

## รายการอ้างอิง

- [1] แนวทางการวินิจฉัยและรักษาโรคไข้เลือดออกเดงกี. กรุงเทพฯ : กระทรวงสาธารณสุข, 2546: 1-2.
- [2] คำนวน อึ้งชูศักดิ์. สถานการณ์และแนวโน้มของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศไทย. ใน: ชิชณุ พันธุ์เจริญ และคณะ บรรณาธิการ. ไข้เลือดออก. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ หจก. เพนตากอน แอ็ดเวอร์โทซิ่ง, 2546:12-3.
- [3] Marchette NJ, Halstead SB, Falkler WA Jr, Stenhouse A, Nash D. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *J Infect Dis* 1973 Jul;128(1):23-30
- [4] Gubler DJ, Suharyono W, Lubis I, Eram S, Sulianti Saroso Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. I. Virological and epidemiological studies. *J Am J Trop Med Hyg* 1979 Jul;28(4):701-10
- [5] Dengue and dengue hemotrrhagic fever, D.J. Gubler and G. Kuno, CAB international Publication, Madison Avenue New York 1997
- [6] Rothwell SW, Putnak R, La Russa VF. Dengue-2 virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigen-positive stromal cells. *Am J Trop Med Hyg* 1996 May;54(5):503-10
- [7] La Russa VF, Innis BL.Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. *Baillieres Clin Haematol* 1995 Mar;8(1):249-70.
- [8] Tomohiko Takasakia Kazuo Takadab Ichiro Kuranea Electron Microscopic Study of Persistent Dengue Virus Infection: Analysis Using a Cell Line Persistently Infected with Dengue-2 Virus *Intervirolgy* 2001;44:48–54
- [9] J.V. Bugrysheva a, V.A. Matveeva a, E.Yu. Dobrikova a, N.V. Bykovskaya a,S.A. Korobova b, V.N. Bakhvalova b, O.V. Morozova Tick-borne encephalitis virus NS1 glycoprotein during acute and persistent infection of cells *Virus Research* 76 (2001) 161–169

- [10] Wang JT, Sheu JC, Lin JT, Wang TH, Chen DS Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 1992;166:1167
- [11] Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 1993;74: 669
- [12] Marek Radkowski, Joanna Kubicka, Elzbieta Kisiel, Janusz Cianciara, Marek Nowicki, Jorge Rakela, and Tomasz Laskus Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects *Blood* 1995;12:3986-9
- [13] Tillmann H. L., Heiken H., Knapik-Botor A., Heringlake S., Ockenga J., Wilber J. C., Goergen B., Detmer J., McMorrow M., Stoll M., Schmidt R. E., Manns M. P. Infection with GB Virus C and Reduced Mortality among HIV-Infected Patients *N Engl J Med* 2001; 345:715-724
- [14] Williams C. F., Klinzman D., Yamashita T. E., Xiang J., Polgreen P. M., Rinaldo C., Liu C., Phair J., Margolick J. B., Zdunek D., Hess G., Stapleton J. T. Persistent GB Virus C Infection and Survival in HIV-Infected Men *N Engl J Med* 2004; 350:981-990
- [15] Kalayannaroj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis* 1997;176:313-21.
- [16] Chye JK, Lim CT, Ng KB, et al. Vertical transmission of dengue. *Clin Infect Dis* 1997;25:1374-7.
- [17] WHO. Dengue hemorrhagic fever : diagnosis, treatment and control. Geneva 1997.
- [18] Tasssniyom S, Vasanawathana S, Chirawatkul A, Rojanasupot S. Failure of high dose methylprednisolone in established dengue shock syndrome : a placebo-controlled, double-blinded study. *Pediatrics* 1993; 92(1):111-5.
- [19] Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2001; 2:33-42.
- [20] Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:621-7.

