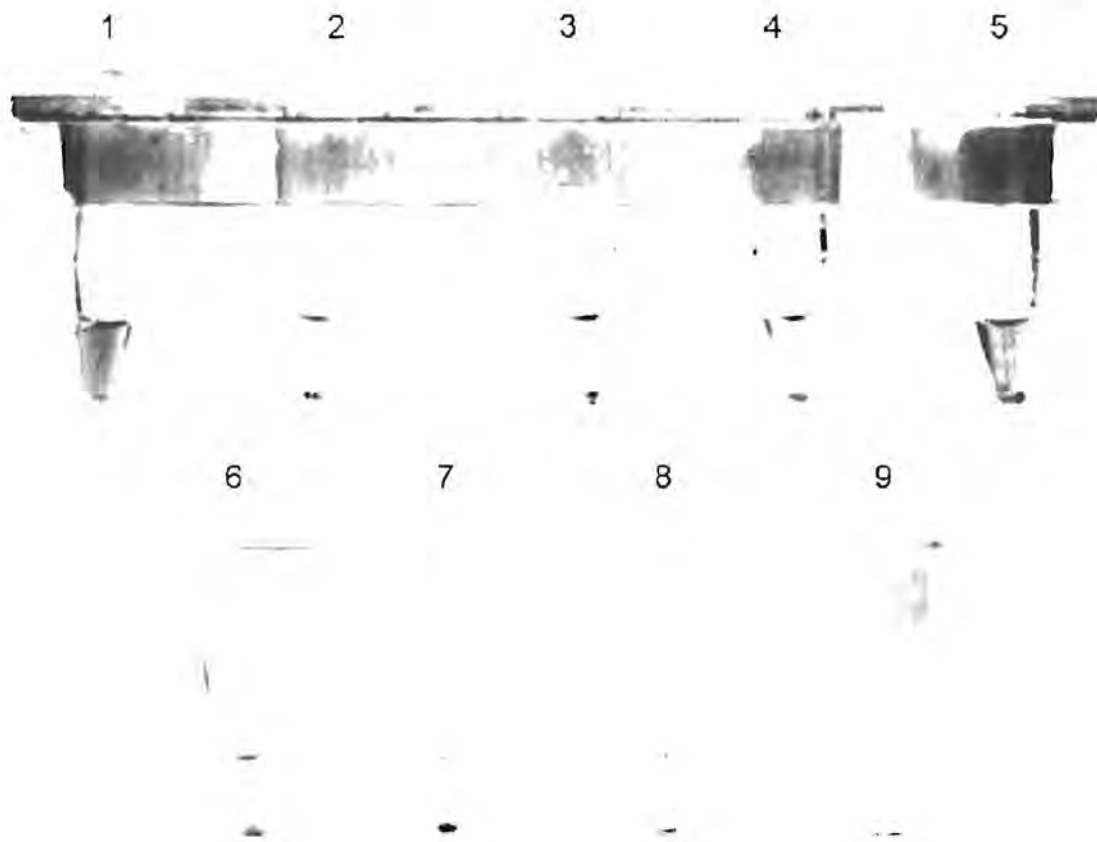


Figure 3.40 Detection of *Leptospira* in urine. Urine containing 1, 10, 102, 103, 104, 105, 106, 107 and 108 leptospíres/ml (Tubes # 1- 9, respectively) was centrifuged and the sediment was resuspended in deionized distilled water. The suspension was then mixed with antibody-coated gold particles as described in Section2. Agglutination of gold particles could be observed in Tubes # 2- 9.

3.7.3 Specificity of anti-Leptospira-coated gold particles

Leptospira antibody-coated nanoparticles were also tested with other organisms commonly found in urine. As shown in Fig. 3.41, no agglutination was observed when anti-Leptospira-coated particles were tested with *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterococcus faecalis* (Tubes # 2–4, respectively). Tube # 1 was a positive control which urine containing *Leptospira* was tested.

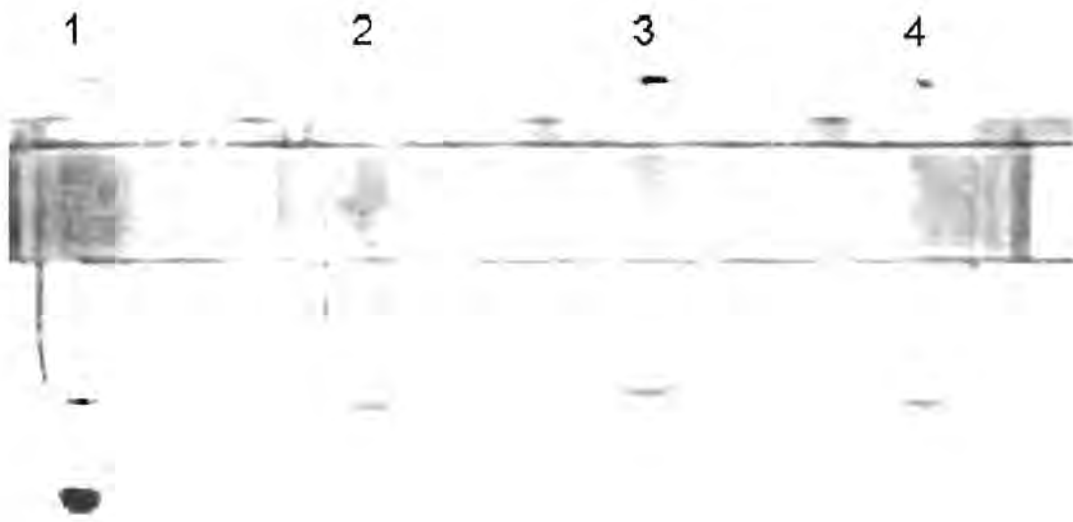


Figure 3.41 Specificity of *Leptospira*-coated gold nanoparticles. *Leptospira* antibody-coated gold particles were tested with *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterococcus faecalis* (Tubes # 2–4). Tube # 1 contained *Leptospira* which was used as a positive control in this experiment.

Discussion

Laboratory diagnosis for Leptospirosis commonly relies on antibody detection. It has been shown that *Leptospira* can be detected in urine before the eighth day of illness [22]. In addition, urine collection from patients is not invasive as blood collection is. *Leptospira* antigen detection in urine has been reported [23]. This method requires special equipment and is not easy to perform. PCR for detection of *Leptospira* in urine samples have also been demonstrated [24,25]. However, the rapid and simple assays should be developed for infectious disease diagnosis so the tests can be performed in any laboratories and the results can be obtained quickly for proper treatment. Our assay could detect *Leptospira* in urine even the amount of *Leptospira* was as few as 2 cells. The assay was inexpensive, simple and easy to perform. The

positive result could be observed immediately to within 15min when urine with 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , and 10^9 leptospires/ml were tested. Urine containing 102, and 10 leptospires/ml gave positive results within 60min. The antibody-coated particles can be stored at 4 C at least for 2 months without losing the sensitivity of detection (data not shown). Moreover, urine sample can be kept frozen at -20 C if it cannot be processed and tested immediately after collection. In summary, our data demonstrate that gold nanoparticles can be used in the development of a rapid and simple assay for detection of *Leptospira* in urine samples. Further study, such as coupling of gold particles with antibody that can react with all pathogenic *Leptospira* should strengthen the usefulness of this assay.

