การศึกษาการแสดงออกของยีนในเลือดคนไข้โรคฉี่หนูอาการรุนแรง

น.ส.เจนจิรา ดินฮูเซ็น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

GENE EXPRESSION PROFILLING OF WHOLE BLOOD IN PATIENTS WITH SEVERE LEPTOSPIROSIS

Miss Janejira Dinhuzen

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences
Common Course
FACULTY OF MEDICINE
Chulalongkorn University
Academic Year 2020
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการแสดงออกของยีนในเลือดคนไข้โรคฉี่หนูอาการรุนแรง
โดย	น.ส.เจนจิรา ดินฮูเซ็น
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.จันทร์จิรา ไทยผดุงพานิช)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เจนจิรา ดินฮูเซ็น : การศึกษาการแสดงออกของยีนในเลือดคนไข้โรคฉี่หนูอาการรุนแรง. (GENE EXPRESSION PROFILLING OF WHOLE BLOOD IN PATIENTS WITH SEVERE LEPTOSPIROSIS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.นพ.ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์

บทนำ โรคเลปโตสไปโรสิส หรือโรคฉี่หนู เป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญระดับโลก โรคส่วนใหญ่น่าจะเกิดในสัตว์มากกว่าคน แต่สามารถพบคนเป็นโรคนี้ได้ในหลายพื้นที่อาการของโรคมีตั้งแต่ความรุนแรงน้อย จนไปถึงระดับความรุนแรงมาก ในปัจจุบันการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส วิเคราะห์อาการทางคลินิกร่วมกับตรวจวินิจฉัยทางชีวโมเลกุล (molecular diagnostic) ซึ่งไม่สามารถประเมินความรุนแรงของโรคได้.

วัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้ ต้องการศึกษาการแสดงออกและการตอบสนองของคนไข้โรคติดเลปโตสไปรา ที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุการเกิดความรุนแรงของโรค ซึ่งในอนาคตอาจเป็นทางเลือกที่ใช้ควบคู่ไป กับวิธีการวินิจฉัยการเกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิสได้. วิธีการศึกษา นำเลือดผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรสิส แบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มรุนแรงและไม่รุนแรง มาทำการค้นหายีนโดยใช้เทคโนโลยี Nanostring® nCounter® PanCancer IO 360 เมื่อได้ยีนที่น่าสนใจ ทำการตรวจสอบยีนที่ค้นพบด้วยวิธี RT-PCR.

ผลการศึกษา จากการค้นหาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Nanostring โดยเลือกยีนจากความแตกต่างของผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งได้ยีนที่สนใจคือ PDCD1, Nos2 และ IL4 ซึ่งเป็นยีน down regulate ทั้งหมด จึงนำยีนที่ได้มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR ในผู้ป่วย 99 คน ซึ่งพบว่า ยีน PDCD1 สามารถระบุการเกิดความรุนแรงของโรคได้ โดยมี AUC เท่ากับ 0.65

สรุปผลการศึกษา PDCD1 สามารถเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ ในการทำนายการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสอาการรุนแรงได้

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา	2563	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6270077630 : MAJOR MEDICAL SCIENCES
KEYWORD: Severe Leptospirosis / mRNA / PDCD1

Janejira Dinhuzen : GENE EXPRESSION PROFILLING OF WHOLE BLOOD IN PATIENTS WITH SEVERE LEPTOSPIROSIS. Advisor: Assoc. Prof. NATTACHAI SRISAWAT, M.D.,Ph.D.

Introduction: Leptospirosis is a one of the major public health problem globally. Human can be infected after contaminated contact with animal reservoir or water reservior. Leptospirosis has a wide range of symptoms from mild to severe illness. However, with the current evidence, the biomarkers to predict severe leptospirosis is still lacking. Objective: The objective of this study was to study the explore the role of gene expression in prediction severe leptospirosis. This study would provide a new knowledge in field of specific leptospirosis biomarkers. Materials and Methods: The patient's blood with positive leptospirosis diagnosis were used in this study. Samples were divided into 2 groups which is mild and severe illness. Samples were determined by Nanostring® nCounter® PanCancer IO 360 technologies for gene expression profiling. The genes of interest were selected and analyzed by qRT-PCR. Results: As a result of Nanostring analysis, the significantly differential gene expressions comparing mild and severe illness indicated the downregulation of PDCD1, Nos2, and IL4 genes. These interested genes were used for RT-PCR (n=99). The RT-PCR results revealed that PDCD1 was associated with disease severity (AUC=0.65). Conclusion: Our results suggested that PDCD1 could be used as a biomarker for prediction severe leptospirosis.

Field of Study:	Medical Sciences	Student's Signature ....
Academic Year:	2020	Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการสนับสนุนทุนในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่คอยแนะนำและช่วยเหลือตลอดมา จนทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.อุมาพร ลิโมทัย ที่ช่วยเหลือและให้คำปรึกษา ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณศศิภา เตชะบูรณ์ ที่คอยช่วยในด้านปฏิบัติการ และคอยแนะนำช่วยเหลือด ตลอดการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในด้านเอกสารตลอดเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์ด้านโรคไตในภาวะวิกฤต ที่อำนวยความสะดวกสถานที่ในการทำวิจัยหลักตลอดการวิจัยที่ผ่านมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาและครอบครัว ผู้ที่ให้กำลังใจและอยู่เบื้องหลังความสำเร็จทุกอย่างของผู้วิจัย

เจนจิรา ดินฮูเซ็น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... ง

กิตติกรรมประกาศ .... จ

สารบัญ .... ฉ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญ(Background and Rationale) 1

1.2 คำถามงานวิจัย (Research questions) 2

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research objectives) 2

1.4 สมมติฐานของงานวิจัย (Research hypotheses) 2

1.5 คำสำคัญ (Keywords) 3

1.6 รูปแบบการวิจัย (Research design) 3

1.7 กรอบแนวคิดการวิจัย (Conceptual framework) 3

1.8 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Anticipated outcomes) 4

1.9 อุปสรรคที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems) 4

1.10 คำนิยามเชิงปฏิบัติการ 4

บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม (Review of the related literature) 5

2.1 โรคเลปโตสไปโรสิส 5

2.1.1 จุลชีววิทยาของเชื้อเลปโตสไปรา 5

2.1.2 ลักษณะทางคลินิก 8

2.2 การเกิดภาวะความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิส (Severity of Leptospirosis) 12

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2.1 การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสอาการรุนแรง ... 13

2.2.2 กลไกที่ทำให้เกิดความรุนแรงจากโรคเลปโตสไปโรสิส ... 20

2.3 messenger RNA (mRNA) ... 21

2.3.1 โครงสร้างและการแสดงออกของ mRNA ... 21

2.3.2 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ในโรคเลปโตสไปโรสิส ... 22

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย ... 25

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย ... 25

3.1.1 เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครที่ใช้ในการศึกษา (inclusion criteria) ... 25

3.1.2 เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากการศึกษา (Exclusion criteria) ... 25

3.2 การวินิจฉัยการเกิดความรุนแรงของโรคโดยใช้ SOFA Score ... 25

3.3 การค้นหาการแสดงออกของ mRNA กับการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง (Discovery) ... 26

3.3.1 กลุ่มตัวอย่าง ... 26

3.3.2 การสกัด mRNA จากตัวอย่างผู้ป่วย ... 27

3.3.3 การศึกษาการแสดงออก mRNA ในเลือดของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสด้วยเทคโนโลยี Nanostring ... 27

3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ที่ค้นพบในส่วนแรก (Validation) ... 29

3.4.1 กลุ่มตัวอย่าง (sample size) ... 29

3.4.2 การสกัด mRNA จากตัวอย่างผู้ป่วยและการวัดความเข้มข้นของตัวอย่าง ... 30

3.4.3 ขั้นตอนการการเปลี่ยน mRNA เป็น cDNA ด้วยกระบวนการ Reverse Transcription ... 30

3.4.4 กระบวนการตรวจสอบความสัมพันธ์การแสดงออก mRNA โรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงด้วย Real Time PCR ... 30

3.5 การรวบรวมข้อมูล (Data collection) ... 31

3.6 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) ... 31

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..32

4.1 คุณลักษณะของผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษา..32

4.2 การศึกษาการแสดงออก mRNA ในเลือดของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสด้วยเทคโนโลยี.36

4.3 กระบวนการตรวจสอบความสัมพันธ์การแสดงออก mRNA โรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง ด้วย Real Time PCR..37

4.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ mRNA PDCD1 กับการเกิดความรุนแรงของโรค 39

บทที่ 5 การอภิปรายผลการทดลอง..44

บรรณานุกรม..47

ประวัติผู้เขียน..50

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตาราง 1 การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อเลปโตสไปรา 7

ตาราง 2 แสดงข้อดีและข้อเสียของแต่ละวิธี(15) 11

ตาราง 3 แสดงการให้คะแนนของการทำงานแต่ละระบบ SOFA Score 26

ตาราง 4 แสดงคุณลักษณะของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา 33

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

รูป 1 แสดงปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคเลปโตสไปโรสิส 1

รูป 2 แสดงกรอบแนวคิดการวิจัย 3

รูป 3 แสดงลักษณะของเชื้อเลปโตสไปราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน(9) 6

รูป 4 แสดงลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์เชื้อเลปโตสไปรา(9) 7

รูป 5 แสดงระยะและอาการของการติดเชื้อเลปโตสไปรา(12) 8

รูป 6 แสดงการเกิดภาวะความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิส 13

รูป 7 แสดงการแสดงออกความสัมพันธ์ของ TNF-α และ IFN-γ ในกลุ่มของหนูที่ติดเชื้อ 14

รูป 8 แสดงปริมาณ NGAL ในเลือดและปัสสาวะของผู้ป่วย 15

รูป 9 แสดงการแสดงออกของยีนต่างๆ ของกลุ่มเลปโตสไปโรสิสรุนแรงเทียบกับกลุ่มเลปโตสไปโรสิสไม่รุนแรงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ 16

รูป 10 แสดงเทคโนโลยีในการศึกษาตัวชี้วัดทางชีวภาพในโรคเลปโตสไปโรสิส(23) 17

รูป 11 แสดงองค์ประกอบของคะแนน Spiro score 17

รูป 12 แสดงระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม macrophage ติดเชื้อสายพันธุ์ต่างๆเทียบกับกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ 19

รูป 13 แสดง Fold change (FC) ระดับการแสดงออกของ microRNA ที่ค้นพบในกลุ่มคนไข้เลปโตสไปโรสิสรุนแรงเทียบกับกลุ่มไม่รุนแรง 20

รูป 14 แสดงกลไกที่ทำให้เกิดความรุนแรงจากโรคเลปโตสไปโรสิส(27) 21

รูป 15 แสดงการสังเคราะห์โปรตีน 22

รูป 16 แสดงการแสดงออกระดับ mRNA ของ cytokine และ enzyme ในสุนัขที่เป็นเลปโตสไปโรสิส (29) 23

รูป 17 แสดงการแสดงออกของ 16s mRNA ในชิ้นเนื้อไต (K) และปอด (L) ของหนูทั้ง 2 กลุ่ม 24

รูป 18 แสดงการแสดงออกของ Interferon-·γ ในชิ้นเนื้อไตและปอดของหนูทั้ง 2 กลุ่ม 24

รูป 19 แสดงขั้นตอนการเตรียม master mix ในขั้นตอนการ hybridization 28

รูป 20 แสดงการจับกันของ Probe และ target ที่มีอยู่ในตัวอย่าง 28

รูป 21 แสดง Heat map 10 อันดับยีนในกลุ่มอาการรุนแรงเทียบกับอาการไม่รุนแรงที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) 36

รูป 22 แสดง Volcano plot 37

รูป 23 แสดงลอกการิทึมความสัมพันธ์การแสดงออกของยีน (Relative expression) PDCD1 38

รูป 24 แสดงระดับการเปลี่ยนแปลงของยีน PDCD1 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสอาการรุนแรง (S) เทียบกับอาการไม่รุนแรง(NS) 38

รูป 25 Receiver operating characteristic curve (ROC) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ mRNA PDCD1 กับการเกิดความรุนแรงของโรค 40

รูป 26 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ระบบการไหลเวียนของเลือด(Coagulation) 40

รูป 27 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ระบบการทำงานของตับ(Liver) 41

รูป 28 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ระบบการทำงานของระบบประสาท(CVS) 41

รูป 29 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ระบบการทำงานของระบบการทำงานของไต(Renal) 42

รูป 30 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ภาวะปอดอักเสบ (Lung hemorrhage) 42

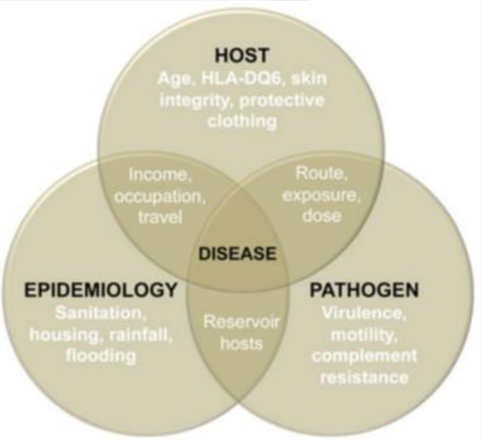
รูป 31 การแสดงออกของ PDCD1 กับ การใส่เครื่องช่วยหายใจ 43

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ(Background and Rationale)

โรคเลปโตสไปโรสิส หรือโรคฉี่หนู เป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญระดับโลก ในทั่วโลกในปี 2562 มีผู้ป่วย 873,000 ราย เสียชีวิต 48,600 ราย(1) ในประเทศไทย มีผู้ป่วย 1,011 รายและเสียชีวิต 16 ราย(2) โดยส่วนมากพบในฤดูฝนและบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย สาเหตุการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสเกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นเกลียวที่มีชื่อว่า *Leptospira spp.* โดย *Leptospira interrogans* เป็นสปีชีร์ที่ก่อโรคในคนมากที่สุด โดยเชื้อนี้จะอาศัยอยู่ตามธรรมชาติ โดยจะถูกกักเก็บอยู่ที่ไตของสัตว์จำพวกฟันแทะหรือพวกสัตว์ป่า ซึ่งเชื้อนี้จะถูกปลดปล่อยออกมาทางปัสสาวะของสัตว์และปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นในน้ำหรือในดิน(3) โดยปัจจัยที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมีปัจจัยหลักๆอยู่สามส่วนได้กันซึ่งได้แก่ ปัจจัยทางระบาดวิทยา ซึ่งได้แก่ สาธารณสุข, ที่พักอาศัยและฤดูฝน ซึ่งปัจจัยนี้เกี่ยวข้องกับการประกอบอาชีพ, การท่องเที่ยว เป็นต้น ซึ่งปัจจัยดังกล่าวยังสามารถเชื่อมได้ถึงปัจจัยของ host ซึ่ง host ก็จะมีภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับ อายุ, ปัจจัยทางภูมิคุ้มกันเช่น HLA-DQ6 และปัจจัยที่สามได้แก่ ปัจจัยของตัวเชื้อเองซึ่งได้แก่ ความอยู่รอด, ความรุนแรงหรือความคงทนของเชื้อเอง ซึ่งปัจจัยทั้งสามล้วนเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสทั้งสิ้นดังแสดงในรูปที่ 1(4)



รูป 1 แสดงปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคเลปโตสไปโรสิส

อาการของโรค มีตั้งแต่ความรุนแรงน้อย จนไปถึงระดับความรุนแรงมาก ซึ่งอาการของโรคเลปโตสไปโรสิส มีอาการคล้ายรุนแรงมากกว่าโรคไข้หวัดทั่วๆไป หรือที่เรียกว่า Weil's symptom(5) ซึ่งอาการของ Weil's symptom มีอาการมีไข้, ปวดศรีษะ, ปวดกล้ามเนื้อ, ไอ, เหนื่อยและเพลีย ส่วนอาการระดับความรุนแรงมีอาการดังต่อไปนี้ดีซ่าน, ไอ, ไอเป็นเลือด, เลือดออกในปอด, หัวใจเต้นผิดจังหวะและมีผื่นที่ผิวหนัง(6) ในปัจจุบันมีการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสจากอาการทางคลินิกร่วมกับวิธีทางวินิจฉัยทางตรวจวินิจฉัยทางชีวโมเลกุล (molecular diagnostic) นั้นก็คือ real time PCR โดยการตรวจจับจากยีน *lipl32* ซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวของเชื้อ *Leptospira interrogans* ซึ่งสามารถตรวจตัวเชื้อได้โดยตรงในระยะเริ่มต้นและร่วมกับการตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลืองวิทยายังคงใช้ Microscopic Agglutination Test (MAT) ที่เป็นวิธีมาตรฐาน(7) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการตรวจ ระดับแอนติบอดี้ที่จำเพาะกับเชื้อเลปโตสไปรา ในระดับโรงพยาบาลชุมชน ได้มีการใช้ชุดตรวจเพื่อคัดกรองเบื้องต้น(rapid test)หรือ strip ในการตรวจเบื้องต้น โดยหาแอนติบอดี้ IgM ที่มีต่อเชื้อเลปโตสไปรา โดยจากวิธีการดังกล่าว เป็นวิธีเบื้องต้นในการวินิจฉัยทำได้เพียงบอกเพียงการติดเชื้อเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งยังไม่สามารถบอกถึงความรุนแรงของโรคในคนได้

ในการวิจัยครั้งนี้จึงต้องการศึกษาการแสดงออกและการตอบสนองของคนไข้โรคติดเชื้อเลปโตสไปรา ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดความรุนแรงของโรค ซึ่งในอนาคตอาจเป็นทางเลือกที่ใช้ควบคู่ไปกับวิธีการวินิจฉัยการเกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนได้

1.2 คำถามงานวิจัย (Research questions)

การแสดงออกของ mRNA ในกลุ่มผู้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงแตกต่างจากกลุ่มผู้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรสิสไม่รุนแรงหรือไม่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research objectives)