- [21] Barnes WJS, Rosen L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. **Am J Trop Med Hyg** 1974;23:495-506.
- [22] Morens DM, Halstead SB, Larsen LK. Comparison of dengue virus plaque reduction neutralization by macro and "semi-micro" methods in LLC-MK2 cells. **Microbiol Immunol** 1985;29:1197-205.
- [23] De Paula SO, Fenseca BAL. Dengue: A review of the laboratory tests – a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian J Infect Dis** 2004;8:390-8.
- [24] Bundo K, Igarashi A. Antibody-capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. **J Virol Methods** 1985;11:15-22.
- [25] Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **Am J Trop Med Hyg** 1989;40:418-27.
- [26] Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. **J Infect Dis** 1997;176:322-30.
- [27] Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Suntayakorn S, Aaskov J, Devine PL. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. **J Clin Microbiol** 1998;36:3737-9.
- [28] Artimos de Oliveira S, Rodrigues CV, Camacho LA, Miagostovich MP, et al. Diagnosis of dengue infection by detecting specific immunoglobulin M antibodies in saliva samples. **J Virol Methods** 1999;77:81-6.
- [29] Balmseda A, Guzmán MG, Hammond S, et al. Diagnosis of dengue virus infection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. **Clin Diagn Lab Immunol** 2003;10:317-22.
- [30] Suandork P, Kulwichit W, Arunyingmongkol K, Krajiw S, Prommalikit O, Panchareon C, et al. Diagnosis of dengue viral infection by detection of specific

- immunoglobulin in oral fluid. **The 11<sup>th</sup> International Congress for Infectious Diseases (ICID) 2004 Mar 4-7;Cancun:Mexico. (Abstract 14.016).**
- [31] Prommalikit O, Kulwichit W, Arunyingmongkol K, Krajiw S, Suandork P, Pupaibool J, et al. Detection of urinary antibody as a tool for diagnosis of dengue infection. **The 11<sup>th</sup> International Congress For Infectious Diseases (ICID) 2004 Mar 4-7;Cancun:Mexico. (Abstract 14.018).**
- [32] Chen WJ, Huang KP, Fang AH. Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. **Southeast Asian J Trop Public Health 1991;22:659-63.**
- [33] Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue in the early febrile phase:viremia and antibody responses. **J Infect Dis 1997;176:322-30.**
- [34] Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **J Microbiol Immunol Infect 2005;38:5-16.**
- [35] HENCHAL EA, POLO SL, VORNDAM V, et al. Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. **Am J Trop Med Hyg 1991;45:418-28.**
- [36] Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang G, Voradam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol 1992;30:545-51.**
- [37] Maneekarn N, Morita K, Tanaka M, et al. Applications of polymerase chain reaction for identification of dengue viruses isolated from patient sera. **Microbiol Immunol 1993;37:41-7.**
- [38] Yenichitsomanus P, Sricharoen P, Jaruthasana I, et al. Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR). **Southeast Asian J Trop Med Public Health 1996;27:228-36.**

- [39] Raengsakulrach B, Nisalak A, Maneekarn N, et al. Comparison of four reverse transcription polymerase chain reaction procedures for the detection of dengue virus in clinical specimens. *J Virol Methods* 2002;105:219-32.
- [40] Kulwichit W, Mekmullica J, Yaporn R, et al. Diagnosis of dengue infection by reverse transcription-nested polymerase chain reaction in urine specimens. **The 1<sup>st</sup> Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases**. Thailand. November 10-13, 2002. Page 151. (Abstract TU-FP8-3).
- [41] Kulwichit W, Mekmullica J, Krajiw S, Prommalikit O, Yaporn R, Intaraprasong P, et al. Highly-sensitive virologic diagnosis of dengue infection by a newly-developed protocol of reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction of serum/plasma, peripheral blood leukocyte and urine specimens. **The 41<sup>st</sup> Annual Meeting of The Infectious Diseases Society of America (IDSA)**. 2003 Oct 9-12; San Diego: USA. (Abstract 345).
- [42] Wang WK, Sung TL, Tsai YC, Kao CL, Chang SM, King CC. Detection of virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:4472-8.
- [43] Sudiro TM, Zivny J, Ishiko H, et al. Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2001;63:29-34.
- [44] De Paula SO, Fonseca BAL. Optimizing dengue diagnosis by RT-PCR in IgM-positive samples: comparison of whole blood, buffy-coat and serum as clinical samples. *J Virol Methods* 2002;102:113-7.
- [45] Wu SL, Lee EM, Putvatana R, et al. Detection of dengue virus RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol* 2001;39:2794-8.