Conclusion

In summary, here we established in house citrate-stabilized gold nanoparticles. Our studies showed that these synthesized nanomaterial is capable of using for biomedical application. The DNA-conjugated and antibody-conjugated gold nanoparticles was shown to be practicable biosensing material. In the case of polyclonal antibody which was electrostatically conjugated, the sensitivity was high enough for primary screening diagnosis purpose while the whole process of detection was superior to the others blotting process such as western-blotting or conventional dot-blotting. In this project, many physical and chemical conditions were studied and examined their effect to the capability of antibody-conjugated gold nanoparticles. It was obviously that temperature, existence of polyethylene glycol (PEG), blocking agents, and impregnation time have influent effects to the functions of biosensing material made from gold nanoparticles. In addition, the silver-enhanced process was capable to increase intensity of the signals from gold nanoparticles and to reduce the whole processing time required per a case of detection. We also established an optimized procedure for lateral flow strip test fabrication. This knowledge would be useful a promising template for making a new tool for detection of microorganisms e.g. bacteria causes fever of unknown origin. Further studies to investigate the possibility of employing silver enhancement in the using of gold nanoparticles for *in vitro* infectious disease detection can bring us to the new era of primary screening diagnosis which will make more convenient life for human.

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยในขั้นต่อไป

1. งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรซึ่งมีคุณภาพดี เสถียรที่อุณหภูมิห้อง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานในทางการแพทย์ โดยการนำไปใช้เป็นเครื่องตรวจหาสารชีวโมเลกุล (Biosensor) ได้ทั้งการตรวจหาดีเอ็นเอและโปรตีน พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ขึ้นมาไม่เป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ และมีราคาถูกมากกว่ายีสบิเทอเมื่อเทียบกับราคาของสินค้าที่มีขายในต่างประเทศ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถผลิตอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรออกมาเป็นปริมาณจำนวนมาก เพื่อการใช้ในการวิจัย และการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ต่อไป
2. งานวิจัยนี้ต้องค้ความรู้เรื่องปัจจัยทางเคมีและกายภาพในการควบคุมการสร้างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร รวมทั้งปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อการผลิตแผ่นตรวจโรคโดยอาศัยหลักการของ Lateral flow strip test ซึ่งได้ทำการทดสอบแล้วในห้องปฏิบัติการ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำความรู้นี้ไปใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาชุดตรวจโรคอื่นๆได้อีกมากมาย ที่อาศัยการตรวจหาดีเอ็นเอและแอนติบอดีของสิ่งส่งตรวจ
3. งานวิจัยค้นพบว่าการใช้อนุภาคเงินระดับนาโนเมตร สามารถเพิ่มความไว (sensitivity) ในการตรวจหาดีเอ็นเอ และ แอนติบอดีของเชื้อก่อโรค ที่ต้องการตรวจได้ โดยจะเสริมความไวในการทำงานของอนุภาคทองคำนาโนเมตร จึงมีความเป็นไปได้และเป็นข้อเสนอแนะให้ใช้อนุภาคเงินนาโนเมตรมาเป็นองค์ประกอบในชุดตรวจโรคอื่นๆที่จะจัดสร้างขึ้นเพื่อให้ใช้เป็นชุดตรวจโรคที่ต้องการ
4. ด้วยประสิทธิภาพของอนุภาคทองคำนาโนเมตรที่สามารถตรวจหาได้ทั้งดีเอ็นเอและโปรตีนที่สนใจ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาต่อยอดให้มีการปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนเมตรให้สามารถตรวจลูกผสมได้ทั้งดีเอ็นเอและโปรตีน โดยการติดดีเอ็นเอโพรบสายสั้นและแอนติบอดีของแอนติเจนที่สนใจเข้าไว้ที่ผิวของอนุภาคทองคำนาโนเมตร
5. ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคซึ่งในบางกรณีมีจำนวนของดีเอ็นเอและ/หรือแอนติบอดีจำนวนน้อย อาจทำให้มีการเกิดผลลบลวง (false negative) ได้ในการตรวจสิ่งส่งตรวจที่มี genomic DNA ของมนุษย์ สามารถเพิ่มความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของการตรวจนี้ได้โดยการใช้ Peptide nucleic acid (PNA) probes แทน DNA probes
6. ต้นแบบชุดตรวจโรคที่ได้นี้ ได้มีการจดสิทธิบัตรแล้ว และอยู่ในระหว่างการขยายผลสู่ภาคอุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง (Bibliography)

เอกสารอ้างอิงภาษาไทย

3. วันชัย บุพพันทรัพย์, ไข้ไม่ทราบสาเหตุ. ใน : พรรณทิพย์ ฉายากุล, ชีษณู พันธุ์เจริญ, ชุษณา สอนกระต่าย และคณะ บรรณาธิการ, ตำราโรคติดเชื้อ1, กรุงเทพฯ : โฮลิสติก พับลิชชิ่ง การพิมพ์, 2548, 23-34
8. อมร ลีลาวัฒน์, Acute fever of undetermined origin. ใน : สมบัติ ลีลาคุภาศิริ, สถาพร ธิติวีเชียร เลิศ, ธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ, กิตติ ตระกูลสุน, บรรณาธิการ, Current practice in common infectious disease, กรุงเทพฯ : สวิชาญการพิมพ์, 2544, 121-139.
15. สมพันธ์ บุญยคุปต์, การตายจากไข้ไม่ทราบสาเหตุ, แพทยสมาคมฯ, 2533, 38-40.

เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษ

1. Petersdorf, R.G.; Beeson, P.B. Fever of unexplained origin : report on 100 cases, *Medicine*, 1961, 40, 1-30.
2. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ๒๕๔๗, <http://epid.moph.go.th>, Access on 22 November 2006.
4. Arnow, P.M.; Flaherty, J.P., Fever of unknown origin, *Lancet*, 1997, 350, 575-580.
5. Norman, DC. Fever in the elderly. *Clin. Infect. Dis.*, 2000, 31, 148-151.
6. Berland, B.; Gleckman, R.A. Fever of unknown origin in the elderly : a sequential approach to diagnosis, *Postgrad. Med.*, 1992, 92, 197-210.
7. Knockaert D.C.; Vanneste, L.J.; Bobbaers, H.J. Fever of unknown origin in elderly patients, *J. Am. Geriatr. Soc.*, 1993, 41, 1187-1192.
9. Mackowiak, P.A.; Durack, D.T. Fever of unknown origin. In : Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. eds. Principles and practice of infectious disease. 5th ed. Philadelphia : Churchill Livingstone, 2000, 622-633.
10. Aduan, R.P.; Fauci, A.S.; Dale, D.C.; Wolff, S.M. Prolonged fever of unknown origin (FUO) : a prospective study of 347 patients, *Clin. Res.*, 1978, 26, 558A.

11. Gaeta, G.B.; Fusco, F.M.; Nardiello, S. Fever of unknown origin: a systematic review of the literature for 1995-2004, *Nucl. Med. Commun.*, **2006**, *27*, 205-211.
12. Srisanthana, V.; Puthanakit, T.; Srisanthana, T. Epidemiologic, clinical and laboratory features of scrub typhus in thirty Thai children, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **2003**, *22*, 341-345.
13. Kim, D.-M.; Yun, N.R.; Yang, T.Y.; Lee, J.H.; Yang, J.T.; Shim, S.-K.; Choi, E.-N.; Park, M.-Y.; Lee, S.-H., Usefulness of nested PCR for the diagnosis of scrub typhus in clinical practice: a prospective study, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2006**, *75*, 542-545.
14. Bharti, A.R.; Nally, J.E.; Ricaldi, J.N.; Matthias, M.A.; Diaz, M.M.; Lovett, M.A.; Gilman, R.H.; Willing, M.R.; Gotuzzo, E.; Vinets, J.M., Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance, *Lancet Infect. Dis.*, **2003**, *3*, 757-771.
16. Ernest, H; Shetty, R. Impact of Nanotechnology on Biomedical Sciences: Review of Current Concepts on Convergence of Nanotechnology With Biology, *Azajono*, **2005**, *1*, 1-14
17. Na K.; Bae Y. H., Self-Assembled Hydrogel Nanoparticles Responsive to Tumour Extracellular Ph From Pullulan Derivative/Sulphonamide Conjugate: Characterization, Aggregation and Adriamycin Release In Vitro, *Pharm. Res.*, **2002**, *19*, 681-683.
18. Xu L.; Frederik P.; Pirolo K.F., Self-Assembly of A Virus-Mimicking Nanostructure System for Efficient Tumour-Targeted Gene Delivery, *Hum. Gene Ther.*, **2002**, *13*, 469-481.
19. Muller R.H.; Keck C.M., Challenges and Solutions for The Delivery of Biotech Drugs -A Review of Drug Nanocrystal Technology and Lipid Nanoparticles, *J. Biotechnol.*, **2004**, *113*, 151-170.
20. Nishizawa M.; Menon V.P; Martin C.R., Metal Nanotubule Membranes with Electrochemically Switchable Ion-Transport Selectivity, *Science*, **1995**, *268*, 700-702.
21. Kukowska-Latallo, J.F.; Candido, K.A.; Cao, Z.; Nigavekar, S.S.; Majoros, I.J.; Thomas, T.P.; Balogh, L.P.; Khan, MK.; Baker, Jr, J.R. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer, *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 5317-5324.