1.เพื่อศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของภาวะการอักเสบซึ่งเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคในผู้ที่ติดเชื้อ Leptospira spp

2. สามารถนำสิ่งที่ค้นพบดูความสัมพันธ์ควบคู่การวินิจฉัยในการเกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิสในคน

1.4 สมมติฐานของงานวิจัย (Research hypotheses)

การแสดงออกของ mRNA ของภาวะการอักเสบเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคในผู้ที่ติดเชื้อ *Leptospira spp*

1.5 คำสำคัญ (Keywords)

โรคเลปโตสไปโรสิส (Leptospirosis)

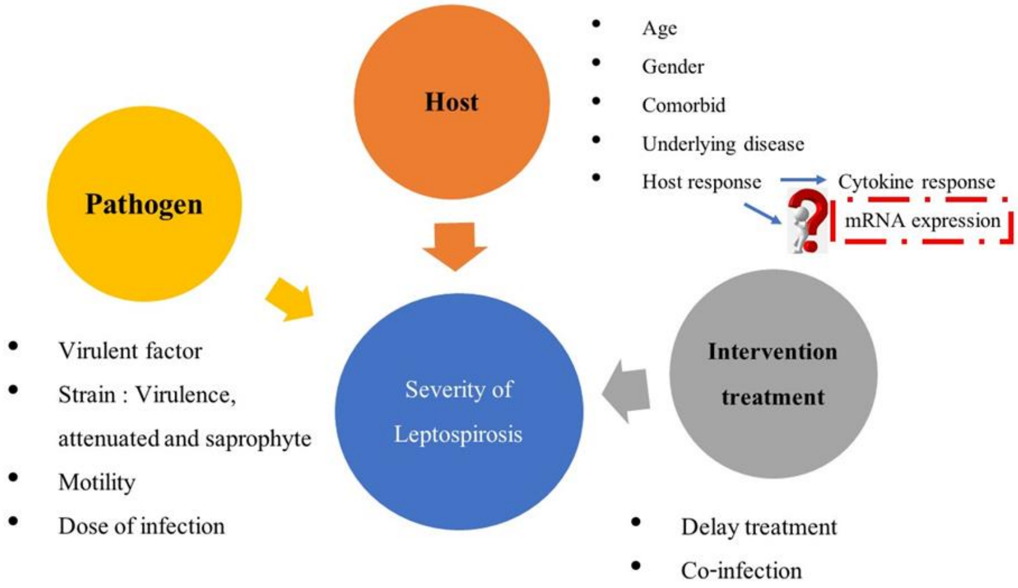
อาการโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง (severe leptospirosis)

การแสดงออกของ mRNA (mRNA expression)

1.6 รูปแบบการวิจัย (Research design)

การศึกษาวิจัยนี้เป็นรูปแบบการศึกษาเชิงวิเคราะห์แบบย้อนกลับโดยศึกษาจากเหตุมาหาผล (Case-control retrospective) โดยศึกษาการแสดงออกของ mRNA ในผู้ที่มีโรคเลปโตสไปโรสิสอาการรุนแรง และกลุ่มควบคุมที่เหมาะสมประกอบด้วยผู้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรสิสไม่รุนแรง (เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ หรือกลุ่มอ้างอิง)

1.7 กรอบแนวคิดการวิจัย (Conceptual framework)



รูป 2 แสดงกรอบแนวคิดการวิจัย การเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงมีปัจจัยทั้งในด้านของตัวเชื้อไม่ว่าจะเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของเชื้อ, สายพันธุ์ของเชื้อ, ปริมาณของเชื้อ ในด้านปัจจัยของ host ซึ่งได้แก่ อายุ, เพศ, โรคประจำตัว, การตอบสนองของ host ทั้งในด้านการแสดงออกของยีน, การตอบสนองของ cytokine และอีกหนึ่งปัจจัยคือ การรักษาอาจจะรักษาช้าหรือติดเชื้ออื่นๆร่วมด้วย โดยงานวิจัยครั้งนี้สนใจในปัจจัยของ host ซึ่งสนใจในด้านการตอบสนองของ host ซึ่งดูการแสดงออกของยีน

1.8 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Anticipated outcomes)

ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์การแสดงออกและการตอบสนอง mRNA กับการเกิดความรุนแรงในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสได้ควบคู่กับการวินิจฉัยของโรคโดยการใช้เทคโนโลยีการใช้เทคนิค High Throughput ในการศึกษาการแสดงออก mRNA ในเลือดของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิส เพื่อเป็นแนวทางร่วมกับการวินิจฉัยความรุนแรงของโรคและนำความรู้นี้ที่ได้จากการศึกษาให้แพทย์ไปใช้ในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยในอนาคตต่อไป

1.9 อุปสรรคที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems)

การวิเคราะห์ข้อมูลจากโปรแกรมที่ใช้ศึกษาการแสดงออก mRNA มีความซับซ้อนจึงต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและแม่นยำ

1.10 คำนิยามเชิงปฏิบัติการ

Leptospirosis คือ โรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คนที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira* ชนิดก่อโรคมีอาการระดับเล็กน้อยจนถึงรุนแรง

severe leptospirosis คือ โรคเลปโตสไปโรสิสที่แสดงอาการรุนแรงได้แก่ ดีซ่าน, ตับและไตทำงานผิดปกติ อวัยวะภายในล้มเหลว

mRNA expression คือ การแสดงออกของ mRNA และแปลรหัสเป็นโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม (Review of the related literature)

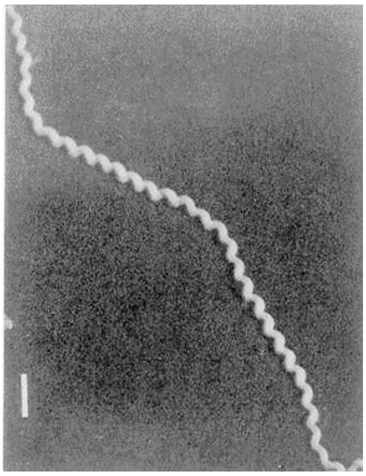
2.1 โรคเลปโตสไปโรสิส

โรคเลปโตสไปโรสิส เป็นโรคติดเชื้อที่พบได้ในทั้งคนและสัตว์ ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญระดับโลก โดยการแพร่เชื้อนั้น เกิดขึ้นได้ง่าย โดยเกิดจากสัตว์ที่มีเชื้อเลปโตสไปราอยู่ที่ไต เมื่อเวลาสัตว์ปัสสาวะออกมา เชื้อเลปโตสไปรา สามารถออกมาพร้อมกับปัสสาวะของสัตว์ ซึ่งทำให้เชื้ออาศัยบริเวณสิ่งแวดล้อม โดยสาเหตุการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิส เกิดจากแบคทีเรียรูปร่างเป็นเกลียวกลุ่ม Spirochete ที่ชื่อว่า *Leptospira* โดยตัวที่สำคัญในการก่อให้เกิดโรค คือ *Leptospira interrogans* โดยการติดเชื้อ สามารถติดเชื้อได้โดยตรง โดยถ้าผู้ติดเชื้อมีบาดแผลที่เปิดปาก เชื้อเลปโตสไปราจะสามารถเข้าทางบาดแผล และนำไปสู่การติดเชื้อทั้งในเลือดและปัสสาวะได้ โดยอาการของผู้ติดเชื้อจะมีตั้งแต่ระดับไม่รุนแรงจนถึงระดับรุนแรง โดยอาการเบื้องต้นของการติดเชื้อเลปโตสไปรา จะมีแค่อาการมีไข้ หนาวสั่น ปวดกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นอาการคล้ายกับโรคทางเขตร้อนทั่วไป(8)

2.1.1 จุลชีววิทยาของเชื้อเลปโตสไปรา

เชื้อเลปโตสไปราจัดเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม Spirochete มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก 3 ถึง 5 ชั้น ซึ่งมีความยืดหยุ่น มีชั้น peptidoglycan แบบขด มี 145 ยีน และมีองค์ประกอบของส่วนไซโตพลาสซึมที่ครอบคลุมภายในเซลล์ นอกจากนี้อีกส่วนประกอบที่สำคัญคือแฟลกเจลลา ซึ่งอยู่ระหว่างชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกกับ peptidoglycan(9) โดยแฟลกเจลลาจะทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่ของเซลล์ในสิ่งแวดล้อม โดยเชื้อเลปโตสไปรามีขนาดประมาณ 0.1 ไมโครเมตร ถึง 20 ไมโครเมตรดังแสดงรูปที่ 3โดยด้านปลายด้านหนึ่งของเชื้อเลปโตสไปรา จะมีลักษณะคล้ายๆตะขอ แต่การมองเชื้อเลปโตสไปราไม่สามารถมองจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Bright filed ได้ ต้องมองจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Dark filed

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูป 3 แสดงลักษณะของเชื้อเลปโตสไปราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน(9)

เชื้อเลปโตสไปราเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยเลปโตสไปราต่างจาก spirochete ตัวอื่นๆก็คือไม่มี glycolipid แต่มี diaminopimelic acid มากกว่า ornithine ที่อยู่ในชั้น peptidoglycan เชื้อเลปโตสไปราเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้ง่ายที่สุดเมื่อเทียบกับ spirochete ตัวอื่นๆ เนื่องจากต้องการสารอาหารที่หาได้ง่าย เช่น Long-chain fatty acids, vitamins B1 และ B12 ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นที่ใช้ในการเจริญเติบโต ถ้าเป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อ เชื้อจะเจริญที่ pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสใช้เวลาในการแบ่งตัวเฉลี่ย 12 ชั่วโมงต้องการอากาศใช้ในการเจริญ(9)

เชื้อเลปโตสไปราที่ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญมีอยู่ 2 สปีชีส์ได้แก่ *L. interrogans* และ *L.borgpetersenii* ในส่วนของสปีชีส์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคได้แก่ *L. biflexa* เมื่อพิจารณา genome ของ *L. interrogans* และ *L.borgpetersenii* ดังแสดงในตารางที่ 1(10)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

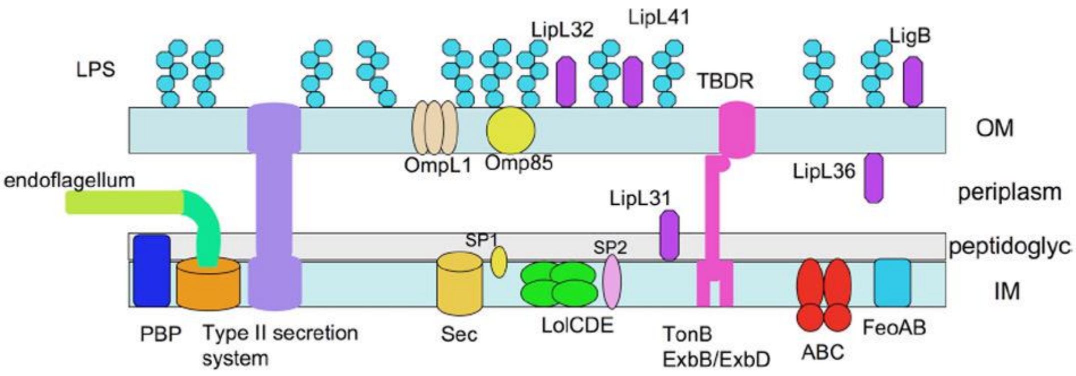
ตาราง 1 การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อเลปโตสไปรา

Table 1 – Leptospira strains used as reference for MALDI-TOF MS measurements.

Specie	Serogruop	Serovar	Strain	Pathogenicity
Leptospira borgpetersenii	Ballum	Castellonis	Castellon 3	
Leptospira borgpetersenii	Celledoni	Whitcombi	Whitcombi	
Leptospira borgpetersenii	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46	
Leptospira borgpetersenii	Mini	Mini	Sari	
Leptospira borgpetersenii	Sejroe	Hardjo	Hardjobovis	
Leptospira borgpetersenii	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin	
Leptospira interrogans	Australis	Australis	Ballico	
Leptospira interrogans	Australis	Bratislava	Jez Bratislava	
Leptospira interrogans	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A	
Leptospira interrogans	Bataviae	Bataviae	Van Tienen	
Leptospira interrogans	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	
Leptospira interrogans	Djasiman	Sentot	Sentot	
Leptospira interrogans	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis	Pathogenic
Leptospira interrogans	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M-20	
Leptospira interrogans	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	
Leptospira interrogans	Pomona	Kennewicki	Fromm	
Leptospira interrogans	Pomona	Pomona	Pomona	
Leptospira interrogans	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem	
Leptospira interrogans	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno	
Leptospira interrogans	Sejroe	Wolffi	3705	
Leptospira kirshneri	Autumnalis	Butembo	Butembo	
Leptospira kirshneri	Cynopteri	Cynopteri	3522C	
Leptospira kirshneri	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskova V	
Leptospira noguchi	Panama	Panama	CZ 214K	
Leptospira santarosai	Shermani	Shermani	1342 K	
Leptospira biflexa	Andamana	Andamana	CH 11	
Leptospira biflexa	Andamana	Bovedo	Bovedo	
Leptospira biflexa	Doberdo	Rufino	RPE	
Leptospira biflexa	Garcia	Garcia	Garcia	Non-pathogenic
Leptospira biflexa	Nazare	Nazare	Nazaré	
Leptospira biflexa	Seramanga	Patoc	Patoc-1	

โครงสร้างผนังของเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปราประกอบไปด้วย outer membrane และ inner membrane โดยบริเวณ outer membrane ประกอบด้วย transmembrane porin OmpL1 และ lipoproteins LipL32, LipL36, LipL41, และ LigB นอกจากนี้ยังมี lipopolysaccharide ซึ่งประกอบไปด้วย lipid A ซึ่งส่วนประกอบต่างๆของเชื้อเลปโตสไปราจะพบในเชื้อก่อโรคเท่านั้น(9) ดังแสดงในรูปที่ 4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

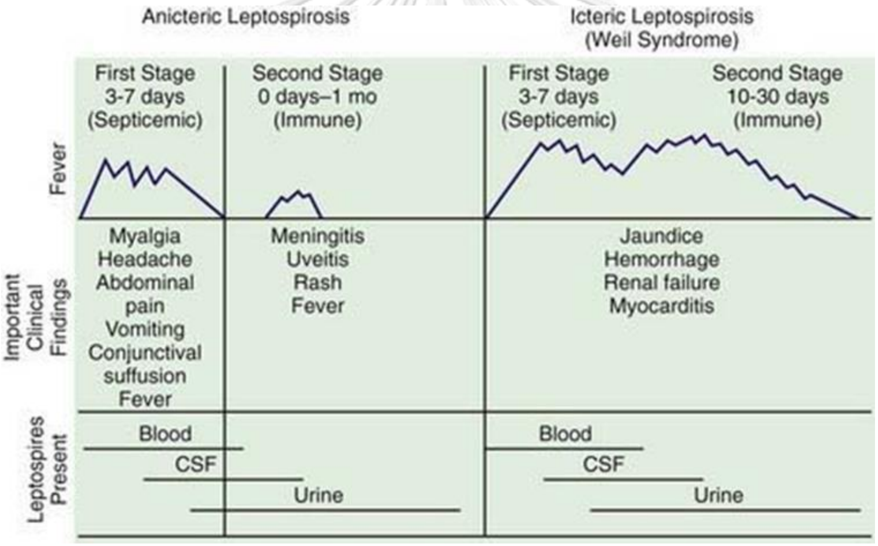


รูป 4 แสดงลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์เชื้อเลปโตสไปรา(9)

2.1.2 ลักษณะทางคลินิก

อาการของโรคเลปโตสไปโรสิส มีความแปรผันสูงและอาการไม่จำเพาะ ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยของผู้ติดเชื้อและปัจจัยของตัวเชื้อเลปโตสไปราเอง สัดส่วนของการติดเชื้อและไม่แสดงอาการนั้น มีสัดส่วนค่อนข้างมากกว่าการแสดงอาการ โดยอาการทางคลินิกจะมีอาการตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 30 หลังจากการสัมผัสเชื้อ ซึ่งมีระยะบ่มในช่วง 7 ถึง 12 วัน ดังแสดงในรูปที่ 5 โดยอาการเริ่มแรกที่พบได้แก่ มีไข้ หนาวสั่น ปวดหัวและปวดกล้ามเนื้อ ซึ่งอาการเหล่านี้คล้ายกับโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุอื่นๆ

ในโรคเลปโตสไปโรสิสอาการที่สำคัญได้แก่ อาการปวดน่องและปวดหลังเป็นหลักๆ ร่วมกับมีอาการปวดหัวและหนาวสั่นร่วมด้วย นอกจากนี้ภาวะเยื่อบุตาขาว (Conjunctival suffusion) ก็เป็นลักษณะเด่นๆที่พบ บางครั้งโรคเลปโตสไปโรสิสพัฒนาไปสู่ระดับรุนแรงซึ่งเกิดจากการมีภาวะเป็นดีซ่าน, ไตล้มเหลวและร่วมกับมีเลือดออกในปอด(11)



รูป 5 แสดงระยะและอาการของการติดเชื้อเลปโตสไปรา(12)

2.1.1 การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสทางห้องปฏิบัติการ

ในปัจจุบันมีการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสจะดูจากอาการทางคลินิกประกอบกับวินิจฉัยกับผลทางห้องปฏิบัติการควบคู่กันไป โดยการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสทางห้องปฏิบัติการมีดังนี้

Direct Diagnostic Methods

Direct Microscopic คือ ตรวจเชื้อเลปโตสไปราได้โดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด dark filed โดยไม่ต้องผ่านการย้อมสี โดยการดูภายใต้ dark filed จะเห็นว่าเชื้อมีการเคลื่อนไหวเป็นเกลียว แต่การดูเชื้อเลปโตสไปราโดยตรงภายใต้กล้อง dark filed นั้นจะดูได้ภายในการติดเชื้อใน 1 อาทิตย์หลังการติดเชื้อ ซึ่งข้อเสียจากวิธีนี้คือมีทั้งผลบวกปลอมและผลลบปลอม