ภาคผนวก

### Protocol การทำ RT-PCR ที่ใช้ในการวิจัย

- EDTA blood process
  - แยก EDTA blood 1 ml เพื่อ extract ด้วย RNA Blood kit เพื่อนำไปทำ Real time PCR และ PCR
- นำ EDTA blood ที่เหลือไปปั่นที่ 3300 rpm 10 นาที
  - แยก Plasma ใส่ tube ขนาด 1.5 ml จำนวน 2 tube ปริมาตร 140 ul และอีก tube คือ Plasma ที่เหลือเก็บที่ -80°C
- เติมน้ำ PBS เป็น 1 เท่าของปริมาตรเดิมแล้ว mix ให้เข้ากัน
  - เตรียม Ficoll-Paque tm Plus ปริมาตรเท่ากับ EDTA blood เริ่มต้นใน tube 15 ml.
  - ทำการ Over layer บน Ficoll- Paque และนำไปปั่นที่ 2200 rpm 20 นาที
  - ดูดชั้นสีขาวขุ่น (PBMC) ใส่ tube ขนาด 15 ml เติมน้ำ PBS เป็น 1 เท่าของ PBMC
  - ปั่นที่ 1500 rpm 10 นาที เทของเหลวในหลอดทิ้งแล้วเติมน้ำ PBS ประมาณ 500-600 ul ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ pellet
- mix ให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่ tube ขนาด 1.5 ml จำนวน 2 tube ปริมาตร 140 ul และอีก tube เป็น PBMC ที่เหลือเก็บที่ -80°C

### Viral RNA extraction

sample 140 ul + 560 ul RVL buffer

room temp 10 min, centrifuge 1 sec - เติมน้ำ 560 ul ethanol (absolute), vortex 15 sec - นำ 630 ul ของ

solution ใส่ใน column

centrifuge 6000 g, 1min (8000 rpm)

- เท filtrate ทิ้ง, เอา column ใส่ tube เดิม
- นำ solution ที่เหลือใส่ column, ปั่น 8000 rpm 1 min
- ทิ้ง tube เดิมแล้วนำ column ใส่ tube ใหม่
- เติมน้ำ 500 ul AW1 ปั่น 8000 rpm 1 min
- ทิ้ง tube เดิมแล้วนำ column ใส่ tube ใหม่
- เติมน้ำ 500 ul AW2 ปั่น 14000 rpm 3 min
- ทิ้ง tube เดิมแล้วนำ column ใส่ tube ใหม่แล้วปั่น 14000 rpm 1 min
- นำ column ใส่ tube 1.5 ml, เติมน้ำ 60 ul AVE, ทิ้งไว้ที่ room temp 1 min
- ปั่น 8000 rpm 1 min , และแบ่งใส่ 0.2 micro tube เก็บที่ -80 °C

## Reverse Transcriptase (Bio lab)

## RT Protocol (ซึ่งเตรียม cDNA)

## ● preparation template &amp; primer

Final concentration

10 uM Den outer1                      0.75                      (0.75  $\mu$ m)10 uM Den outer2                      0.75                      (0.75  $\mu$ m)

template                                      3.5                      (25-50 ng)

นำไป incubate ที่ 70°C, 5 min .....quick chill 4°C, 5min.....hold on ice

## ● Mixture

Final concentration

10X buffer (contain 3 mM Mgcl2                      )                      2 ul                      (1x)

10 uM dNTPs                                      1 ul                      (0.5 mM)

RNA secure                                      0.8 ul

DEPC    10.2 ul

Ribo-inhibitor                                      0.5 ul

นำไป incubate ที่ 60°C , 20 min.....add enz RT 0.5 ul + template and primer

## ● Condition

25 °C                                      5 min

42 °C                                      60 min

70 °C                                      15 min

1<sup>st</sup> PCR

## ● Mixture

Final concentration

10 X buffer                                      2 ul                      1x

10 mM dNTPs                                      0.4 ul                      0.2 mM

25 mM MgCl2                                      1.6 ul                      2  $\mu$ M10 uM Den outer1                                      0.75 ul                      0.75  $\mu$ M10 uM Den outer2                                      0.75 ul                      0.75  $\mu$ M

dWater    11.9 ul

hot strat taq                                      0.1 ul

cDNA 2.5 ul

● **Condition**

95°C	15 min	
95°C	1 min	}
50°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	7 min	