22. Ackerson, C.J.; Sykes, M.; Kornberg, R.D. Defined DNA/nanoparticle conjugate, *PNAS*, **2005**, *102*, 13383-13385.
23. Storhoff, J.J.; Elghanian, R.; Mucic, R.C.; Mirkin, C.A.; Letsinger, R.L. One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959-1964.
24. Reynolds, A.J.; Haines, A.H.; Russell, D.A. Gold Glyconanoparticles for Mimics and Measurement of Metal Ion-Mediated Carbohydrate-Carbohydrate Interactions, *Langmuir* **2006**, *22*, 1156-1163.
25. Hipler, F.; Girol, S.G.; Azzam, W.; Fischer, R.; Wöll, C. Interaction of Thiadiazole Additives with Metal Surfaces: Reactions and Thin-Film Formation on Gold as a Model Surface, *Langmuir*, **2003**, *19*, 6072-6080.
26. Antonij, F. *Panacea Aurea—Auro Potabile*, Bibliopolio Frobeniano, Hamburg, **1681**.
27. Huang, W.; Qain, W.; El-Sayed, M. The Optically Detected Coherent Lattice Oscillations in Silver and Gold Monolayer Periodic Nanoprism Arrays: The Effect of Interparticle Coupling, *J. Phy. Chem. B.*, **2005**, *109*, 18881-18888.
28. Pal, T. Nucleophile-induced dissolution of gold and silver in micelle., *Curr. Sci.*, **2002**, *83*, 627-628.
29. Turkevitch, J.; Stevenson, P.C.; Hillier, J. Nucleation and Growth Process in the Synthesis of Colloidal Gold, *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, *11*, 55-75.
30. Templeton, A.C.; Wuelfing, W.P.; Murrey, R.W. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 27-36.
31. Daniel, M.C.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology., *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 293-346.
32. Schimpf, S.; Lucas, M.; Mohr, C.; Rodemerck, U.; Brückner, A.; Radnik, J.; Hofmeister, H.; Claus, P. Supported gold nanoparticles: in-depth catalyst characterization and application in hydrogenation and oxidation reactions., *Catal. Today*, **2002**, *72*, 63-78.
33. Haruta, M. Size- and Support-Dependency in the Catalysis of Gold *Catal. Today*, **1997**, *36*, 153-166.

34. Himmelhaus, M.; Takei, H. Cap-shaped gold nanoparticles for an optical biosensor., *Sens. Actuat. B.*, **2000**, *63*, 24–30.
35. Puckett, S.D.; Heuser, J.A.; Keith, J.D.; Spendel, W.U.; Pacey, G.E. Interaction of ozone with gold nanoparticles., *Talanta*, **2005**, *66*, 1242–1246.
36. Geddes, C.D.; Parfenov, A.; Gryczynski, I.; Lakowicz, J.R. Luminescent blinking of gold nanoparticles., *Chem. Phys. Lett.*, **2003**, *380*, 269–272.
37. Otto, A. Excitation of Surface Plasma Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflection, *Z. Physik*, **1968**, *216*, 398–410.
38. Mie, G. Beiträge zur optik trüber medien., speziell kolloidaler metallösungen, *Ann. Physik*, **1908**, *25*, 377–445.
39. Mock, J.J.; Smith, D.R.; Schultz, S. Local Refractive Index Dependence of Plasmon Resonance Spectra from Individual Nanoparticles, *Nano Lett.*, **2003**, *3*, 485–491.
40. Nam, J.-M.; Thanxton, C.S.; Mirkin, C.A. Nanoparticle-Based Bio-Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins, *Science*, **2003**, *301*, 1884–1886.
41. Liu, Y.; Cheng, S.Z.D.; Wen, X.; Hu, J. Preparing and Stabilizing Colloidal Nanoparticles with a Helical Synthetic Polymer, *Langmuir*, **2002**, *18*, 10500–10502.
42. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D.J.; Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system., *J. Chem. Soc., Chem Commun.*, **1994**, 801–802.
43. Yonezawa, T. and Kunitake, T. Practical preparation of anionic mercapto ligand-stabilized gold nanoparticles and their immobilization., *Colloid Surf. A.* **1999**, *149*, 193–199.
44. Zhong, X.; Yuan, R.; Chai, Y.; Lui, Y.; Dai, J.; Tang, D. Glucose biosensor based on self-assembled gold nanoparticles and double-layer 2D-network (3-mercaptopropyl) -trimethoxysilane polymer onto gold substrate., *Sen. Actuators B.*, **2005**, *104*, 191–198.
45. Nath, N.; Chilkoti, A. A Colorimetric Gold Nanoparticle Sensor To Interrogate Biomolecular Interactions in Real Time on a Surface, *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 504–509.

46. Hostetler, M.J.; Templeton, A.C.; Murray, R.W. *Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules*, *Langmuir*, **1999**, *15*, 3782-3789.
47. Liu, J.; Lu, Y. A colorimetric lead biosensor using DNAzyme-directed assembly of gold nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 6642-6643.
48. Hone, D.C.; Haines, A.H.; Russell, D.A. Rapid, quantitative colorimetric detection of a lectin Using manose-stabilized gold nanoparticles, *Langmuir*, **2003**, *19*, 7141-7144.
49. Baptista, P.; Doria, G.; Henriques, D.; Pereira, E.; Franco, D. Colorimetric Detection of Eukaryotic Gene Expression with DNA-Derivatized Gold nanoparticles, *J. Biotech.*, **2005**, *119*, 111-117.
50. Kawano, T.; Yamagata, M.; Takahashi, H.; Niidome, Y.; Yamada, S.; Katayama, Y.; Niidome, T. Stabilizing of Plasmid DNA in vivo by PEG-Modified Cationic Gold Nanoparticles and the Gene Expression Assisted with Electronic Pulses, *J. Control. Release*, **2006**, *111*, 382-389.
51. Dixit, V.; Van den Bossche, J.; Sherman, D.M.; Thompson, D.H.; Andres, R.P. Synthesis and Grafting of Thioctic Acid-PEG-Folate Conjugates onto Au Nanoparticles for Selective Targeting of Folate Receptor-Positive Tumor Cells, *Bioconjugate Chem.*, **2006**, *17*, 603-609.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายอมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Amornpun Sereemaspun
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1012 02250 52 5
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย ระดับ A-5)
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2256-4281 โทรสาร 0-2252-7028
5. ประวัติการศึกษา
แพทยศาสตรบัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
Doctor of Philosophy (Human Molecular Biology) Jichi Medical University,
JAPAN
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมัธยมศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Cell Biology, Molecular Genetics
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศโดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือ
ผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น
 - 7.1 ผู้อำนวยการแผนการวิจัย : ชื่อแผนการวิจัย : -
 - 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
 - 7.2.1 การตรวจหาเชื้อ *Leptospira* ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรค leptospirosis และเชื้อ *Helicobacter pylori* ในสารคัดหลั่งจากกระเพาะของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบ โดยวิธี Gold nanoparticles
 - 7.2.2 ศึกษาฤทธิ์ของไขมัน ที่มีผลต่อ การบาดเจ็บของเซลล์ตับ (hepatocyte) และเซลล์สเตลเลท (Stellate cell) ในโมเดลหนูทดลองที่ได้รับสารพิษต่อตับ carbon tetrachloride (CCl₄)
 - 7.2.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