Culture คือ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเชื้อ เพื่อให้เชื้อเลปโตสไปราเจริญได้เร็วขึ้นเนื่องจากมีสารอาหารที่ครบในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยส่วนใหญ่จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson, Harris) ในการเพาะเชื้อ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจะใช้เวลาในการดูเชื้อประมาณทุกๆ 2 อาทิตย์จนครบ 1 เดือน

Molecular Methods

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นวิธีที่รวดเร็วและตรวจได้โดยตรงจากตัวอย่าง ซึ่งตรวจพบได้ตั้งแต่ระยะแรกของการติดเชื้อ ซึ่งเป็นการตรวจจับสารพันธุกรรม DNA ของเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งพบได้ตั้งแต่ปริมาณเชื้อ 10 copies/mL ของเลือด(13) โดยข้อจำกัดของวิธีนี้คือไม่สามารถบอก serovar ของเชื้อเลปโตสไปราได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Serological and other indirect methods

Microscopic Agglutination Test (MAT) เป็นวิธีมาตรฐานที่มีอยู่ในปัจจุบัน วิธีนี้จำเป็นต้องใช้ serovar หลายๆสายพันธุ์และวิธีนี้ยังไม่สามารถวินิจฉัยในระยะการติดเชื้อเริ่มต้นได้เนื่องจากต้องรอแอนติบอดี้ ที่เกิดขึ้นก่อนโดยการแปลผลจะแปลจาก 1:400 ในซีรั่มเดี่ยวและ 4 เท่าจากซีรั่มคู่

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจ IgM แอนติบอดี้ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายกว่า MAT โดยวิธีนี้สามารถบอกปริมาณแอนติบอดี้ได้(14)

Indirect Hemagglutination Assay (IHA) การทดสอบ IHA เป็นวิธีการวินิจฉัยที่รวดเร็วและทำได้ง่าย โดยเทคนิคใช้ดูการตกตะกอนของเลือดเป็นเม็ดกระดุม โดยระยะแรกของการติดเชื้อวิธีนี้มีความไวถึง 92 ร้อยละ และมีความจำเพาะถึง 95 ร้อยละเมื่อเทียบกับวิธี MAT โดยข้อจำกัดของวิธี

นี้คือ สามารถวินิจฉัยได้ก่อน 8 วันหลังการติดเชื้อซึ่งถ้าเกิน 8 วันอาจจะได้ผลลบปลอม(14) โดยวิธีการวินิจฉัยแต่ละวิธี ย่อมมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันได้ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดนั้น โดยข้อดีคือ สามารถเห็นเชื้อได้โดยตรง แต่ขาดความไว เนื่องจากถ้าปริมาณเชื้อมีน้อย จะไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด ปริมาณเชื้อต้องมีจำนวนถึง 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในส่วนของการตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี ELISA นั้นส่วนใหญ่การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสมักทำด้วยวิธีนี้ แต่เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่สามารถวินิจฉัยได้ในช่วงแรกของการติดเชื้อทำให้อาจจะเกิดผลลบปลอม เนื่องจากแอนติบอดี้เกิดขึ้นหลังการติดเชื้อไปแล้ว นอกจากนี้การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสด้วยวิธีมาตรฐานคือวิธี MAT มีความไวต่ำและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการทำแลปวินิจฉัย เนื่องจากเป็นวิธีที่มีการทำที่ยุ่งยาก ในปัจจุบันวิธีที่ค่อนข้างมีความไวและสามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในระยะแรกของการติดเชื้อ คือ วิธี PCR แต่ข้อจำกัดในการใช้วิธีนี้เนื่องจากเป็นวิธีที่มีราคาค่อนข้างสูง ทั้งน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์และเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ดังตารางที่ 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 2 แสดงข้อดีและข้อเสียของแต่ละวิธี(15)

Test	Advantages	Disadvantages
Dark Field Microscopy (DFM)	Visualize Leptospirosis	Lack of sensitivity and specificity. 10^4 Leptospires/ml of blood is necessary for one organism/field to be visible under DFM.
IgM ELISA	Most widely used	False positive, IgM cannot be detected in early stages of infection and can persist in blood for years.
Microscopic Agglutination Test (MAT)	Gold Standard	Less sensitive in early phase of disease. Labor intensive and complicated procedure as there is a need to maintain Leptospira strain for preparing live antigen.
Polymerase Chain Reaction (PCR)	Successful in detecting Leptospira DNA in serum and urine samples of patients	Expensive reagents Requires large quantity of DNA. Cannot identify the infecting serovar.

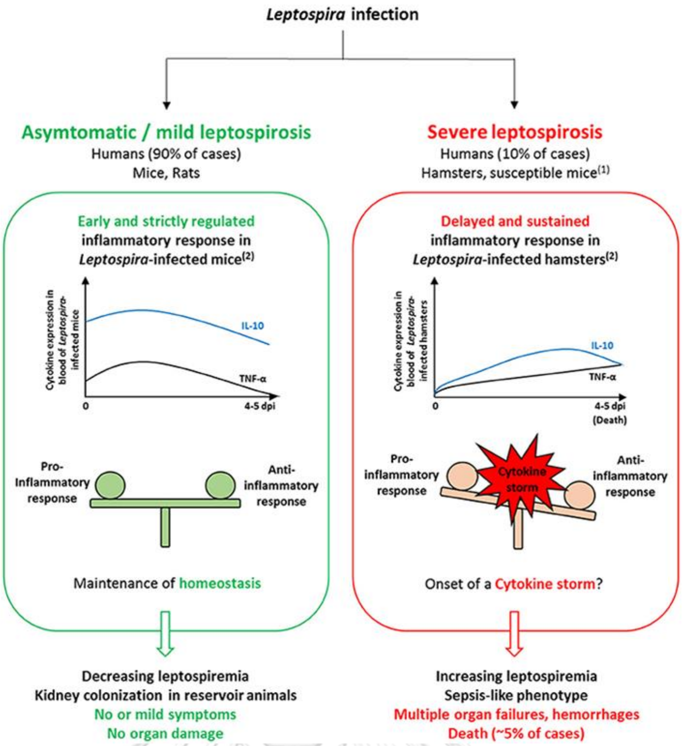
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2 การเกิดภาวะความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิส (Severity of Leptospirosis)

สาเหตุของการเกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิส เกิดจากการเกิดภาวะล้มเหลวของอวัยวะต่างๆ ซึ่งเกิดจาก cytokine storm ซึ่งเป็นกลไกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ *Leptospira spp* ซึ่งทำให้ผู้ป่วยมีระดับ cytokine ที่สูงขึ้น ไม่ว่าจะเป็นระดับ TNF-α, IL-6 และ IL-10 ซึ่งทำให้ผู้ป่วยมีอาการแย่ลง จนเกิดเป็นภาวะรุนแรงเกิดขึ้น(4) มีการศึกษาที่ให้หนูติดเชื้อ *Leptospira spp* โดยในหนูที่อ่อนแอจะทำให้เกิดภาวะความรุนแรงของโรค ซึ่งเกิดจาก cytokine storm ซึ่งมีผลทำให้เกิดอวัยวะภายในล้มเหลว ซึ่งเกิดในผู้ป่วยประมาณร้อยละ 10 ตามรูปที่ 6 (16) การเกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิสนั้น ส่วนใหญ่จะเกิดจากการทำงานล้มเหลวของระบบอวัยวะในหลายๆส่วน ซึ่งประกอบไปด้วยตับ, ไต, ปอดและระบบประสาทโดยทำให้เกิดภาวะความรุนแรงต่างๆดังนี้ ภาวะดีซ่าน (Jaundice), การทำงานล้มเหลวของไต(Acute Renal Failure)และภาวะการมีเลือดออกในปอด(Hemorrhage) โดยมีอัตราการเสียชีวิตตั้งแต่ร้อยละ 5 จนถึงร้อยละ20 นอกจากนี้โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Leptospira spp* ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตถึงร้อยละ 50 ได้แก่ ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) หรือกลุ่มอาการหายใจลำบากเฉียบพลัน(8) ในการเกิดภาวะตับล้มเหลวจะดูจากค่า bilirubin ที่สูงขึ้น ทำให้ผู้ป่วยมีอาการตัวเหลืองตาเหลือง และอีกอวัยวะหนึ่งที่เป็นอวัยวะสำคัญ ที่ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการรุนแรง ซึ่งก็คือ ไต โดยไตเป็นอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญของเชื้อ *Leptospira spp* โดยการประเมินความรุนแรงของไต จะดูได้จากค่า Blood Urea Nitrogen (BUN) และค่า Creatinine(4) ในการเกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนนั้น ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดในปัจจุบันทำได้เพียงดูอาการทางคลินิกเป็นหลัก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ในปี 2543 ประเทศไทยเกิดน้ำท่วมครั้งใหญ่ ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ซึ่งมีการรายงานพบผู้ติดเชื้อ 14,000 รายซึ่งคิดเป็น 23.1 ต่อ 100,000 ประชากรโดยมีการรายงานพบผู้เสียชีวิต ประมาณร้อยละ 2.5 โดยจากการศึกษาของวิลาวรรณและคณะ(17) พบว่ามีผู้ป่วยเป็นโรคเลปโตสไปโรสิสในภาคตะวันออกเฉียงเหนือลดลง ตั้งแต่ปี 2544 แต่มีอัตราจำนวนผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคเลปโตสไปโรสิส จากภาวะรุนแรงเพิ่มขึ้นจากปี 2544 ถึง 2555 โดยสาเหตุสำคัญๆ เกิดจากภาวะเลือดออกในปอดรุนแรง อีกการศึกษาของ กรรณิการ์และคณะ(18) พบว่าตั้งแต่ปี 2542 ถึง 2543 สาเหตุการเสียชีวิตหลักๆได้แก่ การมีเลือดออกในปอด, ภาวะไตวายและการติดเชื้อในกระแสเลือด



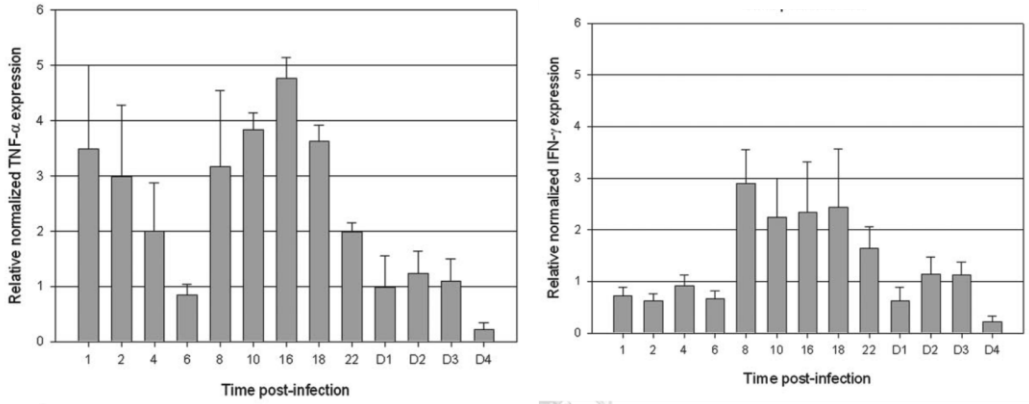
รูป 6 แสดงการเกิดภาวะความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิสในหนู(16) โดยในภาวะที่เชื้อถูกกำจัด *หมดทำให้ผู้ป่วยไม่แสดงอาการ หรือมีอาการเล็กน้อย เนื่องจากยังเกิดภาวะสมดุล (Homeostatic) ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อ* Leptospira การผลิต cytokines จะล่าช้าและคงอยู่ ซึ่งอาจกระตุ้นให้เกิด cytokines storm ระดับการแสดงออกของ IL-10 และ TNF-α มากขึ้นทำให้เกิดภาวะไม่สมดุล นำไปสู่ภาวะรุนแรงของโรค

2.2.1 การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสอาการรุนแรง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในปัจจุบันการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส จะดูจากอาการทางคลินิกเป็นหลักควบคู่กับการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ ตาม WHO ซึ่งได้แก่ วิธีการตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค real time PCR, การตรวจหาเชื้อโดยตรงโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture) และการตรวจทางระบบภูมิคุ้มกันด้วยวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) ซึ่งการตรวจวินิจฉัยดังกล่าวเป็นแค่เพียงการวินิจฉัยเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งไม่ได้มีวิธีใดเป็นการแสดงบอกถึงความรุนแรงของโรค(14)

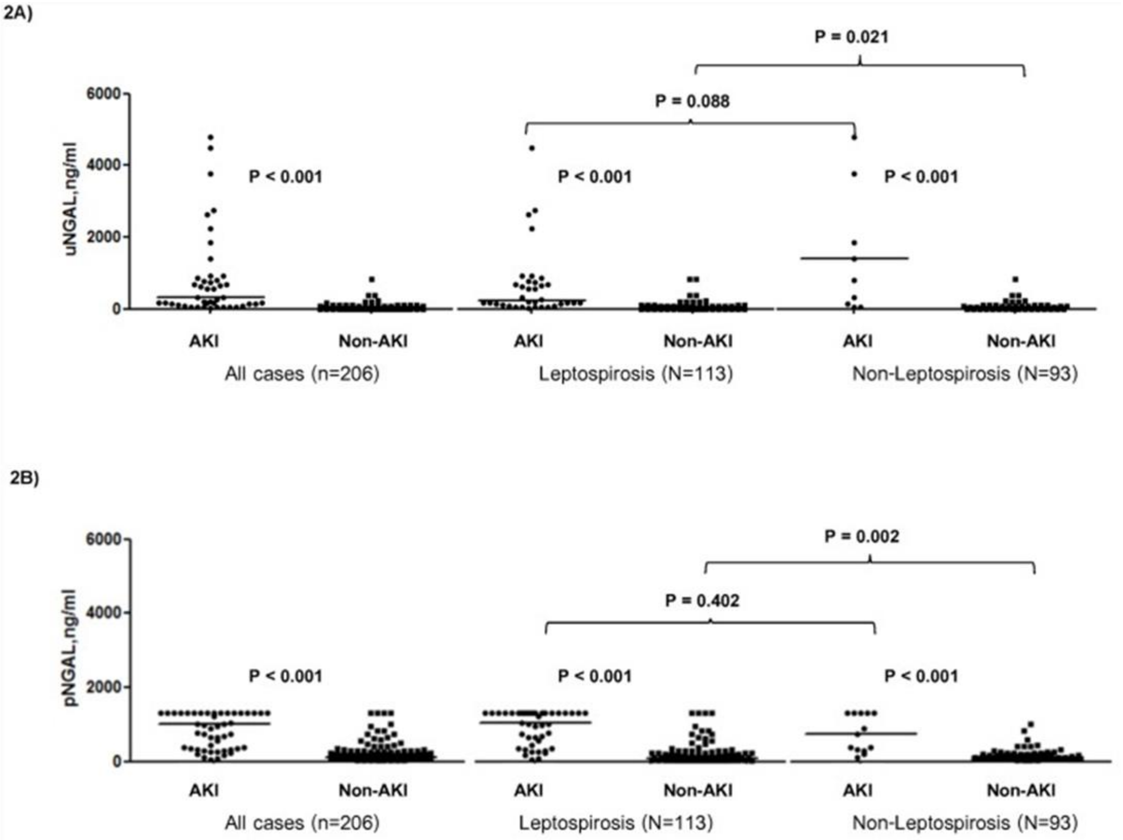
ในปี 2549 Vernelและคณะ(19) ทำการศึกษาการแสดงออกของ cytokine mRNA โดยทำการฉีดเชื้อ *Leptospira* ในหนู hamster เพื่อจำลองสถานการณ์ให้เหมือนกับคนไข้เลปโตสไปโรสิสรุนแรง โดยกลุ่มควบคุมเป็นหนูที่ไม่ติดเชื้อ พบว่าหลังจากที่หนู hamster มีการติดเชื้อหลัง 1 ชั่วโมงมีการแสดงออกของ Th1 cytokine mRNA (TNF-, IFN-, and IL-12) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ผู้วิจัยได้ทราบว่าการติดเชื้อ *Leptospira* สามารถกระตุ้นการผลิต cytokine type 1 สามารถเข้าใจกลไกของโรค จุดแข็งของงานวิจัยนี้คือ เป็นการหยิบ mRNA ที่เกี่ยวข้องกับความโรคเลปโตรุนแรงแต่ไม่ได้ศึกษาในผู้ป่วยจริง ดังแสดงในรูปที่ 7



รูป 7 แสดงการแสดงออกความสัมพันธ์ของ TNF-α และ IFN-γ ในกลุ่มของหนูที่ติดเชื้อโดยดูระดับการแสดงออกของ TNF-α และ IFN-γ เทียบกับการแสดงออกของ β-actin ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงเมื่อเวลาผ่านไป(ชั่วโมง-วัน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ในปี 2558 ณัฐชัยและคณะ(20) ศึกษาตัวชี้วัดทางชีวภาพของภาวะไตวายเฉียบพลันซึ่งเป็นสาเหตุอันดับต้นๆของการเกิดความรุนแรงในโรคเลปโตสไปโรสิส โดยพบว่าตัวชี้วัดทางชีวภาพนั้นก็คือ Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin(NGAL) ในสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่าเมื่อระดับ NGAL สูงขึ้นภาวะการเกิดไตวายเฉียบพลันก็เพิ่มขึ้นด้วย ดังแสดงในรูปที่ 8 จึงนำ NGAL เป็นตัวทำนายการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน



รูป 8 แสดงปริมาณ NGAL ในเลือดและปัสสาวะของผู้ป่วย 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็นโรคเลปโตสไปโรสิส และกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคเลปโตสไปโรสิสโดยทั้ง 2 กลุ่มนี้ประกอบด้วยกลุ่มที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (AKI)และไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Non-AKI)

