

# 1. บทนำ (Introduction)

## โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ (Fever of Unknown origin)

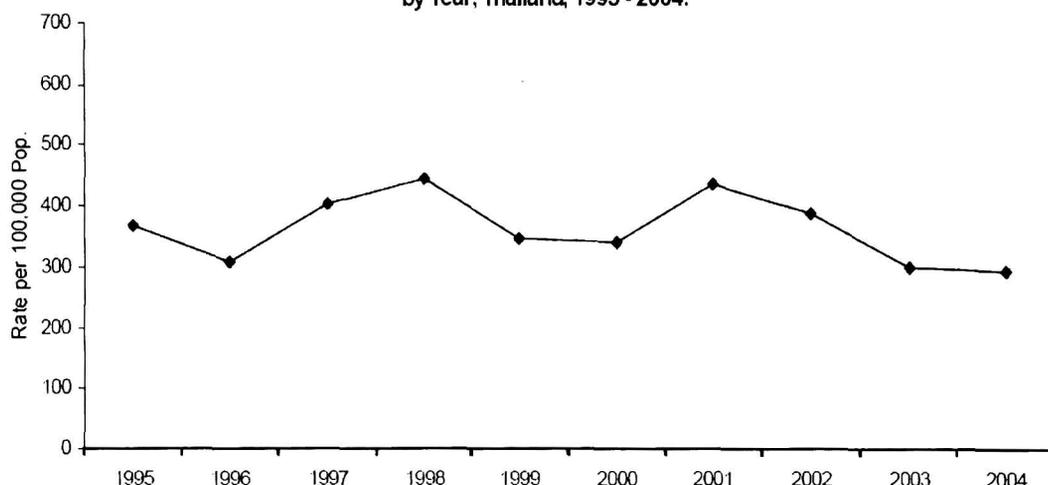
โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ (Fever of Unknown Origin, FUO) เป็นกลุ่มอาการของ โรคที่มาด้วยไข้ ไม่สามารถวินิจฉัยได้ในเวลาอันสั้น ไข้ชนิดนี้มักเป็นอยู่นานและไม่หายเอง การวินิจฉัยโรคนี้ ต้องเข้าเกณฑ์ตามคำจำกัดความของไข้ไม่ทราบสาเหตุ ครบทั้งสามข้อ [1] คือ

- 1) วัดอุณหภูมิร่างกายได้สูงกว่า  $38.3^{\circ}$  เซลเซียส ( $101^{\circ}$  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 สำนักระบาดวิทยา 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 ซึ่งเป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดที่ทำให้เกิดโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ มีการสำรวจ ในต่างประเทศ มักพบเป็นฝี/หนองในช่องท้อง การติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ชนิดมีโรคแทรกซ้อน (complicated urinary tract infection) เป็นปัญหาที่สำคัญ [4] (ตารางที่ 1.1) อูบติการณของโรคติดเชื้อเหล่านี้จะเปลี่ยนไปตามสถานที่ต่างๆ 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

<b>Infection</b>
Intraabdominal abscess (eg. peritonsillar, diverticular, subphrenic); liver, splenic, pancreatic, perinephric, psoas, or placental abscess
Appendicitis, cholecystitis, choledochitis, 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, <i>Mycobacterium avium</i> complex, leprosy, Lyme disease, relapsing fever ( <i>Borrelia recurrentis</i> ), syphilis, Q fever, legionellosis, yersiniosis
Salmoneellosis (including typhoid fever), listeriosis, <i>Campylobacter</i> , brucellosis, tularemia, bartonellosis, ehrlichiosis, psittacosis, <i>Chlamydia pneumoniae</i> , murine typhus, scrub typhus
Gonococcaemia, meningococcaemia
Actinomycosis, nocardiosis, melioidosis, Whipple's disease ( <i>Tropheryma whippelii</i> )
Candidaemia, cryptococcosis, histoplasmosis, coccidioidomycosis, blastomycosis, sporotrichosis, aspergillosis, mucormycosis, <i>Malassezia furfur</i> , <i>Pneumocystis carinii</i>
Visceral leishmaniasis, malaria, babesiosis, toxoplasmosis, schistosomiasis, fascioliasis, toxocarosis, amoebiasis, infected hydatid cyst, trichinosis, trypanosomiasis
Cytomegalovirus, HIV, <i>Herpes simplex</i> , 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 <sup>a</sup>	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].