1. Takeuchi K, Sereemaspun A, Inagaki T, Hakamata Y, Kaneko T, Murakami T, Takahashi M, Kobayashi E, Ookawara S. Morphologic characterization of green fluorescent protein in embryonic, neonatal, and adult transgenic rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003; 274(2):883-6.
 2. Sereemaspun A, Takeuchi K, Sato Y, Iwamoto S, Inakagi T, Ookawara S, Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E. Testosterone-dependent transgene expression in the liver of the CAG-lacZ transgenic rat. *Gene Expr.* 2005;12(4-6):305-13.
 3. Sereemaspun A, Takeuchi K, Iwamoto S, Ookawara S, Hakamata Y, Kobayashi E. Restoring Silenced Transgene Expression in the Female Rat Liver using Testosterone and 5-aza-2'-deoxycytidine. (submitted)
- 7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อแผนงานวิจัยหรือโครงการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย
- 7.4.1 การตรวจหาเชื้อ *Leptospira* ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรค leptospirosis และเชื้อ *Helicobacter pylori* ในสารคัดหลั่งจากกระเพาะของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบ โดยวิธี Gold nanoparticles
 ผู้วิจัยหลัก
 ได้ทำการวิจัยเสร็จแล้วประมาณร้อยละ 40
 - 7.4.2 การศึกษาฤทธิ์ของไขมัน ที่มีผลต่อ การบาดเจ็บของเซลล์ตับ (hepatocyte) และเซลล์สเตลเลท (Stellate cell) ในโมเดลหนูทดลองที่ได้รับสารพิษต่อตับ carbon tetrachloride (CCl₄)
 ผู้วิจัยหลัก
 ได้ทำการวิจัยเสร็จแล้วประมาณร้อยละ 40

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัยร่วม

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายโรจน์ฤทธิ์ โจรจนะเนศ
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Rojrit Rojanathanes
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1016 00004 56 7
- ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานมหาวิทยาลัย (อาจารย์ระดับ A5)
- หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2218-7632 โทรสาร 0-2218-7598
- ประวัติการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บริหารธุรกิจบัณฑิต มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช
วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมหาบัณฑิต) ระบุสาขาวิชาการ
Organic synthesis, Supramolecular chemistry
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศโดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือ
ผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น
 - ผู้อำนวยการแผนการวิจัย : ชื่อแผนการวิจัย : -
 - หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย : -
 - งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจ
มากกว่า 1 เรื่อง)
 - Sukwattanasinitt, M; Rojanathanes, R.; Jiwpanich, S.; Tuntulani, T.;
Ruangpornvisuti V. Selective Oxidation of
25,27-Bis-(3-formylphenoxyethoxy)-*p-tert*-butylcalix
[4]arene, *Science Asia*, 2002, 28, 25-28.
 - Sukwattanasinitt, M; Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Sritana-Anant,
Y.; Ruangpornvisuti V. Synthesis of Stilbene Crown Ether *p-tert*-
butylcalix[4]arenes, *Tetrahedron Lett.*, 2001, 42, 5291-5293.

3. Rojanathanes, R.; Pipoosananakaton, B.; Tuntulani, T.; Bhanthumnavin, W.; Orton, J. B.; Cole, S. J.; Hursthouse, M. B.; Grossel, M. C.; Sukwattanasinitt, M. Comparative Study of Azobenzene and Stilbene Bridged Crown Ether *p*-*tert*-butylcalix[4]arene, *Tetrahedron*, 2005, 61, 1317–1324.
 4. Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Bhanthumnavin, W.; Sukwattanasinitt, M. Stilbene-bridged *tert*-butylcalix[4]arene as photoswitchable molecular receptors, *Org. Lett.*, 2005, 7, 3401–404.
 5. Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Sukwattanasinitt, M. Synthesis of stilbene crown ether calix[4]arenes and their isomerization studies, 26th International Symposium on Macrocyclic Chemistry, 15–20 July 2001, Fukuoka, Japan.
 6. Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V.; Sukwattanasinitt, M. Selective oxidation of 25,27-di-(3'-formylphenoxyethoxy)-*p*-*tert*-butylcalix[4]arene, 26th Congress on Science and Technology of Thailand, 18–20 October 2000, Bangkok, Thailand.
 7. Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V.; Sukwattanasinitt, M. Synthesis of stilbene crown ether calix[4]arenes and their isomerization, 27th Congress on Science and Technology of Thailand, 16–18 October 2001, Songkla, Thailand.
 8. Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Bhanthumnavin, W.; Sukwattanasinitt, M. Synthesis of calixarene based photo-switchable ionophores, International Conference and Exhibition on Pure and Applied Chemistry (PACCON 2002), 29–31 May 2002, Bangkok, Thailand.
- 7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อแผนงานวิจัยและหรือโครงการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย
- 7.4.1 การพัฒนาฟิล์มเปลี่ยนสีตามอุณหภูมิจากอนุภาคนาโนของกรดไขมันไดอะเซทิลีน
- ผู้วิจัยร่วม

ได้ทำการวิจัยเสร็จแล้วประมาณร้อยละ 60

7.4.2 การสังเคราะห์และปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร

ผู้วิจัยร่วม

ได้ทำการวิจัยเสร็จแล้วประมาณร้อยละ 95

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวกนิษฐา ภัทรกุล
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Kanitha Patarakul
2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 2499 00005 28 0
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 8
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2564333 ต่อ 3632 โทรสาร 0-2525952
5. ประวัติการศึกษา
แพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Doctor of Philosophy (Microbiology) Georgetown University, USA
วุฒิปริญญาตรีที่มีความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาอายุรศาสตร์
อนุมัติบัตรผู้มีความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรมสาขาเวชศาสตร์
ครอบครัว
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Molecular Bacteriology
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศโดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้
ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น
 - 7.1. ผู้อำนวยการแผนการวิจัย : ชื่อแผนการวิจัย : -
 - 7.2. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
 - 7.2.1 การตรวจหาเชื้อ *Leptospira* ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรค leptospirosis โดยวิธี
polymerase chain reaction (PCR)
 - 7.2.2 การสำรวจแบบ cross-sectional เพื่อหาอัตราการล้างมือและทัศนคติต่อการ
ล้างมือก่อนการสัมผัสผู้ป่วยของบุคลากรทางการแพทย์และผู้เข้าเยี่ยมผู้ป่วย
ในหอผู้ป่วยวิกฤตโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