ในปี 2558 Mikulskiและคณะ(21) หาปัจจัยอาการทางคลินิก เพื่อใช้ในการทำนายโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงในโรงพยาบาล คนไข้เลปโตสไปโรสิสยืนยันวินิจฉัยด้วย PCR ในเลือดหรือฉี่ และ MAT 1:800 จำนวน 47 คนแบ่งเป็น 2 กลุ่ม เป็นกลุ่มรุนแรงโดยดูจากการเสียชีวิต, การใส่เครื่องช่วยหายใจ, การล้างไต และกลุ่มไม่รุนแรง พบว่ามีการแสดงออกของ IL-1ra, PTX3 และ IL-1alpha ดังแสดงในรูปที่ 9 จุดเด่นก็คือสามารถหาการแสดงออก mRNA ในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงได้ แต่ข้อจำกัดคือไม่ได้มีการค้นพบการแสดงออกเองเป็นการนำ cytokine ที่เกี่ยวข้องหลายๆตัวมาจากการศึกษาก่อนหน้านี้มาแล้ว

Table 3 Gene expression of cytokines and other immune markers according to severity

	Numbers: non-severe/ severe	Non-severe			Severe			*p*-Value
		25th percentile	Median	75th percentile	25th percentile	Median	75th percentile	
TNF-α	14/16	0.51	1.22	2.32	0.56	1.84	3.44	0.313
IL-1β	13/16	0.42	0.92	1.62	0.36	0.78	1.64	0.846
IL-1ra	13/16	0.58	1.29	3.05	1.66	4.10	6.98	0.015
PTX-3	14/16	0.38	1.62	3.38	3.38	5.40	12.43	0.001
IL-6	14/16	0.01	0.09	0.19	0.08	0.26	0.42	0.110
IL-1α	14/16	0.16	0.80	1.52	0.74	1.96	4.19	0.025
IL-12p40	14/16	0.22	0.33	1.03	0.22	0.55	1.41	0.179
IL-10	13/16	1.63	3.99	22.70	5.19	10.89	24.80	0.156
IFN-α	13/14	0.02	0.10	0.59	0.12	0.37	1.21	0.105
TGF-β	13/16	0.06	0.11	0.12	0.05	0.06	0.07	0.062
Cox-2	13/16	0.40	1.06	1.26	0.43	1.43	2.12	0.170
Leptospira 16S to human household	12/14	0.01	3.95	802.25	0.00	54.77	3,867.50	0.494

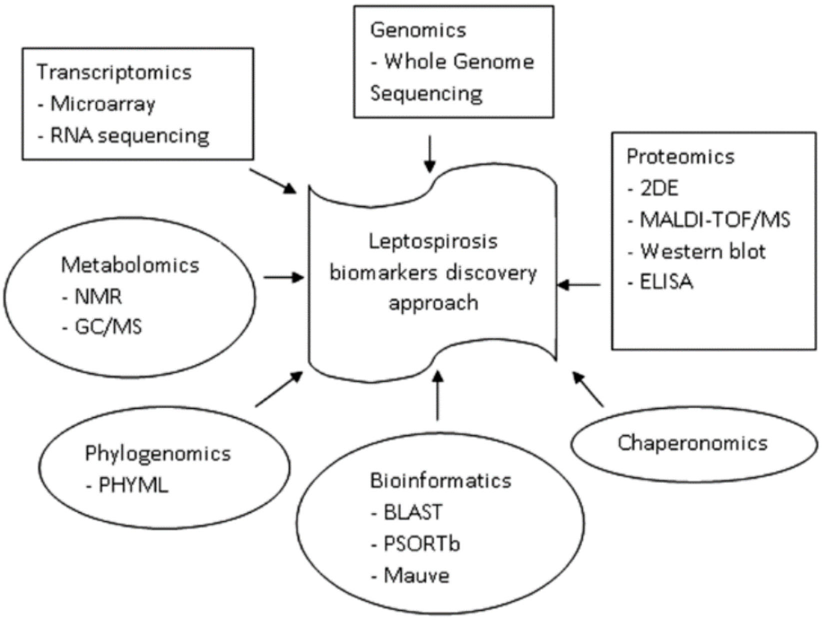
The results are the relative normalized expression ratios as detailed in the text, where normal values are 1

รูป 9 แสดงการแสดงออกของยีนต่างๆ โดยพบว่า IL-1ra, PTX3 และ IL-1alpha ของกลุ่มเลปโตสไปโรสิสรุนแรงเทียบกับกลุ่มเลปโตสไปโรสิสไม่รุนแรงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในปี 2559 Nairและคณะ(22) มีการนำ Sequential Organ Failure Assessment score (SOFA Score) ที่ใช้ในการประเมินผู้ป่วยที่อยู่ในหอผู้ป่วยวิกฤต (ICU) เปรียบเทียบกับ Simplified Acute Physiology score (SAP) มาใช้ในการประเมินความรุนแรงของโรค ในกลุ่มโรคติดเชื้อเช่น โรคติดเชื้อไวรัสเดงกี, โรคเลปโตสไปโรสิสและโรคมาลาเลีย ซึ่งสามารถใช้ในการประเมินรุนแรงของโรคได้

ในปี 2562 Tan Xue Ting และคณะ(23) ทำการทบทวนและอภิปรายเกี่ยวกับการค้นพบตัวชี้วัดทางชีวภาพซึ่งมีเทคโนโลยีรูปแบบหลายๆวิธีด้วยกัน ซึ่งได้แก่ การศึกษาทางด้าน genomic, transcriptomic, metabolomic, phylogenomic, bioinformatic และ proteomics ในการค้นพบตัวชี้วัดทางชีวภาพดังแสดงในรูปที่ 10



รูป 10 แสดงเทคโนโลยีในการศึกษาตัวชี้วัดทางชีวภาพในโรคเลปโตสไปโรสิส โดยในกรอบสี่เหลี่ยมเป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในปัจจุบัน ส่วนในวงรีเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่พึ่งเกิดขึ้น(23)

ในปี 2562 Smith(24) ใช้คะแนนในการประเมินโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง โดยดูจากความดัน การหายใจที่ผิดปกติ การมีปัสสาวะออกน้อยโดยตัดคะแนนอยู่ที่ 1 คะแนนที่มีความไวร้อยละ 80 แต่เนื่องจากเป็นการประเมินทางคลินิกจึงทำให้เป็นข้อจำกัด ซึ่งยังไม่สามารถตรวจได้ไวพอ เนื่องจากผู้ป่วยบางรายอาจจะไม่แสดงอาการ ดังแสดงในรูปที่ 11

Clinical feature	
Systolic blood Pressure ≤100 mmHg	1 point
Respiratory auscultation abnormalities	1 point
Oliguria	1 point

	0	**1**	**2**	**3**
Number of with severe disease/number of cases (%)	8/287 (3%)	14/70 (20%)	18/26 (69%)	9/9 (100%)
Sensitivity % (95% CI)	-	84% (70–93)	55% (40–69)	18% (9–32)
Specificity % (95% CI)	-	81% (77–85)	98% (96–99)	100% (99–100)
Positive predictive value % (95% CI)	-	39% (30–49)	77% (60–90)	100% (66–100)
Negative predictive value % (95% CI)	-	97% (95–99)	94% (91–96)	90% (86–92)

รูป 11 แสดงองค์ประกอบของคะแนน Spiro score และความไวของคะแนนที่คะแนนต่างๆ โดยคะแนนที่มีความไวสูงคือ 1 คะแนน

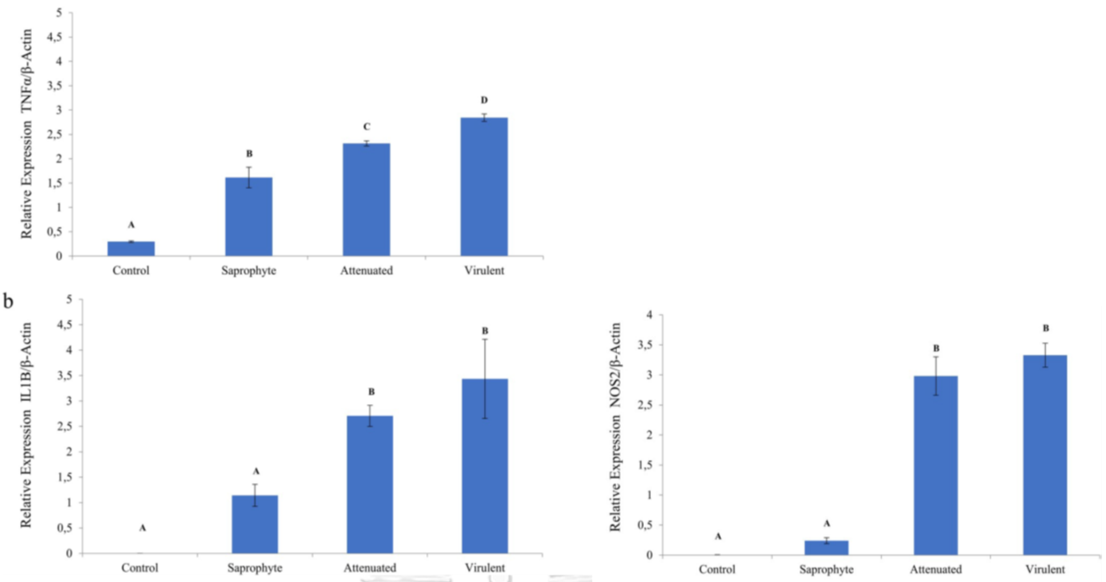
ในปี 2562 Araújo Junior ECdและคณะ(25) ศึกษาการแสดงออกของ mRNA ใน macrophage โดย ติดเชื้อต่างสายพันธุ์ได้แก่ vilulence, attenuated และ saprophyte เพื่อดูการตอบสนองของ host ซึ่งตารางที่ 1แสดงการแสดงออกของยีนของ macrophage เมื่อมีการติดเชื้อต่างสายพันธุ์ ซึ่งมีทั้งการ up และ down regulate ซึ่งทางผู้วิจัยได้นำยีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ มาทำการตรวจสอบด้วย real time PCR ดังแสดงในรูปที่ 12 ซึ่งการศึกษานี้ทำให้ผู้วิจัยทราบถึงกลไกของการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสได้มากขึ้น จุดเด่นของงานวิจัยชิ้นนี้คือมีการค้นพบยีนซึ่งค้นพบทั้ง up และ down regulate ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อเลปโตสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง แต่ข้อจำกัดคือไม่ได้ทำในตัวอย่างของผู้ป่วยและเป็นการหายีนที่เกิดจาก macrophage ติดเชื้อก่อโรคที่รุนแรงแต่อาจจะไม่ได้เกิดเป็นโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงจริงๆ

ตารางที่ 1 แสดงการแสดงออกของยีนทั้ง up-regulate และ down-regulate ของ macrophage ที่ติดเชื้อ Leptospira สายพันธุ์ต่างๆเทียบกับกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ

Table 1. Top modulated transcripts in murine macrophages following 6h of infection with saprophyte, culture-attenuated and virulent strains of *Leptospira* spp.

Regulation	Gene Symbol	FDR-adjusted p-value	FC (Sap vs. CT)	FC (Att vs. CT)	FC (Vir vs. CT)
Up	Il1b	0,000037	202,85	253,12	259,03
	Il1a	0,000004	42,58	120	127,28
	Saa3	0,000003	58,32	113,49	95,44
	Il6	0,000005	17,92	90,05	93,09
	Ccl5	0,000008	15,72	56,83	56,56
	Ptgs2	0,000011	38,21	52,72	56,33
	Nos2	0,000008	6,83	48,29	51,82
	Cxcl10	0,000035	8	45,54	51,25
	Ifit1	0,000217	6,16	33,6	37,61
Down	Rasgrp3	0,000059	-6,97	-9,16	-7,8
	Ighm	0,000045	-4,88	-8,22	-7,91
	Hal	0,000022	-4,52	-6,78	-7,01
	Cxcr4	0,000133	-5,65	-5,93	-6,11
	Klhl24	0,000053	-4,81	-5,77	-5,76
	Il18rap	0,000074	-3,7	-5,55	-5,31
	Nrcam	0,000032	-3,37	-5,43	-5,05
	Il1rl1	0,000028	-3,24	-5,35	-4,53
	Ankrd44	0,000476	-2,68	-5,3	-4,67

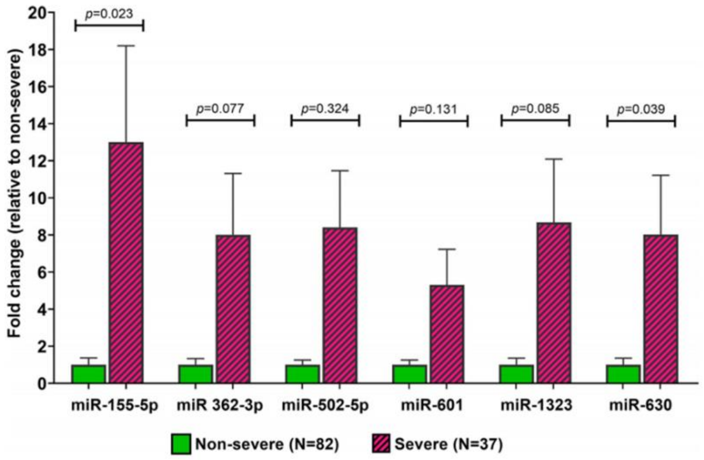
(FC = fold change; SAP = saprophyte; Att = attenuated; Vir = virulent)



รูป 12 แสดงระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม macrophage ติดเชื้อสายพันธุ์ต่างๆเทียบกับกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ

ในปี 2563 Umapornและคณะ(26) เป็นการศึกษา miRNA เพื่อใช้ในการทำนายการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง ใช้ตัวอย่างจากคนไข้ที่เป็นกลุ่มรุนแรงและไม่รุนแรงในโรคเลปโตสไปโรสิส เจอ miR Upregulation ของ miR155-5p, miR362-3p, miR502-5p, miR601, miR1323, และ miR630 โดยทำในคนไข้ 119 คน พบว่าระดับ miR155-5p และ miR630 ในเลือด ในกลุ่มโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงมีค่ามากกกว่ากลุ่มไม่รุนแรง อย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในรูปที่ 13 จุดเด่นของงานวิจัยครั้งนี้ คือ พบว่า miR155 กับ miR630 สามารถใช้เป็น biomarker สำหรับโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงได้ แต่ข้อจำกัดคือ microRNA ไม่ได้จำเพาะเจาะจงกับการแสดงออกของยีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

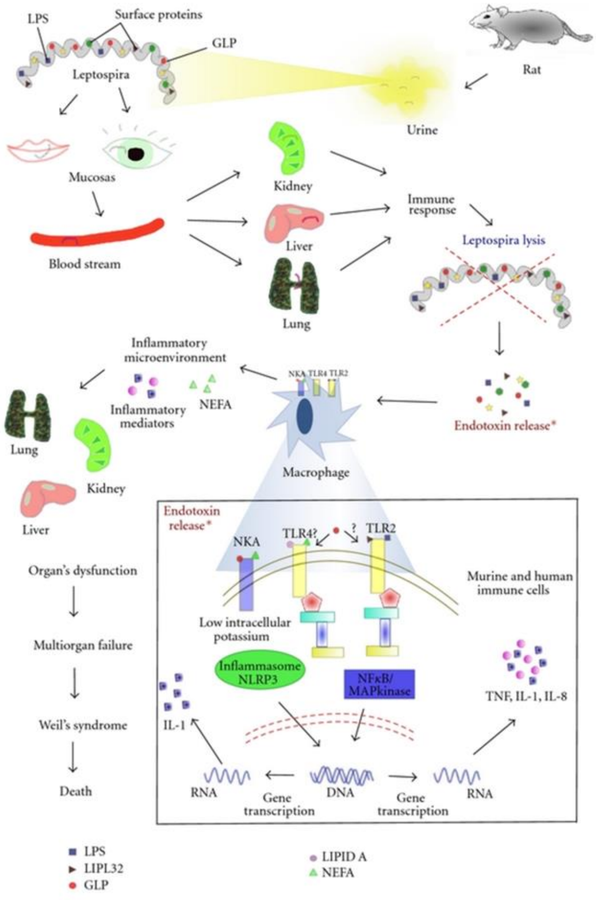


รูป 13 แสดง Fold change (FC) ระดับการแสดงออกของ microRNA ที่ค้นพบในกลุ่มคนไข้เลปโตสไปโรสิสรุนแรงเทียบกับกลุ่มไม่รุนแรง

2.2.2 กลไกที่ทำให้เกิดความรุนแรงจากโรคเลปโตสไปโรสิส

ในขณะที่ติดเชื้อเชื้อเลปโตสไปราจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด โดยทำให้เกิดการตอบสนองการอักเสบโดย Microbial Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) จะจดจำตัวรับ Pattern Recognition Receptors (PRRs) ที่อยู่บนผิวเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ซึ่งหลักๆก็คือ Toll-like receptors (TLRs) และ nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) โดยการจับกันของ PAMPs และ PRRs จะกระตุ้น signaling pathways ประกอบด้วย NF-**K**B และ activator protein 1 (AP-1) transcription factorsซึ่งจะควบคุมการแสดงออกของ cytokine, Prostaglandins (PGs), และ Nitric Oxide (NO) ซึ่ง PGs และ NO เป็น pro-inflammatory ซึ่งช่วยเพิ่มการขยายของหลอดเลือดและช่วยในการซึมผ่านของหลอดเลือดซึ่งนำไปสู่การเข้ามาของ cytokine ของหลอดเลือด Pro-inflammatory cytokines ประกอบด้วย interleukins (IL)-1β, IL-6, IL-12, interferons (IFNs) และtumor necrosis factors (TNFs) หรือที่รู้จักในนามของ chemokines ซึ่งทำให้เกิดการเสียหายของอวัยวะแต่ความจริงยังไม่แน่ชัด(16) กลไกที่ทำให้เกิดความรุนแรงจากโรคเลปโตสไปโรสิสดังแสดงในรูปที่ 14

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูป 14 แสดงกลไกที่ทำให้เกิดความรุนแรงจากโรคเลปโตสไปโรสิส(27)