<sup>a</sup> 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 มีการศึกษาหาสาเหตุของไข้ในผู้ป่วย 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 ออกเดงกี 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 คือการช่วยลดการใช้ยา และอุปกรณ์ในการวินิจฉัยและรักษาโรค และเป็นประโยชน์ด้านสังคมและความมั่นคงของ ประเทศชาติด้วย การประเมินผู้ป่วยจะเริ่มตั้งแต่ซักประวัติอย่างละเอียด ตรวจร่างกายซ้ำๆทุกวัน การสืบค้นทางห้องปฏิบัติการและการเอกซเรย์ [9]

ในแง่การสืบค้นทางห้องปฏิบัติการนั้น ถือเป็นหัวใจในการตรวจหาสาเหตุของไข้ และการวัดระดับความรุนแรงของโรคซึ่งใช้ในการติดตามผลการรักษาด้วย [10] โดยส่วนใหญ่แล้ว การตรวจที่ถือว่าเป็นมาตรฐาน(gold standard) คือการตรวจโดยการเพาะเชื้อในกรณีเชื้อ 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 บุคลากรที่มี ความชำนาญในการตรวจสอบ และต้องรอเวลาที่จะตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ antibody titer ซึ่งส่วนใหญ่ ต้องใช้เวลานานหลังตรวจพบว่ามีผู้ป่วย ผลบวกของ antibody titer มักตรวจพบ หลังการป่วยรุนแรงใน ระยะแรกหายไปแล้ว โดยสรุป การตรวจหาสาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุ ทำได้ในขอบเขตที่จำกัด และไม่สามารถตรวจค้นหาสาเหตุของไข้ได้ในทุกโรคจากห้องปฏิบัติการ บางครั้งยังไม่สามารถวินิจฉัยสาเหตุของ ไข้แม้ผู้ป่วยจะถึงแก่กรรมแล้ว [15]

จากข้อมูลข้างต้นและปัญหาเกี่ยวกับการวินิจฉัยสาเหตุของไข้ข้างต้น โครงการวิจัยนี้จึงสนใจจะศึกษาและพัฒนาวิธีวินิจฉัยสาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุในส่วนใหญ่ที่เกิดจากโรคติดเชื้อ 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 โดยไม่ต้องตรวจด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของDNAเพื่อตรวจสอบ ดังที่ ต้อง ทำในการตรวจ Polymerase Chain Reaction (PCR) ชุดตรวจเชื้อก่อโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่ ถูกผลิตขึ้นนี้ จะถูกนำมาวัดค่าความไวและความจำเพาะ โดยใช้ เชื้อก่อโรคที่เพาะเลี้ยงไว้ หรือ จากDNA ของ

เชื้อก่อโรคที่เก็บไว้ (in vitro) ก่อนจะนำมาใช้ ทดสอบกับเลือดของผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่ได้จากโรงพยาบาล/สถาบันร่วมวิจัยที่กระจายอยู่ในส่วนต่างๆของประเทศรวมทั้งในรพ. จุฬาลงกรณ์

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะผลิต ทองคำอนุภาคนาโนเมตร มาต่อกับสาย DNA ของเชื้อก่อโรคหลากหลายชนิดที่พบเป็นสาเหตุโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุให้อยู่ในชุดตรวจเดียวกัน และให้ออกมาในรูปของ dipstick เป้าหมายและเป้าหมายในระยะยาว (long-term goal) ของโครงการวิจัยนี้คือ พัฒนาชุดตรวจโรคติดเชื้อที่เป็นสาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุ เพื่อนำไปใช้งานได้ครอบคลุมทุกพื้นที่ของประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### การประยุกต์นำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการแพทย์