- 7.2.3 การศึกษาความเหมือนกันของยีน *mce* และ *invA* ระหว่างเชื้อ *Leptospira interrogans* serovars ต่างๆ และการแสดงออกของยีน *in vivo*
- 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)
1. Patarakul K, Cole MF, Hughes CAN. Complement resistance in *Borrelia burgdorferi* strain 297: outer membrane proteins prevent MAC formation at lysis susceptible sites. *Microbial Pathogenesis*. 1999; 27:25-41.
 2. Patarakul K, Lertpocasombat K. Detection of pathogenic leptospiral DNA in urine by polymerase chain reaction. *J Med Assoc Thai* 2004; 87(Suppl2): S134-9.
 3. Patarakul K, Tan-Khum A, Kanha S, Padungpean D, and Jaichaiyaphum O. Cross-sectional survey of hand-hygiene compliance and attitudes of health care workers and visitors in the intensive care units at King Chulalongkorn Memorial Hospital. *J Med Assoc Thai* 2005; 88 (Suppl 4):S287-93.
 4. Chirathaworn C, Patarakul K, Saksit V, Poovorawan Y. Binding of *Leptospira* to extracellular matrix proteins. *J Med Assoc Thai* 2006 (submitted)
- 7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อแผนงานวิจัยและโครงการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย
- 7.4.1 การศึกษาความเหมือนกันของยีน *mce* และ *invA* ระหว่างเชื้อ *Leptospira interrogans* serovars ต่างๆ และการแสดงออกของยีน *in vivo*
 ผู้วิจัยหลัก
 ได้ทำการวิจัยเสร็จแล้วประมาณร้อยละ 90
- 7.4.2 การศึกษาความชุกและผลการรักษาของผู้ป่วยที่มาด้วยอาการไข้แบบเฉียบพลันและมีการเพาะแยกเชื้อจากเลือดให้ผลบวกโดยได้รับการรักษาแบบผู้ป่วยนอกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
 ผู้วิจัยหลัก
 ได้ทำการวิจัยเสร็จแล้วประมาณร้อยละ 60

ประวัติผู้วิจัยร่วมคนที่ 2

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวณัฐพร พิมพะ
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Nuttaporn Pimpha
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
- ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย
- หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร
ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
โทรศัพท์ 0-2564-7000 ต่อ 6551
- ประวัติการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Organic synthesis, Polymer synthesis, Photocatalysis
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศโดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้
ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น
 - ผู้อำนวยการแผนการวิจัย : ชื่อแผนการวิจัย : -
 - หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย : -
 - งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจ
มากกว่า 1 เรื่อง)
 - Pimpha, N; Harris F.W.; Tantayanon, S. Synthesis and optical property of
a novel fluorescent poly(aryl ether) containing 4-chloro-2,5-
diphenyloxazole, *Abs. J.Am. Chem. Soc.*, 2004, 227, U358.
 - Pimpha, N.; Tantayanon, S.; Harris, F. Synthesis and characterization of a
novel poly(aryl ether) containing 4-chloro-2,5-diphenyloxazole,
Macromol. Symp., 2004, 216, 109–115.
 - งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อแผนงานวิจัยและหรือโครงการวิจัย และสถานภาพในการทำ
วิจัย

7.4.1 การสังเคราะห์และปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร
ผู้วิจัยหลัก

ได้ทำการวิจัยเสร็จแล้วประมาณร้อยละ 95

7.4.2 การออกแบบและพัฒนาระบบนำส่งยีนโดยใช้อนุภาคAmphiphilic Core-shell ขนาดนาโนเมตร

ผู้วิจัยหลัก

ได้ทำการวิจัยเสร็จแล้วประมาณร้อยละ 60

ประวัติผู้วิจัยร่วมคนที่ 3

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางดวงพร พูลสุขสมบัติ

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Duangporn Phulsuksombati

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1017 01467 85 6

3. ตำแหน่งปัจจุบัน พันโทหญิง

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาชีวเคมี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร กรมแพทย์ทหารบก

โทรศัพท์ 0-2644-8091 โทรสาร 0-22450456

5. ประวัติการศึกษา

สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

M.Sc. (Public Health) มหาวิทยาลัยมหิดล

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมัธยมศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
ชีวเคมี

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศโดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้
ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนการวิจัย : ชื่อแผนการวิจัย :-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 การศึกษาความชุกและการกระจายตัวของโรค Leptospirosis ในประเทศ
ไทย

7.2.2 Health Problem among the Royal Thai Army Personnel in
Metropolitan of Bangkok and Perimeters

7.2.3 การศึกษาความชุกและการกระจายของโรค Scurb Typhus ของประเทศไทย

7.2.4 การศึกษาพยาธิสภาพของ Leptospirosis ในหนู Hamster

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

1. Tunsuphasiri U, Deepradit S, Phulsuksombati D, Tangkanakul W. A Test Strip IgM Dot-Elisa Assay Using *Leptospira* Antigen of Endemic Strains for Serodiagnosis of Acute Leptospirosis. *J Med Assoc Thai* 2005; 88: 391-397.
2. Tunsuphasiri U, Deepradit S, Phulsuksombati D, Tangkanakul W. Two sample Immunoassays Using Endemic Leptospiral Antigens for Serodiagnosis of Human Leptospirosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36 (2); 302-311
3. Phulsuksombati D, Utainnam D. Health Problem among the Royal Thai Army Personnel in Metropolitan of Bangkok and Perimeters, 2003. Proceeding of The 32nd Rama the Sixth Hospital Annual Medicine Conference;2004 Nov 24-26: Bangkok, Thailand.
4. Lerdthusnee K, Khunirat B, Leepitakrat W, Tansakul P, Monkanna T, Khlaimanee N, Inlao I, Kengluetcha A, Mungviriyaya S, Chandranol K, Krairojananan P, Bodhidatta D, Rodkwamthook W, Phulsuksombati D, Sangjun N, Watcharapichat P, Jones J.W., and Coleman R.E. Vector Competence of *Leptotrombidium chiangraiensis* Chiggers and Transmission Efficacy and Isolation of *Orientia tsutsugamushi*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003; 990; 25-35
5. Coleman R. E., Monkanna T, Linthicum K. J., Strickman D. A., Frances S. P., Tanskul P, Kollars T. M., Jr., Inlao I, Watcharapichat P, Khlaimanee N, Phulsuksombati D, Sangjun N, Lerdthusnee K. Occurrence Of *Orientia Tsutsugamushi* In Small Mammals From Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2003
6. Nitatpattana N, Henrich T, Palabodeewat S, Tangkanakul W, Phulsuksombati D, Chauvancy G, Barbazan P, Yoksan S, Gonzalez J. Hantaan Virus Antibody Prevalence in Rodent Populations of Several

- Provinces of Northeastern Thailand. *Tropical Medicine and International Health* 2002; 7(10): 840-845.
7. Pilakasiri K, Phulsuksombati D, Muensoongnoen J, Sangjan N, Sripaoraya K, Koedpuech K, Pilakasiri C. A Microanatomical Study of the Olgans of Hamsters (*mesocricetus auratus*) Infected with *Leptospira interrogans*, serovars Pyrogenes Which Caused an Outbreak in Thailand 1999. *Siriraj Hosp Gaz* 2001; 53(12): 887-905.
 8. Phulsuksombati D, Sangjun N, Khoprasert Y, Kingnate D, Tangkanakul W. Leptospire in Rodent, Northeastern Thailand 1999-2000. *Journal of Health Science* 2001; 10: 516-525.
 9. Kollars T.M., Tippayachai B, Phulsuksombati D, Bodhidatta D, Lerdthusnee K, Parrish J, Coleman R.E. Variation in Weight Loss in *Mus musculus* (Rodentia) Fed Upon by *Leptotrombidium chiangraiensis* and *Leptotrombidium imphalum* (Acari: trombicuridae) Infected with Two Strains of *Orientia tsutsugamushi* (Rickettsia). *Internat. J. Acarol.* 2000; 26(2): 173-176.
 10. Tangkanakul W, Sangjun N, Phunlar P, Phulsuksombati D. Evaluation of Lepto Latex Test for Diagnosis of Leptospira. *Monthly Epidemiological Surveillance Report, Division of Epidemiology, MOPH* 2001;33:45-50.
 11. Phulsuksombati D, Sangjun N, Tangkanakul W, Sudsaward Y, Chumchat P. Prevalence of Leptospiral Antibody among Military Recruits, Khon Kaen, 1999.
 12. *Royal Thai Army Medical Journal* 2001; 54(3): 209-14.
 13. Phulsuksombati D, Sangjun N, Khoprasert Y, Kingnate D, Tangkanakul W. Leptospire in Rodent, Northeastern Thailand 1999-2000. *Journal of Health Science* 2001; 10: 516-525.
 14. Tharmaphornpil P, Plikaytis BD, Bragg S, Phulsuksombati D, Choomkasien P, Kingnate D, Ashford DA. Risk Factors Associated with Leptospirosis in Northeastern Thailand, 1988. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63(3,4): 204-208.