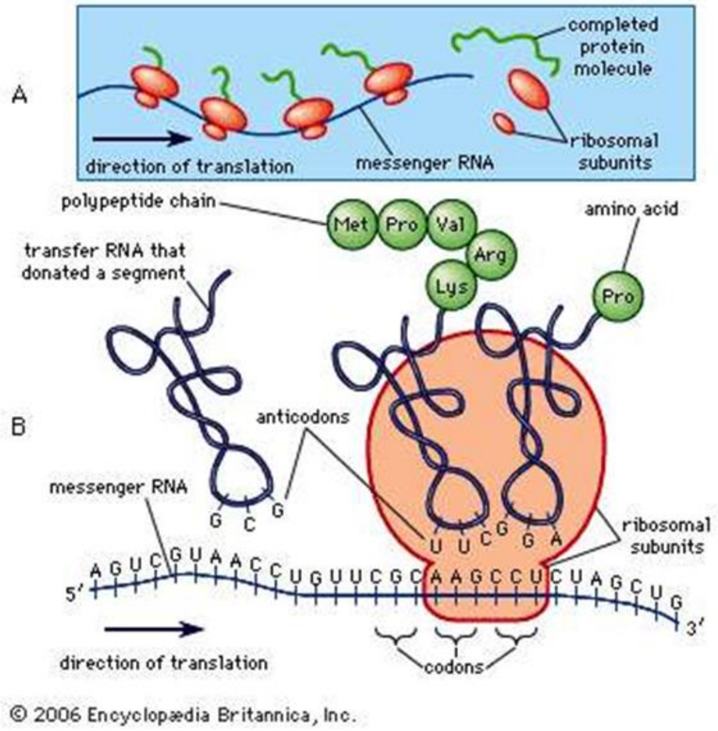
2.3 messenger RNA (mRNA)

2.3.1 โครงสร้างและการแสดงออกของ mRNA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

mRNA เป็นโมเลกุลที่พบในเซลล์ซึ่งถูก code มาจาก DNA ในนิวเคลียสซึ่งจะเกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีนในไซโตพลาสซึมโดย mRNA ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1956 โดยนักวิทยาศาตร์ชื่อว่า Elliot Volkin และLazarus Astrachan เนื่องจาก DNA ไม่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนได้เลยต้องถอดรหัสเป็น mRNA โดยไนโตรเจนเบสของ mRNA ตะตรงกับกรดอะมิโนของโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 15(28)

ในยูคาริโอตบริเวณปลาย 5’ มี triphosphate residue ซึ่งมีหมู่เอสเทอร์ที่ฟอร์มตัวเป็น cap ในบริเวณปลาย 3’ จะมีหมู่ adenosine ซึ่งเป็น poly A ซึ่งกระบวนการทั้ง 2 กระบวนการไม่ได้เกิดขึ้นตอนเป็น DNA และเกิดหลังกระบวนการการถอดรหัส(Transcription) ซึ่งทำให้ mRNA มีความเสถียรมากขึ้น

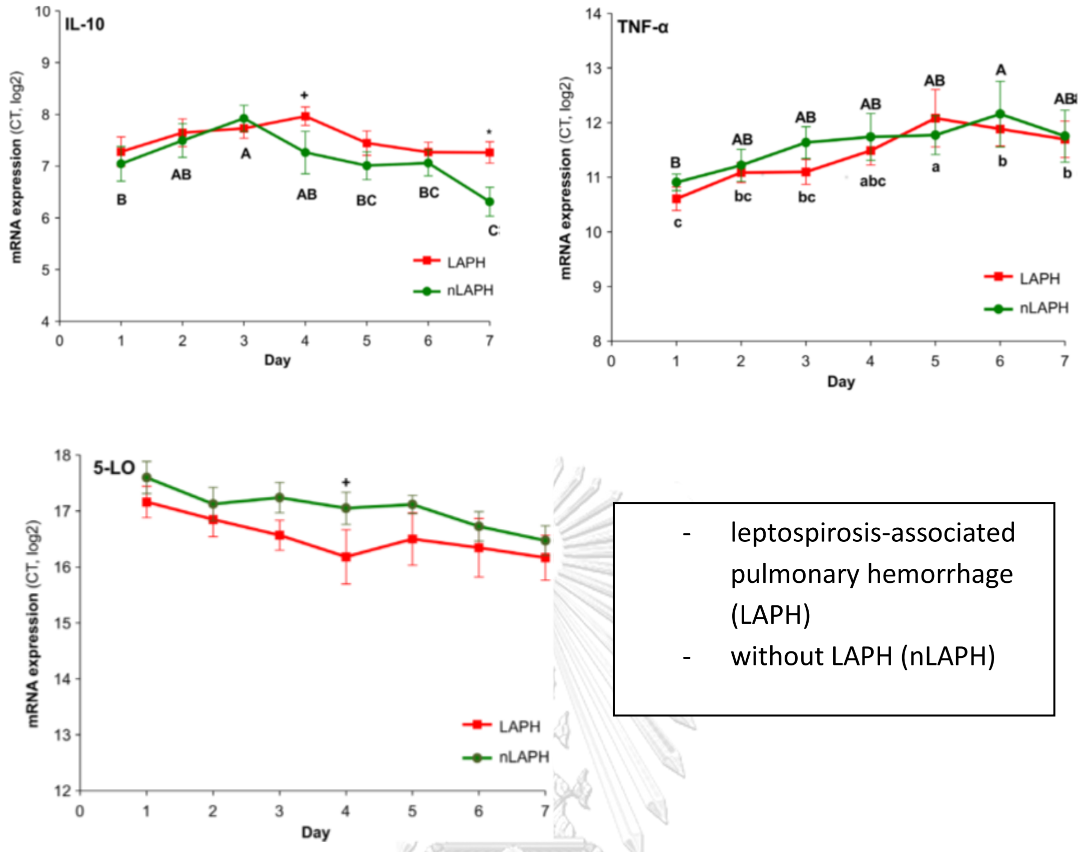


รูป 15 แสดงการสังเคราะห์โปรตีน

2.3.2 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ในโรคเลปโตสไปโรสิส

ในปี 2559 Maissen-Villiger CA และคณะ(29) ได้ศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ Pro-inflammatory และ anti-inflammatory cytokine ในสุนัขที่เป็นโรคเลปโตสไปโรสิส เนื่องจากอาการทางคลินิกในการเป็นโรคเลปโตสไปโรสิสมีอาการคล้ายกับอาการของคน ผลการทดลองพบ mRNA ของ cytokines (IL-1α, IL-1β, IL-8, IL-10, TNF-α, TGF-β) และเอนไซม์ (5-LO, iNOS)ในเลือดของสุนัขที่มีอาการเลือดออกในปอด, ไตวายเฉียบพลัน นอกจากนี้พบว่ามีการแสดงออกระดับเอนไซม์ 5-Lo สูงแต่การแสดงออก iNOS ต่ำ การตายของสุนัขที่มีเลือดออกในปอดพบว่าจะมีระดับการแสดงออก TNF-α ต่ำ, IL-1β และ iNOS ที่สูง ดังรูปที่ 16 สรุปผลการทดลองการแสดงออกของ cytokine และ enzyme บ่งบอกว่าการตอบสนองต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราเกิดจาก complex pro- และ anti-inflammatory ซึ่งจากองค์ความรู้ดังกล่าวอาจจะช่วยในการวินิจฉัยโรคหรือการพยากรณ์โรคสำหรับโรคเลปโตสไปโรสิสต่อไป

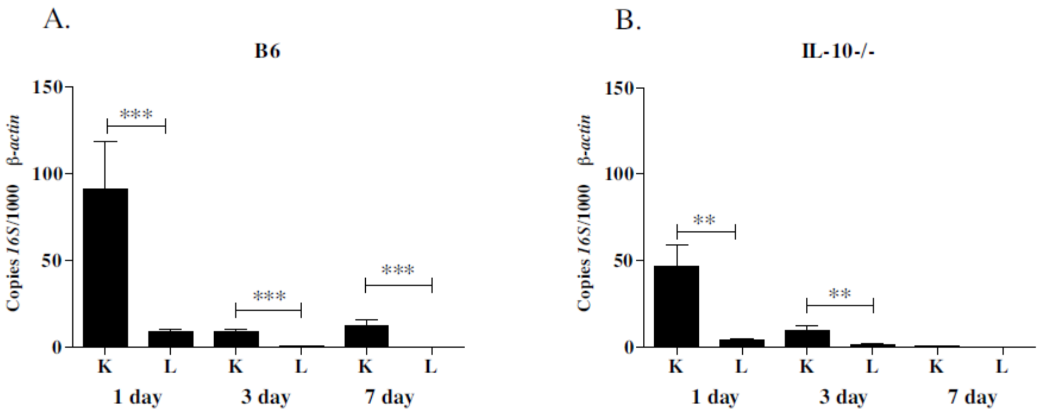
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



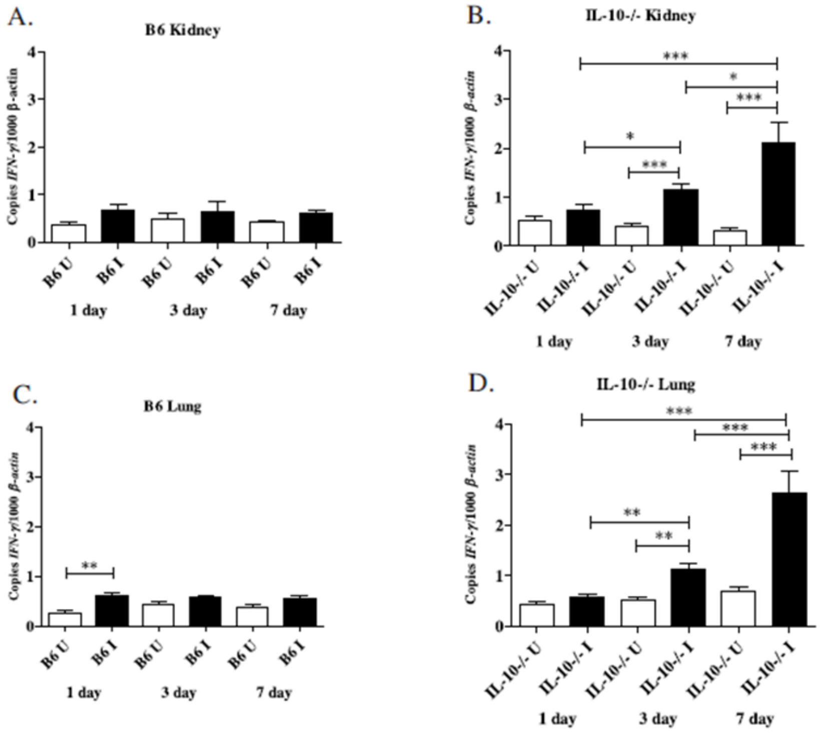
รูป 16 แสดงการแสดงออกระดับ mRNA ของ cytokine และ enzyme ในสุนัขที่เป็นเลปโตสไปโรสิสด้วยอาการเลือดออกในปอดเทียบกับกลุ่มควบคุมเมื่อเวลาผ่านไป(วัน) (29)

ในปี 2560 Devlin และคณะ(30) ทำการศึกษาการผลิตของ IL-10 ซึ่งมีผลทำให้ไม่ว่าจะเป็นสัตว์หรือคนที่ติดเชื้อเลปโตสไปรามีอาการรุนแรง โดยศึกษาการแสดงออกของ IL-10 ในหนู C57Bl/6(กลุ่มควบคุม) เปรียบเทียบกับหนูที่ไม่มีการควบคุมของ IL-10 หลังจากการติดเชื้อเลปโตสไปรา โดยมีการติดตามในการเก็บเลือดของหนูทั้ง 2 กลุ่มในวันที่ 1, 3 และวันที่ 7 หลังการติดเชื้อ เมื่อครบกำหนด 7 วันทำการเก็บชิ้นเนื้อไตและปอดของหนูทั้ง 2 กลุ่ม ผลการทดลองพบว่าในหนูทั้ง 2 กลุ่มมีการแสดงออกของ 16sRNA ในชิ้นเนื้อไตมากกว่าปอดอย่างมีนัยสำคัญและมีระดับลดลงเมื่อเวลาผ่านไปดังแสดงในรูปที่ 17

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูป 17 แสดงการแสดงออกของ 16s mRNA ในชิ้นเนื้อไต (K) และปอด (L) ของหนูทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อเวลาผ่านไป(วัน) ทางผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของ cytokine IL-10, TNF-α, IL-6, IFN-และ IL-4 พบว่ามีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในหนู C57Bl/6และหนูที่ขาดการควบคุม IL-10 โดยสรุปคือในหนูทั้ง 2 กลุ่มมีการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokine ที่ไม่แตกต่างกันแต่ในทางกลับกันการแสดงออกของ Interferon-·γ ในกลุ่มหนูที่ขาดการควบคุม IL-10 ดังแสดงในรูปที่ 18



รูป 18 แสดงการแสดงออกของ Interferon-·γ ในชิ้นเนื้อไตและปอดของหนูทั้ง 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ติดเชื้อ(Infected) และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ (Uninfected) เมื่อเวลาผ่านไป (วัน)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครที่ใช้ในการศึกษา (inclusion criteria)

1) ผู้ป่วยที่เป็นอาสาสมัครทั้งหมดยินยอมที่จะเข้าร่วมการวิจัยด้วยความสมัครใจ
2) ผู้ป่วยอาสาสมัครทั้งหมดจะต้องมาจากโรงพยาบาลทั้ง 15 โรงพยาบาล ในจังหวัดศรีสะเกษและจังหวัดนครศรีธรรมราชประเทศไทย
3) เป็นผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรสิสโดยมีเกณฑ์วินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Real time PCR, ผลการตรวจเพาะเชื้อเลปโตสไปรา (Culture) และ ผลการตรวจทาง serology ซึ่งก็คือผลจากทางห้องปฏิบัติการ Microscopic Agglutination Test (MAT) ซึ่งถ้าผลการตรวจวินิจฉัยใดวินิจฉัยหนึ่งเป็นผลบวกผู้ป่วยจะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรสิสทันทีตามหลัก WHO(6)
4) มีประวัติการสัมผัสน้ำ พื้นที่ชื้นแฉะ หรือสิ่งแวดล้อมที่สัมผัสสิ่งขับถ่ายของสัตว์รังโรค

3.1.2 เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

เป็นผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยติดเชื้อโรคอื่นๆ

3.2 การวินิจฉัยการเกิดความรุนแรงของโรคโดยใช้ SOFA Score

ถ้าคะแนน SOFA Score มีค่าเท่ากับ 3 หรือ 4 ในระบบใดระบบหนึ่งจะแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยรายนั้นมีอาการรุนแรงทันทีโดยพิจารณาจากระบบการทำงานการหายใจ,ระบบการทำงานเลือดและการแข็งตัวของเลือด ระบบการทำงานของตับ ระบบการทำงานของหัวใจ ระบบการทำงานประสาทและระบบการทำงานของไต ดังแสดงในตารางที่ 3(31)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 3 แสดงการให้คะแนนของการทำงานแต่ละระบบ SOFA Score

Table 1 The Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score[a]

Organ system	SOFA score				
	0	1	2	3	4
Respiratory, PO_2/FiO_2, mmHg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory
Coagulation, Platelets, $\times10^3/mm^3$	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver, Bilirubin, mg/dL	<1.2	1.2–1.9	2.0–5.9	6.0–11.9	>12.0
Cardiovascular	MAP ≥70 mmHg	MAP <70 mmHg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose)[b]	Dopamine 5.1–15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1[b]	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1[b]
Central nervous system, Glasgow Coma Scale	15	13–14	10–12	6–9	<6
Renal, Creatinine, mg/dL. Urine output, mL/d	<1.2	1.2–1.9	2.0–3.4	3.5–4.9 <500	>5.0 <200

[a], adapted from Vincent *et al.* (7); [b], Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour. FiO_2, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; PO_2, partial pressure of oxygen.