40 cycles

● **2<sup>nd</sup> PCR**

10 X buffer	2 ul
10 mM dNTPs	0.4 ul
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0.4 ul
10 uM Den inner1	0.75 ul
10 uM Den inner2	0.75 ul
dWater	14.6 ul
hot strat taq	0.1 ul
1 st PCR product	1 ul

● **Condition**

95°C	15 min	
95°C	1 min	}
58°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	7 min	

25 cycles

4. Run gel electrophoresis (2%)

- ชั่ง agarose หรือ ำุ่น 1.6 g (large chamber ) เติม TBE buffer 80 ml หรือชั่ง agarose ำุ่น 0.8 g (small chamber) เติม TBE buffer 40 ml
- ใส่ microwave เมื่อละลายจึงเทใส่ chamber และเสียบcombลงไปรอให้ gel เย็นจึงตั้ง combออก

load gel โดยใช้ PCR product 10 ul : loading dye 2 ul ผสมกันแล้วหยอดลงในช่องว่างบน gel

load marker โดยใช้ 100 bp 1 ul : loading dye 2 ul : buffer TBE 9 ul

95 – 100 volt เป็นเวลา 60-70 min

## Protocol การทำ Dengue ELISA

### I. Materials

1. Nunc E.I.A. Microtitration plate, 96 Flat bottom wells 1.0 x 0.7 cm, CAT. No. 449824
2. Humidified box
3. Goat anti-human IgM and IgG (5 FCm) (Cappel) 1:800 (40 ml = 250 บาท)
4. 0.006 M Carbonate-Bicarbonate buffer (pH 9.0 + 0.1)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>                      0.076 gm.

NaHCO<sub>3</sub>                      0.700 gm.

DW                              500 ml.

5. 1 x PBS

10 x PBS (pH 7.4 + 0.1)

Sodium chloride                      80.0 gm.

Potassium chloride                      2.0 gm.

Potassium phosphate, monobasic                      1.9 gm.

Sodium phosphate, dibasic, anhydrous                      9.0 gm.

DW                                      1000 ml.

6. PBS-T (0.05% Tween in PBS):

Dilute 10 x PBS to 1:10 (10 x PBS 200 ml + DW 1800 ml) add Tween 20, 1 ml

7. 5% acetone extracted normal human serum (40 ml = 700 บาท)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Bovine albumin fraction v (Sigma)

7. Test serum or CSF

8. Serum controls: (1 ชุด = 250 บาท)                      กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

weak anti-dengue IgM (WDM); strong anti-dengue IgM (SDM)

weak anti-dengue IgG (WDG); strong anti-dengue IgG (SDG) and negative control (NC)

11. Antigens: (0.5 ml = 1000 บาท)

Dengue-1, Hawaii strain,                      HA: 1:5120, pH 6.2

}

Dengue-2, Tr 1751 strain, HA: 1:5120, pH 6.2

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Dengue-3, H 87 strain, HA: 1:1280, pH 6.4

Dengue-4, H 241 strain, HA: 1:1280, pH 6.4

12. Anti-flavivirus IgG-horseradish peroxidase conjugate to give a weak positive control OD of 0.40 + 0.15

(100 ml = 250 บาท) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

13. Substrate:

1) 0.1 M Citrate phosphate buffer (pH 5.0 + 0.1)

Citric acid 3.5 gm.

Sodium phosphate dibasic, anhydrous 5.1 gm.

DW 1000 ml.

2) O-phenylene diamine (OPD) (5 mg) 1 tab Sigma

3) 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: To prepare: Dissolve 1 tab (OPD) in 10 ml (0.1 M citrate phosphate buffer) and add 33 ul of fresh 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