15. Watt G, Kantipong P, Jongsakul K, Watcharapichat P, **Phulsuksombati D**, Strickman D. Doxycycline and rifampicin for mild scrub-typhus infections in northern Thailand: a randomized trial. *Lancet* 2000; 356: 1057-1061.
16. Frances SP, Watcharapichat P, **Phulsuksombati D**, Tanskul P. Transmission of *Orientia tsutsugamushi*, the Aetiologic Agent for Scrub Typhus, to Co-feeding Mites. *Parasitology* 2000; 120: 601-607
17. Nitatpattana N, Chauvancy G, Dardaine J, Poblap T, JuronsawatK, Tangkanakul W, **Phulsuksombati D**, Yoksan S, Gonzalez JP. Serological Study of Hantavirus in the Rodent Population of Nakorn Pathom and Nakhon Ratchasima Province Thailand. *Southeast Asia J Trop Med* 2000; 31(2):277-282
18. **Phulsuksombati D**, Sangjun N, Khoprasert Y, Suwanjaroen D, Tangkanakul W. Situation of Leptospirosis in Thailand and survey of *Leptospira* in Major Animal Reservoirs. Proceeding of The 10th Annual Asia-Pacific Military Medicine Conference;2000 May 7-12: Singapore.
19. **Phulsuksombati D**, Tangkanakul W, Kingnate D, Sangjun N, Khoprasert U, Hamarit k. Isolation of *Leptospira* from Wild Rodents in Nakornratchasima Province, 1998. *Journal of Health Science* 1999; 8(3): 360-369.
20. **Phulsuksombati D**, Tangkanakul W, Kingnate D, Sangjun N. Re-emergence of Leptospirosis in Thailand. Proceeding of the 9th Annual Asia-Pacific Military Medicine Conference;1999 March 7-12: Bangkok.
21. Tansuphasiri U, **Phulsuksombati D**, Vathanophas K, Dejsirilert S. Rapid Detection of *Haemophilus influenzae* Type b by PCR. *Sriraj Hosp Gaz* 1999; 51(8): 597-609.
22. Tansuphasiri U, **Phulsuksombati D**. Comparison of PCR-Enzyme Immunoassay with Other Three Conventional Assays for Detection of *Haemophilus influenzae* Type b PCR products. *Thai J Epidemiol* 1999; 7(3): 89-102.

23. Tansuphasiri U, Phulsuksombati D. Development of PCR-ELISA for Rapid Detection of *Haemophilus influenzae* Type b in Seeded Cerebrospinal Fluid Samples. *Chula Med J* 1999; 43(11): 797-812.
 24. Frances SP, Watcharapichat P, Phulsuksombati D, Tanskul P, Linthicum KJ.. Seasonal Occurrence of *Leptotrombidium deliense* (Acari: Trombiculidae) Attracted to Sentinel Rodents in an Orchard near Bangkok, Thailand. *J. Med. Entomol* 1999; 39(6): 869-874.
 25. Frances SP, Watcharapicht P, Phulsuksombati D, Tanskul P. Occurrence of *Orientia tsutsugamushi* in Chiggers (Acari: Trombiculidae) and Small Animals in an Orchard Near Bangkok, Thailand. *J. Med. Entomol* 1999; 36(4): 449-453.
 26. Tanskul P, Linthicum KJ, Watcharapichat P, Phulsuksombati D, Mungviriyaya S, Ratanatham S, Suwanabun N, Satabongkot J, Watt G.
 27. A New Ecology for Scrub Typhus Associated with a Focus of Antibiotic Resistance in Rice Farmers in Thailand. *J. Med. Entomol* 1998; 35(4): 551-555.
 28. Watt G, Chouriyagune C, Ruangweerayud R, Watcharapichat P, Phulsuksombati D, Jongsakul K, Teja-Isavadpharm P, Bhodhidatta D, Corcoran KD, Dasch GA, Strickman D. Scrub Typhus Infections Poorly Responsive to Antibiotics in Northern Thailand. *Lancet* 1996; 348(13): 86-89.
 29. Stricman D, Smith CD, Corcoran KD, Ngampochjana M, Watcharapichat P, Phulsuksombati D. Pathology of *Rickettsia tsutsugamushi* infection in *Bandicota savilei*, A Natural Host in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 51(4): 416-423.
- 7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อแผนงานวิจัยและหรือโครงการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย
- 7.4.1 Study of pathology and pathogenesis of leptospirosis in an animal model inoculated with various *in vivo* passages of leptospire: implications for vaccine development and diagnosis.

ผู้วิจัยร่วม

- 7.4.2 An evaluation of the topical hemostatic effect and wound healing process of blend of carboxymethylchitosan and alginate in Wistar Rats.

ผู้วิจัยหลัก

- 7.4.3 Comparison of hydrogel biomaterial preparation from silk waste proteins and commercial product (Cutinova hydro[®]) for deep wound healing in guinea pig.

ผู้วิจัยหลัก

ประวัติผู้วิจัยร่วมคนที่ 4

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายวันลา กุลวิชิต
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Wanla Kulwichit
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1015 00392 70 1
- ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330
โทรและโทรสาร 0-2256-4578 ต่อ 105
e-mail: wanla.k@chula.ac.th, wkulwich@gmail.com
- ประวัติการศึกษา
แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับสอง) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วุฒิปัตริ์ผู้เชี่ยวชาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาวิชาอายุรศาสตร์
Certificate of Fellowship in Infectious Diseases, University of North Carolina School of Medicine (clinical and research fellowship years 2535-2543)
อนุมัติบัตรผู้เชี่ยวชาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาวิชาอายุรศาสตร์โรคติดเชื้อ
- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิปัตริ์การศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
ไวรัสวิทยาคลินิก พยาธิวิทยาโมเลกุล และจุลชีววิทยาคลินิก
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วม
วิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

- 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย
- 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
- 7.2.1 Characterization of viral infections in human tissues, Part I: Roles of enteroviral species and/or strains in the infection of normal hearts, myocarditis, and dilated cardiomyopathy.
- 7.2.2 Diagnostic accuracy of commercial kits in the identification of catalase-negative Gram positive coccobacilli
- 7.2.3 Quantitation of Dengue Virus in Peripheral Blood of Patients with Acute Infection: Viral Load in Serum/Plasma V.S. Peripheral Blood Leukocytes-Which One better predicts Severity and Outcome?
- 7.2.4 Impact of antimicrobial use in food animals on serious human infections caused by antimicrobial-resistant *Salmonella*
- 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)
1. Chayakul P, Ovarlarnporn B, Kulwichit W, Piratvisut T, Kunasakdakun A. Intestinal Capillariasis: Report of 2 cases from the Southern Thailand. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 1988; 5: 187-90.
 2. Chayakul P, Silpapojakul K, Krisanapan S, Kulwichit W. Leptospirosis: Clinical Manifestations in a Recent Outbreak. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 1989; 6: 194-201.
 3. Ovarlarnporn B, Kulwichit W, Hiranniramol S. Medication-Induced Esophageal Injury: Report of 17 cases with Endoscopic Documentation. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 748-50.
 4. Ovarlarnporn B, Kulwichit W. Tetracycline-Induced Esophageal Ulcer: A Condition That Is Probably More Common Than It Appears To Be. *J Med Assoc Thai* 1991; 74: 443-7.
 5. Kulwichit W, Wehbie RS. The Impact of Human Immunodeficiency Virus on Syphilis. *Res Staff Phys* 1994; 40(suppl 1):24-6.
 6. Kulwichit W. Antiviral Chemoprophylaxis After Occupational Exposure to Human Immunodeficiency Virus. *Am J Ophthalmol* 1998; 125: 328.

7. Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raab-Traub N. Expression of the Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces B Cell Lymphoma in Transgenic Mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11963-8.
แหล่งทุน National Institutes of Health (Viral Program Projects) – University of North Carolina สหรัฐอเมริกา
8. Uchida J, Yasui T, Takaoka-Shichijo Y, Muraoka M, Kulwichit W, Raab-Traub N, Kikutani H. Mimicry of CD40 Signals by Epstein-Barr Virus LMP1 in B Lymphocyte Responses. *Science* 1999; 286: 300-3.
แหล่งทุน National Institutes of Health (Viral Program Projects) University of North Carolina สหรัฐอเมริกา และทุนสถาบันวิจัย ประเทศญี่ปุ่น
9. Kulwichit W. Malaria in a Trinidadian Man. *N Engl J Med* 2000; 343: 1046-7.
10. Amador-Zarco JJ, Mora-Tiscareno A, Sangri-Pinto AG, Braun-Roth G, Dressler LG, Kulwichit W, Van Dyke T, Calderon-Garciduenas L. Nasal squamous cell carcinoma in a child *J Otolaryngol* 2002; 31: 45-9.
แหล่งทุน National Institute for Environmental Health Sciences (NIEHS), NIH, สหรัฐอเมริกา
11. Pancharoen C, Kulwichit W, Tantawichien T, Thisyakorn U, Thisyakorn C. Dengue infection: a global concern. *J Med Assoc Thai* 2002; 85 suppl 1: S25-33.
12. Tanyaowaiak W, Sunthornyothin S, Luengtaviboon K, Suankratay C, Kulwichit W.* Mycotic Aneurysm Caused by *Burkholderia pseudomallei* with Negative Blood Cultures. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 68-70. * = corresponding author
แหล่งทุน ทุนวิจัยอาจารย์ใหม่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ทุนส่งเสริมบัณฑิต มูลนิธิอานันท์มหาราช และทุนพัฒนาอาจารย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. Kulwichit W, Torranin P. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, Vitamin K, and Ambiguity in Medical Textbooks. *Acta Haematol* 2004; 111: 173-4.
แหล่งทุน ทุนวิจัยอาจารย์ใหม่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ทุนส่งเสริมบัณฑิต
มูลนิธิอานันทมหิดล และทุนพัฒนาอาจารย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย
14. Kulwichit W. First-line and second-line antiretroviral therapy. *Lancet* 2004; 364: 329-30.
15. Kulvichit K, Kulwichit W, Lumbiganon P. Clinical Trial Registration. *N Engl J Med* 2005; 352: 198-9.
16. Bronnert J, Malhotra C, Suavansri K, Hanvesakul R, Kulwichit W, Wilde H. Complete Ptosis Caused by Dengue Fever. *Lancet* 2005;366:1982.
17. Pupaibool J, Chindamporn A, Patarakul K, Suankratay C, Sindhuphak W, Kulwichit W.* Human Pythiosis. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 517-8.
18. Thornburg NJ*, Kulwichit W*, Edwards RH*, Shair KHY, Bendt KM, Raab-Traub N. LMP1 Signaling and Activation of NF-KB in LMP1 Transgenic Mice. *Oncogene* 2006; 25: 288-97.
19. Incomserb P, Bhattarakosol P, Kulwichit W, Chantratita W, Hansasuta. Establishment of real-time polymerase chain reaction-based assay for quantitation of Epstein-Barr virus DNA in healthy donors and in patients with EBV associated lymphomas. *J Med Assoc Thai* 2005; 88 suppl 4: S280-6.
20. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, Chaiprasert A, Assanasen P, Saipetch M, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Lekhakula A, Mitarnun W, Kalnauwakul S, Supparatpinyo K, Chaiwarith R, Chiewchanvit S, Tananuvat N, Srisiri S, Suankratay C, Kulwichit W, Wongsaisuwan M, Somkaew S. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis* 2006;43(5):569-76.

ผลงานวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุมระดับชาติและนานาชาติ

1. Raab-Traub N, Kulwichit W, Edwards RH. Expression of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 in Transgenic Mice. *J Cell Biochem* 1994; 18(C): 233. (Keystone Symposium)
2. Raab-Traub N, Kulwichit W, Edwards RH, Miller W, Paine E, Flynn K, Sadler R, Pathmanathan R. Expression of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 in Epithelial Cells and in Transgenic Mice. The VI International Conference on Epstein-Barr Virus And Associated Diseases. Cold Spring Harbor Laboratory, Long Island, NY, USA. September 7-11, 1994.
3. Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Raab-Traub N. Lymphoid Hyperplasia and Malignancies in LMP1 Transgenic Mice. The VII International Conference on Epstein-Barr Virus And Associated Diseases. Hong Kong, November 13-16, 1996.
4. Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Raab-Traub N. LMP1 Transgenic Mice Develop Lymphoma, with Increased Expression of Several Oncogenes. The XXII International Herpes Virus Workshop. San Diego, CA, USA. August 2-8, 1997.
5. Kulwichit W, Edwards RH, Bendt KM, Raab-Traub N. LMP1 Transgenic Mouse Lymphomas: Activation of NF- κ B and JNK Signaling Pathways Without Mutations in p53. The XXV International Herpes Virus Workshop, Portland, OR, USA. July 29-August 4, 2000.
6. Kulwichit W*, Mekmullica J, Yapom R, Intaraprasong P, Mutirangura A, Nisalak A, Pancharoen C, Thisyakorn U. Diagnosis of dengue infection by reverse transcription-nested polymerase chain reaction in urine specimens. The 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases. Pattaya, Thailand. November 10-13, 2002.
7. Kulwichit W*, Mekmullica J, Krajiw S, Prommalikit O, Yapom R, Intaraprasong P, Arunyingmongkol, Suandork P, Sittichai R, Sakdikul S, Mutirangura A, Pancharoen C, Thisyakorn U, and Nisalak A. Highly-

- sensitive Virologic Diagnosis of Dengue Infection by A Newly-Developed Protocol of Reverse Transcription-Nested Polymerase Chain Reaction (RT-nested PCR) of Serum/Plasma, Peripheral Blood Leukocyte (PBL), and Urine Specimens. The 41st Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. San Diego, CA, USA. October 9-12, 2003.
8. Jaimchariyatam N, Chatsuwan T, Nilgate S, Chongthaleong A, Chindamporn A, **Kulwichit W.*** Mixed Bacterial Meningitis due to a Co-infection with *Enterococcus faecalis* and *Neisseria meningitides* in an HIV-infected Patient. 29th Annual Meeting of The Infectious Diseases Association of Thailand. Hua-Hin, Prachuabkirikhan, Thailand October 4-7, 2003.
 9. Srisawat N, Tanyaowalak W, Bhattarakosol P, Hemachudha T, **Kulwichit W.*** Detection of Herpes simplex DNA in Cerebrospinal Fluid of a Patient with Normal CSF Parameters and Radiographic Examinations. 29th Annual Meeting of The Infectious Diseases Association of Thailand. Hua-Hin, Prachuabkirikhan, Thailand October 4-7, 2003.
 10. Suandork P, **Kulwichit W.***, Arunyingmongkol K, Krajiw S, Prommalikit O, Pancharoen C, Nisalak A, Thisyakorn U. Diagnosis of Dengue Virus Infection by Detection of Specific Immunoglobulin in Oral Fluid. 11th International Congress on Infectious Diseases. Cancun, Mexico. March 4-7, 2004.
 11. Prommalikit O, **Kulwichit W.***, Arunyingmongkol K, Krajiw S, Suandork P, Pupaibool J, Jaimchariyatam N, Pancharoen C, Nisalak A, Thisyakorn U. Detection of Urinary Antibody as a Tool for Diagnosis of Dengue Infection. 11th International Congress on Infectious Diseases. Cancun, Mexico. March 4-7, 2004.
 12. Srisawat N, Nilgate S, Krajiw S, Unhasuta C, Chongthaleong A, **Kulwichit W.*** Inaccuracies on Leuconostoc Identification by Analytical Profile Index (API) Systems. 44th Interscience Conference on

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, D.C. USA.
October 30- November 2, 2004.