นาโนเทคโนโลยี คือเทคโนโลยี และ วิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม สังเคราะห์ และศึกษา โครงสร้างที่มีขนาดช่วงนาโนเมตร ซึ่งมีความหมายกว้างขวางมากโยงไปถึง หลายศาสตร์ด้วยกัน เช่น คอลลอยด์ เคมีมหโมเลกุล (supramolecular chemistry) พอลิเมอร์ หรือรวมไปถึงชีวโมเลกุล ในหลายกลุ่ม ในการศึกษา นาโนเทคโนโลยีอาจจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ Top-down ซึ่งหมายถึงใช้การบด กัดกร่อน เสียดสี 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]

<b>Nano-Applications</b>	<b>References</b>
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
Biom mineralization	37
Nanorobotics	14
Nanocomputers	39
Nanorods for vaccination applications	40

ตารางที่ 1. 4 : การประยุกต์นำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในทางการแพทย์

(ข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 16)

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

ตัวกรองระดับนาโนเมตรได้ถูกพัฒนาขึ้นในปี 1995 โดยอาศัยอนุภาคทองคำใน ลักษณะที่เป็นทอกลวง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.6 นาโนเมตรติดประจุบวก กรองผ่านเปลือกเฉพาะ โมเลกุลประจุลบ ที่มีขนาดเล็กเท่านั้นได้ ทำให้ช่วยในการส่งผ่านไอออนได้ [20]

และเมื่อไม่นานมานี้ Baker และคณะได้ทำการสังเคราะห์เดนไดรเมอร์ (dendrimer) ขนาดเล็กกว่า 5 นาโนเมตร ยึดกับกรดโฟลิก (folic acid) และ methotrexate เมื่อฉีดเข้าไปในหนูทดลองที่มีเซลล์ human KB tumor อยู่ จะพบว่ามีเดนไดรเมอร์หนาแน่น 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 บางชนิดที่เป็นที่มาของโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุเช่นกัน

### 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 ในน้ำนั้นได้เริ่มมีมาตั้งต่อก่อนคริสตวรรษที่ 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 ซึ่งปัจจัยที่ผลกระทบต่อความยาวคลื่นของแสงที่เกิดปรากฏการณ์ 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
$\epsilon_m$	คือค่าคงที่ไดอิเล็กตริกของตัวกลาง
$\lambda$	คือความยาวคลื่น
$\epsilon_r$	คือส่วนจำนวนจริงในฟังก์ชันไดอิเล็กตริก
$\epsilon_i$	คือส่วนจำนวนจินตภาพในฟังก์ชันไดอิเล็กตริก

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

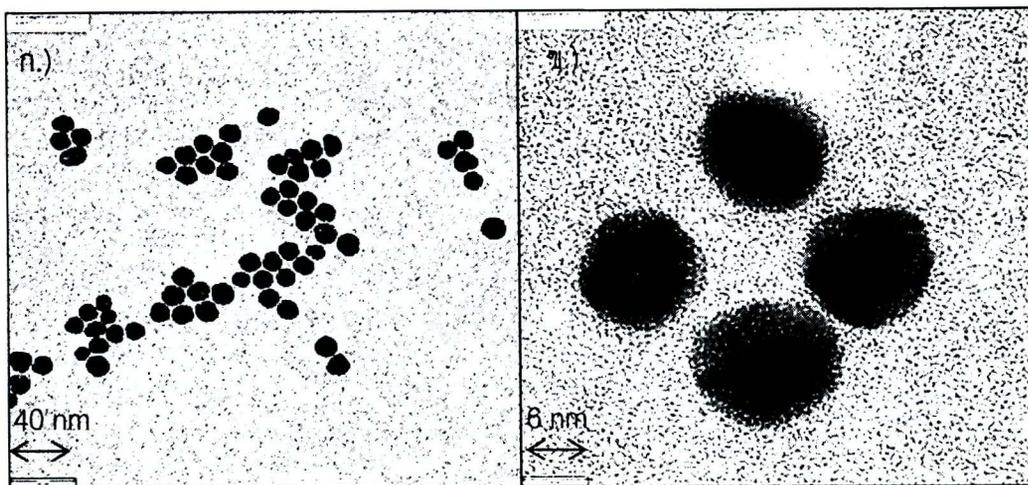
นอกจากนั้นความยาวคลื่นแสงที่ถูกดูดกลืนด้วยปรากฏการณ์ SPR นั้นยังขึ้นอยู่กับ ค่าดัชนีหักเหของสารไดอิเล็กตริกที่ผิวของอนุภาคโลหะด้วย [39] ด้วยคุณสมบัตินี้จึงสามารถนำเอา AuNPs ไปประยุกต์ใช้ในการเป็นเครื่องมือตรวจวัดโมเลกุลที่ผิวหน้าของอนุภาคได้ต่อไป โดยอาศัยการปรับปรุผิวหน้าของ AuNPs ให้มีความสามารถในการเลือกจับกับโมเลกุลเป้าหมาย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

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

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

ส่วนการสังเคราะห์ในน้ำนั้นสามารถทำได้โดยอาศัยสารช่วยทำให้เสถียรได้หลายชนิดเช่นกัน เช่นในปี 1999 นั้น Yonezawa และ Kunitake ได้ทำการสังเคราะห์ AuNPs โดยอาศัยเกลือ sodium 3-mercaptopropionate เป็นสารช่วยทำให้เสถียร[43] แต่สารช่วยทำให้เสถียรที่นิยมใช้กันมากก็ sodium citrate ซึ่งสามารถเตรียมได้ในหลายสภาวะ และได้อนุภาค AuNPs ที่มีขนาดแตกต่างกันออกไป ข้อดีประการหนึ่งก็คือ sodium citrate นั้นจะทำหน้าที่เป็นได้ทั้งสารช่วยทำให้เสถียร และเป็นตัวรีดิวซ์ไปด้วย [44] โดยสภาวะของปฏิกิริยาไม่รุนแรงเหมือนกับการใช้  $NaBH_4$

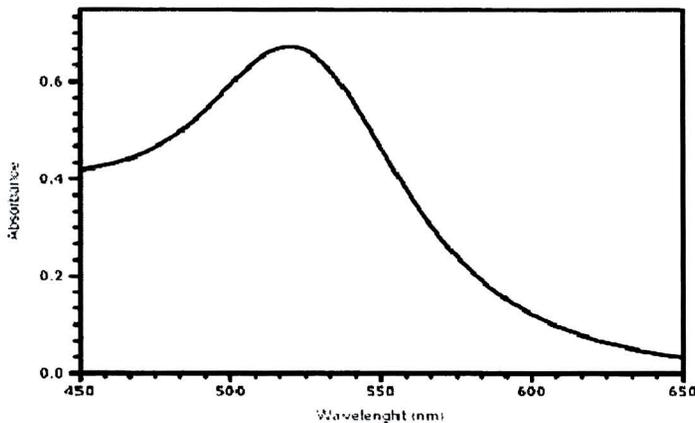
ในปัจจุบันคณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาวิธีการเตรียมคอลลอยด์ของ AuNPs ในน้ำจากการรีดิวซ์  $Au^{3+}$  ด้วยเกลือ citrate ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นาโนเมตร (รูปที่ 1. 2) ซึ่งมีการกระจายตัวของอนุภาคต่ำ และเหมาะกับการนำมาทำเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดได้ดี โดรนคอลลอยด์ที่ได้นั้นมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 520 nm (รูปที่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



รูปที่ 1. 2 : อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เตรียมได้

ก.) กำลังขยาย 60000 เท่า

ข.) กำลังขยาย 400000 เท่า



รูปที่ 1. 3 : สเปกตรัมแสงของคอลลอยด์ของ AuNPs ขนาด 9 nm ที่เตรียมได้

AuNPs นั้น เมื่อมีสารช่วยทำให้เสถียรเข้ามาล้อมรอบ จะทำให้ AuNPs ไม่รวมตัวกันหรือเกาะตัวกันจนตกตะกอน เพราะสารช่วยทำให้เสถียรจะเกาะที่ผิวของ AuNPs และทำให้ผิวของ AuNPs แต่ละอนุภาคไม่สามารถเชื่อมต่อกันได้ อย่างไรก็ตาม สารช่วยทำให้เสถียรเหล่านี้สามารถจะทำการแลกเปลี่ยนเข้าออกจากผิวของ 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 สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิด (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 ที่ต่ออยู่กับ gold nanoparticle ต้องพบการเปลี่ยนแปลงของ UV emission light เมื่อตรวจด้วย UV spectrophotometer ซึ่งสามารถนำคุณสมบัติที่มีการเปลี่ยนแปลงของ UV absorbance

### Conceptual framework

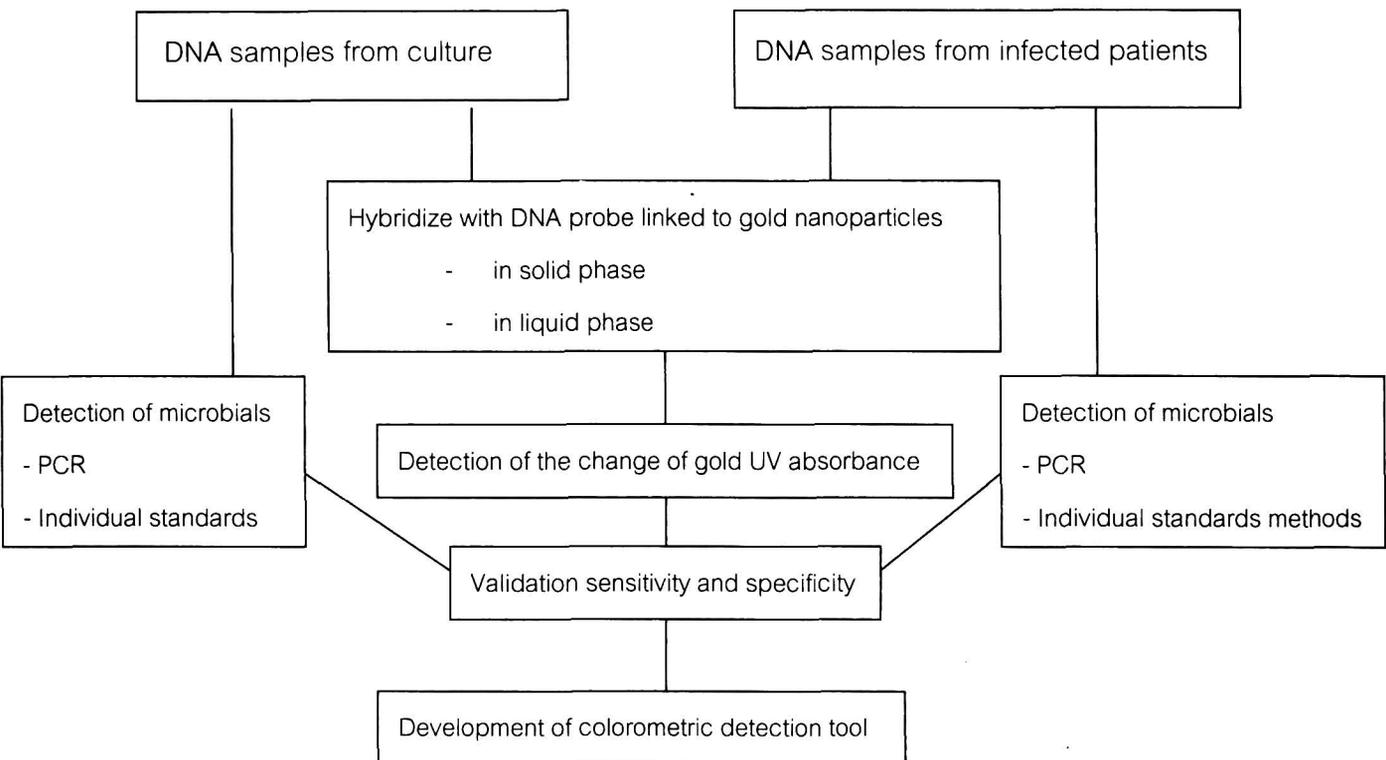


Figure 1.5 Conceptual framework



### ความคาดหมาย แนวทางที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

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