ในการศึกษาครั้งนี้จะแบ่งผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรสิสออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่มีอาการรุนแรงกับกลุ่มที่ไม่มีอาการรุนแรงโดยการวินิจฉัยในกลุ่มอาการรุนแรงวินิจฉัยจากคะแนน SOFA Score ซึ่งถ้ามีอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งมีคะแนน 3 กับ 4 คะแนนจะถือว่าผู้ป่วยรายนั้นเป็นกลุ่มที่มีอาการรุนแรงส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการรุนแรงก็คือมีคะแนนตั้งแต่ 1 ถึง 2 คะแนน

ในการศึกษาวิจัยนี้มี 2 ส่วนคือการค้นหาการแสดงออกของ mRNA กับการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง (Discovery) และส่วนที่สองคือการตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ที่ค้นพบในส่วนแรก(Validation)

3.3 การค้นหาการแสดงออกของ mRNA กับการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง (Discovery)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.1 กลุ่มตัวอย่าง

CHULALONGKORN UNIVERSITY

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้นำเลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรสิส จำนวน 12 ราย ที่ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์ด้านโรคไตในภาวะวิกฤต แห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้เก็บรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยอาสาสมัครจาก 15 โรงพยาบาล ในจังหวัดศรีสะเกษและจังหวัดนครศรีธรรมราชของประเทศไทย ตัวอย่างทั้งหมดได้ผ่านการขออนุญาตจากคณะกรรมการกลางจริยธรรมการวิจัยในคน (Central Research Ethics Committee, National Research Council of Thailand [CREC 5/2016]) และได้รับจริยธรรมจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

3.3.2 การสกัด mRNA จากตัวอย่างผู้ป่วย

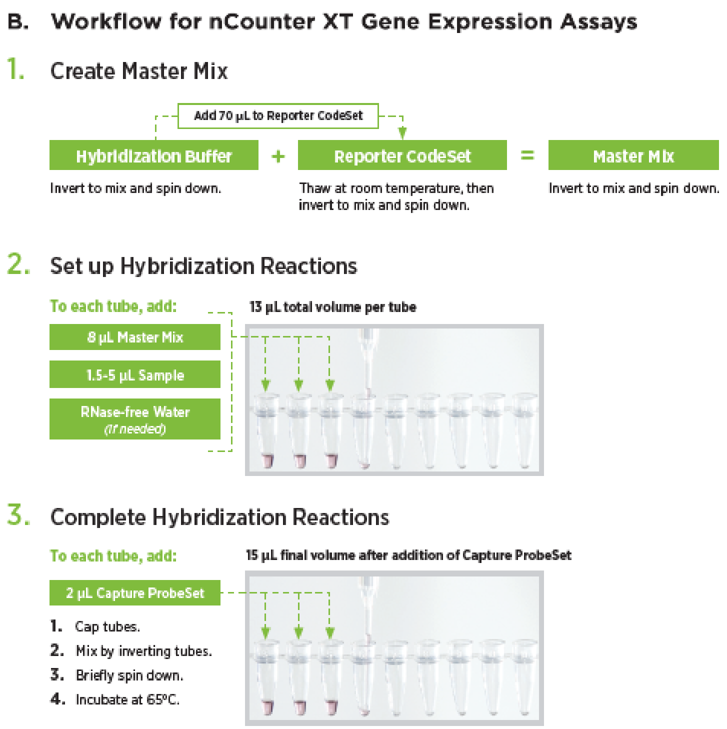
นำเลือดทั้งหมดของผู้ป่วย (Whole blood) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร สกัดด้วยวิธี Trizol (TRIzol™ Reagent thermoFisher) เมื่อได้ mRNA ทำการวัดความเข้มข้นของ mRNA โดยใช้ Nano-drop 1000 spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE)

3.3.3 การศึกษาการแสดงออก mRNA ในเลือดของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสด้วยเทคโนโลยี Nanostring

ในขั้นตอนการค้นพบการแสดงออก mRNA นั้นจะใช้ 12 ตัวอย่างเนื่องจาก 1 kit ทำตัวอย่างได้ 12 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งเป็นผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิสรุนแรงจำนวน 8 รายและผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิสไม่รุนแรงจำนวน 4 ราย ซึ่งผู้ป่วยที่มีความรุนแรงทั้งหมด 8 คน โดยใน 8 คนนี้พิจารณาจากคะแนน SOFA Score ในระบบการทำงานของอวัยวะต่างๆมีค่า 3 หรือ 4 แบ่งเป็นอาการ acute kidney injury 3 ราย ซึ่งดูจากระบบการทำงานของไตคือค่า creatinine >3.5 mg/dl, lung hemorrhage โดยดูจากอาการเลือดออกในปอดของคนไข้จำนวน 1 ราย, อาการ acute liver failure จำนวน 1 ราย ดูจากการทำงานของตับโดยดูค่า bililubin > 6 mg/dlส่วน และ multiple organ failure คือมีอาการดังกล่าวมากกว่า 1 ระบบ จำนวน 3 รายโดยหลักการเลือกตามระบบอวัยวะตามอัตราการเกิดของความรุนแรงในโรคเลปโตสไปโรสิส(4) และไม่รุนแรงทั้งหมด 4 คน โดยขั้นตอน การศึกษาการแสดงออก mRNA จำนวน 750 ยีนในคน โดยใช้ Cancer Panel gene 360 IO cancer panel และใช้เครื่อง nCounter Analysis System ในการค้นหาการแสดงออกของ mRNA (NanoString Technologies, Seattle, USA) โดยมีขั้นตอนทั้งหมด 3 ขั้นตอนได้แก่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ขั้นตอนการ Hybridization โดยที่ capture probe และ reporter probe ที่จำเพาะกับตัวอย่างของผู้ป่วยจะจับกันเป็น complex โดยเตรียม master mix จาก Reporter CodeSet 70 ไมโครลิตรใน Hybridization Buffer แบ่ง master mix 8 ไมโครลิตรจำนวน 12 หลอดและใส่ total RNA ปริมาณ 300 นาโนกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร โดยพิจารณาอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตรมีค่าประมาณ 1.7 ถึง 2.3 โดยปริมาตรรวมของแต่ละหลอดเป็น 13 ไมโครลิตรหลังจากนั้นเติม Capture ProbeSet จำนวน 2 ไมโครลิตรทุกหลอดบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงถึง 30 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 19

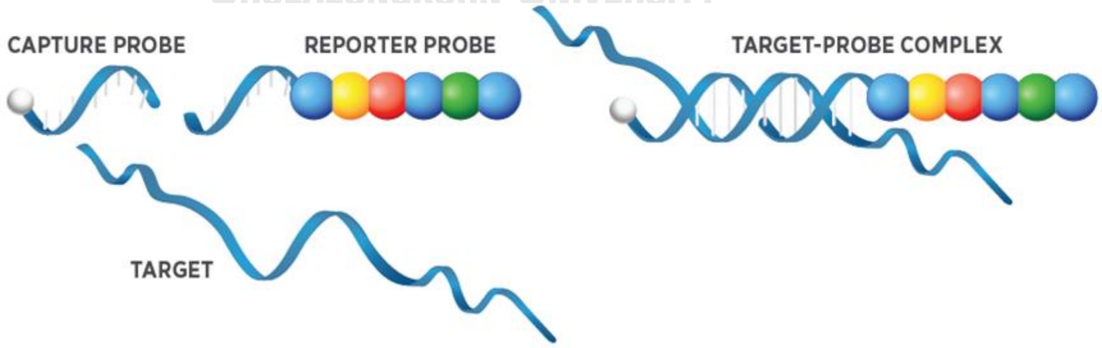


รูป 19 แสดงขั้นตอนการเตรียม master mix ในขั้นตอนการ hybridization

ขั้นตอนที่ 2 คือ Purify และ immobilize โดยขั้นตอนนี้จะล้างส่วนเกินออกที่ไม่ได้จับกันเป็น complex และจะตรึง complex กับ nCounter cartridge โดยทำการโหลด hybridization ปริมาณ 30 ไมโครลิตรลงใน cartridge ใช้เวลา 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนสุดท้ายคือ ขั้นตอน Count คือขั้นตอนการนับจำนวนสี fluorescence ดังแสดงในรูปที่ 20 โดยขั้นตอนทั้งหมดใช้เวลา 2 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูป 20 แสดงการจับกันของ Probe และ target ที่มีอยู่ในตัวอย่าง

โดยการควบคุมคุณภาพของตัวอย่างจำนวน 12 ตัวอย่างจะต้องมีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง A260/A280 มีค่า 1.7 ถึง 2.3 และมีค่าความเข้มข้น 300 นาโนกรัมเท่ากันทุกตัวอย่างและมี Positive control ที่รู้จำนวนความเข้มข้นโดยนับเป็น count จำนวน 6 ตัวอย่างและ Negative control อีก 6 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างทั้งหมดจะผ่านกระบวนการโดยใช้ NanoString Prep Station และจะนำตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่าง นำมาใส่ใน nCounter cartridge หลังจากการทำการทดลองทุกขั้นตอนดังกล่าว จะใช้ nSolver™ Analysis Software ในการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA

3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ที่ค้นพบในส่วนแรก (Validation)

3.4.1 กลุ่มตัวอย่าง (sample size)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สูตรสำหรับคำนวณหาขนาดตัวอย่าง (n) ดังนี้

$$n_1 = \frac{(z_{1-\frac{\alpha}{2}} + z_{1-\beta})^2 \left[\sigma_1^2 + \frac{\sigma_2^2}{r}\right]}{\Delta^2}$$

$$r = \frac{n_2}{n_1}, \Delta = \mu_1 - \mu_2$$

โดยที่ Z1-α/2 เป็นค่าวิกฤตของการแจกแจงแบบปกติที่ α/2 (เช่น สำหรับระดับความเชื่อมั่น 95%, α เท่ากับ 0.05 และค่าที่สำคัญคือ 1.96), Z1-β เป็นค่าวิกฤตของการแจกแจงแบบปกติที่ β (เช่น สำหรับ power of 80%, β คือ 0.2 และ critical value คือ 0.84), σ2 คือความแปรปรวนของประชากรซึ่งในการศึกษานี้อ้างอิงจากการศึกษาก่อนหน้า Mikulski และคณะ(21)

ค่า median ± IQR ของการแสดงออกของยีน IL-1ra ในกลุ่มผู้ป่วยรุนแรงคือ 4.10 ± 5.32

ค่า median ± IQR ของการแสดงออกของยีน IL-1ra ในกลุ่มผู้ป่วยไม่รุนแรงคือ 1.29 ± 2.47

โดยใช้สัดส่วน ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยรุนแรงและไม่รุนแรงเป็น 1:2 โดยต้องการประมาณค่าสัดส่วนประชากรให้ผิดพลาดไม่เกิน 5% ด้วยระดับความเชื่อมั่นที่ 95%, power of 80%, ความแตกต่างของสมมติฐานเท่ากับ 10 ซึ่งจะได้จำนวนในกลุ่มผู้ป่วยรุนแรงจำนวน 32 คนและจำนวนในกลุ่มผู้ป่วยไม่รุนแรงจำนวน 63 คน ดังนั้นการศึกษานี้ จึงต้องใช้ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสประมาณ 95 คนจึงจะสามารถตอบคำถามงานวิจัยได้ ซึ่งในขั้นตอนการตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA จะใช้ตัวอย่างทั้งหมด 95 ตัวอย่าง ในการทำการทดสอบ โดยตัวอย่างได้มาจากโครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปรากับความรุนแรงของโรค ซึ่งได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมจากคณะกรรมการกลางจริยธรรมการวิจัยในคน (Central Research Ethics Committee, National Research Council of Thailand [CREC 5/2016] และโครงการการศึกษาการใช้แบบ

แผนการดูแลผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิส ซึ่งได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย [IRB 521/2019) ซึ่งไม่ใช่การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยใหม่

3.4.2 การสกัด mRNA จากตัวอย่างผู้ป่วยและการวัดความเข้มข้นของตัวอย่าง

นำเลือดทั้งหมดของผู้ป่วย (Whole blood) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร จำนวน 99 ตัวอย่าง สกัดด้วยวิธี Trizol (TRIzol™ Reagent thermoFisher) โดยสกัดตามการใช้ของ reagent เมื่อได้ mRNA ทำการวัดความเข้มข้นของ mRNA โดยใช้ Nano-drop 1000 spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE)

3.4.3 ขั้นตอนการการเปลี่ยน mRNA เป็น cDNA ด้วยกระบวนการ Reverse Transcription

กระบวนการ Reverse Transcription โดยใช้ iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories (Pacific) Pty Ltd, Gladesville, Australi) ปริมาณ 4 ไมโครลิตร และใช้ mRNA ของผู้ป่วยจากการสกัดในขั้นตอนแรกจำนวน 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรเท่ากันทุกตัวอย่าง โดยปริมาตรรวมทั้งสิ้น 20 ไมโครลิตร

3.4.4 กระบวนการตรวจสอบความสัมพันธ์การแสดงออก mRNA โรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง ด้วย Real Time PCR

จากการวิเคราะห์ด้วย nanostring analysis ในส่วนของการค้นหาการแสดงออกของ mRNA กับการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิส ใน mRNAs ที่แสดงออกในกลุ่มรุนแรงมากกว่ากลุ่มไม่รุนแรงอย่างมีนัยสำคัญและมีค่า Fold change มากกว่า 1.5 เท่า มาทำการทดสอบในกลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิส ด้วยวิธี Real Time PCR โดยใช้วิธีตรวจจับด้วย Syber green ซึ่งมีปัจจัยภายในควบคุม คือยีน β-actin ซึ่งเป็น house-keeping gene ในคน โดยใช้ positive control เป็น HepG2 cell ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับและใช้ negative control เป็นน้ำกลั่น โดยในการทำการทดลองจะใช้วิธีการทำซ้ำสองครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง และการแสดงผลจะแสดงผลในรูปแบบของระดับความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ mRNA ซึ่งคำนวณได้จากค่า $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ โดยศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ mRNA แต่ละชนิดในการศึกษาทำการทดสอบ positive cell(HepG2 cell) โดยทำ Real time PCR ที่อุณหภูมิ 55, 57, 60, 64 และ 67 ของแต่ละ mRNA

3.5 การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

เก็บรวบรวมข้อมูลจากเครื่อง nCounter analysis system และเครื่อง Real time PCR ไว้ใน USB และบันทึกข้อมูลไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ รวมทั้งจดบันทึกข้อมูลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการไว้ในสมุดบันทึก

3.6 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1) วิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออก mRNA ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในกลุ่มผู้ป่วยรุนแรงและไม่รุนแรงโดยใช้ค่ากลางของข้อมูลทั้งสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันโดยตัวแปรมีการแจกแจงไม่ปกติ โดยใช้ Mann-Whitney U test

2) ระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติพิจารณาที่ p-value<0.05

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 คุณลักษณะของผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษา

ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิส จำนวน 99 คน จากเกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครที่ใช้ในการศึกษา มีผู้ป่วยจำนวน 30 คน มีอาการรุนแรงและจำนวน 69 คน อาการไม่รุนแรง โดยตารางที่ 4 แสดงคุณลักษณะของผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาของทั้งสองกลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 มี 12 ตัวอย่าง ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออก mRNA ในเลือดของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสด้วยเทคโนโลยี Nanostring โดยแบ่งเป็นผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิสรุนแรงจำนวน 8 รายและผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิสไม่รุนแรงจำนวน 4 รายและกลุ่มที่ 2 มีผู้ป่วย จำนวน 99 คน ที่ใช้ในกระบวนการ การตรวจสอบความสัมพันธ์การแสดงออก mRNA โรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงด้วย Real Time PCR โดยคุณลักษณะของผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาของทั้งสองกลุ่มจะแสดงในเรื่องของข้อมูลคุณลักษณะได้แก่ เพศ, อายุ, น้ำหนัก, ส่วนสูง, โรคประจำตัว, ข้อมูลโรคประจำตัวได้แก่ โรคเบาหวาน, โรคความดัน, โรคไขมันในเลือดสูงและโรคมะเร็งในทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่โรค alcoholism มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลลักษณะทางกายภาพได้แก่ อุณหภูมิของร่างกาย ในทั้งสองกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ข้อมูลด้านความดันของทั้งสองกลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการได้แก่ Hemoglobin, Platelet, Creatinine, Total bilirubin, Albumin และ HCO_3^- ของทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 4 แสดงคุณลักษณะของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา

Clinical Characeristic	Discovery Phase (Nanostring)		Validation Phase (RT-qPCR)		p-value
	Severe n=8	Non-severe n=4	Severe n=30	Non-severe n=69	
Demograohic data					
Age (mean±SD)	47±16	65±10.1	44±15.41	49±15.45	0.127
Sex (male, %)	8(100.00%)	3(75.00%)	26(83.80%)	57(82.60%)	0.614
Body weight; kg (median, IQR)	59.50(50.75,64.25)	56.00(50.00,63.00)	59.50(50.75,64.25)	56.00(50.00,63.00)	0.502
Height; cm(median,IQR)	162.00(160.00,170.00)	161.50(154.00,164.00)	163.00(160.00,170.00)	159.00(163.00,167.00)	0.618
Day of fever (median,IQR)	3(0.5,3)	3(1.5,6)	3(1,4.5)	2(1,3)	0.207
Co-morbid disease					
DM (N, %)	0(0.00%)	1(25.00%)	0(0.00%)	3(4.30%)	0.246
HT (N, %)	0(0.00%)	1(25.00%)	2(6.70%)	8(11.60%)	0.455
Dyslapimia (N, %)	0(0.00%)	0(0.00%)	1(3.30%)	1(1.40%)	0.54
IHD (N, %)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	NA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

PVD (N, %)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	NA
Malignancy (N, %)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	NA
HIV (N, %)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	NA
Alcoholism (N, %)	0(0.00%)	2(50.00%)	3(10.0%)	1(1.40%)	**0.047***
Physical examination					
Body temperature; ^{o}C (mean±SD)	36.95±0.47	39.00±0.78	38.08±1.47	38.52±1.19	0.062
Systolic blood pressure; mmHg (mean±SD)	99.38±25.88	115±20.31	100.55±21.18	115.49±21.02	**0.003***
Diastolic blood pressure; mmHg (mean±SD)	58.13±17.19	71.00±15.56	60.00±12.91	66.29±10.16	**0.015***
Laboratory					
Hemoglobin; g/dL (mean±SD)	12.46±1.98	11.65±1.03	11.42±1.98	12.78±3.99	**0.037***
White Blood Cell; cellX10^3 μL (mean±SD)	11.62±6.60	12.30±-3.51	10.87±4.99	10.40±-3.66	0.911
Platelets; cellX10^3 μL	58.50(30.25,148.25)	208.00(94.50,344.75)	48.00(29.5,85.25)	208.00(102.25,230.00)	**<0.001***