14. M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

15. Vortex

16. ELISA plate reader with 490 nm

17. Multichannel: 50-300  $\mu$ l

18. Pipet: 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l

19. Tip: 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l

20. Incubator (35-37°C)

21. pH meter

22. Refrigerator

23. Disposable gloves

24. Distilled water

25. Absorbent paper

26. Sodium hypochlorite and Sodium bicarbonate

II. **Methods** (ทุกขั้นตอนต้องเก็บไว้ใน humidified box)

### 1. Sensitize Step

- ก. นำ Goat anti-human IgM & IgG (1:800) 12.5  $\mu$ l ลงใน 0.006 M Carbonate-Bicarbonate buffer 10 ml mix ให้เข้ากัน
- ข. ใส่ 100  $\mu$ l ลงในแต่ละหลุมของ EIA plate เมื่อเสร็จแล้วนำ plate ใส่ลงใน moisture box และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ประมาณ 1 คืน หรือที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ก่อนจะนำมาทำ

### 2. Antibody Step

- ก. Dilute serum, to make 1:100  $\longrightarrow$  1 x PBS 990  $\mu$ l + Serum 10  $\mu$ l  
Dilute CSF, to make 1:10  $\longrightarrow$  โดยใช้ 1 x PBS 900  $\mu$ l + CSF 100  $\mu$ l
- ข. Dilute controls 1:100  $\longrightarrow$  โดยใช้ 1 x PBS 990  $\mu$ l + controls 10  $\mu$ l  
(สามารถเก็บไว้ที่ 4 °C นาน 1 สัปดาห์หรือมากกว่าเล็กน้อย)
- ค. นำ Plate ที่ sensitized แล้ว (ถ้าเก็บไว้ที่ -20°C นำมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลาย หรือใส่ PBS-T ลงไปเพื่อให้ละลายได้เร็วขึ้น) ล้าง plate ด้วย PBS-T 5 ครั้ง แล้วเคาะให้แห้ง
- ง. ใส่ Serum, controls (duplicate) 50  $\mu$ l จนครบทุกหลุม เก็บไว้ใน moisture box ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำมคืน หรือถ้าต้องการให้เสร็จภายในวันเดียว เก็บไว้ที่ moisture box ประมาณ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- จ. เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้ว ล้าง plate ด้วย PBS-T 5 ครั้ง เคาะ plate ให้แห้ง

### 3. Antigen Step

ก. เตรียม 5 ml. ต่อ plate ของ Den-1, -2 และ -3 ที่ 16 units ส่วน Den-4 ที่ 8 units ดังนี้

#### Den-1

$$1 \text{ unit} = 1:5120$$

$$16 \text{ units} = (1/5120) \times 16 = 16:5120 = 1:320$$

ที่ dilution 1/320, 320 ml. มี Den-1 = 1 ml.

$$\text{ที่ dilution } 1/320, 5 \text{ ml. มี Den-1} = (1 \times 5)/320 = 0.01563 \text{ ml.} = 15.63 \mu\text{l}$$

#### Den-2

1:5120 จำนวนเหมือน Den-1 ดังนั้น Den-2 ที่ 16 units ใน 5 ml. = 15.63  $\mu\text{l}$

#### Den-3

$$1 \text{ unit} = 1:1280$$

$$16 \text{ units} = (1/1280) \times 16 = 16:1280 = 1:80$$

ที่ dilution 1/80, 80 ml. มี Den-3 = 1 ml.

$$\text{ที่ dilution } 1/80, 5 \text{ ml. มี Den-3} = (1 \times 5)/80 = 0.0625 \text{ ml.} = 62.5 \mu\text{l}$$

#### Den-4

$$1 \text{ unit} = 1:1280$$

$$8 \text{ units} = (1/1280) \times 8 = 8:1280 = 1:160$$

ที่ dilution 1/160, 160 ml. มี Den-4 = 1 ml.

$$\text{ที่ dilution } 1/160, 5 \text{ ml. มี Den-4} = (1 \times 5)/160 = 0.03125 \text{ ml.} = 31.25 \mu\text{l}$$

ข. ใส่ antigen Den-1 titer 1:5120 = 15.63  $\mu\text{l}$

Den-2 titer 1:5120 = 15.63  $\mu\text{l}$

Den-3 titer 1:1280 = 62.50  $\mu\text{l}$

Den-4 titer 1:1280 = 31.25  $\mu\text{l}$

ลงใน NHS acetone extracted 5 ml. Mix ให้เข้ากัน

ค. ใส่ antigens ที่ได้ลงในทุก ๆ หลุมๆ ละ 50  $\mu\text{l}$  จนครบ เก็บไว้ใน moisture box ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำมคืน หรือถ้าต้องการให้เสร็จภายในวันเดียว เก็บไว้ใน moisture box ประมาณ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

ง. เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้ว ล้าง plate ด้วย PBS-T 5 ครั้ง เคาะ plate ให้แห้ง

#### 4. Conjugate Step

ก. เตรียม 0.5% BSA (Bovine Serum albumin) ลงใน NHS 2.5 ml. ต่อ plate โดย  
คำนวณดังนี้

100 ml. of 0.5% BSA มี BSA = 0.5 gm.

2.5 ml. of 0.5% BSA มี BSA =  $(0.5 \times 2.5)/100 = 0.0125$  gm.

Mix ให้เข้ากัน

ข. เตรียม conjugate at 1:300 ลงใน NHS 2.5 ml ต่อ plate โดยคำนวณดังนี้

300 ml. conjugate = 1 ml.

2.5 ml. conjugate =  $(1 \times 2.5)/300 = 0.00714$  ml. = 8.33  $\mu$ l

ใช้ NHS 2.5 ml + 0.5% BSA 0.0125 gm. + conjugate 7.14  $\mu$ l mix ให้  
เข้ากัน

ค. ใส่ conjugate ที่ได้ลงในทุก ๆ หลุม ๆ ละ 25  $\mu$ l จนครบ เก็บไว้ใน moisture  
box เก็บไว้ในที่ moisture box ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35-37°C

#### 5. Substrate Step

ก. นำ 1 tab (5 mg) ของ O-phenylene diamine (OPD) ลงใน 0.1 M citrate  
phosphate buffer 10 ml. แล้วตามด้วย 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.3  $\mu$ l mix ให้เข้ากัน (เมื่อ  
เหลือเวลา 20 นาทีก่อนจะล้าง plate) ขั้นตอนนี้ต้องหุ้ม foil เพื่อไม่ให้แสงเข้า

ข. เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้ว ล้าง plate ด้วย PBS-T 5 ครั้ง และล้างตามด้วย PBS 2 ครั้ง  
เคาะ plate ให้แห้ง

ค. ใส่ Substrate ลงไปทุก ๆ หลุม ๆ ละ 100  $\mu$ l จนครบ เก็บไว้ในที่มืด ถ้าเป็น IgG  
ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ส่วน IgM ทิ้งไว้ประมาณ 35 นาที

ง. หยุดปฏิกิริยาด้วย 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50  $\mu$ l ทุกหลุม

6. อ่านผล: โดยใช้ spectrophotometer wave length 490 nm.

#### 7. แปลผล:

ก. The weak positive control (WPC) is defined as 100 units

ข. Calculate a binding index:  $BI = \frac{OD(\text{test sample}) - OD(\text{negative control})}{OD(\text{WPC}) - OD(\text{negative control})}$

ค. Unit = BI x 100

ง. A value of > 40 units is positive.

๑. For dengue infection, a ratio of anti-dengue IgM to IgG (if either test is > 40 units) of > 1.8 is typical of a primary infection. A ratio of units IgM to units IgG < 1.8 is typical of a secondary infection. This ratio is not valid for determining if JE occurred in a dengue-immune host. Test specificity is > 95%

**แบบฟอร์ม Dengue ELISA และสรุปวิธีทำทั้งหมด**

Anti-dengue IgM or IgG Infectious Diseases Division, Chulalongkorn Hospital

Date .....

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Empty										Empty	
B	SPC											
C												
D					WPC							
E												
F							NC					
G									WPC			
H	Empty										Empty	

SPC = Strong positive control, WPC = Weak positive control, NC = Normal control

Step	Material (working/plate)	Buffer (working/plate)	Vol/well	Time	Temp	Wash	Time
Sensitize	Goat anti-human IgM 1:800 = 12.5 $\mu$ l Goat anti-human IgG 1:800 = 12.5 $\mu$ l	0.006 M Carbonate = 10 ml	100 $\mu$ l	ON or 4 hrs	4 °C	PBS-T 5 ๕ ครั้ง	
Test specimen	Serum 1:100 = 10 $\mu$ l CSF 1:10 = 100 $\mu$ l Control 1:10 = 3 $\mu$ l	PBS = 990 $\mu$ l PBS = 900 $\mu$ l PBS = 300 $\mu$ l	50 $\mu$ l	ON or 2 hrs	4 °C RT	PBS-T 5 ๕ ครั้ง	
Antigen	Ag Den 1 (1:5120) = 15.63 $\mu$ l Den 2 (1:5120) = 15.63 $\mu$ l Den 3 (1:1280) = 62.5 $\mu$ l Den 4 (1:1280) = 31.25 $\mu$ l	5% NHS = 5 ml	50 $\mu$ l	ON or 2 hrs	4 °C RT	PBS-T 5 ๕ ครั้ง	
Conjugate	0.5% BSA = 0.0125 gm Human anti- flavivirus IgG-HRP conjugate 1:300 = 8.33 $\mu$ l	5% NHS = 2.5 ml	25 $\mu$ l	1 hr	35- 37 °C	PBS-T 5 ๕ ครั้ง + PBS 2 ๕ ครั้ง	
Substrate	OPD 0.5 mg/ml = 0.005 g 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 33 $\mu$ l (ตูดจาก stock 3.3 $\mu$ l) เมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที add OPD + 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> แล้วหุ้ม foil	0.1 M Citrate phosphate = 10 ml	100 $\mu$ l	30 min	RT	IgM = 35 mins IgG = 30 mins	
Stop reaction	4 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		50 $\mu$ l				

## Anti-dengue IgM/IgG, Infectious Diseases Division, Chulalongkorn Hospital

Date .....

	IgM						IgG					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Empty						SDG (HN)				Empty	
B	SDM (HP)											
C												
D			WDM (LP)						WDG (LN)			
E												
F							NC (ST)					
G					WDM (LP)						WDG (LN)	
H	Empty										Empty	

SPC = Strong positive control, WPC = Weak positive control, NC = Normal control

Step	Material (working/plate)	Buffer (working/plate)	Vol/well	Time	Temp	Wash	Time
Sensitize	Goat anti-human IgM 1:1800 = 6.25 $\mu$ l Goat anti-human IgG 1:800 = 6.25 $\mu$ l	0.006 M Carbonate = 5 ml	100 $\mu$ l	ON or 4 hrs	4 <sup>o</sup> C	PBS-T 5 ครั้ง	
Test specimen	Serum 1:100 = 10 $\mu$ l CSF 1:10 = 100 $\mu$ l Urine & saliva No dilute Control: 1:100 = 3 $\mu$ l	PBS = 990 $\mu$ l PBS = 900 $\mu$ l  PBS = 300 $\mu$ l	50 $\mu$ l	ON or 2 hrs	4 <sup>o</sup> C RT	PBS-T 5 ครั้ง	
Antigen	Ag Den 1 (1:5120) = 15.63 $\mu$ l Den 2 (1:5120) = 15.63 $\mu$ l Den 3 (1:1260) = 63.5 $\mu$ l Den 4 (1:1280) = 31.25 $\mu$ l	5 % NHS = 5 ml	50 $\mu$ l	ON or 2 hrs	4 <sup>o</sup> C RT	PBS-T 5 ครั้ง	
Conjugate	0.5% BSA = 0.0125 gm Human anti-flavivirus IgG-HRP conjugate 1:300 = 8.33 $\mu$ l	5 % NHS = 2.5 ml	25 $\mu$ l	1 hr	35- 37 <sup>o</sup> C	PBS-T 5 ครั้ง + PBS 2 ครั้ง	
Substrate	OPD 0.5 mg/ml = 1 tab (5 mgs) 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 33 $\mu$ l (ดูด จาก stock 3.3 $\mu$ l) เมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที add OPD + 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> แล้วหุ้ม foil	0.1 M Citrate phosphate = 10 ml	100 $\mu$ l	30 mins	RT	IgM = 35 mins IgG = 30 mins	
Stop reaction	4 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		50 $\mu$ l				

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล โอภาส พุทธเจริญ

วัน เดือน ปี เกิด 23 ธันวาคม 2514

ภูมิลำเนา กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

2538 แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2545 วุฒิบัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์

การทำงาน

2539 แพทย์เวชปฏิบัติทั่วไป โรงพยาบาลพนัสนิคม จ.ชลบุรี

ปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอดหน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์