13. Pupaibool J, Jaimchariyatam N, Suandork P, Prommalikit O, Sittichai R, Krajiw S, Arunyingmongkol K, Pancharoen C, Thisyakorn U, **Kulwichit W.*** Diagnosis of dengue infection by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-nested polymerase chain reaction from dried urine spots on filter paper. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark. April 2-5, 2005.
14. Jaimchariyatam N, Pupaibool J, Krajiw S, Arunyingmongkol K, Suandork P, Prommalikit O, Sittichai R, Nisalak A, Pancharoen C, Thisyakorn U, **Kulwichit W.*** Diagnosis of dengue infection by reverse transcription-nested polymerase chain reaction and enzyme linked immunosorbent assay using whole blood stored on filter paper. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Copenhagen, Denmark. April 2-5, 2005.

This work received ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Award for selected high-quality abstracts.
15. **Kulwichit W.**, Nilgate S, Krajiw S, Srisawat N, Unhasuta C, Chongthaleong A. Enigmatic *Leuconostoc* and *Lactobacillus* Infections. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Copenhagen, Denmark. April 2-5, 2005.
16. Pungjitprapai A, Chatsuwan T, Lertpocasombat K, Unhasuta C, Chongthaleong A, **Kulwichit W.*** Resistance Without Sacrificing Virulence: The Growing Problem of Ciprofloxacin and Cephalosporin Resistance in Invasive Salmonellosis. Annual Scientific Meeting of The Infectious Disease Association of Thailand October 15-18, 2005; Pattaya, Thailand.
17. **Kulwichit W.**, Chatsuwan T, Unhasuta C, Pulsrikarn C, Bangtrakulnonth A, Chongthaleong A. Nontyphoidal *Salmonella* invasive bloodstream

infections resistant to quinolone and/or an extended spectrum cephalosporin in a country with extensive use of these antimicrobials in food animals. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Nice, France, April 1-4, 2006.

18. Jaimchariyatam N, Kawkitinarong K*, Naweewitphadung K, Udomsantisuk N, Tumwasorn S, **Kulwichit W***, Diagnosis of tuberculous pleuritis by nested polymerase chain reaction: a comparison of four different volumes of pleural fluid. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Nice, France, April 1-4, 2006.

19. Pupaibool J, Krajiw S, Arunyingmongkol K, Nisalak A, Pancharoen C, Thisyakorn U, **Kulwichit W.*** Diagnosis of dengue infection by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction from oral specimens. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Nice, France, April 1-4, 2006.

This work received ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Award for selected high-quality abstracts.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่า ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

7.3.1 Characterization of viral infections in human tissues, Part I: Roles of enteroviral species and/or strains in the infection of normal hearts, myocarditis, and dilated cardiomyopathy.

แหล่งทุน มูลนิธิกระจกเงาชาฮี (ผ่านทางจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ทำวิจัยลุล่วงไปแล้ว 95%

7.3.2 การศึกษาความเป็นไปได้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี ด้วยการตรวจหาแอนติบอดีในสิ่งคัดหลั่งในช่องปากและปัสสาวะ

แหล่งทุน ทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ร่วมกับสกอ.

ทำวิจัยลุล่วงไปแล้ว 15%

- 7.3.3 Impact of quinolone use in food animals on serious human infections caused by ciprofloxacin-resistant *Salmonella*
แหล่งทุน ทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2550
ทำวิจัยลุล่วงไปแล้ว 95%

ประวัติผู้วิจัยร่วมคนที่ 5

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายจักรวาล สังฆพรหม
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chakrawan Sangkaprom
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 3309 00698 00 6
- ตำแหน่งปัจจุบัน นายแพทย์ 6
- หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
โรงพยาบาลกาบเชิง อ.กาบเชิง จ.สุรินทร์
โทรศัพท์ 0-4455-9002
e-mail: chakrawan@hotmail.com
- ประวัติการศึกษา
แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Health promotion, Health prevention
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วม
วิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย
อุบัติการณ์ไข้ไม่ทราบสาเหตุในโรงพยาบาลกาบเชิง
หัวหน้าโครงการ

ประวัติผู้วิจัยร่วมคนที่ 6

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายธเนศ สิ้นสงสุข
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Thanee Sinsongsuk
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1004 00032 77 9
- ตำแหน่งปัจจุบัน นายแพทย์ 6 หัวหน้ากลุ่มงานอาชีวเวชกรรม
- หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร e-mail

กลุ่มงานอาชีวเวชกรรม โรงพยาบาลสมุทรปราการ จ.สมุทรปราการ
โทรศัพท์ 081-611-6004
e-mail: thanes9@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

แพทยศาสตรบัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (อาชีวเวชศาสตร์)
วุฒิปัตร์แพทย์เฉพาะทาง เวชศาสตร์ป้องกัน (แขนงอาชีวเวชศาสตร์)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา การ
Health promotion, Occupational Medicine

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วม
วิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนการวิจัย : ชื่อแผนการวิจัย :-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย :

7.2.1 ศึกษาสถานการณ์การให้บริการอาชีวอนามัยในภาคอุตสาหกรรม ในจังหวัด
สมุทรปราการ

7.2.2. ศึกษาสถานการณ์ใช้เข็มพลันไม่ทราบสาเหตุ และใช้ไม่ทราบสาเหตุใน
ภาคอุตสาหกรรม ในเขตจังหวัดสมุทรปราการ

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจ
มากกว่า 1 เรื่อง)

Sinsongsook T, Taptagaporn S, Jiamjarasrangi W. Association of work-
related factors and shoulder pain among hospital nursing personnel. Chula
Med J 2005 Feb; 49(2): 61 - 72

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อแผนงานวิจัยและหรือโครงการวิจัย และสถานภาพในการทำ
วิจัย

7.4.1 ศึกษาสถานการณ์การให้บริการอาชีวอนามัยในภาคอุตสาหกรรม ในจังหวัด
สมุทรปราการ
หัวหน้าโครงการวิจัย

7.4.2 ศึกษาสถานการณ์ใช้เข็มพลันไม่ทราบสาเหตุ และใช้ไม่ทราบสาเหตุใน
ภาคอุตสาหกรรม ในเขตจังหวัดสมุทรปราการ

ประวัติผู้วิจัยร่วมคนที่ 7

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวมาลี เตชพรุ่ง
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Malee Techapornroong
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3-1006-02369-40-5
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นายแพทย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
กลุ่มงานอายุรกรรม โรงพยาบาลพระปกเกล้า จ.จันทบุรี
โทรศัพท์ 039-324-975 ต่อ 2700, 085-810-0150
e-mail: malee47t@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา
แพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วุฒิปัตรมัธยมศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 11 วิชาชีววิทยา
อนุปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาสาธารณสุขศาสตร์
ชื่อ
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
อายุรศาสตร์โรคติดเชื้อ, เวชศาสตร์ชุมชน
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วม
วิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย
 - 7.1 ผู้อำนวยการแผนการวิจัย : ชื่อแผนการวิจัย : -
 - 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย : -
 - 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)
 - 7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อแผนงานวิจัยและหรือโครงการวิจัย และสถานภาพในการทำ
วิจัย
 - 7.4.1 Program for HIV Prevention and Treatment, Institut de Recherche
pour le Developpement Research Group
ผู้วิจัยร่วม
 - 7.4.2 ใช้ไม่ทราบสาเหตุในรพ. พระปกเกล้า จ. จันทบุรี
ผู้วิจัยร่วม