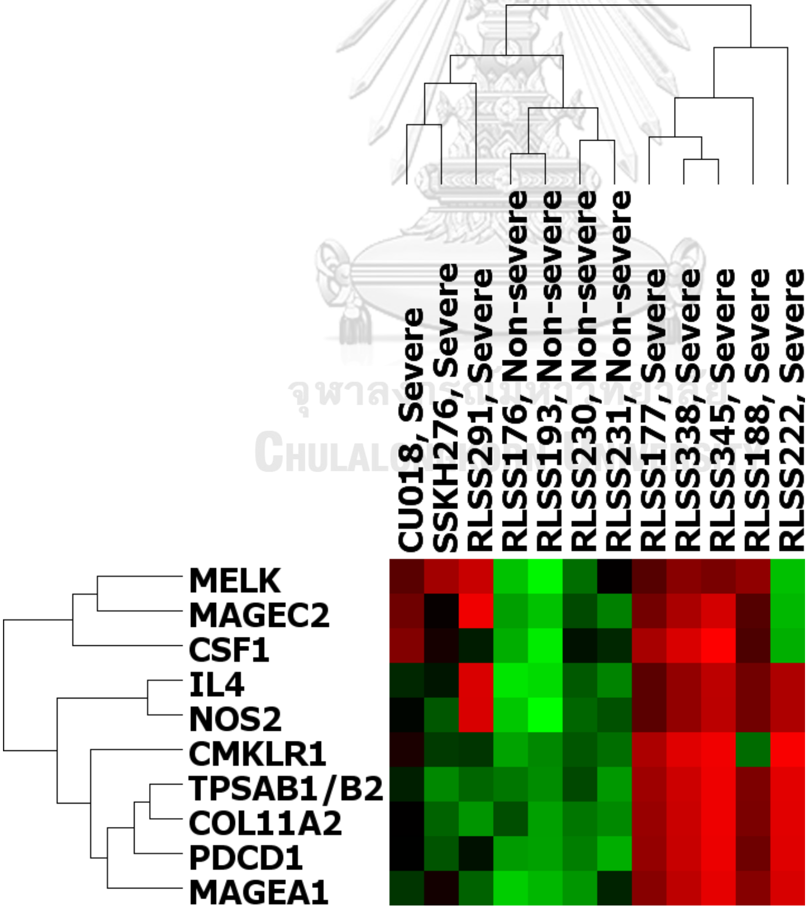
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

(median,IQR)					
Creatinine; mg/dL (mean±SD)	5.86±3.21	1.10±0.22	3.15±2.53	1.17±0.50	**<0.001***
Total Bilirubin; g/dL (mean±SD)	2.71±2.59	1.32±0.95	3.80±3.74	1.42±0.91	**0.002***
SGOT; U/L (median,IQR)	44.50(26.75,281.00)	62.00(27.75,157.75)	54.00(39.00,170.00)	60.00(37.75,112.00)	0.824
SGPT; U/L (median,IQR)	60.50(33.00,523.75)	66.00(22.50,177.00)	56.00(32.00,156.25)	56.00(24.75,93.00)	0.635
Albumin; g/dL (mean±SD)	3.20±0.58	3.52±0.66	3.04±0.72	3.69±0.54	**<0.001***
HCO_3^-; mmol/L (mean±SD)	18.67±5.50	26.00±2.16	20.79±4.71	25.37±3.50	**<0.001***

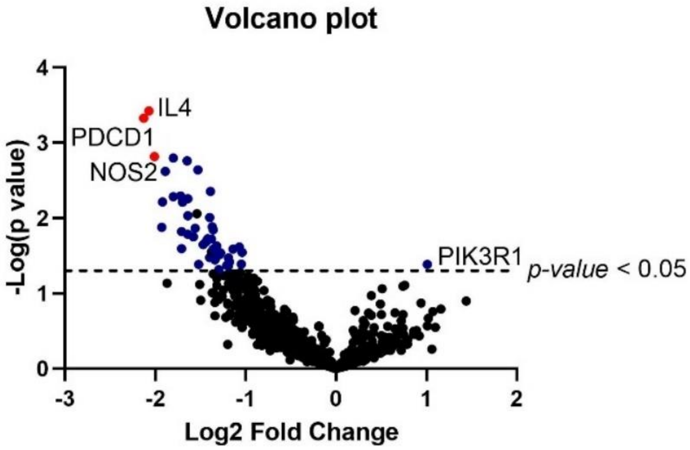
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.2 การศึกษาการแสดงออก mRNA ในเลือดของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสด้วยเทคโนโลยี Nanostring

จากการศึกษาการค้นหาการแสดงออกของ mRNA ในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิส ที่มีอาการรุนแรงเทียบกับอาการไม่รุนแรงด้วยเทคโนโลยี NanoString จากการศึกษาทั้งหมด 750 ยีนของระดับ mRNA พบว่ามีระดับ mRNA ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง เมื่อเทียบกับอาการไม่รุนแรง ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) มีจำนวนทั้งสิ้น 46 ยีน ซึ่งเป็น upregulate จำนวน 1 ยีน และมี downregulate จำนวน 45 ยีน ดังแสดงในรูปที่ 22 ในส่วน Heat map 10 อันดับยีนในกลุ่มอาการรุนแรงเทียบกับอาการไม่รุนแรงที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 21 หลังจากนั้นทำการเลือก candidate ยีนที่มี Fold change มากกว่า 1.5 เท่าและเป็น 3 อันดับแรกที่มี Fold change มากที่สุดได้แก่ ยีน PDCD1, IL4 และ NOS2 ดังแสดงในรูป volcano plot ที่ 22 ซึ่งแสดงเป็นจุดสีแดง



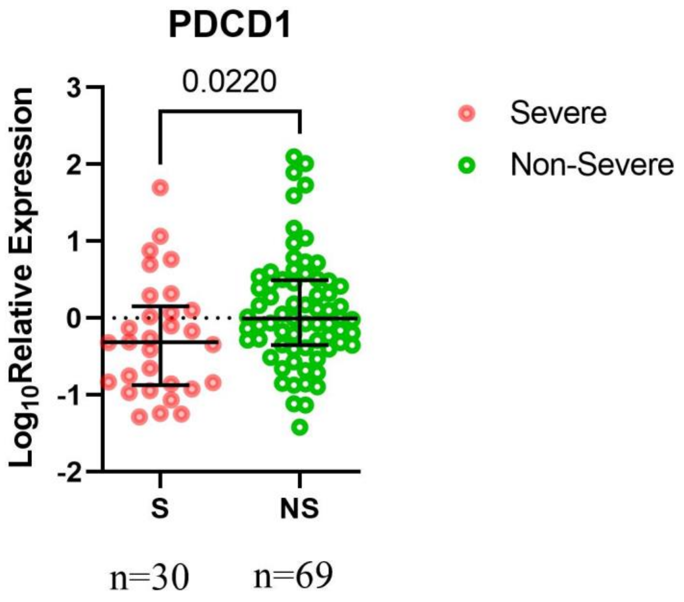
รูป 21 แสดง Heat map 10 อันดับยีนในกลุ่มอาการรุนแรงเทียบกับอาการไม่รุนแรงที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยสีแดง แสดงยีนที่ downregulate และสีเขียวแสดงยีนที่ upregulate



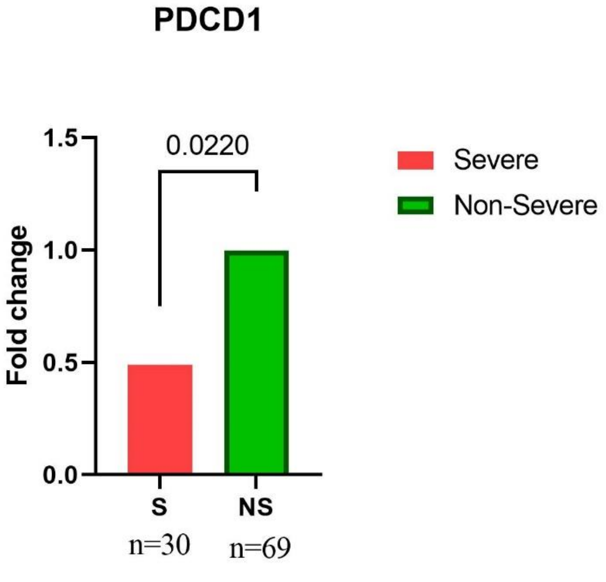
รูป 22 แสดง Volcano plot ซึ่งมีการแสดงออกของ mRNA โดยแสดงระหว่าง [-log10(p-value)] และ fold change [log2(fold change)] ของทุกยีน โดย mRNA ที่เป็นจุดสีแดงเป็น mRNA ที่จะใช้ในการตรวจสอบด้วย qRT-PCR ต่อไป (Fold change > 1.5, p-value <0.05), จุดสีน้ำเงินแสดง mRNA ที่มีการแสดงออกในกลุ่มอาการรุนแรงเทียบกับอาการไม่รุนแรงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value <0.05)

4.3 กระบวนการตรวจสอบความสัมพันธ์การแสดงออก mRNA โรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงด้วย Real Time PCR

ผลการทดสอบศึกษาอุณหภูมิของ mRNA PDCD1, NOS2 และ IL4 พบว่า mRNA PDCD1 และ NOS2 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในการทำ qRT-PCR คือ 64 องศาเซลเซียส และ mRNA IL4มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 67 องศาเซลเซียส จากตัวอย่างผู้ป่วย โรคเลปโตสไปโรสิสทั้งหมด 99 ตัวอย่าง พบว่า ลอกกาลิทึมความสัมพันธ์การแสดงออกของยีน (Log Relative expression) PDCD1 ในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิส อาการรุนแรงมีระดับต่ำกว่าผู้ป่วยอาการไม่รุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ (-0.258 ± 0.75 vs. 0.098 ± 0.73, p = 0.022) ดังแสดงในรูปที่ 23 และรูปที่ 24 แสดงระดับการเปลี่ยนแปลงของยีน PDCD1 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสอาการรุนแรงเทียบกับอาการไม่รุนแรง โดยในกลุ่มอาการรุนแรงมีการแสดงออกลดลง 0.5 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มอาการไม่รุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.022) ในส่วนของยีน NOS2 และ IL4 นั้น ไม่สามารถนำมาคำนวณ Relative expression และ Fold change ได้ เนื่องจากทั้งสองยีนดังกล่าว เมื่อนำมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ไม่สามารถเจอได้เนื่องจากมีการแสดงออกที่น้อยเกินไป เพราะ housekeeping gene β-actin มีการแสดงออกในทั้ง 99 ตัวอย่าง



รูป 23 แสดงลอกการิทึมความสัมพันธ์การแสดงออกของยีน (Relative expression) PDCD1 ในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสอาการรุนแรง(S) มีระดับต่ำกว่าผู้ป่วยอาการไม่รุนแรง(NS) อย่างมีนัยสำคัญ (-0.258 ± 0.75 vs. 0.098 ± 0.73, p = 0.022)

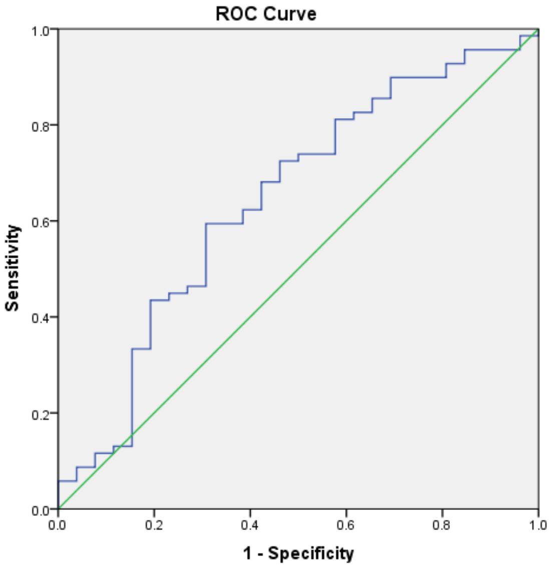


รูป 24 แสดงระดับการเปลี่ยนแปลงของยีน PDCD1 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสอาการรุนแรง (S) เทียบกับอาการไม่รุนแรง(NS) โดยในกลุ่มอาการรุนแรง มีการแสดงออกลดลง 0.5 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มอาการไม่รุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.022)

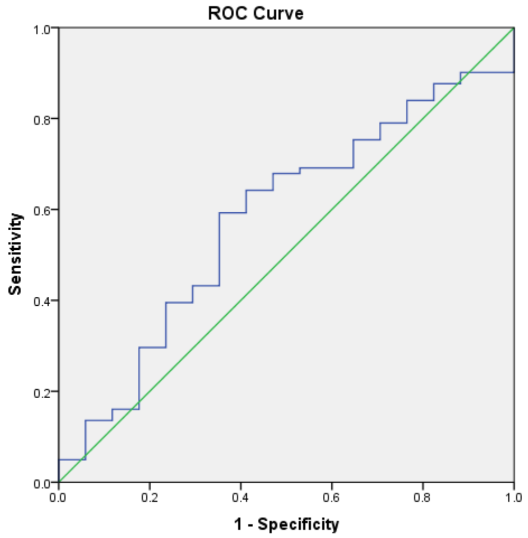
4.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ mRNA PDCD1 กับการเกิดความรุนแรงของโรค

จากการเกิดความรุนแรงของโรคจากคะแนน SOFA score กับระดับการแสดงออกของ PDCD1 พบว่าความสัมพันธ์ไปในทางเชิงบวก ROC เท่ากับ 0.65 (p=0.022) ดังแสดงในรูปที่ 25 โดยจากคะแนน SOFA Score ดังกล่าวนำมาจำแนกความรุนแรงตามระบบอวัยวะดังนี้ รูปที่ 26 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ระบบการไหลเวียนของเลือด(Coagulation) พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ROC เท่ากับ 0.58 (p=0.313), รูปที่ 27 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ระบบการทำงานของตับ (Liver) พบว่ายีน PDCD1 ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการทำงานของตับ ROC เท่ากับ 0.62 (p=0.264), รูปที่ 28 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ระบบการทำงานของระบบประสาท(CVS) พบว่ายีน PDCD1 ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการทำงานของระบบประสาท ROC เท่ากับ 0.64 (p=0.337), รูปที่ 29 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ภาวะไตวาย พบว่ายีน PDCD1 ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการทำงานของไต ROC เท่ากับ 0.52 (p=0.788) รูปที่ 30 พบว่ายีน PDCD1 ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับภาวะปอดอักเสบ (Lung hemorrhage) ROC เท่ากับ 0.86 (p=0.07) และ รูปที่ 31 การแสดงออกของ PDCD1 กับการใส่เครื่องช่วยหายใจ พบว่ายีน PDCD1 มีความสัมพันธ์ กับการใส่เครื่องช่วยหายใจ ROC เท่ากับ ROC เท่ากับ 0.75 (p=0.005) ซึ่งสรุปได้ว่า ยีน PDCD1 สามารถทำนายการเกิดอาการรุนแรงของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสได้ ROC เท่ากับ 0.64 (p=0.002) เมื่อทำการวิเคราะห์ PDCD1 กับปัจจัยอื่นๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องได้แก่ ปัจจัยด้านอายุ, เพศและจำนวนวันที่เป็นไข้ พบว่าปัจจัยที่กล่าวมาไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน PDCD1 เพื่อใช้ในการทำนายความรุนแรงของโรค โดย OR เท่ากับ 0.42 (95%CI, 0.20–0.87, p = 0.020) สรุปได้ว่า ถ้าลอกกาลิทึมของการแสดงออก PDCD1 มีลดลง 1 หน่วย ความเสี่ยงของการเกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิสจะเพิ่มขึ้นเป็น 2.4 เท่า

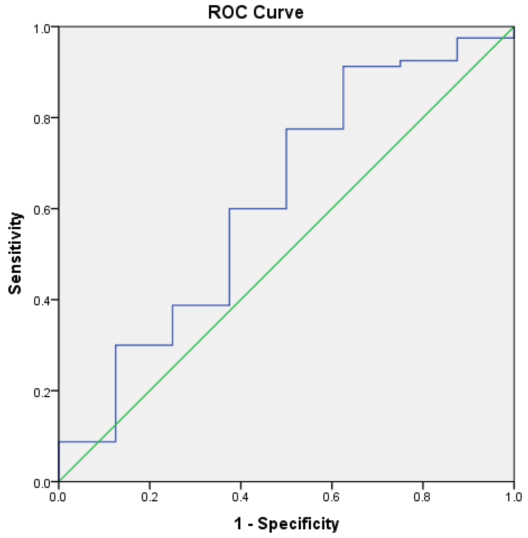
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



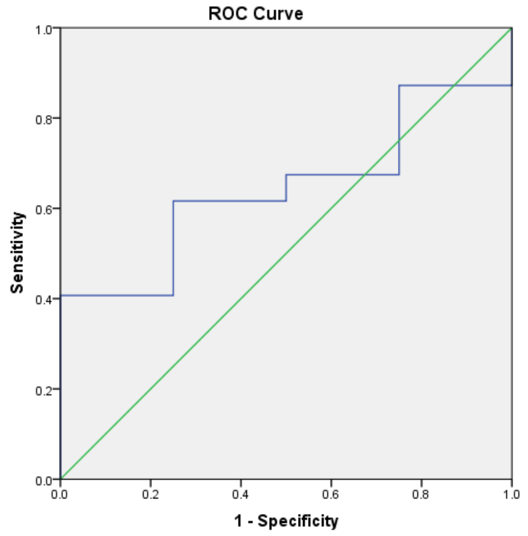
รูป 25 Receiver operating characteristic curve (ROC) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ mRNA PDCD1 กับการเกิดความรุนแรงของโรค พบว่าความสัมพันธ์ไปในทางเชิงบวก ROC เท่ากับ 0.65 (p=0.022)



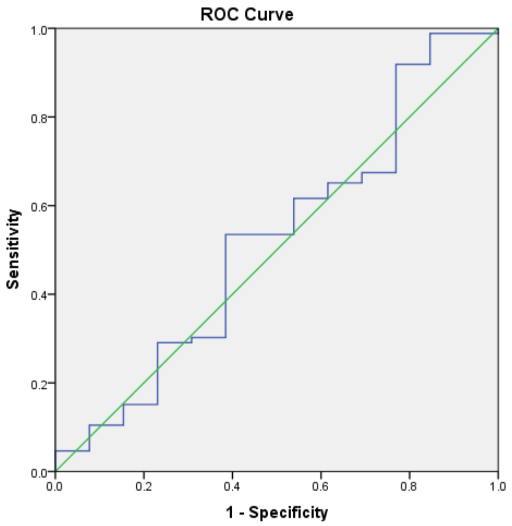
รูป 26 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ระบบการไหลเวียนของเลือด(Coagulation) พบว่าไม่ได้มีความสัมพันธ์กัน ROC เท่ากับ 0.58 (p=0.313)



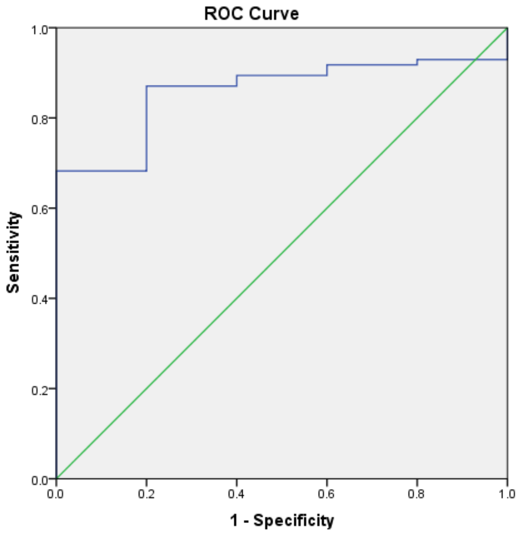
รูป 27 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ระบบการทำงานของตับ(Liver) พบว่ายีน PDCD1 ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการทำงานของตับ ROC เท่ากับ 0.62 (p=0.264)



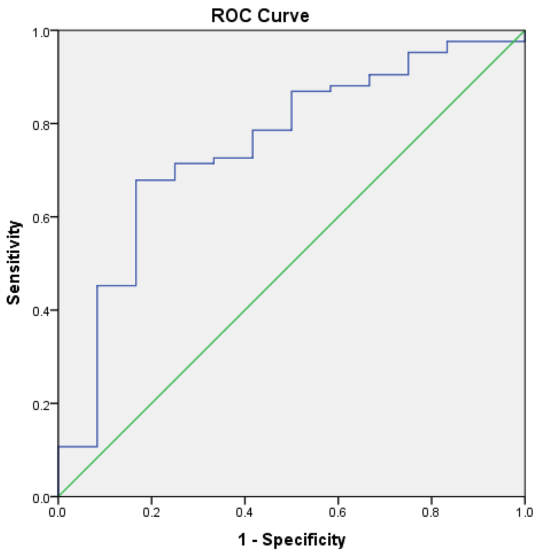
รูป 28 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ระบบการทำงานของระบบประสาท(CVS) พบว่ายีน PDCD1 ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการทำงานของระบบประสาท ROC เท่ากับ 0.64 (p=0.337)



รูป 29 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ระบบการทำงานของระบบการทำงานของไต(Renal) พบว่ายีนPDCD1 ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการทำงานของการทำงานของไต ROC เท่ากับ 0.52 (p=0.788)



รูป 30 การแสดงออกของ PDCD1 กับ ภาวะปอดอักเสบ (Lung hemorrhage) พบว่ายีน PDCD1 มีความสัมพันธ์ กับภาวะปอดอักเสบ(Lung hemorrhage) ROC เท่ากับ 0.86 (p=0.07)



รูป 31 การแสดงออกของ PDCD1 กับ การใส่เครื่องช่วยหายใจพบว่ายีน PDCD1 ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการใส่เครื่องช่วยหายใจ ROC เท่ากับ 0.75 (p=0.005)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 5
การอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาการแสดงออกของยีน เพื่อใช้ในการทำนายการเกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิส ในการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลอง ออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การศึกษาการแสดงออกของ mRNA กับการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงด้วยวิธี nanostring และ การตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ที่ค้นพบ ในส่วนแรกด้วยวิธี RT-qPCR โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อค้นหา ตัววัดทางชีวภาพ เพื่อใช้ในการทำนายการเกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิสต่อไปในอนาคต โดยในส่วนแรก คือ ในส่วนการศึกษาการแสดงออกของ mRNA กับการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง จากการศึกษาในส่วนแรก ได้ยีนเป้าหมาย 3 ยีน ซึ่งได้แก่ PDCD1, IL4 และ NOS2 ซึ่งเป็นยีนในฝั่ง down regulate ซึ่งเมื่อได้ยีนที่สนใจจำนวนทั้งสิ้น 3 ยีน จึงนำทั้ง 3 ยีนนี้มาทำการศึกษาต่อในส่วนที่ 2 ซึ่งจากการศึกษาในส่วนที่ 2 พบว่า ยีน IL4 และ ยีน NOS2 ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี RT-qPCR เนื่องจากทั้งสองยีนนี้มีปริมาณที่น้อยเกินไป แต่ยีน PDCD1 สามารถตรวจสอบได้ พบว่า ยีน PDCD1 สามารถทำนายการเกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิสได้ โดยมี ROC เท่ากับ 0.65 (p=0.022)

ในการศึกษาการทำนายการเกิดความรุนแรงโรคเลปโตสไปโรสิส ในปี 2549 Vernelและคณะ(19) ทำการศึกษาการแสดงออกของ cytokine mRNA ที่มีบทบาทสำคัญในโรคเลปโตสไปโรสิส ได้แก่ interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-10, IL-12p40, tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), gamma interferon (IFN-gamma), โดยทำการฉีดเชื้อ *Leptospira* ในหนู hamster ทำให้หนูเกิดอาการรุนแรง เทียบกับกลุ่มหนูที่ไม่ติดเชื้อ โดยดูภายใน 24 ชั่วโมงของการติดเชื้อและดูหลังการติดเชื้อ 4 วัน พบว่าการแสดงออกของ Th1 cytokine mRNA (TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-12) สามารถตรวจเจอได้ภายใน 1 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ แต่การแสดงออกของ anti-inflammatory cytokines เช่น IL-4 and IL-10 ตรวจพบภายหลังการติดเชื้อ 1 ถึง 4 วัน การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงกลไกระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่า ในปี 2558 ณัฐชัยและคณะ(20) ศึกษาตัวชี้วัดทางชีวภาพของภาวะไตวายเฉียบพลันซึ่งเป็นสาเหตุอันดับต้นๆของการเกิดความรุนแรงในโรคเลปโตสไปโรสิส โดยการศึกษานี้ใช้ NGAL เป็นตัวช้วัดทางชีวภาพในระยะต้น ในการทำนาย การเกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน โดยทำการศึกษาในเลือดและปัสสาวะของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรสิส ซึ่งพบว่า ทั้งในเลือดและปัสสาวะ มีระดับ NGAL สูงขึ้นในภาวะผู้ป่วยไตวายเฉียพลันในโรคเลปโตสไปโรสิส ทั้งในเลือดและปัสสาวะ NGAL ให้ผลลัพธ์ที่มีแนวโน้มว่าจะเป็นตัวบ่งชี้สำหรับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในโรคเลปโตสไปโรสิส อย่างไรก็ตาม NGAL ไม่ได้แสดงบทบาทที่อาจเป็นตัวทำนายการฟื้น

ตัวของไต ในปี 2558 Mikulskiและคณะ(21) ศึกษาปัจจัยอาการทางคลินิก เพื่อใช้ในการทำนายโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงในโรงพยาบาล โดยใช้คะแนน SAP score, Total bilirubin, Lctate, AST/ALT หรือการลดลงของอัตราส่วน IL-10/TNF-α พบว่าล้วนสำคัญกับการเกิดความรุนแรงของโรค นอกจากนี้ยังศึกษาการแสดงออกของ IL-1ra, PTX3 และ IL-1alpha ซึ่งพบว่า ระดับการแสดงออกสูงขึ้นในกรณีที่เกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิส ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจในโรงพยาบาลอยู่แล้วสามารถทำนายการเกิดความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรสิสได้และ ในปี 2563 Umapornและคณะ(26) เป็นการศึกษา miRNA เพื่อใช้ในการทำนายการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง ใช้ตัวอย่างจากคนไข้ที่เป็นกลุ่มรุนแรงและไม่รุนแรงในโรคเลปโตสไปโรสิส เจอ miR Upregulation ของ miR155-5p, miR362-3p, miR502-5p, miR601, miR1323, และmiR630 โดยทำในคนไข้ 119 คน พบว่าระดับ miR155-5p และ miR630 ในเลือดในกลุ่มโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงมีค่ามากกกว่ากลุ่มไม่รุนแรง อย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษางานวิจัยครั้งนี้ คือ พบว่า miR155 กับ miR630 สามารถใช้เป็น biomarker สำหรับโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงได้ แต่ข้อจำกัดคือ microRNA ไม่ได้จำเพาะเจาะจงกับการแสดงออกของยีน จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้ยังไม่มีงานวิจัยใดที่ใช้ PDCD1 ในการทำนายการเกิดความรุนแรงเลปโตสไปโรสิส แต่มีการใช้ PDCD1 ในการทำนายภาวการณ์ติดเชื้อ (sepsis) PDCD1 หรือที่รู้จักกันในนามของ PD1 โดย PD1 เป็นหนึ่งในสมาชิกของ immunoglobulin CD28 มีขนาด 55 กิโลดาลตัน PD1 ทำหน้าที่เป็น immune checkpoint โดยทำหน้าที่เป็น negative suppressor ของ T cell โดยจะทำหน้าที่ยับยั้ง T cell ในสถานะการปกติ เพื่อไม่ให้ร่างกายเกิดภาวะ autoimmune และไม่ผลิต cytokine ในสถานการณ์ปกติ(32) ในปี 2559 Zhao Yและคณะ (33) ทำการศึกษา PD1 ในซีรั่มเพื่อใช้ในการทำนายการเกิดความรุนแรงของโรคติดเชื้อ และใช้ในการทำนายอัตราการเสียชีวิตภายใน 28 วัน ในหอผู้ป่วย ICU โดยศึกษาการแสดงออกของ PD-1 บน CD4 และ CD8 Tcells และ ศึกษาการแสดงออกของลิแกน PD1 ซึ่งก็คือ PD-L1 บน monocytes โดยทำการวัดในวันแรกและวันที่ 7 หลังการอยู่ใน ICU โดยการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงซีรั่ม PD-1 สามารถทำนายการเกิดความรุนแรงในโรคติดเชื้อ และทำนายอัตราการเสียชีวิตภายใน 28 วันในระยะแรกของการอยู่ใน ICU ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากการศึกษางานวิจัยนี้มีจุดแข็งคือ ใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วยเป็นโรคเลปโตสไปโรสิส ซึ่งถูกยืนยันด้วยวิธีมาตรฐานตาม WHO และใช้ตัวอย่างของคนไข้ ในวันแรกของการติดเชื้อเลปโตสไปร่า ซึ่งถือว่าเป็นประโยชน์ในการหาตัวชี้วัดทางชีวภาพอย่างมาก และยังใช้เทคนิค Nanostring ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการใช้ตัวอย่างในปริมาณที่น้อย แต่สามารถค้นพบยีนได้หลายยีน ซึ่งเทคนี้ยังมีความไวและความจำเพาะสูงอีกด้วย ในเวลาเดียวกัน นอกจากนี้ ในโรคเลปโตสไปโรสิสยังไม่มีการศึกษาใด ที่ศึกษาการทำนายโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงด้วยการแสดงออกของยีน PDCD1 ซึ่งถือว่างานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรก ที่ค้นพบการแสดงออกของยีน PDCD1 เพื่อใช้ในการทำนาย การเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง และข้อจำกัดของงานวิจัยนี้คือ วันแรกของการเก็บตัวอย่างไม่ใช่วันแรกของการเป็นไข้จริงๆ ซึ่งอาจจะทำให้ผู้ป่วยอาจมีอาการรุนแรงก่อนหน้านี้แล้ว ซึ่งการค้นพบตัวชี้วัดชีวภาพนี้ใช้ในการระบุความรุนแรงของการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสอาจจะไม่สามารถทำนายในอนาคตว่าจะเกิดความรุนแรงได้ และเนื่องจากยีนที่พบเป็นยีน down regulate ซึ่งในการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR อาจจะทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีนี้

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า ยีน PDCD1 เป็นยีน down regulate ในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรง ซึ่งใช้ในการระบุการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงได้ในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Nick Day D, FRCP. Leptospirosis: Epidemiology, microbiology, clinical manifestations, and diagnosis. Sep 26, 2019.

2. กองโรคติดต่อทั่วไป สญวศ. ไข้ฉี่หนู โรคร้ายที่มากับน้ำ [Internet]. กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค; 2019. Podcast

3. De Brito T, Silva AMGd, Abreu PAE. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2018;60:e23-e.

4. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. Curr Top Microbiol Immunol. 2015;387:65-97.

5. Evangelista KV, Coburn J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Future Microbiol. 2010;5(9):1413-25.

6. (WHO) WHO. Human leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control 2003.

7. Waggoner JJ, Pinsky BA. Molecular diagnostics for human leptospirosis. Curr Opin Infect Dis. 2016;29(5):440-5.

8. Wang H-K, Lee M-H, Chen Y-C, Hsueh P-R, Chang S-C. Factors associated with severity and mortality in patients with confirmed leptospirosis at a regional hospital in northern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2020;53(2):307-14.

9. Ko A, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. Nat. Rev. Microbiol.2009;7:736-47.

10. Karcher D, Grenfell RC, Moreno AM, Moreno LZ, Vasconcellos SA, Heinemann MB, et al. Identification of pathogenic and nonpathogenic Leptospira species of Brazilian isolates by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization and Time Flight mass spectrometry. Braz J Microbiol. 2018;49(4):900-8.

11. Lane A, Dore M. Leptospirosis: A clinical review of evidence based diagnosis, treatment and prevention. World J Clin Infect Dis. 2016;6:61.

12. Feigin RD ADHl, CRC Crit Rev Clin Lab Sci 5:413–467, 1975. Copyright CRC Press, Inc, Boca Raton, FL.

13. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

pathogenic Leptospira spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;64(3):247-55.

14. Budihal SV, Perwez K. Leptospirosis diagnosis: competancy of various laboratory tests. J Clin Diagn Res. 2014;8(1):199-202.

15. Levett PN. Leptospirosis. Clin. Microbiol Re. 2001;14(2):296.

16. Cagliero J, Villanueva SYAM, Matsui M. Leptospirosis Pathophysiology: Into the Storm of Cytokines. 2018;8(204).

17. Thipmontree W, Suputtamongkol Y, Tantibhedhyangkul W, Suttinont C, Wongswat E, Silpasakorn S. Human leptospirosis trends: northeast Thailand, 2001-2012. Int J Environ Res Public Health. 2014;11(8):8542-51.

18. Niwattayakul K, Homvijitkul J, Khow O, Sitprija V. Leptospirosis in northeastern Thailand: hypotension and complications. Asian J Trop Med Public Health. 2002;33(1):155-60.

19. Vernel-Pauillac F, Merien F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of Leptospira interrogans. Infect. Immun. 2006;74(7):4172-9.

20. Srisawat N, Praditpornsilpa K, Patarakul K, Techapornrung M, Daraswang T, Sukmark T, et al. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) in Leptospirosis Acute Kidney Injury: A Multicenter Study in Thailand. PLoS One. 2015;10(12):e0143367-e.

21. Mikulski M, Boisier P, Lacassin F, Soupé-Gilbert ME, Mauron C, Bruyere-Ostells L, et al. Severity markers in severe leptospirosis: a cohort study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34(4):687-95.

22. Nair R, Bhandary NM, D'Souza AD. Initial Sequential Organ Failure Assessment score versus Simplified Acute Physiology score to analyze multiple organ dysfunction in infectious diseases in Intensive Care Unit. Indian J Crit Care Med. 2016;20(4):210-5.

23. Ting TX, Amran Fb, Ahmad N, Abdul-Rahman PS. INTEGRATION OF OMICS RESEARCH IN DISCOVERY OF BIOMARKERS FOR LEPTOSPIROSIS DIAGNOSIS AND VACCINE DEVELOPMENT. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health SE ASIAN J TROP MED. 2019;50(2):300-24.

24. Smith S, Kennedy BJ, Dermedgoglou A, Poulgrain SS, Paavola MP, Minto TL, et al. A simple score to predict severe leptospirosis. PLoS NTD. 2019;13(2):e0007205.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

25. Araújo Junior ECd, Garcia LE, Araújo MJ, Oliveira-Junior IS, Arnold DR, Lopes FL, et al. Gene expression is associated with virulence in murine macrophages infected with Leptospira spp. PLoS One. 2019;14(12):e0225272.

26. Limothai U, Dinhuzen J, Payongsri T, Tachaboon S, Tangkijvanich P, Chuaypen N, et al. Circulating microtranscriptome profiles reveal distinct expression of microRNAs in severe leptospirosis. PLoS NTD. 2020;14(11):e0008809.

27. Gonçalves-de-Albuquerque C, Burth P, Silva A, Younes-Ibrahim M, Castro-Faria-Neto H, Faria M. Leptospira and Inflammation. Mediat. Inflamm. 2012;2012:317950.

28. Britannica TEoE. Messenger RNA.

29. Maissen-Villiger CA, Schweighauser A, van Dorland HA, Morel C, Bruckmaier RM, Zurbriggen A, et al. Expression Profile of Cytokines and Enzymes mRNA in Blood Leukocytes of Dogs with Leptospirosis and Its Associated Pulmonary Hemorrhage Syndrome. PLoS One. 2016;11(1):e0148029-e.

30. Devlin AA, Halvorsen PJ, Miller JC, Laster SM. Il-10 deficient mice express IFN-γ mRNA and clear Leptospira interrogans from their kidneys more rapidly than normal C57BL/6 mice. Immu. 2017;222(5):768-77.

31. Jones AE, Trzeciak S, Kline JA. The Sequential Organ Failure Assessment score for predicting outcome in patients with severe sepsis and evidence of hypoperfusion at the time of emergency department presentation. Crit Care Med. 2009;37(5):1649-54.

32. Shao R, Fang Y, Yu H, Zhao L, Jiang Z, Li C-S. Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3–4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: a prospective cohort study. Crit Care
. 2016;20(1):124.

33. Zhao Y, Jia Y, Li C, Shao R, Fang Y. Predictive Value of Soluble Programmed Death-1 for Severe Sepsis and Septic Shock During the First Week in an Intensive Care Unit. Shock (Augusta, Ga). 2019;51(3):289-97.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวเจนจิรา ดินฮูเซ็น
วัน เดือน ปี เกิด	14 กุมภาพันธ์ 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	ปริญญาโท
ที่อยู่ปัจจุบัน	28 ถนน กัลปพฤกษ์ แขวงบางหว้า เขตภาษีเจริญ กทม 10160

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY