การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะ กับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส

น.ส.เกศรินทร์ ศรีรุ่งเรือง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE STUDY CORRELATION OF THE AMOUNT OF LEPTOSPIROSIS IN THE URINE AND ACUTE KIDNEY INJURY IN LEPTOSPIROSIS PATIENTS

Miss Kesarin Sriroongrueng

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 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะ กับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส
โดย	น.ส.เกศรินทร์ ศรีรุ่งเรือง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นายแพทย์กฤษณพงศ์ มโนธรรม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เกศรินทร์ ศรีรุ่งเรือง : การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราใน ปัสสาวะ กับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส. (THE STUDY CORRELATION OF THE AMOUNT OF LEPTOSPIROSIS IN THE URINE A ND ACUTE KIDNEY INJURY IN LEPTOSPIROSIS PATIENTS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. นพ. ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน เกิดจากเชื้อเลปโตสไปรา ทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส การศึกษานี้ได้นำผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 330 ราย มาวินิจฉัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) ได้แก่ วิธีเพาะเชื้อในเลือด หรือวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) หรือวิธี real time PCR ที่วิธีใดวิธีหนึ่งให้ผลเป็นบวก วัตถุประสงค์เพื่อนำวิธี quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) และวิธี Droplet Digital PCR (ddPCR) มาใช้หาปริมาณเชื้อเลปโตสไปราจากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย และนำปริมาณเชื้อมาศึกษาความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยใช้เกณฑ์ของ Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) เป็นเกณฑ์ในการแบ่งความรุนแรงของโรคไตวายเฉียบพลัน ที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มคนไข้ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (AKI) และกลุ่มคนไข้ที่ไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Non-AKI) ผลคือ คนไข้ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 207 รายตามหลักเกณฑ์ของ WHO มีปัสสาวะที่นำมาใช้ในการศึกษาด้วยวิธี qPCR ให้ผลบวก 53 ตัวอย่าง สรุปว่าวิธี qPCR ในกลุ่ม AKI มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 12937 (1412, 101614) ตัว/มล. มีแนวโน้มของปริมาณเชื้อเลปโตสไปรามากกว่ากลุ่ม Non-AKI เฉลี่ย 3719 (1308, 15495) ตัว/มล. ค่า P-value 0.228 จึงไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและ วิธี ddPCR มีปัสสาวะที่นำมาใช้ในการศึกษา ให้ผลบวก 69 ตัวอย่าง สรุปว่าวิธี ddPCR ในกลุ่มAKI มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 2100 (645, 4300) ตัว/มล. มีปริมาณเชื้อเลปโตสไปรามากกว่ากลุ่ม Non-AKI เฉลี่ย 320 (150, 1700) ตัว/มล. ค่า P-value 0.005 จึงมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น ปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะจึงมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยวิธี ddPCR ถึงแม้ว่าจะไม่พบความสัมพันธ์ในวิธี qPCR แต่ก็มีแนวโน้วปริมาณเชื้อเฉลี่ยในกลุ่ม AKI สูงกว่ากลุ่ม non-AKI ถึง 4 เท่า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

5974002730 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: Leptospira, acute kidney injury (AKI), quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Kesarin Sriroongrueng :

THE STUDY CORRELATION OF THE AMOUNT OF LEPTOSPIROSIS IN THE URINE AND ACUTE KI DNEY INJURY IN LEPTOSPIROSIS PATIENTS. Advisor: Asst. Prof. Nattachai Srisawat, M.D.

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by *Leptospira spp.* which can cause acute kidney injury. This research aimed to study the correlation between the amount of leptospires in the urine and acute kidney injury in leptospirosis patients. We collected urine from patients with leptospirosis for *Leptospira* detection by using three standard techniques (microscopic agglutination test (MAT), culture, or real-time PCR (qPCR) technique) following World Health Organization (WHO) standardized test to confirm suspected leptospirosis in 330 patients. We then used qPCR technique and droplet digital PCR (ddPCR) to quantitate the amount of leptospires in urine. The correlation of the leptospiral load in the urine and acute kidney injury defined by Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) was analyzed. The suspected patients had been confirmed as leptospirosis 207 . The results from qPCR showed positive result in 53 samples . There was a non-significant (P =0.228) trend for increasing amount of leptospiral load in AKI 12937 (1412, 101614) leptospiral load/mL than Non-AKI patients 3719 (1308, 15495) leptospiral load/mL. Whereas the ddPCR technique showed the positive results for 69 sample . There was a significant (P =0.005) trend for increasing amount of leptospiral load in AKI 2100 (645, 4300) leptospiral load/mL than Non-AKI patients 320 (150, 1700) leptospiral load/mL. In conclusion, There was a trend for more leptospiral load in AKI than Non-AKI patients by qPCR. There was a significant trend for increasing amount of leptospiral load in AKI than Non-AKI patients by ddPCR.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study:	Medical Sciences	Student's Signature .....
Academic Year:	2018	Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์ด้านโรคไตในภาวะวิกฤต แห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านวัสดุ อุปกรณ์ ตลอดถึงองค์ความรู้ทั้งหมดที่ได้รับตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่อบรมสั่งสอนเมตตากรุณา ปรารถนาดีแก่ลูกศิษย์ด้วยดีตลอดมา

ขอบคุณรุ่นพี่และเพื่อนๆในรุ่น ที่ให้ความช่วยเหลือ ทั้งกำลังแรงกาย แรงใจ ความรู้และประสบการณ์การใช้ชีวิตในรั้วจามจุรีอันแสนอบอุ่นตลอดระยะเวลาที่ได้ศึกษามาในสถาบันอันทรงเกียรติแห่งนี้

และสุดท้ายนี้ขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่และครอบครัวผู้อยู่เบื้องหลังความสำเร็จทั้งหมด

เกศรินทร์ ศรีรุ่งเรือง

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) 3
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research objectives) 3
1.4 สมมติฐานของงานวิจัย (Research hypotheses) 3
1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น (Asumption) 3
1.6 กรอบแนวคิดการวิจัย (Conceptual framework) 4
1.7 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Anticipated outcomes) 5
1.8 อุปสรรคที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems) 5
1.9 คำนิยามเชิงปฏิบัติการ (operational Definitions) 5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 7
โรคเลปโตสไปโรซิส 7
ภาวะไตวายเฉียบพลัน 10
การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ 13
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 20
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research design) 20

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology) 20
1. กลุ่มตัวอย่าง 20
เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้ามาใช้ในการศึกษา (inclusion criteria) 20
เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากการศึกษา (exclusion criteria) 21
ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่นำมาใช้ในการทดลอง (sample size) 21
2. การหาปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราจากเทคนิค Real-time PCR (qPCR) 23
3. การหาปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราจากเทคนิค Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) 24
3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data collection) 26
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) 26
3.5 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical consideration) 27
3.6 ข้อจำกัดของงานวิจัย (Limitations) 27
บทที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูล 28
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 28
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 41
สรุปผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ 42
ข้อดีของการศึกษานี้ 44
ข้อด้อยของการศึกษานี้ 44
ข้อเสนอแนะและการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ 44
บรรณานุกรม 46
ภาคผนวก 52
เกณฑ์ต่างๆที่ใช้ในการแบ่งความรุนแรงของโรคไตวายเฉียบพลัน 53
ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR 55
Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) 56

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน 67

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ (Background and Rationale)

โรคเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis) เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonosis) ที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทย มีรายงานจำนวนผู้ติดเชื้อในทุกๆปี โดยเพิ่มขึ้นจาก 398 รายในปี พ.ศ.2539 เป็น 14,285 รายในปี พ.ศ.2543 โดย ต่อมาในปี พ.ศ.2544-2546 มีรายงานจำนวนผู้ติดเชื้อลดลงตามลำดับ แต่ก็ยังมีจำนวนผู้ติดเชื้อที่สูงอยู่คือ 10,217 ราย 6,864 และ 4,958 ราย ในประเทศไทยมักจะมีรายงานการติดเชื้อที่สูงในช่วงเดือนกันยายนและเดือนตุลาคมซึ่งตรงกับช่วงฤดูฝน โดยมักพบได้ในบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีอัตราการเสียชีวิตอยู่ที่ 4.4% โดยส่วนมากเป็นผู้ชายที่ประกอบอาชีพทำนา อายุ 15-45 ปี สำหรับทางด้านผู้ป่วยในโรงพยาบาล ผู้ป่วยนอกมีจำนวนสูงกว่าผู้ป่วยในถึง 9 เท่า โดยการติดเชื้อเกิดจากสัตว์ที่เป็นพาหะกักเก็บเชื้อแพร่ไปสู่คน(1) โรคเลปโตสไปโรซิสแพร่กระจายเป็นวงกว้างในภูมิภาคเขตร้อนมากกว่าเขตอบอุ่นประมาณ 10 เท่า(2) และเป็นโรคระบาดที่มักไม่ได้รับการรายงานเมื่อมีผู้ติดเชื้อ ซึ่งรายงานจากองค์การอนามัยโลกพบว่ามีจำนวนผู้ติดเชื้อประมาณ 873,000 รายทั่วโลกในทุกๆปี และมีผู้เสียชีวิตจากโรคนี้ถึง 48,600 รายทั่วโลก(3)

สาเหตุการเกิดโรคเลปโตสไปโรซิสมาจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Leptospira* ซึ่งมีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิดเป็นพาหะนำเชื้อโรคโดยเฉพาะในสัตว์ฟันแทะ เช่น หนู ซึ่งคนส่วนใหญ่ติดเชื้อทางอ้อมจากการไปสัมผัสน้ำที่ปนเปื้อนสารคัดหลั่งที่มาจากสัตว์เหล่านี้ โดยการวินิจฉัยหาโรคเลปโตสไปโรซิสในปัจจุบันนั้นยังไม่ดีพอ เนื่องจากอาการของโรคนี้ยังไม่เด่นชัด มีอาการที่หลากหลาย รวมถึงอาการที่รุนแรงของโรค เช่น ภาวะไตวายเฉียบพลัน ภาวะการหายใจล้มเหลว ส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ อีกทั้งเครื่องมือที่ใช้ทดสอบตรวจหาโรคนั้นยังมีความรวดเร็ว และแม่นยำไม่เพียงพอ กรณีศึกษาของโรคนี้ที่ผ่านมามักใช้วิธี Microscopic agglutination test (MAT) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่องค์กรอนามัยโลกกำหนดขึ้นในการตรวจทางซีรัมวิทยา (serological diagnosis) และ Polymerase chain reaction (PCR) ในการตรวจหาสารพันธุกรรม (nucleic acid detection) ในการตรวจจับเชื้อเพื่อวินิจฉัยโรค โดยจะใช้ตัวอย่างเลือดในช่วงสัปดาห์แรกของโรคเมื่อเริ่มมีอาการป่วย หรือตรวจหาแอนติบอดีในช่วงสัปดาห์ที่สองของการเป็นโรคก็ได้ ซึ่งในปัจจุบันนี้ประเทศไทยยังเป็นประเทศที่กำลังพัฒนา ทั้งยังเป็นประเทศเกษตรกรรม มีชุมชนแออัดที่มีปัญหาด้านสุขอนามัยและเป็นแหล่งชุกชุมของหนู รวมถึงมีปัญหาโลกร้อน หรือเหตุการณ์น้ำท่วมต่างๆ ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อของโรค

เลปโตสไปโรซิสได้ จึงเป็นสาเหตุที่ต้องค้นหาวิธีการวินิจฉัยโรคที่ทำได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ เพื่อประโยชน์สูงสุดของผู้ป่วยเอง(4)

การใช้ PCR ในการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปรานิยมนำมาใช้กันมากขึ้น โดยมีแนวโน้มที่จะใช้แทนที่วิธีทางซีรัมวิทยาใน Endemic zones เพราะวิธีนี้มีความไวสูงและสามารถวินิจฉัยได้ตั้งแต่ช่วงแรกๆ โดย Real-time PCR (SYBR Green or Taqman technology) จะให้ผลที่เร็วกว่า regular PCR และมีความไวต่อสิ่งเจือปนอื่นๆได้น้อยกว่า ทั้ง Regular PCR หรือ real-time PCR ก็ต่างถูกพัฒนาขึ้นเพื่อที่จะใช้ตรวจจับวินิจฉัยหาเชื้อก่อโรค แต่มีเพียงจำนวนน้อยเท่านั้นที่ให้ผลอย่างสมบูรณ์ทางคลินิก ซึ่งโดยส่วนมากแล้วจะมีความไวในการตรวจจับจำนวนเชื้อในตัวอย่างทางคลินิกอยู่ที่ 10-100 ตัว/มิลลิลิตร ในตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะ(1, 5, 6) และสามารถตรวจหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย (bacterial load) ได้หากนำค่ากราฟมาตรฐาน (standard curve) เข้ามาใช้ด้วย แต่ในปัจจุบันยังไม่สามารถพบระดับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อแบคทีเรียและการทำนายโรคของผู้ป่วยได้ การที่ PCR ให้ผลบวกบ่งบอกว่ามีเชื้อเลปโตสไปรา ชนิด ก่อโรคในตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์ Amplification products นั้นสามารถทำได้ด้วยการ melting curves หรือ sequencing ซึ่งอาจจะช่วยระบุชนิดของเชื้อ และในบางกรณีก็อาจจะระบุ serovar หรือ genotype ได้(4)

เมื่อเกิดการติดเชื้อเลปโตสไปราในสิ่งมีชีวิต เชื้อจะเข้าไปหลบอยู่ในท่อไตส่วนต้น (proximal tubule) แล้วขับออกมาทางปัสสาวะ จึงทำให้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน(5) โดยภาวะเนื้อเยื่อท่อไตอักเสบแบบ Tubulointerstitial nephritis เป็นสาเหตุหลักของการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิส และทำให้เกิดการทำงานของท่อไตที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้อัตราการกรองที่หน่วยไต (glomerular filtration rate) ลดลงตามมา(7) หากรักษาได้ไม่ทันเวลาอาจทำให้ผู้ติดเชื้อเสียชีวิตจากภาวะไตวายเฉียบพลันได้

เพราะฉะนั้น ผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อเลปโตสไปรา ในปัสสาวะกับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส ผ่านการตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค PCR ทั้ง 2 เทคนิค คือ เทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นเครื่องมือวินิจฉัยที่นิยมทำกันมากขึ้นในปัจจุบันเพื่อนำไปหาค่ากราฟมาตรฐานที่สัมพันธ์กับจำนวนเชื้อเลปโตสไปรา และเทคนิค Droplet Digital PCR (ddPCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากในการหาปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อชนิดต่างๆ ที่ให้ความแม่นยำสูงในการระบุปริมาณของเชื้อ

ในปัจจุบันยังไม่มีการนำมาใช้ในการศึกษาตรวจวัดปริมาณของเชื้อเลปโตสไปรา พบแค่เพียงการศึกษานับจำนวนเชื้อชนิดอื่นเท่านั้นเช่นเชื้อMethicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA), Human immunodeficiency virus (HIV), Cryptosporidium เป็นต้น

1.2 คำถามงานวิจัย (Research questions)

ปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research objectives)

1.เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะกับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส

1.4 สมมติฐานของงานวิจัย (Research hypotheses)

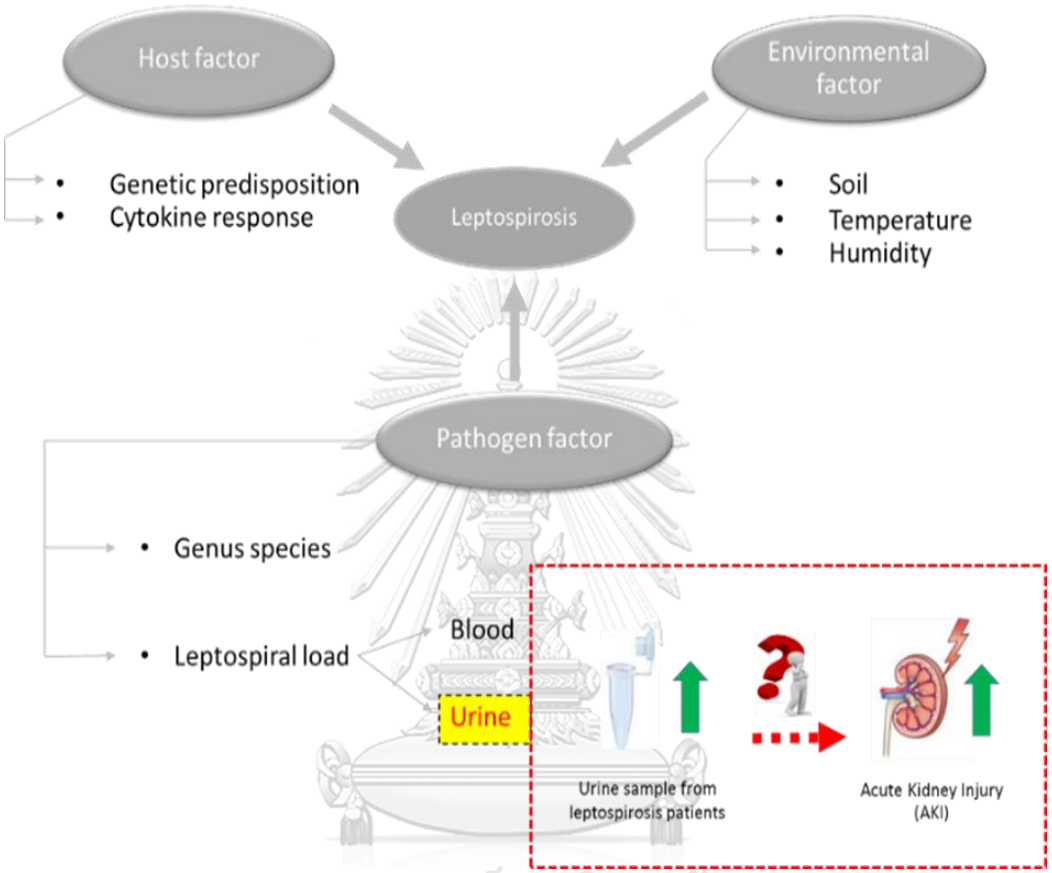
ปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น (Asumption)

ไม่มี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.6 กรอบแนวคิดการวิจัย (Conceptual framework)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดการวิจัย

1.7 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Anticipated outcomes)

ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะ กับการเกิดภาวะตายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสได้ถูกต้อง และแม่นยำมากยิ่งขึ้นด้วยการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการทดสอบทั้ง 2 เทคนิคคือ Real time - PCR และ Droplet digital PCR ในการตรวจนับเชื้อเลปโตส-ไปราที่ปนเปื้อนในปัสสาวะของผู้ป่วย และเพื่อเป็นแนวทางให้แพทย์นำความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยไปใช้ในการวางแผนการฟอกไต (dialysis) ให้กับผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันต่อไปในอนาคต

1.8 อุปสรรคที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems)

เนื่องจากเทคนิค Droplet digital PCR เป็นเทคนิคที่ใหม่อีกทั้งยังต้องใช้ความชำนาญของผู้วิจัยเป็นอย่างมาก ดังนั้นอาจทำให้ผลการวิจัยออกมาล่าช้ากว่ากำหนดได้

1.9 คำนิยามเชิงปฏิบัติการ (operational Definitions)

1. Leptospirosis คือ โรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คนที่มีสาเหตุมาจากเชื้อสกุล *Leptospira* ชนิดก่อโรค มีอาการระดับเล็กน้อยจนถึงรุนแรง เช่น ปวดศีรษะ อาการหนาวสั่น คลื่นไส้ และอาเจียน ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ และมีผื่นขึ้นเล็กน้อย อาการที่รุนแรง ได้แก่ jaundice, เยื่อหุ้มสมองอักเสบ, มีเลือดออกในปอด, ตับและไตทำงานผิดปกติ
2. Acute kidney injury (AKI) คือ ภาวะไตวายเฉียบพลัน จากการสูญเสียการทำหน้าที่ของไต ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เสียชีวิตได้หากไม่ได้รับการรักษาทันเวลา
3. Polymerase chain reaction (PCR) คือ เทคนิคการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA หรือ RNA

   ในหลอดทดลอง จากการคัดลอก DNA template ต้นแบบ เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต
4. Conventional PCR (cPCR) คือ เทคนิค PCR แบบเก่า ซึ่งสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA หรือ RNA ในหลอดทดลอง แล้วต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นจึงนำไปผ่าน gel electrophoresis ต่อเพื่อวิเคราะห์ผล
5. Real-time PCR (qPCR) คือ เทคนิค PCR ชนิดหนึ่งซึ่งพัฒนามาจาก Conventional PCR (cPCR) ซึ่งสามารถใช้ Fluorescent probe เพื่อตรวจจับปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก ได้โดยไม่ต้องรอให้เสร็จสิ้นกระบวนการ

6. Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) คือ เทคนิค PCR ชนิดหนึ่งซึ่งถูกพัฒนาขึ้นมาใหม่ เป็นเทคนิคการคัดลอก DNA ในหยดปฏิกิริยาย่อยๆทั้งหมดที่มีค่าใกล้เคียง 20,000 ปฏิกิริยา ซึ่งแขวนลอยอยู่ในน้ำมันแล้วทำการวิเคราะห์ผลแบบดิจิตอล
7. Bacterial Load คือ ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ณ ตำแหน่งที่ตรวจวัด
8. D_0 คือ การเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (ปัสสาวะ) ของผู้ป่วยในวันแรกที่เข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาล
9. D_7 คือ การเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (ปัสสาวะ) ของผู้ป่วยในครั้งที่ 2 ถัดจากวันแรกที่เข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลา 7 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

โรคเลปโตสไปโรซิส

โรคเลปโตสไปโรซิสหรือโรคฉี่หนู เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonosis) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ spirochete สกุล *Leptospira* species *interrogans* สามารถจำแนกประเภทเชื้อได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิด saprophytic species หรือเชื้อชนิดที่ไม่ก่อโรคและอาศัยอยู่ตามดินหรือแหล่งน้ำ เช่น *Leptospira biflexa* และเชื้อชนิดก่อโรคหรือ pathogenic species ที่พบบ่อยคือ *L. interrogans* ซึ่งการจำแนกประเภทของเชื้อมี 19 สปีชี่ส์ (ชนิดก่อโรค 13 สปีชี่ส์และชนิดไม่ก่อโรค 6 สปีชี่ส์)ซึ่งทำการวิเคราะห์เชื้อ 7 สปีชี่ส์ต่อไปนี้ คือ *L. interrogans* , *L. borgpetersenii* , *L. santarosai*, *L.noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* และ*L.alexanderi* ผ่านทาง DNA hybridization พบว่าเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคเลปโตสไปโรซิส เชื้อเลปโตสไปโรซิสนั้นจำแนกต่อได้อีก 24 ซีโร-กรุ๊ป (serogroups) และ 250 ซีโรวาร์ (serovars) ตามความใกล้เคียงของรหัสพันธุกรรมและการแสดงออกของ lipopolysaccharide ของเชื้อ โครงสร้างคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันของ lipopolysaccharide เป็นตัวกำหนด antigenic diversity ระหว่างกลุ่ม serovar วิวัฒนาการในการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ได้ระบุไว้ว่าเชื้อเลปโตสไปโรซิส สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ pathogenic, saprophytic และ intermediate(5)

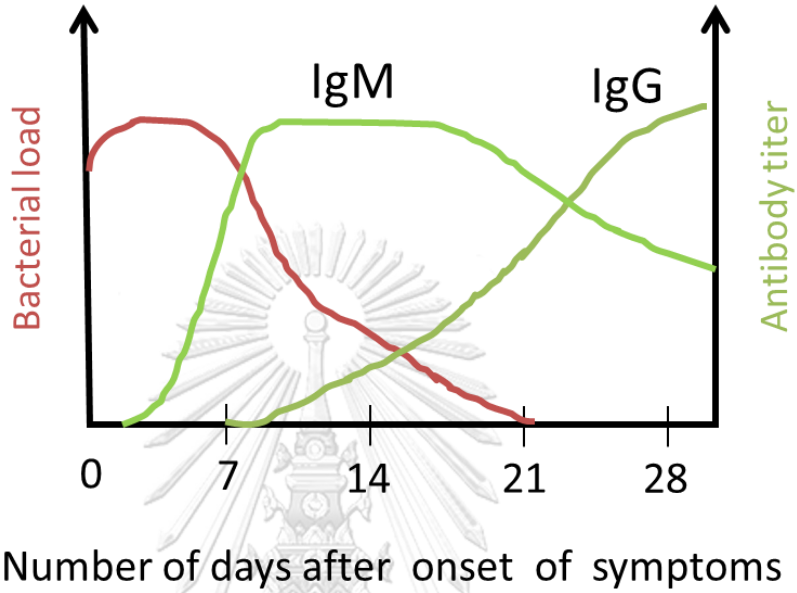
เชื้อเลปโตสไปรา (*Leptospira)* เป็นเชื้อใน family Leptospiraceae order Spirochaetales(8) มีลักษณะบาง เป็นขดเหมือนขดลวด (helically coiled) ความยาวประมาณ 6-20 ไมโครเมตร ตรงส่วนปลายลำตัวมีปากเป็นรูปตะขอคล้ายรูปเครื่องหมายคำถาม (question-mark) เชื้อเลปโตสไปรามีลักษณะคล้ายทั้งแกรมบวกและแกรมลบ คือมีเยื้อหุ้ม 2 ชั้น เป็นโครงสร้าง lipopolysaccharide คล้ายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่มีผนังเซลล์เป็น murein คล้ายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก(5) การเคลื่อนที่ของเชื้อสามารถดูได้ผ่านกล้องจุลทรรศน์ dark field microscopy (DFM)(8) เชื้อเลปโตสไปราเคลื่อนที่โดยใช้หางที่เรียกว่า periplasmic flagella หรือ endoflagella ซึ่งอยู่ที่บริเวณส่วนปลายของเชื้อ การหยุดทำงานของ flagellin gene *fla*B ซึ่งทำหน้าที่ถอดรหัสสร้าง endoflagella โดยการให้ยาต้านจุลชีพ kanamycin ในเชื้อ*L. biflexa* ทำให้แบคทีเรียไม่มี endoflagella และสูญเสียการเคลื่อนที่ไป ในทางกลับกัน flagellar motor ของ pathogenic *L.interrogans* กลายพันธุ์เปลี่ยนยีนส์เป็น *fliY* ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเชื้อที่ลดลงทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (liquid medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง (semisolid medium) โดยพบว่าหนูตะเภาที่ติดเชื้อที่มียีน *fliY* mutant จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าหนู

ตะเภาที่มีการติดเชื้อสายพันธุ์ปกติที่ไม่เกิดการกลาย ทำให้สรุปได้ว่าการเคลื่อนที่โดยอาศัย endoflagellar ของแบคทีเรียอาจเป็นตัวแปรสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการติดเชื้อเลปโตสไปโรซิส(5) เชื้อเลปโตสไปราเป็นเชื้อชนิด obligate aerobes และสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส(8) มีระยะฟักตัวประมาณ 1-2 สัปดาห์ เกิดการติดเชื้อได้ทั้งในคนและสัตว์ ติดเชื้อผ่านทางสัตว์รังโรค ซึ่งมักติดเชื้อผ่านการสัมผัสทั้งโดยตรงกับปัสสาวะของสัตว์ที่ติดเชื้อปนเปื้อนอยู่ในน้ำ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมทั้งหมดสามารถเป็นพาหะของเชื้อนี้ได้ โดยเชื้อเลปโตสไปรา จะหลบอยู่ภายในท่อไตส่วนต้น proximal renal tubules ของไตแล้วออกมาสู่ภายนอกได้จากการปัสสาวะของสัตว์ หนูเป็นสัตว์พาหะหลักในการนำเชื้อโรคมาสู่คน ซึ่งสามารถปล่อยเชื้อเลปโตสไปรา ที่มีความเข้มข้นสูง (10^7 organisms/ml) เข้าสู่คนแล้วก่อโรคขึ้น ทำให้คนที่ติดเชื้อมีอาการป่วย โดยบางกรณี ก็อาจถึงขั้นเสียชีวิต(5) เชื้อเลปโตสไปราเข้าสู่ร่างกายผ่านทางรอยแผล, รอยถลอกของผิวหนัง หรือผ่านทางเยื่อเมือกของดวงตา จมูก และคอ ระยะเวลาที่เริ่มแสดงอาการป่วยนั้นแตกต่างกันออกไปในแต่ละบุคคล ซึ่งจะอยู่ในช่วงระหว่าง 1 วัน ถึง 4 สัปดาห์หลังจากที่ได้รับเชื้อ และในคนที่ติดเชื้อแล้วหายจากอาการป่วย เชื้อจะยังสามารถอยู่ได้เป็นเดือนๆ โรคเลปโตสไปรามีอาการแสดงทางคลินิกที่แตกต่างกันออกไป โดยความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับสายพันธ์ (strain) หรือซีโรวาร์ของเชื้อ ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย รวมถึงอายุของผู้ป่วยที่เป็นโรค มีหลายกรณีที่มีอาการเพียงเล็กน้อยหรือสามารถหายเองได้ และยังยากในการแยกโรคเลปโตสไปโรซิสจากโรคติดเชื้ออื่นๆอีกด้วย จนกระทั่งมีการวินิจฉัยโรคฉี่หนูที่มีความจำเพาะ แม่นยำสูงเกิดขึ้น โดยดูร่วมกับอาการแสดงอื่นๆอย่างเช่น อาการปวดศีรษะ หนาวสั่น คลื่นไส้ และอาเจียน ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ และมีผื่นขึ้นเล็กน้อย นอกจากนี้อาการที่รุนแรงที่เกิดจากการติดเชื้อก็พบได้ ได้แก่ jaundice,เยื่อหุ้มสมองอักเสบ,มีเลือดออกในปอด, ตับและไตทำงานผิดปกติ ซึ่งเรียกว่า Weil's syndrome สามารถเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้ รวมทั้งระบบการทำงานของหัวใจและหลอดเลือดหยุดการทำงาน ซึ่งการมีภาวะ vascular injury และ endothelial lesions เป็นตัวที่ทำให้อวัยวะต่างๆได้รับผลกระทบทั้งหมด(5)

การติดเชื้อที่เกิดจากเลปโตสไปรานั้นอาจแบ่งได้เป็น 2 ระยะ โดยระยะที่หนึ่งคือ การติดเชื้อใน กระแสเลือด (septicemia) หรือเรียกว่าช่วง acute stage ซึ่งจะอยู่ในช่วง 3-10 วันแรกหลังจากติดเชื้อ มัก มีอาการปวดศีรษะและปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ระยะนี้เชื้อเลปโตสไปราในเลือดจะมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 15 หลังจากเริ่มต้นมีอาการวันแรก การเก็บตัวอย่างในช่วงนี้ต้องเก็บก่อนการให้การรักษาด้วยยาต้านจุล-ชีพอย่างน้อย 2 วัน จึงจะตรวจพบเชื้อได้ ส่วนระยะที่สอง หรือเรียกว่า immune stage จะปรากฏขึ้นหลังจากสัปดาห์ที่สอง และจะอยู่ในระยะนี้เป็นเวลา 4-30 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในช่วงระยะนี้จะมีแอนติบอดี (antibody) เพิ่มสูงขึ้นพร้อมๆกับมีจำนวนเชื้อเลปโตสไปราในเลือดที่ลดลง(4) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงระยะการติดเชื้อที่เกิดจาก leptospires
(ดัดแปลงมาจาก Picardeau et al., 2013)

ในผู้ป่วยบางรายไม่สามารถตรวจพบแอนติเจนหรือ DNA ของเชื้อเลปโตสไปราในเลือดได้ อาจเป็นเพราะว่าผู้ป่วยรายนั้นมีช่วง acute stage น้อย หรือเพราะเก็บสารตัวอย่างจากผู้ป่วยช้าเกินไป หรือเพราะผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพทำให้เชื้อเลปโตสไปราถูกกำจัดออกจากเลือด การเก็บตัวอย่างทางคลินิกหากเก็บในช่วง Sero-conversion คือช่วงเปลี่ยนผ่านจากระยะ acute stage ก็อาจทำให้ตรวจไม่พบเชื้อทั้งที่จริงแล้วมีเชื้ออยู่ หรือเรียกว่าได้ผล false negative(4) เมื่อเกิดการติดเชื้อเลปโตสไปราในสิ่งมีชีวิตในระยะ acute phase คือใน 3-10 วันแรกเชื้อจะอาศัยอยู่ในเลือด เมื่อเข้าสู่ immune stage คือช่วง สัปดาห์ที่ 2 หลังจากติดเชื้อ เชื้อจะเข้าไปหลบอยู่ในท่อไตส่วนต้น (proximal tubule) แล้วขับออกมาทางปัสสาวะในขณะที่จะตรวจไม่พบเชื้อในเลือดแล้ว(5) การติดเชื้อเลปโตสไปรา จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส(9)

ภาวะไตวายเฉียบพลัน

ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute kidney injury หรือ AKI) ซึ่งสามารถเรียกได้อีกอย่างว่า acute renal failure หรือ acute renal insufficiency คือ การทำหน้าที่ของไตที่ลดลงอย่างทันที (ภายใน 48 ชั่วโมง) ร่วมกับการเพิ่มระดับของ serum creatinine ปริมาณปัสสาวะที่ขับออกลดลง ทำให้ต้องการฟอกไต (dialysis)(9) ซึ่งสามารถแบ่งออกตามระดับ serum creatinine และปริมาตรปัสสาวะ หรือ urine output ได้เป็น 3 ระดับด้วยกัน เป็นภาวะไตวายเฉียบพลัน stage 1 ถึง 3 จากความรุนแรงน้อยไปมาก(10) โดยสาเหตุของภาวะไตวายเฉียบพลันแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ประเภทแรกคือ prerenal คือ เกิดจากปริมาณเลือดที่มาเลี้ยงไตลดลง หรือ ภาวะการสูญเสียน้ำ ประการต่อมาคือ intrinsic renal เกิดจากกระบวนการทำงานภายในไต และสุดท้ายคือ postrenal เกิดจากการขับปัสสาวะออกจากไตได้ลดลง(9)

อุบัติการณ์เกิดไตวายเฉียบพลันจากการติดเชื้อเลปโตสไปรา มีช่วงที่หลากหลายตั้งแต่ร้อยละ 10 ถึงร้อยละ 60 ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน ได้แก่ อายุ ระดับความรุนแรงของโรคและชนิดซีโรวาร์ของเชื้อ ความเกี่ยวข้องกับไตในการติดเชื้อเลปโตสไปราทำให้มีอาการทางคลินิกที่หลากหลายโดยที่ไม่ได้เป็นอาการแสดง เช่น มีโปรตีนในปัสสาวะและมีตะกอนในปัสสาวะ จนถึงระดับไตวายเฉียบพลัน ผู้ป่วยภาวะไตวายเฉียบพลันจะมีระดับบิลลิรูบินในเลือดสูง แสดงให้เห็นว่าโรคมีระดับที่รุนแรง ประกอบกับปัสสาวะที่ออกมาน้อย หรือปัสสาวะไม่ออก (11) ในทางตรงกันข้าม การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าภาวะไตวายเฉียบพลันอาจไม่มีอาการปัสสาวะน้อยก็เป็นได้ และพบว่าผู้ป่วยเหล่านั้นมีโพแทสเซียมในเลือดต่ำถึงร้อยละ 41 ถึง 45 ของผู้ป่วยติดเชื้อเลปโตสไปราทั้งหมด(12) การสูญเสียการทำหน้าที่ของไตมักเป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบในระดับรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรซิส โดยมีสาเหตุมากจากการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณท่อไต(13) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินภาวะไตวายเฉียบพลันคือการติดเชื้อแบบเฉียบพลันบริเวณไตจากเชื้อก่อโรคต่างๆหรือเกิดการทำลายไตจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มเติมคือการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต ระดับบิลลิรูบินในเลือดสูง หรือภาวะกล้ามเนื้อสลาย มีความสัมพันธ์กับกระบวนการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันจากการติดเชื้อเลป-โตสไปราเช่นเดียวกัน(14)

การศึกษาปัจจัยการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 205 คน ในประเทศบราซิล พบว่าจากจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อทั้งหมดมีผู้ป่วย 182 คน ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน คิดเป็นร้อยละ 88.7 โดยแบ่งเป็นระดับความรุนแรงของภาวะไตวายโดย KDIGO criteria ได้ 3 ระดับ คือระดับ1 ถึง 3 จากความรุนแรงน้อยไปมาก พบว่าผู้ป่วยอยู่ใน KDIGO 3 มีจำนวนมากกว่าครึ่ง คือ

ประมาณร้อยละ 55.1(15) จึงเห็นได้ว่าการติดเชื้อเลปโตสไปรา มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของภาวะไตวายเฉียบพลัน และการศึกษาชนิดซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปราในผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันจำนวน 46 คน จากผู้ป่วยทั้งหมด 67 คน พบว่าชนิดซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปรา ในผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน คือ *L.Icterohaemorrhagiae, L.Australis* และ *L.Autumnalis* และในผู้ป่วยทั้งหมดมีการขับปัสสาวะลดลงโดยผู้ป่วยที่เสียชีวิตมีปัสสาวะน้อยกว่าผู้ที่รอดชีวิตจากการติดเชื้อ(16) ดังนั้นปริมาณปัสสาวะจึงสามารถใช้ในการคาดการณ์ความรุนแรงของโรคถึงขั้นเสียชีวิตได้ ต่อมาเป็นงานวิจัยเพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ของจำนวนเชื้อเลปโตสไปราในเลือดกับอาการแสดงทางคลินิกต่างๆในประเทศศรีลังกา โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดภายใน 10 วันแรกหลังแสดงอาการ พบว่าผู้ป่วยติดเชื้อเลปโตสไปราที่มีภาวะไตวาย มีเชื้อเลปโตสไปราอยู่ในเลือดจำนวน 11,007 ตัวต่อมิลลิลิตร(17) แต่ยังไม่มีการศึกษาใดที่หาปริมาณเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะของผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสเพื่อหาความสัมพันธ์กับภาวะไตวายเฉียบพลัน ซึ่งการตรวจเพื่อหาจำนวนในปัสสาวะนั้นเป็นตัวอย่างทางคลินิกที่น่าจะอธิบายพยาธิสภาพของไตได้ดีกว่าเชื้อในเลือด เนื่องจากการสูญเสียการทำหน้าที่ของไตเกิดจากการที่มีเชื้อเข้าไป

โรคติดเชื้อเลปโตสไปโรซิส มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันดังที่ได้กล่าวมาจากการศึกษาข้างต้น โดยผู้ป่วยติดเชื้อที่มีชีวิตรอดบางราย มีการดำเนินของโรคไปเป็นโรคไตเรื้อรัง เพราะเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อบริเวณท่อไตหรือที่เรียกว่า tubulointerstitial inflammation การติดเชื้อในระดับรุนแรงทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน แม้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพสามารถแก้ปัญหาการติดเชื้อและหายจากภาวะไตวายเฉียบพลันได้ แต่การเสียการทำงานของไตที่เกิดขึ้นไปแล้วจะยังคงอยู่ การเก็บเนื้อเยื่อไตไปตรวจพบภาวะการอักเสบของท่อไต โดยเซลล์ที่อักเสบจำนวนมากมี monocytes หรือ macrophages ที่มี CD68 โดยพบว่าการใช้ corticosteroids สามารถทำให้ค่า serum creatinine ของผู้ป่วยเข้าสู่ภาวะปกติได้(18) ในทางกลับกันในผู้ป่วยติดเชื้อบางรายที่เชื้อเลปโตสไปราเข้าสู่ไตแต่ไม่มีอาการแสดงของภาวะไตวาย เชื้อจะยังคงอยู่ในไตและเกิดการเจริญและเพิ่มจำนวนเชื้อขึ้น แม้จะไม่มีอาการแต่เมื่อเวลาผ่านไปจะทำให้เป็นโรคไตเรื้อรังได้(19)

กลไกการเคลื่อนที่ของเชื้อเลปโตสไปรา เป็นสาเหตุโดยตรงของการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันโดยเชื้อจะเริ่มต้นเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่หลอดเลือดฝอยในวันที่ 2 ของการติดเชื้อ และทำให้เกิดภาวะบวมของลำไส้ในวันที่ 4-8 ของการติดเชื้อ ซึ่งเชื้อมักจะเริ่มเกาะที่ท่อไตหลังผ่านไปสัปดาห์แรกและเข้าสู่ท่อไตเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่สอง เมื่อเข้าสู่ท่อไตจะอยู่บริเวณท่อไตส่วนต้น (proximal tubule) และเกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ภายในนั้น เชื้อจะมีเยื่อหุ้มเซลล์เป็น outer membrane proteins (OMPs) ซึ่งจะประกอบด้วยแอนติเจนหลายชนิดคือ lipoproteins, lipopolysaccharides, peptidoglycans และ endotoxins ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้ไตวายและเกิดการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อักเสบภายในท่อไต ซึ่ง OMPs ที่ถูกถอดรหัสมาจากยีน LipL32 จะไปกระตุ้มระบบภูมิคุ้มกันให้หลั่ง cytokine เพื่อมาทำลายเชื้อและก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น inducible nitric oxide synthase (iNOS), monocyte chemotactic protein-1 (CCL2/MCP-1), T cells (RANTES) และ tumor necrosis factor (TNF-**α**) นอกจากนั้น OMPs จะไปจับกับ *Toll-like receptor 2* (TLR2) ในเซลล์ท่อไตส่วนต้น เพื่อกระตุ้นให้ nuclear factor-kappa beta (NF-kβ) ผลิต CCL2/MCP-1 ออกมาเพื่อทำให้ monocyte เข้ามารวมกันในท่อไตจำนวนมาก และการกระตุ้น NF-kβ ทำให้ TNF-**α** และ iNOS เพิ่มขึ้น ทำให้ไตเกิดการอักเสบ(20) ลดการทำงานลงจนสูญเสียหน้าที่การทำงาน และสุดท้ายทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน

เชื้อเลปโตสไปรา มี virulent factor หลายชนิด ซึ่ง lipoprotein ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อหลายชนิดสามารถใช้ตรวจวัดได้เพื่อตรวจจับเชื้อ มีการศึกษาความสัมพันธ์ของ lipoprotein ของเชื้อกับความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันแบบมีการขับปัสสาวะออกมาน้อย (Oligouria) ในหนูตะเภา หนูตะเภาที่ติดเชื้อที่มี Lp25 ซึ่งเป็น lipoprotein ชนิดหนึ่งบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อก่อโรค เทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มี Lip32 ซึ่งเป็น lipoprotein อีกชนิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าหนูที่ติดเชื้อกลุ่มที่มี Lp25 มีปริมาตรปัสสาวะที่ขับออกมาน้อยกว่าอีกสองกลุ่ม รวมถึงระดับโพแทสเซียมเพิ่มขึ้นมากกว่าอีกสองกลุ่ม และหนูที่ติดเชื้อกลุ่มที่มี Lp25 ทั้งหมดมีภาวะไตวายเฉียบพลัน(21) ดังนั้นการตรวจจับ lipoprotein ของเชื้อก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจต่อการหาความสัมพันธ์ของเชื้อเลปโตสไปราและการเกิดไตวายเฉียบพลัน

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า มีการตรวจวัดชนิด serovars ของเชื้อที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลันจากเทคนิค MAT(16) และมีการตรวจจับ virulent factor ที่มีความสัมพันธ์กับไตวายเฉียบพลัน แต่ยังไม่เคยมีการวัดปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลป-โตสไปโรซิสมาใช้ในหาสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลันโดยเทคนิค PCR ในมนุษย์มาก่อน

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การวินิจฉัยโรคนอกจากการดูอาการแสดงทางคลินิกแล้ว ต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย โดยการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการในประเทศอังกฤษนั้น จะใช้การตรวจจากตัวอย่างเลือดและวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Bacteriological culture) ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อนั้นมีความยุ่งยากและต้องใช้เวลานาน การแยกเชื้อจากตัวอย่างเลือดหรือตัวอย่างน้ำไขสันหลัง อาจต้องทำการเก็บตัวอย่างระหว่างสัปดาห์แรกของการติดเชื้อหรือภายใน 10 วันแรกของการติดเชื้อ และการเก็บตัวอย่างปัสสาวะต้องทำการเก็บในสัปดาห์ที่สองของการติดเชื้อ โดยเชื้อเลปโตสไปราไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานในปัสสาวะ ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบตัวอย่างทันทีที่เก็บตัวอย่าง(22) ส่วนการตรวจจับแอนติบอดีในเลือดสามารถทำได้ 5-7 วันหลังจากเริ่มแสดงอาการของโรค(23)

การเก็บตัวอย่างเลือดที่เกาะตัวเป็นกลุ่มหรือ Coagulated blood (ประกอบด้วย serum และclot Blood) หรือ Non-coagulated blood (ประกอบด้วย พลาสมา, เซลล์เม็ดเลือดแดง, เซลล์เม็ดเลือดขาว และ เกล็ดเลือด) ขึ้นอยู่กับรูปแบบการวินิจฉัยที่ต้องการทำ มีนักวิจัยหลายท่านรายงานว่า EDTA plasma ให้ผลที่ดีที่สุดในการทำ Gene amplification ในทางกลับกัน Serum หรือ Heparinized plasma มีความไวต่ำเมื่อเทียบกับ Blood fractions การใช้ Serum หรือ Plasma เพื่อทำ Serological tests นั้นให้ผลที่เหมือนกัน แต่นิยมใช้ Serum มากกว่า(4)

ปัจจุบันมีการพัฒนาทดทดสอบผ่านเครื่องมือต่างๆในการวินิจฉัยตรวจโรคมากมาย ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ Direct examination, Gene amplification (การตรวจวินิจฉัย และ Isothermal methods) และ Serological tests (MAT และ IgM enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA))(24) การพัฒนาวิธีทดสอบทางห้องปฏิบัติการแรกเริ่มยังมีคงมีปัญหา การนับจำนวนเชื้อเลป-โตสไปราโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ dark field microscopy (DFM) ยังให้ผลที่ยังไม่น่าเชื่อถือและไม่แนะนำให้ใช้ในการวินิจฉัยโรค เลปโตสไปโรซิส ซึ่งการศึกษาในปี 2012 พบว่าตรวจไม่พบเชื้อเลปโตสไปราจากการส่องกล้อง DFM ทั้งในตัวอย่างปัสสาวะและตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อเลปโตสไปราทั้งหมด 100 คน ในขณะที่ตรวจพบเชื้อในตัวอย่างเหล่านั้นโดยวิธีอื่น(25) เชื้อเลปโตสไปราไม่สามารถตรวจมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา เนื่องจากเชื้อมีลักษณะใส แต่สามารถใช้กล้องจุลทรรศน์ DFM ส่องเพื่อดูลักษณะและการเคลื่อนที่ของเชื้อได้ ค่าความไวในการนับจำนวนเชื้อเลปโตสไปราของกล้องจุลทรรศน์ DFM มีค่าประมาณ 10^7 ตัวต่อมิลลิลิตร วิธีนี้จะสามารถทำการทดสอบได้รวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมง แต่การทดสอบในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะโดยตรงมีค่าความไวและความจำเพาะเจาะจงที่ต่ำ ทำให้เกิดการแปลความหมายของผลการ ตรวจผิดพลาดจากไฟบรินหรือโปรตีนที่ปนเปื้อนมาจากสิ่งมีชีวิต และไม่สามารถวินิจฉัยในระยะเริ่มต้นของโรคได้ จึงเป็นวิธีที่ไม่แนะนำให้ใช้ในการนับจำนวนเชื้อเลปโตสไปรา รวมถึงการย้อมสีแกรมของเชื้อที่ไม่สามารถใช้สีย้อม

แกรมธรรมดาได้ แต่ต้องใช้วิธีย้อมที่เพิ่มความไวในการทดสอบโดยตรง เช่น immunofluorescence, immunoperoxidase, silver staining, Warthin-Starry staining, immunohistochemistry และ in situ hybridization ซึ่งจากที่กล่าวมาทั้งหมดถือเป็นข้อเสียเปรียบของวิธีส่องกล้องจุลทรรศน์ DFM เพราะจะเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดผล false-positive หรือ false-negative ขึ้นได้(22) ทำให้ถึงแม้ว่าจะได้ผลการทดสอบเป็นบวกก็เป็นผลที่ไม่น่าเชื่อถือ

การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีการวินิจฉัยที่มีราคาถูกเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆและมักจะให้ข้อมูลชนิดของเชื้อรวมถึงความไวต่อยาต้านจุลชีพภายใน 24 ถึง 48 ชั่วโมงในเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น แต่ไม่ใช่ในกรณีเชื้อเลปโตสไปราที่มักจะไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบมาตรฐานทั่วไป(26) การเพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบพิเศษ เช่น oleic acid-albumin Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium พบว่าเชื้อเจริญเติบโตช้ามากในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ semisolid medium โดยใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ถึง 4 เดือนและนับจำนวนเชื้อได้ยาก(22) ทำให้การวินิจฉัยและการรักษาโรคเลปโตสไปโรซิสในผู้ป่วยล่าช้าตามไปด้วย กว่าจะได้ผลการทดสอบผู้ป่วยจะมีความรุนแรงของโรค ที่เพิ่มขึ้นเพราะไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม หรือถึงแม้จะได้รับการรักษาจากยาต้านจุลชีพแบบครอบคลุมเชื้อหรือ Broad-spectrum ไปก่อนผลการวินิจฉัยจะออกมา ก็ทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูงและอาจส่งผลให้เกิด อัตราการดื้อยาของเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆเพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีความไวที่ต่ำอีกด้วย และจากการการเจริญของเชื้อใน *Leptospira* Vanaporn Wuthiekanun (LVW) Agar ซึ่งทำการวัดแถบความขุ่นที่เชื้อเจริญในหลอดทดลอง พบว่าบางแถบมีความไม่ชัดเจนและบางจนไม่สามารถวัดได้(27)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การใช้เทคนิค PCR ในการตรวจจับ DNA ของเชื้อเลปโตสไปราด้วย Real-time PCR สำหรับการคัดลอก DNA จากเชื้อก่อโรค ซึ่งในที่นี้ผู้วิจัยก่อนหน้าได้มุ่งเน้นศึกษาการตรวจวินิจฉัยด้วย PCR เพราะเป็นวิธีการที่ได้ถูกนำมาใช้กันมาก โดยมีแนวโน้มที่จะใช้แทนที่การใช้วิธีทาง Serological tests เพราะวิธีนี้ มีความไวสูงและมีความสามารถในการตรวจวินิจฉัยได้ตั้งแต่ช่วงแรกๆ ซึ่งการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วนั้นมีความสำคัญมาก เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ถูกสงสัยว่าติดเชื้อเลปโตสไปโรซิสอย่างรุนแรงจะถูกรักษาด้วยยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ Broad-spectrum ที่สามารถคลุมการฆ่าเชื้อ *Leptospira spp.* ได้ก่อนที่จะทำการวินิจฉัยด้วยวิธีต่างๆ หากสามารถวินิจฉัยได้แล้วว่าเกิดจากเชื้อ *Leptospira spp*. จริงก็จะสามารถเปลี่ยนยาต้านจุลชีพชนิดออกฤทธิ์แคบหรือ Narrow-spectrum ได้ เช่น Benzyl penicillin เพื่อลดผลข้างเคียงจากยาหรือลดค่าใช้จ่ายต่างๆลงได้จากการใช้ยาฆ่าเชื้อที่เป็นแบบ Broad-spectrum นอกจากนี้การวินิจฉัยแยกโรคได้ตั้งแต่ช่วงแรกจะช่วยให้แพทย์สามารถตัดสินใจเลือกการรักษาแบบประคับประคองได้อย่างถูกต้องและสามารถคาดการณ์สาเหตุ

ของโรคได้(39) จึงเป็นเหตุผลว่าวิธีการวินิจฉัยที่มีความไว ความจำเพาะสูง และสามารถตรวจโรคได้ตั้งแต่ระยะแรกๆจึงมีความสำคัญ โดยการวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR จะจำเพาะกับยีนเป้าหมายของเชื้อ *Leptospira* นั่นคือ (16S rrs, secY, gyrB) หรือ pathogenic species-specific genes (เช่น lipL32, lfb1)(28)

PCR เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส เมื่อไม่มีการตรวจจับแอนติบอดี หรือ micro-agglutination antibodies โดยความไวในการตรวจจับที่ดีที่สุด คือ primer G1/G2 และ LP1/LP2 (63.6%) โดย G1/G2 primer มีความไวกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ LP1/LP2 เมื่อผลเลือดและปัสสาวะเป็นบวก ซึ่งความไวที่สูงกว่าของ G1/G2 อธิบายได้โดย amplification of a highly conserved DNA region ที่ปรากฏจำนวนของ serogroup มากกว่า ในทางตรงกันข้าม LP1/LP2 amplified แค่ 10 *Leptospira* reference strains จึงมีความไวที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ G1/G2 primers ในการทดลอง Gravekamp et al. ใช้ G1/G2 primers อธิบายว่ามี ความไว 50% ใน sera แต่การทดลองของ Bal et al. รายงานเป็นแค่ 28% นอกจากนี้การใช้ primer ที่เหมือนกันในจำนวนตัวอย่างที่มากในการทดลองของ Brown et al. รายงานว่า 62% ผลบวกทั้งในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะซึ่งมีความคล้ายคลึงกันกับการทดลองนี้ที่ได้ผล 57.6% จาก G1/G2 primers(24) โดยผล PCR เป็น positivity ภายใน 11 วันแรกของโรค อาจเป็นเพราะมีเชื้อแบคทีเรียในเลือดที่สูงตามด้วยการเข้าสู่ปัสสาวะ อาจมีการปล่อย DNA ในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะระหว่างที่ sample processing ได้ นอกจากนี้พบว่าในผู้ป่วยกลุ่มย่อย PCR positivity ที่สูงที่สุด (81.8%) ซึ่งเกิดในตัวอย่างที่เก็บครั้งแรกที่ไม่มี agglutinins ในการเป็นโรคตอนแรกๆ (ค่าเฉลี่ยระยะเวลาการเจ็บป่วย 7.8 วัน) เมื่อมีเชื้อแบคทีเรียในเลือดตามด้วยในปัสสาวะ ซึ่งอาจมี DNA amplification ที่มากกว่าในผู้ป่วยกลุ่มนี้ มากกว่านั้นพบว่าผลของ serovar hybridization ของ PCR products ยังได้แนะนำถึง heterogeneity ของ sequence amplified โดย G1/G2 และ LP1/LP2 primers และแสดงการเลือก probe ในการทดลองในอนาคตที่มีเป้าหมายเพื่อแยกความต่างระหว่าง *Leptospires* ด้วย applicationสำหรับการวิจัยทางระบาดวิทยาต่อไป ท้ายที่สุดแล้ว PCR อาจเป็นตัวเสริมช่วยในการวินิจฉัยโรค leptospirosis เมื่อมีข้อมูลที่ไม่เพียงพอใน serological tests โดย PCR นี้อาจสามารถประยุกต์ใช้การการวินิจฉัยแยกโรคที่เป็น โรคมีไข้ (febrile illnesses) อื่นๆได้อีก เช่น โรคไข้เลือดออก(24)

ในห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจวินิจฉัยแยกโรคนั้น real-time PCR เป็นที่นิยมใช้สูงขึ้นมากแทนที่การใช้ conventional PCR เนื่องจากมีความเร็วมากกว่า ใช้บุคลากรในการทำน้อยและดำเนินการในระบบปิด ทำให้ลดการเกิดความเสี่ยงการปนเปื้อนกันของ DNA ได้ นอกจากนี้การยังสามารถหาจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายได้ แต่ข้อเสียของ real-time-PCR คือลำดับของ

amplified DNA มักจะสั้นเกินไปที่จะยืนยันได้ว่าเป็น sequence ของ amplified DNA ในตัวอย่างทางคลินิก หรือผลทางคลินิกกับผลทางห้องปฏิบัติการณ์มีความย้อนแย้งกัน เพื่อที่จะปรับปรุงการวินิจฉัยโดย real-time PCR สำหรับยีนส์ lipL32 ให้ดีขึ้น Galloway และ Hoffmaster ได้ทำการ Re-optimized เพิ่มเติมจากการศึกษาเดิมโดยเพิ่มความเข้มข้นของ primer และ probe การทำ Re-optimized ใหม่นี้ทำให้เพิ่มความไวจากเดิมเป็น 10 เท่า เมื่อใช้เชื้อเลปโตสไปรา 2 สายพันธุ์ การทดสอบนี้ทำให้ตรวจวินิจฉัยพบเชื้อเลปโตสไปราในผู้ป่วย 4 คนที่ถูกสงสัยว่าเป็นติดเชื้อจากการวินิจฉัยด้วย MAT มาก่อนหน้านี้แล้วผลตรวจเป็น Negative(28)

การพัฒนาเทคนิค PCR เพื่อให้สามารถนับจำนวนเชื้อเลปโตสไปราได้นั้น เทคนิค real-time PCR ถูกนำมาใช้ประโยชน์เพื่อตรวจนับจำนวนเชื้อเลปโตสไปราจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยในการศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ของจำนวนเชื้อเลปโตสไปราในเลือดกับอาการแสดงทางคลินิกต่างๆในประเทศศรีลังกาโดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดภายใน 10 วันแรกหลังแสดงอาการ พบว่าผู้ป่วยติดเชื้อเลปโตสไปโรซิส จำนวน 58 รายตรวจพบจำนวนเชื้อเลปโตสไปราในเลือดโดยเทคนิค real-time PCR อยู่ในช่วง 10^2-10^6 ตัวต่อมิลลิลิตร โดยคิดเฉลี่ยเท่ากับ 9,577 ตัวต่อมิลลิลิตร และพบว่าช่วงที่ real-time PCR ให้ผลบวกต้องเก็บตัวอย่างในช่วง 2 ถึง15 วันหลังจากแสดงอาการแต่ผู้ป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อน มีภาวะกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ ไตวาย และการทำงานของอวัยวะล้มเหลว มีเชื้อเลปโตสไปราอยู่ในเลือดจำนวน 8,616 ตัวต่อมิลลิลิตร 36,100 ตัวต่อมิลลิลิตร11,007 ตัวต่อมิลลิลิตร และ15,882 ตัวต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ(17) และจากการศึกษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเลปโตสไปรา จำนวน 25 ราย เมื่อใช้ LFB1 real-time PCR ที่มีความไวในการตรวจจับเชื้อเลปโตสไปรา 50 ตัวต่อมิลลิลิตร นับจำนวนเชื้อในตัวอย่างซีรัมที่เก็บจากผู้ป่วยได้ $8.0x10^1$–$3.9x10^4$ ตัวต่อมิลลิลิตร และพบว่าตัวอย่างทางคลินิกจำนวน 12 ตัวอย่างถูกวิเคราะห์โดยใช้เวลาไม่ถึง 3 ชั่วโมง(29) นอกจากการศึกษาเพื่อนับจำนวนเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างเลือดหรือซีรัมแล้ว ยังมีการศึกษาในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บจากมนุษย์ ได้แก่ การศึกษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเลปโตสไปรา จำนวน 7 คน ที่มีอาการที่ปอดระดับรุนแรงและเสียชีวิตจำนวน 5 คน จากอาการเลือดออกที่ปอด (pulmonary hemorrhage) และภาวะหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน (acute respiratory distress syndrome) พบว่าใช้เทคนิค real-time PCR (Taqman probe) ร่วมกับการใช้ค่ากราฟมาตราฐาน (standard curve) ช่วยในการนับจำนวนเชื้อในปัสสาวะของผู้ป่วยที่เสียชีวิตส่วนมากได้อย่างน้อย 10^4 ตัวต่อมิลลิลิตร โดยมีผู้ป่วย 2 รายติดเชื้อ *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae และผู้ป่วยอีก 1 รายติดเชื้อ *L. interrogans* serovar Canicola ซึ่งเมื่อผ่านไปนานถึง 90 วันผู้ป่วยรายที่ติดเชื้อ *L. interrogans* serovar Canicola ยังคงมีเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะเกือบ 10 ตัวต่อมิลลิลิตร และเมื่อผ่านไปนานกว่า 140 วัน เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นอีกเป็นเกือบ 10^3 ตัวต่อมิลลิลิตร อีกทั้งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เก็บมาจากตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของผู้ป่วย 1 ใน 7 รายนั้นพบว่าเชื้อไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่กลับตรวจพบเชื้อในตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธี real-time PCR(30) ต่อมาในการศึกษาการนับจำนวนเชื้อในปัสสาวะโดยเทคนิค real-time PCR ในชาวเปรูแถบลุ่มแม่น้ำอะเมซอน พบว่าอาสาสมัครที่ตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะแต่ไม่มีอาการแสดงของโรคจำนวน 6 คน มีจำนวนเชื้อเลปโตสไปราชนิด pathogen และintermediate-pathogen ในปัสสาวะจำนวน 75–229 ตัวต่อมิลลิลิตร (31) จะเห็นได้ว่าการวัดปริมาณเชื้อเลปโตสไปราโดยเทคนิค real-time PCR มีข้อดีที่โดดเด่นหลายอย่าง ทั้งมีความไวและความจำเพาะเจาะจงในการตรวจจับสูง และยังสามารถวิเคราะห์ได้ในระยะเริ่มต้นของโรคขณะเริ่มแสดงอาการทางคลินิก รวมถึงใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เวลาไม่นาน ทำให้เป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยเพื่อหาจำนวนเชื้อและตรวจจับชนิดของเชื้อเลปโตสไปรา เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคในผู้ติดเชื้อเลปโตสไปราในระยะเริ่มต้นและนำไปสู่การรักษาอย่างถูกต้องและรวดเร็ว

มีการรายงานถึงการเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อเลปโตสไปรา โดยใช้ real-time reverse-transcription-PCRs (rRT-PCR) ที่16S rrs gene โดยในงานวิจัยนี้ได้นำผู้ป่วยที่เป็นโรคไข้เลือดออกและโรคมาลาเรียเข้ามาในการศึกษาด้วย โดยผู้ป่วยถูกประเมินจาก optimized rtPCR โดยใช้ primers และ probes เดียวกัน ผลปรากฏว่า rRT-PCR มีความไวมากกว่า rt-PCR ถึง 100 เท่า ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อเลปโตสไปรา(28) การวินิจฉัยโดย PCR ในวิธีการต่างๆมีความไวในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อเลปโตสไปราในระยะ acute stage ได้โดยมีความไวที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการพัฒนาเทคนิคเหล่านั้น เช่น Real time PCR (rt-PCR) หรือ Real-time reverse-transcription-PCRs (rRT-PCR) โดยไม่ได้ลดความจำเพาะต่อเชื้อในทางคลินิกลง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) เป็นเทคนิค PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาจากเทคนิค Real time PCR เทคนิคนี้สามารถบอกจำนวน DNA เป้าหมายในตัวอย่างทางคลินิกได้อย่างแม่นยำเนื่องจากเป็นเทคนิคแบบใหม่ที่มีจำนวนปฏิกิริยา PCR ถึง 20,000 ปฏิกิริยา ซึ่งแต่ละปฏิกิริยาเกิดในหยดน้ำเล็กๆซึ่งแขวนลอยอยู่ในน้ำมันในแต่ละ well plate จำนวน 96 well plate โดยมีขั้นตอนคือ ให้ใส่ตัวอย่างลงใน droplet generator cartridge ซึ่งจะมีลักษณะเป็น cartridge 8 ช่อง จำนวน 3 แถว โดยใส่ตัวอย่างลงใน cartridge แถวกลางระหว่างแถวที่มีน้ำมันและแถวสำหรับบรรจุหยดปฏิกิริยาที่ถูกสร้างขึ้นมา น้ำมันจะไหลมาบรรจบด้านข้างของตัวอย่างเพื่อสร้างหยดปฏิกิริยาย่อยๆที่หุ้มด้วยน้ำมัน แล้วจึงนำหยดปฏิกิริยาไปใส่ลง 96 well plate ให้ความร้อนในระดับต่างๆ เพื่อให้เกิดการคัดลอก DNA ขึ้น แล้วนำไปใส่ในเครื่องอ่านค่า beta-prototype droplet reader ซึ่งสารตรวจจับเรืองแสงสองสีหรือ fluorescence detector จะจับกับปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกจะทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้น แล้วทำการวิเคราะห์แบบดิจิตอลเพื่อหาปริมาณใน BioMark System

digital arrays ทำให้ได้ผลการตรวจจับปริมาณ DNA ของเชื้อที่มีความแม่นยำ น่าเชื่อถือ และมีค่าความคลาดเคลื่อนน้อยกว่าร้อยละ 5 เมื่อเทียบกับการทดลองเทคนิคเดิมเพื่อตรวจจับหาปริมาณของเชื้อโรคโดยที่ไม่ต้องใช้กราฟมาตรฐาน (Standard curve)(32) ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาที่ใช้เทคนิค ddPCRเพื่อหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ได้แก่ นับจำนวนเชื้อ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาที่สำคัญในโรงพยาบาล ซึ่งใช้ ddPCR เพื่อตรวจจับ staphylococcal protein SA0140 (SA) และ methicillin resistance (*mecA*) gene ของเชื้อMRSA พบว่ามีความไวและความจำเพาะร้อยละ 96.8 และ 91.0 ตามลำดับ (33) ต่อมามีการตรวจนับ DNA ของเชื้อไวรัส Human immunodeficiency virus (HIV) โดยวิธี ddPCR และ real-time PCR พบว่าการตรวจนับจำนวน DNA ของทั้งสองเทคนิคมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในความเข้มข้นของจำนวนเชื้อที่ต่ำจะไม่มีนัยสำคัญเนื่องจากเกิดความคลาดเคลื่อนในการตรวจวัดด้วยเทคนิค real-time PCR และพบว่าเทคนิค ddPCRเหนือกว่า real-time PCR เนื่องจากสามารถตรวจวัดปริมาณของ DNA ได้อย่างถูกต้องมากกว่าโดยไม่ต้องอาศัยกราฟมาตรฐานและตรวจจับได้โดยปราศจากความไวต่อ primer และ probe ที่จับคู่ผิดพลาด(34) และมีการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิค real-time PCR และ ddPCR เพื่อวัดจำนวน Cytomegalovirus ในพลาสมาผู้ป่วยจำนวน 50 คน พบว่าทั้ง 2 วิธี สามารถวัดจำนวนเชื้อในพลาสมาได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แม้ real-time PCR มีความไวมากกว่า ddPCR แต่ที่ความเข้มข้นสูง ddPCR มีความแปรผันในการวัดน้อยกว่า real-time PCR โดยไม่ต้องใช้ standard curve ช่วยในการวิเคราะห์(35) นอกจากเชื้อไวรัสแล้วยังมีการใช้ ddPCR เพื่อตรวจจับ oocyte ซึ่งเป็นระยะติดต่อของเชื้อ Cryptosporidium ในตัวอย่างอุจจาระ ซึ่งเป็นปรสิตชนิดหนึ่งในทางเดินอาหาร และเป็นสาเหตุที่ทำให้กระเพาะอาหารอักเสบ โดยตรวจจับ 18S rRNA และ actin ของเชื้อพบว่าเมื่อเทียบกับวิธี real-time PCR แล้ว ddPCR สามารถตรวจจับได้น้อยกว่าและยังเสียค่าใช้จ่ายมากกว่าอีกด้วย แต่ real-time PCR มีการใช้ปิเปตในขั้นตอนการวัด และอาจมีการสูญเสียDNAไป ทำให้มีโอกาสเกิดความคลาดเคลื่อนมากกว่า ddPCR และยังมีความยุ่งยากในการใช้ standard curve เพื่อช่วยในการวิเคราะห์อีกด้วย(36) และสุดท้ายการใช้ ddPCR เพื่อตรวจจับ Escherichiacoli O157 และ Listeria monocytogenes โดยใช้ mineral oil-saturated polydimethylsiloxane(OSP)chipเพื่อแก้ปัญหาการระเหยของหยดปฏิกิริยา และใช้ TaqMan-MGB fluorescentprobe จำนวน 2 ชนิด ที่ให้สีแตกต่างกันเพื่อแยกกันจำเชื้อแต่ละชนิดในตัวอย่างเดียวกัน พบว่ามีความไวในการนับจำนวนเชื้อ 40 CFU/ml โดยใช้ เวลา 18 ชั่วโมง และเมื่อลองทดสอบตรวจจับเชื้อในน้ำดื่มที่ปนเปื้อนเชื้อพบว่าตรวจจับเชื้อได้ที่ 10 CFU/ml โดยใช้เวลาเพียง 2 ชั่วโมงเท่านั้น(37) เมื่อเปรียบเทียบการทดลองในเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆข้างต้น การนับจำนวนเชื้อด้วย PCR มีข้อดีเมื่อเทียบกับ real-time PCR แม้จะพบว่ามีความไวในการตรวจจับน้อยกว่าหรือเท่ากับ real-time PCR และราคาในการทดสอบแพงกว่า

แต่สามารถนับจำนวนกรดนิวคลิอิกอย่างถูกต้องและแม่นยำได้โดยไม่ต้องใช้ standard curve และมีความคลาดเคลื่อนหรือความแปรผันในการวัดน้อยกว่า real-time PCR เนื่องจากมีจำนวนปฏิกิริยาจำนวนมากต่อการทดสอบหนึ่งครั้งและไม่สูญเสียจำนวนเชื้อไประหว่างการทดสอบเท่ากับ real-time PCR ทำให้ ddPCR อาจมีความน่าเชื่อถือมากกว่าผลจากการทดสอบด้วย real-time PCR ซึ่งการวิจัยพื้นฐานเกี่ยวกับการทดสอบเพื่อวินิจฉัยโรคทางโมเลกุลนั้น ความไว ความจำเพาะที่สูง และความคลาดเคลื่อนที่น้อยเป็นสิ่งสำคัญในการวิจัย อย่างไรก็ตามเทคนิคแบบใหม่นี้ยังไม่มีงานวิจัยในการใช้เทคนิค ddPCR เพื่อหาปริมาณของเชื้อเลปโตสไปรา ดังนั้นการนับจำนวนเชื้อในตัวอย่างทางคลินิกโดยวิธี real-time PCR และ ddPCR จึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำไปหาปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะเพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือในการหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ป่วย กับภาวะไตวายเฉียบพลันต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research design)

การศึกษาวิจัยนี้เป็นรูปแบบสังเกตการณ์ไปข้างหน้าหลายสถาบัน (multicenter prospective observational study) ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปรา กับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)

1. กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้นำปัสสาวะและเลือดของผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 229 ราย ที่ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์ด้านโรคไตในภาวะวิกฤต แห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้เก็บรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยอาสาสมัครจาก 15 โรงพยาบาล ในจังหวัดศรีสะเกษ ของประเทศไทย ตั้งแต่ช่วงวันที่ 11 กันยายน 2558 ถึงวันที่ 2 พฤศจิกายน 2560 ตัวอย่างทั้งหมดได้ผ่านการขออนุญาตจากคณะกรรมการกลางจริยธรรมการวิจัยในคน (Central Research Ethics Committee,National Research Council of Thailand [CREC 5/2016]) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว รวมถึงก่อนทำการวิจัยผู้วิจัยได้ขออนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน (IRB) หมายเลข 169/61 เอาไว้แล้ว

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้ามาใช้ในการศึกษา (inclusion criteria)

1) ผู้ป่วยที่เป็นอาสาสมัครทั้งหมดยินยอมที่จะเข้าร่วมการวิจัยด้วยความสมัครใจ
2) ผู้ป่วยอาสาสมัครทั้งหมดจะต้องมาจากโรงพยาบาลทั้ง 15 โรงพยาบาล ในจังหวัดศรีสะเกษ ประเทศไทย
3) เป็นผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกว่ามีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส โดยมีเกณฑ์วินิจฉัยทางคลินิก ได้แก่ ไข้สูง หนาวสั่น ปวดศีรษะขั้นรุ่นแรง ร่วมกับอาการต่างๆ ดังนี้
    - ไอแห้งหรือมีเสมหะปนเลือด
    - ตาแดง (หลอดเลือดแดงแผ่เป็นตาข่าย หรือ มีเลือดออก)
    - ปวดกล้ามเนื้อย่างรุนแรง

Chulalongkorn University

- อาการเกี่ยวกับระบบประสาทผิดปกติ เช่น คอแข็ง เป็นต้น

4) มีประวัติการสัมผัสน้ำ พื้นที่ชื้นแฉะ หรือสิ่งแวดล้อมที่สัมผัสสิ่งขับถ่ายของสัตว์รังโรค
5) เป็นตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยตามหลักของ WHO ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกทางห้องปฏิบัติการ (any positive) ว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างของผู้ป่วยมีเชื้อเลปโตสไปรา ชนิดก่อโรค สปีชี่ส์ *L. interrogans* อยู่จริง ที่ส่งตรวจตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อคือ ในระยะ D_0 หรือ D_7

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากการศึกษา (exclusion criteria)

เป็นตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่ให้ผลลบทางห้องปฏิบัติการตามหลักการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไป-โรซิสของ World Health Organization (WHO) คือการตรวจด้วยวิธี เพาะเชื้อ PCR และ MAT(38) และสำหรับตัวอย่างที่ไม่มีข้อมูลของ serum creatinine ที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มของการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการว่ามีผลเป็น positive leptospirosis และคนไข้ที่มีแต่ตัวอย่างเลือดแต่ไม่มีตัวอย่างปัสสาวะ

ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่นำมาใช้ในการทดลอง (sample size)

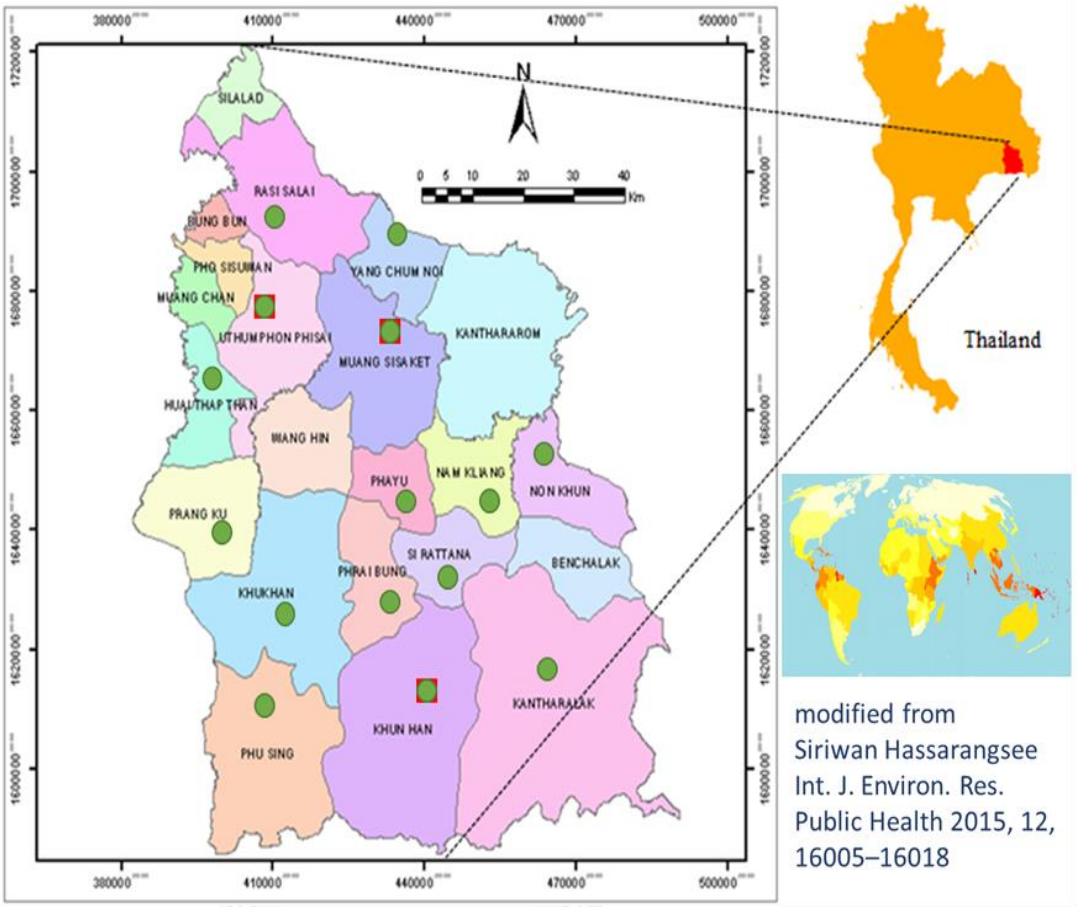
ในการศึกษานี้ ใช้สูตรสำหรับคำนวณหา ขนาดตัวอย่าง (n) ดังนี้

$$n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * 2 * \sigma^2 / d^2$$

โดยที่ $Z_{\alpha/2}$ เป็นค่าวิกฤตของการแจกแจงแบบปกติที่ $\alpha / 2$ (เช่น สำหรับระดับความเชื่อมั่น 95%, α เท่ากับ 0.05 และค่าที่สำคัญคือ 1.96), Z_{β} เป็นค่าวิกฤตของการแจกแจงแบบปกติที่ β (เช่น สำหรับ power of 80%, β คือ 0.2 และ critical value คือ 0.84), σ^2 คือความแปรปรวนของประชากร และ d คือความแตกต่างที่ต้องการตรวจสอบ

ซึ่งในการศึกษานี้ต้องการประมาณค่าสัดส่วนประชากรให้ผิดพลาดไม่เกิน 5% ด้วยระดับความเชื่อมั่นที่ 95% , power of 80% , ความแตกต่างของสมมติฐาน เท่ากับ 10 , ความแปรปรวนของประชากร เท่ากับ 1000

ดังนั้นการศึกษานี้จึงต้องใช้ขนาดตัวอย่างของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสมาใช้ในการศึกษาอย่างน้อย 157 ตัวอย่างในการแบ่งกลุ่มของคนไข้ที่มีภาวะ AKI และ non-AIK จึงจะสามารถตอบคำถามงานวิจัยได้



รูปที่ 3 แสดงภาพแผนที่โรงพยาบาลทั้ง 15 แห่งในจังหวัดศรีสะเกษ

(ดัดแปลงภาพจาก Siriwan Hassarangsee, 2015)

โรงพยาบาลทั้ง 15 แห่งประกอบไปด้วย

1.	รพ.ศรีสะเกษ	32	ราย
2.	รพ.ราษีไศล	3	ราย
3.	รพ.ยางชุมน้อย	2	ราย
4.	รพ.อุทุมพรพิสัย	135	ราย
5.	รพ.ห้วยทับทัน	3	ราย
6.	รพ.ปรางค์กู่	6	ราย
7.	รพ.พยุห์	4	ราย
8.	รพ.น้ำเกลี้ยง	4	ราย

9. รพ.ศรีรัตนะ	7	ราย
10. รพ.โนนคูณ	2	ราย
11. รพ.ภูสิงห์	19	ราย
12. รพ.ไพรบึง	21	ราย
13. รพ.ขุขันธ์	68	ราย
14. รพ.ขุนหาญ	9	ราย
15. รพ.กันทรลักษณ์	7	ราย
16. ไม่ระบุข้อมูลชื่อของโรงพยาบาล (no document)	8	ราย

2. การหาปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราจากเทคนิค Real-time PCR (qPCR)

นำตัวอย่างปัสสาวะไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 g เป็นเวลา 30 นาที นำไปละลายใน PBS จำนวน 200 ไมโครลิตร สกัดสารพันธุกรรมตามชุดการทดลองสำเร็จรูปของ High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche,USA) วัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง Nanodrop (Thermo scientific nd 1000,USA) และเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิติดลบ 20 องศาเซลเซียส สำหรับทำ qPCR เป็นเวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมง จำนวน 40 รอบ โดยใช้ TaqMan probe : FAM-5’ -AA AGC CAG GAC AAG CGC CG-3’ ใช้ primers Lepto Forward : 5’-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3’ และ primers Lepto Reveres : 5’-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3’(Villumsen และคณะ, 2012) ใน 1 ปฏิกิริยา มีปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่แบบ 5 ไมโครลิตร และ Master mix 15 ไมโครลิตร สร้างกราฟค่ามาตรฐาน (standard curve) โดยนำยีน *LipL 32* โคลนนิ่งเข้าไปในพลาสมิดของแบคทีเรีย *E.coli* ด้วยวิธี Transformation หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงที่ระยะ mid-logarithmic สกัดพลาสมิดด้วยตามชุดการทดลองสำเร็จรูปของ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ที่ค่าความเข้มข้น 10^9 ตัว/มล. (ตามวิธีการนับจานวนเชื้อของ Petrolf hausser) มาเจือจางแบคทีเรียเพื่อนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี 10-fold dilutions จนถึงระดับความเข้มข้นที่ 10^0 ตัว/มล. (LOD: 10^0 – 10^9)

<u>รายละเอียดของ Master mix</u>

ใน 1 ปฏิกิริยา จะมีปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย DNA แม่แบบ จำนวน 5 ไมโครลิตร และ Master mix จำนวน 15 ไมโครลิตร ซึ่งใน Master mix จะประกอบไปด้วย

Sterile H_2O	จำนวน	2.6	ไมโครลิตร
(2x) PCR buffer	จำนวน	10	ไมโครลิตร
TaqMan probe 10 μM	จำนวน	0.4	ไมโครลิตร
F – primer 10 μM	จำนวน	1	ไมโครลิตร
R – primer 10 μM	จำนวน	1	ไมโครลิตร

(Lepto-LipL32)

TaqMan probe : FAM-5’ -AA AGC CAG GAC AAG CGC CG-3’

primers Lepto Forward : 5’-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3’

primers Lepto Reveres : 5’-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT- 3’(39)

นำ Standard curves ที่เตรียมไว้ในระดับความเข้มข้นต่างๆคือ 10^9 ถึง 10^1, Negative control (DW) และ Total volume ใส่ลงไปใน 48 well plate จากนั้นใส่ลงไปในเครื่อง StepOnePlus™ Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific,USA) เพื่อทำการวิเคราะห์หาค่า Standard curve ที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราเจอ เพื่อเอาค่าประมาณของจำนวนเชื้อที่ได้มาหาความสัมพันธ์ของภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. การหาปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราจากเทคนิค Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR)

เตรียมตัวอย่าง DNA ซึ่งเตรียมเหมือนกับการทดสอบด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ primers, fluorescent probes (TaqMan probes คือ FAM) และส่วนผสมน้ำยาของ บริษัท Bio-Rad ให้จำเพาะต่อการสร้างหยดปฏิกิริยา โดยการเตรียม Master mix ใน 1 ปฏิกิริยา ในส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร มีรายละเอียด ดังนี้

รายละเอียดของ Master mix

2x super mix	จำนวน	10	ไมโครลิตร
10 µM Reverse primer	จำนวน	1.8	ไมโครลิตร
10 µM forward primer	จำนวน	1.8	ไมโครลิตร
10 µM Probe	จำนวน	0.5	ไมโครลิตร
Restriction enzyme	จำนวน	1	ไมโครลิตร
DNA	จำนวน	1	ไมโครลิตร
DW	จำนวน	3.9	ไมโครลิตร

(Lepto-LipL32)

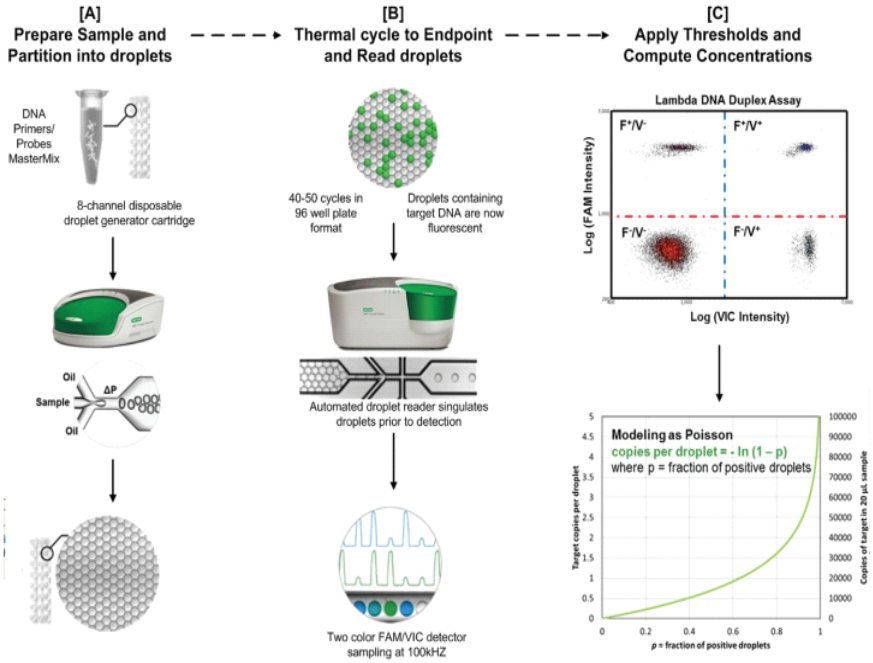
TaqMan probe : FAM-5’ -AA AGC CAG GAC AAG CGC CG-3’

primers Lepto Forward : 5’-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3’

primers Lepto Reveres : 5’-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT- 3’(39)

โดยรวมตัวอย่าง DNA ของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส primers และ probe เข้าด้วยกันด้วยเครื่อง Bio-Rad ddPCR supermix เพื่อสร้างตัวอย่างจำนวน 8 ตัวอย่าง ทำการเติมตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาตร 20 µl เข้าไปในแต่ละ wells ของ droplet generator cartridge ที่มี 8 ช่อง และใช้น้ำมันที่มากับชุดอุปกรณ์ ปริมาตร 70 µl ปิดตัวอย่างด้วยยาง (Gasket) จากนั้นนำตัวอย่างเข้าไปในเครื่องสร้างหยดอิมัลชันที่เรียกว่า QX200 Droplet Generator จากนั้นใช้ปิเปตดูดหยดอิมัลชันที่ถูกสร้างขึ้นออกมาจาก cartridge ใส่ลงไปใน 96-well plate ปิดปาก well ด้วย PX1™ PCR plate sealer ดำเนินการทำ PCR เพื่อหาผลลัพธ์ (40 cycle) โดยการใช้เครื่อง Thermal cycler ขั้นตอนนี้ใช้ระยะเวลา 1-2 ชม. ขึ้นกับจำนวนตัวอย่างแต่ละรอบที่ทำการทดลอง จากนั้นนำตัวอย่างไปอ่านค่าหยดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง QX200 Droplet Reader ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยซอฟแวร์ QuantaSoft™ ซึ่งจะนับจำนวนหยดปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกและหยดปฏิกิริยาที่ให้ผลลบถือเป็นการเสร็จสิ้นขั้นตอนการหาปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราจากเทคนิค ddPCR ดังแสดงภาพประกอบส่วนของการทดลองในรูปที่ 3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4 แสดงภาพประกอบส่วนของการทดลองด้วยเทคนิค ddPCR (32)

(ลิขสิทธิ์ภาพของ บริษัท Bio-Rad)

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data collection)

เก็บรวบรวมข้อมูลจากการประมวลผลของเครื่อง qPCR และ ddPCR ไว้ใน USB, แผ่น CD, และบันทึกข้อมูลไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม excel รวมทั้งจดบันทึกข้อมูลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการไว้ในสมุดบันทึก และทำการส่งผลที่ได้รายงานให้อาจารย์ที่ปรึกษาทราบตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1) ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะกับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน โดยทำการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อเลปโตสไปราระหว่างกลุ่มคนไข้ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (AKI) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Non-AKI) ด้วยการใช้สถิติ Mann-Whitney U test โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย กรณีที่ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ หรือเปรียบเทียบในเทอมของลอการิทึมของปริมาณเชื้อเลปโตสไปรากรณีที่ปริมาณไม่ได้มีการแจกแจงแบบปกติ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์นี้ร่วมกับปัจจัยพื้นฐานอื่นๆที่มีความสัมพันธ์กับการเกิด AKI ตามทฤษฎี เช่น baseline creatinine โดยใช้ binary logistic regression model

2) ใช้โปรแกรม SPSS 22 และ STATA 14 ในการวิเคราะห์ผล

3) ระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติพิจารณาที่ p-value < 0.05

3.5 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical consideration)

งานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาผลการทดลองในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสที่ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์ด้านโรคไตในภาวะวิกฤต แห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้เก็บตัวอย่างและตัวอย่างทั้งหมดได้ผ่านการขออนุญาตจากคณะกรรมการกลางจริยธรรมการวิจัยในคน (Central Research Ethics Committee, National Research Council of Thailand [CREC 5/2016]) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

รวมถึงก่อนทำการวิจัยผู้วิจัยได้ขออนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน (IRB) หมายเลข 169/61 เอาไว้แล้วสำหรับนำตัวอย่างดังกล่าวมาใช้ในการการศึกษาต่อยอด ดังนั้นจึงไม่มีผลกระทบต่อปัญหาจริยธรรมในด้านความเคารพในตัวบุคคล (Respect of person) การก่อประโยชน์และการไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/ non-maleficence) และความยุติธรรม (Justice) ต่อผู้เข้าร่วมโครงการ

3.6 ข้อจำกัดของงานวิจัย (Limitations)

ปัจจุบันข้อมูลที่ทำการศึกษาการตรวจสอบเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสในผู้ป่วยยังมีอยู่น้อยมาก จึงทำให้การศึกษาต่อยอดมีความรู้ก่อนหน้าค่อนข้างจำกัด

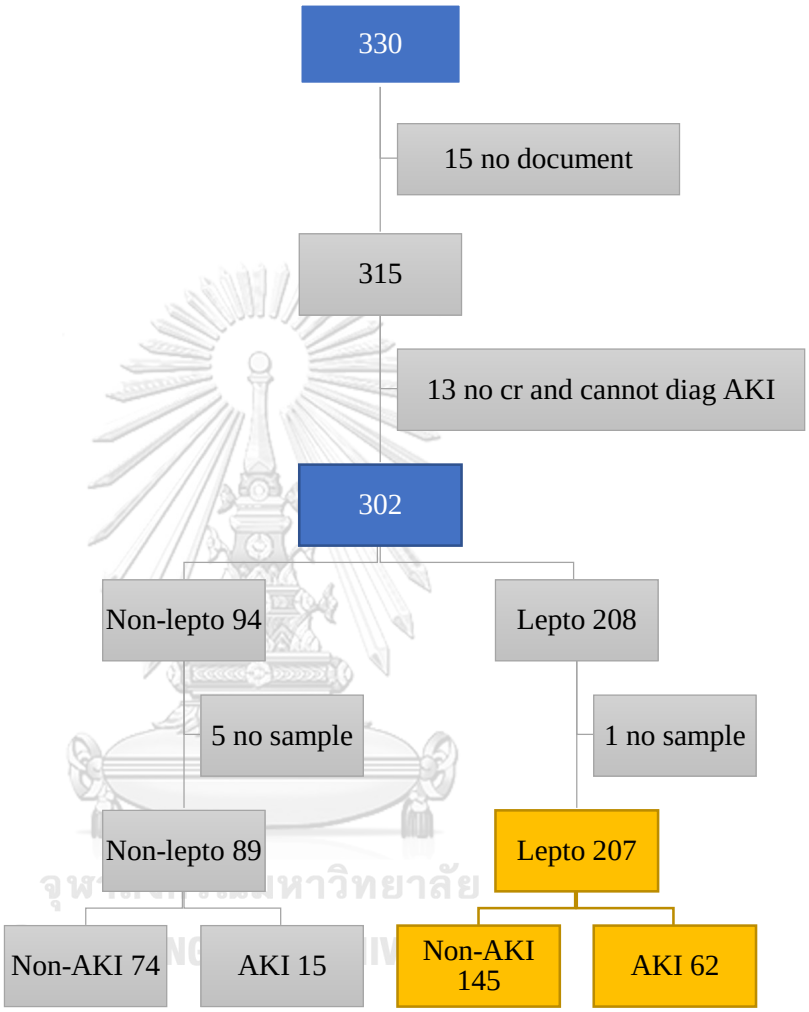
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาวิจัยนี้เป็นรูปแบบสังเกตการณ์ไปข้างหน้าหลายสถาบัน (multicenter prospective observational study) ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปรากับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยแพทย์จาก 15 โรงพยาบาล ในจังหวัดศรีสะเกษ ได้ทำการเก็บบันทึกข้อมูลทั้งหมดของคนไข้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสตามเกณฑ์ทางคลินิก (clinical criteria) ไว้ในแบบฟอร์มการวินิจฉัยโรคของแพทย์เอาไว้ตั้งแต่ในวันแรกที่เข้ารับการรักษา เป็นจำนวนทั้งสิ้น 330 ราย ผลปรากฏว่าเมื่อนำข้อมูลตามแบบฟอร์มที่บันทึกไว้มาทำการวิเคราะห์ลักษณะอาการของคนไข้ พบว่าในข้อมูลของคนไข้จำนวน 330 รายนั้น มีข้อมูลของคนไข้ไม่ครบแบ่งเป็น มีข้อมูลประวัติของคนไข้ไม่ครบ (no document) จำนวน 15 ราย และขาดข้อมูลของค่าซีรัมครีแอทินินที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มคนไข้ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันอีกจำนวน 13 ราย จึงเหลือจำนวนผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (suspected case) ทั้งสิ้น 302 ราย จากนั้นได้นำผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 302 ราย ไปทำการวินิจฉัยต่อทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (confirmed case) ตามหลักเกณฑ์การวินิจฉัยโรคขององค์การอนามัยโลก (WHO) ที่ให้ผลเป็นบวกตามวิธีใดวิธีหนึ่ง ได้แก่วิธี Microscopic Agglutination Test (MAT), PCR และการเพาะเชื้อในตัวอย่างเลือด พบว่า มีกลุ่มคนไข้ที่ไม่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (Non-Lepto) ทั้งสิ้น 94 ราย และเป็นกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (Lepto) มีทั้งสิ้น 208 ราย หนึ่งในนั้นของกลุ่มที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสพบว่าไม่มีตัวอย่างของปัสสาวะจำนวน 1 ราย ทำให้เหลือตัวอย่างปัสสาวะของคนไข้สุทธิที่จะนำเข้ามาใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปรากับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวนทั้งสิ้น 207 ราย ซึ่งในจำนวนดังกล่าวนี้ เมื่อใช้หลักเกณฑ์ของ Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) ในการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (AKI) มีจำนวน 62 ราย และกลุ่มที่ไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Non-AKI) มีจำนวน 145 ราย ดังแสดงภาพการแบ่งกลุ่มคนไข้ที่นำเข้ามาใช้ในการศึกษา ตามรูปที่ 5

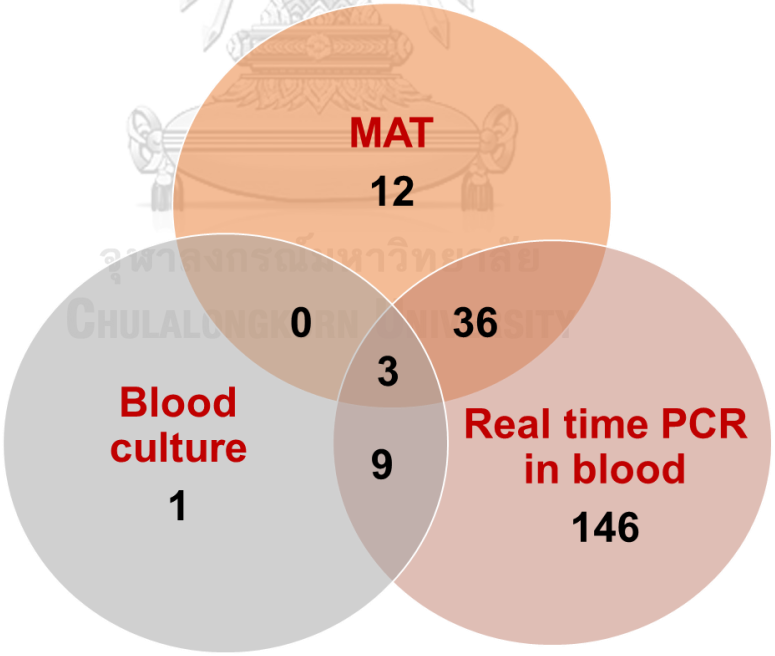
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 5 แสดงภาพการแบ่งกลุ่มคนไข้ที่นำเข้ามาใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปรากับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส ตามหลักเกณฑ์ของ clinical criteria, WHO และ KDIGO

และจากการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสตามเกณฑ์ของ WHO ตามที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ได้แบ่งคนไข้ได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (Lepto) และกลุ่มที่ไม่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (Non-Lepto) พบว่าได้คนไข้กลุ่มที่ไม่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 94 ราย คิดเป็นร้อยละ 31.1 และกลุ่มที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสทั้งหมด 208 ราย (ไม่มีตัวอย่างปัสสาวะ 1 ราย) คิดเป็นร้อยละ 68.9 นั้น

การศึกษานี้ จึงได้นำเฉพาะคนไข้ที่ได้รับวินิจฉัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (confirmed case) และมีตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่เป็นโรคเข้ามาใช้ในการศึกษา ทั้งสิ้น 207 ราย เพื่อนำมาหาปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในการศึกษาหาความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโสไปโณซิส พบว่าในจำนวนคนไข้ 207 รายที่มีจำนวนตัวอย่างของปัสสาวะนั้น จากการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสตามเกณฑ์ของ WHO มีคนไข้ที่ให้ผลบวกจากวิธี MAT อย่างเดียว 12 ราย วิธี qPCR อย่างเดียว 146 ราย ผลบวกจากวิธีเพาะเชื้ออย่างเดียวจำนวน 1 ราย และวิธี qPCR ให้ผลบวกตรงกับวิธีเพาะเชื้อ 9 ราย จากวิธี MAT ตรงกับ qPCR 36 ราย และพบผลบวกตรงกันทั้ง 3 วิธีจำนวน 3ราย แสดงผลการวินิจฉัยคนไข้ที่ให้ผลบวกในวิธีตามเกณฑ์ของ WHO ทั้ง 3 วิธี ในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงภาพการการวินิจฉัยคนไข้ที่ให้ผลเป็นบวกด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งตามหลักเกณฑ์ของ WHO

เมื่อทำการแบ่งกลุ่มของคนไข้ที่ต้องการนำเข้ามาศึกษาได้แล้ว การศึกษานี้ได้นำข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยถูกสงสัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสที่มีข้อมูลครบถ้วน จำนวน 302 ราย มาแสดงไว้ในตารางที่ 1 ด้วยเพื่อยืนยันว่ากลุ่มคนไข้ที่ได้นำเข้ามาใช้ในการศึกษานี้ผ่านการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสอย่างแน่นอน จากการยืนยันทั้งทางคลินิกและทางห้องปฏิบัติการ โดยในตารางที่ 1 ได้แบ่งเป็นกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 208 ราย และกลุ่มคนไข้ที่ไม่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 94 ราย ผู้ป่วยจำนวนดังกล่าวนี้ได้ถูกนำว่าวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยต่างๆ ที่ปรากฏในตารางที่ 1 พบว่าข้อมูลทางคลินิคของคนไข้ทั้ง 302 ราย แบ่งเป็นเพศชาย 249 ราย (ร้อยละ 82) เป็นกลุ่ม Lepto 174 ราย non-lepto 75 ราย เพศหญิง 53 ราย (ร้อยละ 18) เป็นกลุ่ม Lepto 34 ราย non-lepto 19 ราย อายุเฉลี่ยของทั้งสองกลุ่มอยู่ที่ 47.9 ปี ระยะเวลาของการมีไข้ฉลี่ย 3 วัน วัดอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยได้ที่ 38.3 องศาเซลเซียส ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ของทั้งสองกลุ่ม จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับรายละเอียดอื่นๆ อาทิ จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด ค่าความดันโลหิต ซีรีมครีแอทินิน บิลลิรูบิน และภาวะไตวายเฉียบพลัน รวมถึงอาการทางคลินิคของคนไข้ทั้ง 302 ราย ที่แบ่งออกเป็นกลุ่มที่ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส และกลุ่มคนไข้ที่ไม่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส ในแต่ละลักษณะ เช่น กลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 208 ราย มีอายุเฉลี่ย 47 ปี และกลุ่มคนไข้ที่ไม่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 94 มีอายุเฉลี่ย 50 ปี ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้ง 2 กลุ่ม ที่ค่า p-value = 0.323 ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยของอายุอยู่ที่ 47.9 (16.5) ปี ซึ่งแสดงรายละเอียดไว้ตามที่ปรากฏในตารางที่ 1 โดย เพศ และ ภาวะไตวายเฉียบพลัน แสดงไว้ในรูปของจำนวนร้อยละ, อายุ อุณหภูมิร่างกาย ค่าความดันโลหิต ฮีโมโกลบิล โซเดียมไอออน โพแทสเซียมไอออน ไบคาร์บอเนต แสดงไว้เป็นค่า Mean (SD) และจำนวนวันที่มีไข้ ค่าซีรีมครีแอทินิน บิลลิรูบิน จำนวนเกล็ดเลือด และข้อมูลอื่นๆที่เหลือแสดงไว้เป็นค่า Median (IQR)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 1 แสดงข้อมูลทางคลินิกลักษณะอาการของผู้ป่วยกลุ่ม AKI ในวันแรกที่เข้ารับการรักษา

Characteristic	Non-leptospirosis (N=94)	Leptospirosis (N=208)	p-value
Gender (%)			0.413
Male	75 (80%)	174 (84%)	
Female	19 (20%)	34 (16%)	
Age, years, Mean (SD)	49.6 (16.4)	47.2 (16.6)	0.323
Fever days, Median (IQR)	2 (1 - 4)	3 (1 - 4)	
Body temperature, Mean (SD)	38.4 (1.2)	38.2 (1.2)	0.206
SBP, mmHg, Mean (SD)	119.2 (20.6)	113.3 (22.6)	0.040
DBP, mmHg, Mean (SD)	67.9 (11.7)	66.3 (12)	0.239
Creatinine, mg/dL, Median (IQR)	1.01 (0.85 - 1.26)	1.2 (0.95 - 1.9)	<0.001
WBC x 103 /uL, Median (IQR)	10000 (7200 - 12900)	10000 (7000 - 13000)	0.948
Hb, Mean (SD)	12.4 (2.1)	12.3 (3.3)	0.761
Pletlet, Median (IQR)	170000 (127000 - 222000)	114000 (60000 - 191000)	<0.001
TB, mg/dL, Median (IQR)	1 (0.53 - 2.1)	1.2 (0.75 - 2.4)	0.031
DB, mg/dL, Median (IQR)	0.5 (0.3 - 1.11)	0.6 (0.3 - 1.6)	0.155
SGOT, u/L, Median (IQR)	56 (34 - 121)	61 (38 - 120)	0.498
SGPT, u/L, Median (IQR)	45 (32 - 76)	52 (28 - 90)	0.742
Na, mEq/L, Mean (SD)	136.1 (4.6)	134.8 (4.8)	0.048
K, mEq/L, Mean (SD)	3.6 (0.6)	5.3 (22.5)	0.483
HCO_3^-, mEq/L, Mean (SD)	24.6 (3.4)	23.3 (4.8)	0.023
AKI, n (%)	17 (18)	58 (28)	0.068

หลังจากที่ได้ทำการแบ่งกลุ่มคนไข้เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ได้นำปัสสาวะของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสไปตรวจหาปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี qPCR และ ddPCR จากการตรวจด้วยยีน *LipL 32* พบว่าตัวอย่างปัสสาวะของคนไข้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะ D_0 จำนวน 207 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่ม AKI จำนวน 62 ตัวอย่าง และกลุ่ม Non-AKI จำนวน 145 ตัวอย่าง สามารถแยกสรุปผลของแต่ละวิธีจากการตรวจวัดปริมาณเชื้อทางห้องปฏิบัติการได้ดังนี้

วิธี qPCR พบว่ามีตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสที่ให้ผลบวกจากวิธีนี้จำนวนทั้งสิ้น 53 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่ม AKI จำนวน 19 ตัวอย่าง มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 12937 (1412, 101614) ตัว/มล. และในกลุ่ม Non-AKI ให้ผลบวก 34 ตัวอย่าง มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 3719 (1308, 15495) ตัว/มล. p-value 0.228 การหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะกับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสของทั้งสองกลุ่มนี้ ด้วยวิธี qPCR จึงไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงอย่างไรก็ตามปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในกลุ่ม AKI ก็มีแนวโน้มที่จะสูงกว่าในกลุ่ม non-AKI ถึง 4 เท่าด้วยกัน

และสำหรับวิธี ddPCR พบว่ามีตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสให้ผลบวกจากวิธีนี้จำนวนทั้งสิ้น 69 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่ม AKI จำนวน 20 ตัวอย่าง มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 2100 (645, 4300) ตัว/มล. และในกลุ่ม Non-AKI ให้ผลบวก 49 ตัวอย่าง มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 320 (150, 1700) ตัว/มล. p-value 0.005 แสดงว่าการหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะกับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสของทั้งสองกลุ่มนี้ ด้วยวิธี ddPCR จึงมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พิจารณาที่ค่า p-value < 0.05

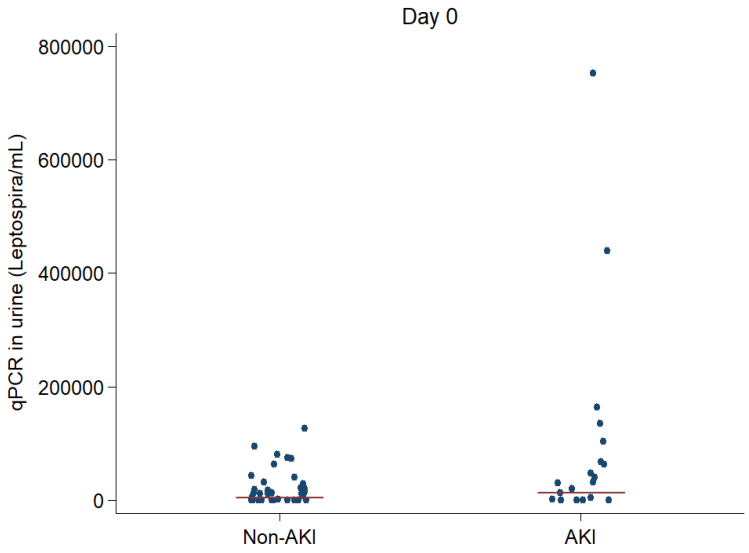
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หลังจากได้ทำการหาปริมาณเชื้อเฉลี่ยของคนไข้ในระยะ D_0 แล้วการศึกษานี้ได้สนใจตามไปศึกษาหาปริมาณเชื้อเลปโตสไปราของคนไข้ต่อในระยะ D_7 ผลปรากฏว่าการหาจำนวนเชื้อของทั้ง 2 วิธีในระยะ D_7 ให้ผลลบเป็นจำนวนมากซึ่งไม่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ใดๆได้ ดังนั้นการศึกษาในขั้นถัดไปในกลุ่ม severe (AKI ระยะที่ 3) เทียบกับกลุ่ม non-severe (AKI ระยะ 0,1,2) และการศึกษาในขั้นของ วันที่มีไข้ จึงได้ทำการตัดปริมาณเชื้อเฉลียในระยะ D_7 ออกไปไม่นำมาใช้ในการศึกษาต่อ คงเหลือไว้แต่เพียงการศึกษาหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อในระยะ D_0 เท่านั้น ซึ่งผลจากการหาปริมาณเชื้อของทั้ง 2 วิธีดังกล่าวได้แสดงรายละเอียดเอาไว้ในตารางที่ 2 และกราฟดังภาพที่ 7,8,9 และ 10 ดังนี้

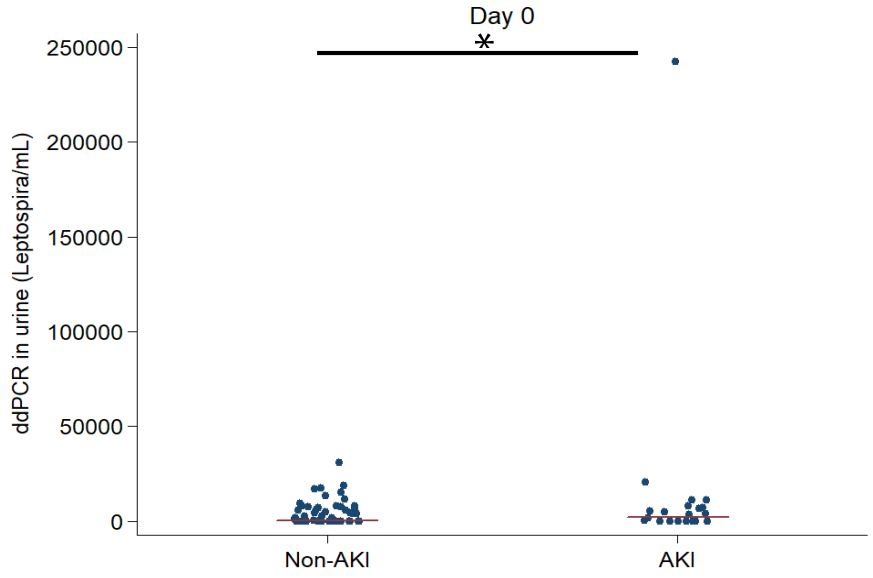
ตาราง 2 แสดงปริมาณเชื้อเฉลี่ยจากตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสของกลุ่ม AKI และ non-AKI ทั้งในระยะ D_0 และ D_7 ด้วยวิธี qPCR และวิธี ddPCR

Diagnosis	n	Day 0			Day 7		
		AKI	Non-AKI	p-value	AKI	Non-AKI	p-value
qPCR	53	12937 (1412, 101614), N=19	3719 (1308, 15495), N=34	0.228	0 (0, 0), N=4	0 (0, 75), N=15	0.847
ddPCR	69	2100 (645, 4300), N=20	320 (150, 1700), N=49	0.005	0 (0, 0), N=3	0 (0, 0), N=13	0.445

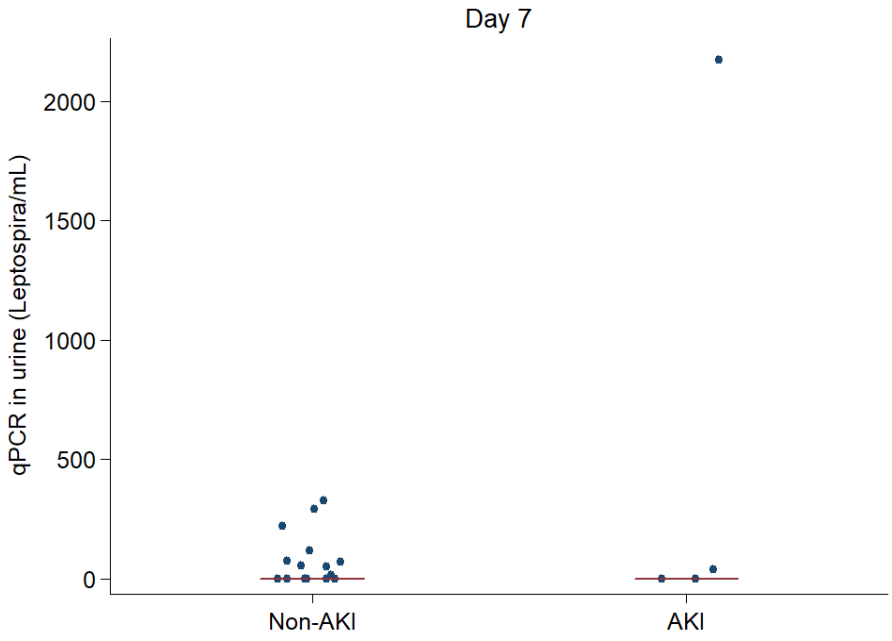
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Chulalongkorn University



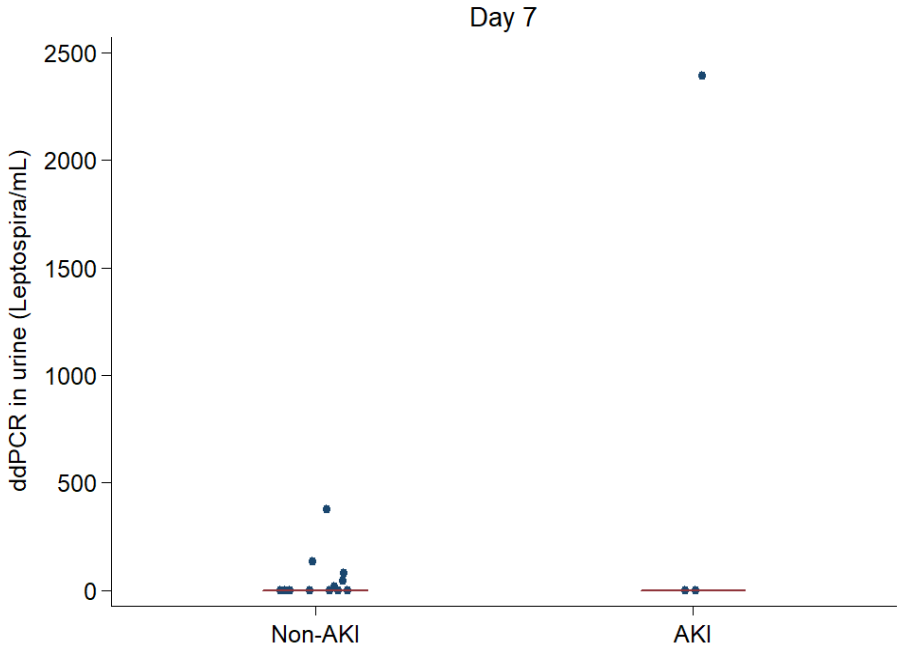
รูปภาพที่ 7 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะ D_0 ด้วยวิธี qPCR ในกลุ่ม AKI และ Non-AKI



รูปภาพที่ 8 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะ D_0 ด้วยวิธี ddPCR ในกลุ่ม AKI และ Non-AKI



รูปภาพที่ 9 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะ D_7 ด้วยวิธี qPCR ในกลุ่ม AKI และ Non-AKI



รูปภาพที่ 10 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะ D_7 ด้วยวิธี ddPCR ในกลุ่ม AKI และ Non-AKI

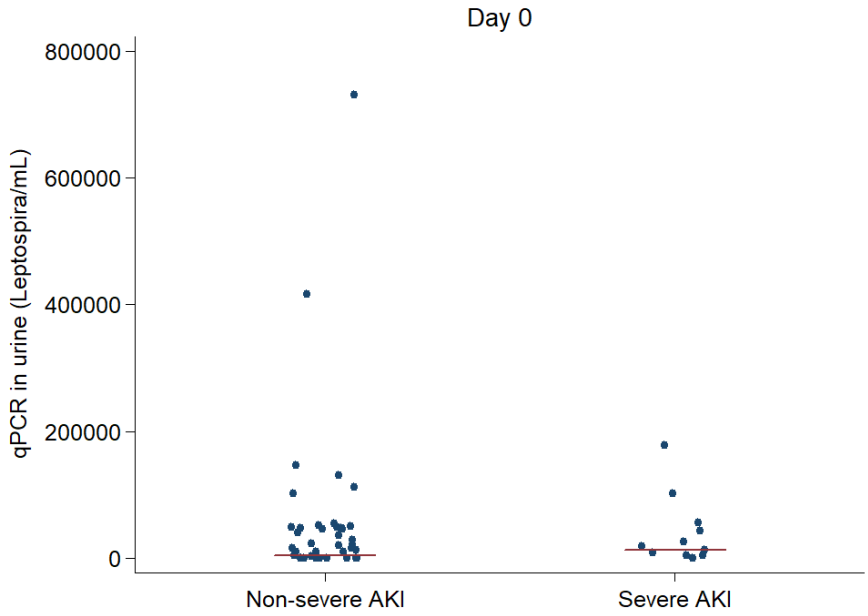
และจากการที่ความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส ทั้ง 2 วิธีให้ผลของความสัมพันธ์กับภาวะไตวายเฉียบพลันไม่ตรงการ ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้สนใจตามไปศึกษาโดยการแบ่งกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสใหม่ออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม severe AKI คือคนไข้ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันอยู่ในระยะที่ 3 ให้จัดเข้าไว้ในกลุ่มนี้ จำนวน 38 ราย และกลุ่ม non-severe AKI เป็นคนไข้ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันในระยะ 0,1 และ 2 จำนวน 169 ราย ตามเกณฑ์การจำแนกผู้ป่วยตามหลักเกณฑ์ของ KDIGO เช่นเดิม ดังนั้นจึงได้ว่า

วิธี qPCR มีตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสให้ผลบวกด้วยวิธีนี้จำนวน 53 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่ม severe AKI 11 ตัวอย่าง มีปริมาณเชื้อเลปโตสไปราเฉลี่ย 15000 (1037, 89304) ตัว/มล. และกลุ่ม non-severe AKI 42 ตัวอย่าง มีปริมาณเชื้อเลปโตสไปราเฉลี่ย 3780 (1375, 21627) ตัว/มล. p-value 0.539 ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงอย่างไรก็ตามปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในกลุ่ม severe AKI ก็มีแนวโน้มที่จะสูงกว่าในกลุ่ม non - severe AKI เกือบถึง 4 เท่าด้วยกัน สำหรับ วิธี ddPCR พบว่ามีตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกจากวิธีนี้จำนวนทั้งสิ้น 69 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่ม severe AKI จำนวน 13 ตัวอย่าง มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 2700 (1160, 4400) ตัว/มล. และในกลุ่ม non - severe AKI ให้ผลบวก 56 ตัวอย่าง มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 375 (150, 1750) ตัว/มล. p-value 0.007 ทั้ง 2 กลุ่มจึงมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อหาปริมาณเชื้อด้วยวิธี ddPCR พิจารณาที่ค่า p-value < 0.05 ผลทั้งหมดดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 และกราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อแต่ละกลุ่ม ดังรูปที่ 11 และ 12 ในวิธี qPCR และ dPCR ตามลำดับ

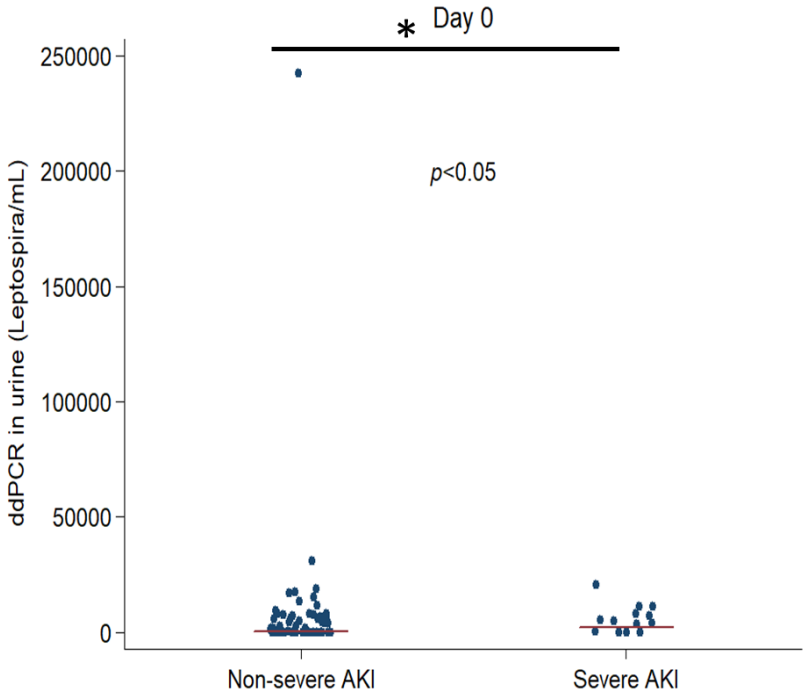
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 3 แสดงปริมาณเชื้อเฉลี่ยจากตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสของกลุ่ม severe - AKI และ non-severe AKI ทั้งในระยะ D0 ด้วยวิธี qPCR และวิธี ddPCR

Diagnosis	n	Day 0		
		AKI	Non-AKI	p-value
qPCR	53	15000 (1037, 89304), N=11	3780 (1375, 21627), N=42	0.539
ddPCR	69	2700 (1160, 4400), N=13	375 (150, 1750), N=56	0.007



รูปภาพที่ 11 แสดงปริมาณเชื้อเฉลี่ยจากตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสของกลุ่ม severe - AKI และ non-severe AKI ทั้งในระยะ D_0 ด้วยวิธี qPCR



รูปภาพที่ 12 แสดงปริมาณเชื้อเฉลี่ยจากตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสของกลุ่ม severe - AKI และ non-severe AKI ทั้งในระยะ D_0 ด้วยวิธี ddPCR

นอกจากนี้ งานวิจัยชิ้นนี้ยังได้สนใจตามไปศึกษาต่อในในการหาปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสตามระยะเวลาการมีไข้ ทั้งในกลุ่ม AKI และ non-AKI ด้วย โดยทำการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยที่มีไข้ออกเป็น 2 ดังนี้ คือกลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่ผู้ป่วยมีไข้ ช่วง 0 – 3 วัน จำนวน 140 ราย และกลุ่มที่สอง คือกลุ่มที่ มีไข้ตั้งแต่ 4 ขึ้นไป พบว่า

วิธี qPCR ตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของคนไข้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสมรจำนวน 53 ตัวอย่าง ในกลุ่ม non-AKI มีจำนวน 34 ตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มที่มีไข้ตั้งแต่ 0-3 วัน จำนวน 25 ตัวอย่าง หาปริมาณเชื้อเฉลี่ยได้ 3590.6 (1375, 15495.5) ตัว/มล. เทียบกับ กลุ่มที่มีไข้ตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป จำนวน 9 ตัวอย่าง หาปริมาณเชื้อเฉลี่ยได้ 3849 (888.2, 12478.3) ตัว/มล. p-value เท่ากับ 0.984 และในกลุ่ม AKI มีจำนวน 19 ตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มที่มีไข้ตั้งแต่ 0-3 วัน จำนวน 11 ตัวอย่าง หาปริมาณเชื้อเฉลี่ยได้ 12937.1 (1036.8, 89303.7) ตัว/มล. เทียบกับ กลุ่มที่มีไข้ตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป จำนวน 8 ตัวอย่าง หาปริมาณเชื้อเฉลี่ยได้ 8900 (1551.9, 152850.3) ตัว/มล. p-value เท่ากับ 0.804 พบว่าเมื่อนำปริมาณเชื้อของกลุ่มที่มีไข้ตั้งแต่ 0-3 วัน มาเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่ม AKI กับ non-AKI แล้วพบว่า มีค่า p-value เท่ากับ 0.381 และเมื่อนำกลุ่มนไข้ที่มีไข้ตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป มาเปรียบเทียบในทำนองเดียวกัน พบว่า ค่า p-value เป็น 0.441 จึงสรุปได้ว่าการหาปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส ไม่มีความสัมพันธ์กันกับภาวะไตวายเฉียบพลันในวิธี qPCR

และในวิธี ddPCR ตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของคนไข้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสมรจำนวน 68 ตัวอย่าง (ไม่มีข้อมูลการมีไข้ของผู้ป่วยจำนวน 1 ราย) ในกลุ่ม non-AKI จึงเหลือจำนวนที่ให้ผลเป็นบวก 48 ตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มที่มีไข้ตั้งแต่ 0-3 วัน จำนวน 32 ตัวอย่าง หาปริมาณเชื้อเฉลี่ยได้ 255 (145, 1950) ตัว/มล. เทียบกับ กลุ่มที่มีไข้ตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป จำนวน 16 ตัวอย่าง หาปริมาณเชื้อเฉลี่ยได้ 485 (165, 1500) ตัว/มล. p-value เท่ากับ 0.533 และในกลุ่ม AKI มีจำนวน 20 ตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มที่มีไข้ตั้งแต่ 0-3 วัน จำนวน 11 ตัวอย่าง หาปริมาณเชื้อเฉลี่ยได้ 1160 (350, 4200) ตัว/มล. เทียบกับ กลุ่มที่มีไข้ตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป จำนวน 9 ตัวอย่าง หาปริมาณเชื้อเฉลี่ยได้ 2800 (1700, 4400) ตัว/มล. p-value เท่ากับ 0.160 พบว่าเมื่อนำปริมาณเชื้อของกลุ่มที่มีไข้ตั้งแต่ 0-3 วัน มาเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่ม AKI กับ non-AKI แล้วพบว่า มีค่า p-value เท่ากับ 0.077 ซึ่งทั้งหมดนี้ถือว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเนื่องจากค่า p-value < 0.05 แต่เมื่อนำกลุ่มนไข้ที่มีไข้ตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป มาเปรียบเทียบในทำนองเดียวกัน กลับพบว่า ค่า p-value เป็น 0.017 จึงสรุปได้ว่าการหาปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส ระหว่างกลุ่ม AKI กับ non-AKI ในกลุ่มที่

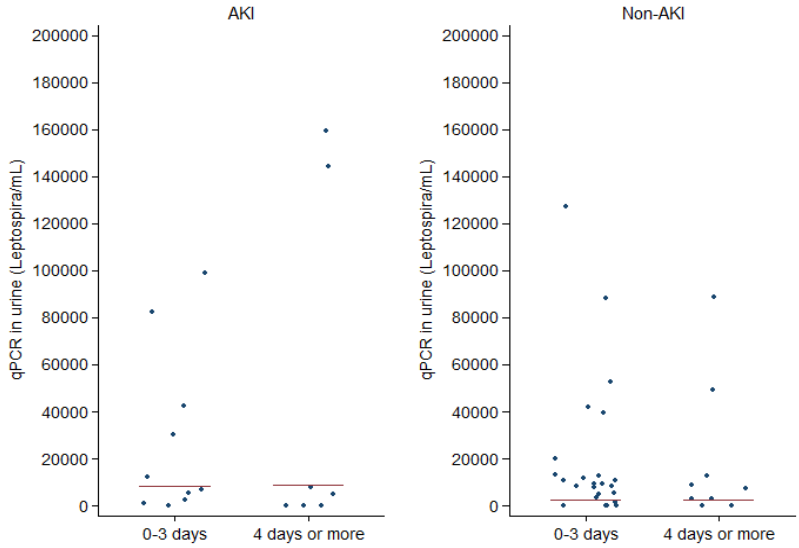
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

มีไข้ตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวิธี ddPCR ดังแสดงในตารางที่ 4 และกราฟในรูปภาพที่ 13 และ 14

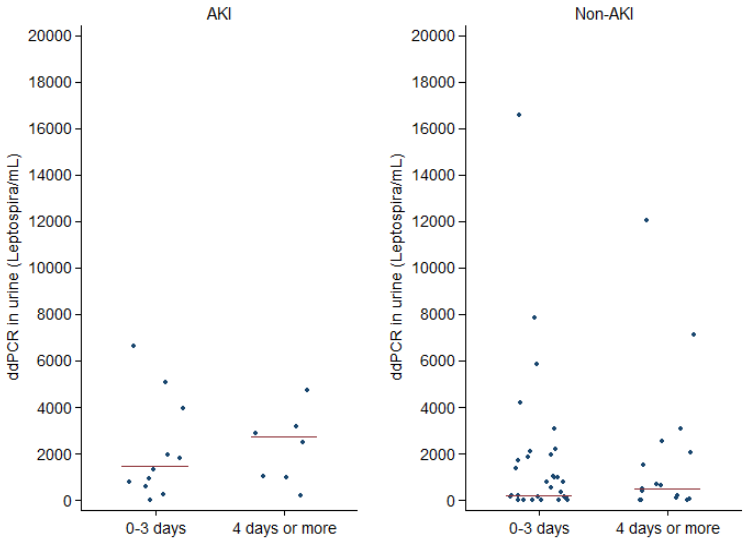
ตาราง 4 แสดงปริมาณเชื้อเฉลี่ยจากตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสของกลุ่ม AKI และ non-AKI ทั้งในระยะที่มีไข้ ด้วยวิธี qPCR และวิธี ddPCR

	Days of fever 0-3 days	Days of fever 4-6 days	p-value
qPCR			
Non-AKI (N=34)	3590.6 (1375, 15495.5), N=25	3849 (888.2, 12478.3), N=9	0.984
AKI (N=19)	12937.1 (1036.8, 89303.7), N=11	8900 (1551.9, 152850.3), N=8	0.804
p-value (AKI vs Non-AKI)	0.381	0.441	
ddPCR			
Non-AKI (N=48)	255 (145, 1950), N=32	485 (165, 1500), N=16	0.533
AKI (N=20)	1160 (350, 4200), N=11	2800 (1700, 4400), N=9	0.160
p-value (AKI vs Non-AKI)	0.077	0.017	

Chulalongkorn University



รูปภาพที่ 13 แสดงปริมาณเชื้อเฉลี่ยจากตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสของกลุ่ม AKI และ non-AKI ทั้งในระยะที่มีไข้ ด้วยวิธี qPCR



รูปภาพที่ 14 ปริมาณเชื้อเฉลี่ยจากตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสของกลุ่ม AKI และ non-AKI ทั้งในระยะที่มีไข้ ด้วยวิธี ddPCR

บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยนี้เป็นรูปแบบสังเกตการณ์ไปข้างหน้าหลายสถาบัน (multicenter prospective observational study) ซึ่งถือว่าเป็นการศึกษาวิจัยขนาดใหญ่ ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปรากับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส จากการนำข้อมูลทางคลินิกของคนไข้ทั้ง 15 โรงพยาบาล ในจังหวัดศรีสะเกษ ที่อยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่มักพบการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิสชุกชุมในช่วงฤดูฝน โดยโรงพยาบาลทั้ง 15 แห่งได้เก็บข้อมูลคนไข้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสไว้ทั้งสิ้นจำนวน 330 ราย พร้อมทั้งสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส นำมาตรวจหาปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราจากวิธี PCR ทั้งสองวิธีคือ วิธี qPCR ที่นิยมนำมาให้หาปริมาณของเชื้อไวรัสและแบคทีเรียต่างๆอย่างแพร่หลาย มีข้อดีที่สามารถตรวจหาปริมาณของเชื้อได้แม้จะมีปริมาณตัวอย่างของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจเพียงเล็กน้อยก็ตาม และวิธี ddPCR ที่แม้จะยังไม่เคยมีงานวิจัยชิ้นใดนำมาใช้ในการหาปริมาณเชื้อมาก่อนก็ตาม แต่ก็เป็นเทคนิคที่มีความน่าสนใจ คือ สามารถตรวจนับปริมาณของเชื้อไวรัสและแบคทีเรียต่างๆได้ตามจำนวนจริงโดยไม่ต้องอาศัยการประมาณค่าจากการนำไปเปรียบเทียบค่า Standard curves อย่างในวิธีของ qPCR ช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายของขั้นตอนในการสร้าง Standard curves อีกทั้งวิธี ddPCR ยังใช้ DNA แม่แบบที่น้อยมากช่วยให้ประหยัด DNA แม่แบบสำหรับใช้ในงานวิจัยลงไปได้มาก

เชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะที่ตรวจพบโดยวิธี qPCR พบมากที่สุดในช่วง 7 วันแรกของการติดเชื้อพบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะกับความผิดปกติของระบบอวัยวะต่างๆ ทั้ง ระบบหัวใจและหลอดเลือด ทางเดินหายใจ ตับ ไต และการแข็งตัวของเลือด ทำให้เกิดภาวะแรกซ้อนต่างๆที่รุนแรงตามมา โดยเฉพาะภาวะไตวายเฉียบพลัน ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้าศึกษาเกี่ยวกับการใช้ปัสสาวะในการวินิจฉัยโรคด้วยวิธี Conventional PCR ที่ต้องใช้ปริมาณปัสสาวะในการตรวจ มากถึง 20-300 มล.มีค่า Sensitivity ร้อยละ 83.3 และ ค่า Specificity ร้อยละ 22.2 จากผู้ป่วยจำนวน 29 ราย เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานคือ MAT และนอกจากความไวแล้ว ได้มีปัจจัยหลายอย่างได้รับการปรับให้เหมาะสมอย่างถูกต้อง เช่น ปริมาณปัสสาวะ ไม่เกิน 300 มล.(41) การปรับค่ากรดเบสของปัสสาวะให้เป็นกลาง และสารป้องกันการแข็งตัวของเซลล์ เช่น กลีเซอรอล อาจลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของการแช่แข็งได้

ผลการศึกษานี้ ในคนไข้ทั้งหมด 330 ราย พบว่าการตรวจด้วยวิธี qPCR และ ddPCR จากการใช้ยีน *LipL 32* จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส ในระยะ D_0 จำนวนที่ให้ผลเป็นบวกด้วยวิธี qPCR และวิธี ddPCR เมื่อนำมาแบ่งเป็นกลุ่ม AKI และ Non-AKI แล้ว พบว่า วิธี qPCR มีตัวอย่างปัสสาวะของคนไข้กลุ่ม AKI ให้ผลบวกจำนวน 19 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างปัสสาวะของคนไข้กลุ่ม Non-AKI ที่ให้ผลบวกจำนวน 34 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกจากวิธี qPCR เป็นทั้งสิ้น 53 ตัวอย่าง จากจำนวน 207 ตัวอย่าง และสำหรับวิธี ddPCR มีตัวอย่างปัสสาวะของคนไข้กลุ่ม AKI ที่ให้ผลบวกจำนวน 20 ตัวอย่าง และ คนไข้กลุ่ม Non-AKI ที่ให้ผลบวกจำนวน 49 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกจากวิธี ddPCR เป็นทั้งสิ้น 69 ตัวอย่าง ซึ่งการศึกษานี้ยังไม่เคยมีการศึกษาในเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะ กับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสมาก่อน ผลการการศึกษาแม้ว่าวิธี qPCR จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติแต่ในกลุ่มคนไข้ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันแต่ก็มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 12937 (1412, 101614) ตัว/มล. ที่มีแนวโน้มของปริมาณเชื้อเลปโตสไปรามากกว่ากลุ่มคนไข้ที่ไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลันอยู่สูงถึง 3-4 เท่า คือมีปริมาณ เชื้อเฉลี่ยจำนวน 3719 (1308, 15495) ตัว/มล. ค่า p-value เท่ากับ 0.228 แต่สำหรับวิธี ddPCR ในกลุ่มที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันมีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 2100 (645, 4300) ตัว/มล. มีปริมาณเชื้อเลปโตสไปรามากกว่ากลุ่มที่ไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน ซึ่งมีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 320 (150, 1700) ตัว/มล. พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า p-value เท่ากับ 0.005 ที่ระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติพิจารณาที่ p-value < 0.05 ดังนั้นจึงสรุปว่าปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มคนไข้ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน กับกลุ่มคนไข้ที่ไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน จากการหาปริมาณเชื้อของทั้งสองวิธี ด้วยการใช้ยีน *LipL32*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สรุปผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้

จำนวนตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส ในระยะ D_0 ที่ให้ผลเป็นบวกด้วยวิธี qPCR และวิธี ddPCR เมื่อนำมาแบ่งเป็นกลุ่ม AKI และ Non-AKI แล้ว พบว่า วิธี qPCR มีตัวอย่างปัสสาวะของคนไข้กลุ่ม AKI ให้ผลบวกจำนวน 19 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างปัสสาวะของคนไข้กลุ่ม Non-AKI ที่ให้ผลบวกจำนวน 34 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกจากวิธี qPCR เป็นทั้งสิ้น 53 ตัวอย่าง และสำหรับวิธี ddPCR มีตัวอย่างปัสสาวะของคนไข้กลุ่ม AKI ที่ให้ผลบวกจำนวน 20 ตัวอย่าง และคนไข้กลุ่ม Non-AKI ที่ให้ผลบวกจำนวน 49 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวก

จากวิธี ddPCR เป็นทั้งสิ้น 69 ตัวอย่าง พบว่าเมื่อนำมาหาปริมาณเชื้อเฉลี่ยตามกลุ่มที่ได้ศึกษาแล้ว ให้ผลดังนี้

1. การหาปริมาณเชื้อเฉลี่ยจากตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม AKI กับ Non-AKI ในระยะ D_0 ด้วยวิธี qPCR และวิธี ddPCR พบว่า วิธี qPCR ในกลุ่ม AKI มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 12937 (1412, 101614) ตัว/มล. และกลุ่ม Non-AKI มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 3719 (1308, 15495) ค่า p-value เท่ากับ 0.228 จึงไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และวิธี ddPCR กลุ่ม AKI มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 2100 (645, 4300) ตัว/มล. และ กลุ่ม Non-AKI มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 320 (150, 1700) ค่า p-value เท่ากับ 0.005 จึงมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
2. การหาปริมาณเชื้อเฉลี่ยจากตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม severe AKI กับ non-severe AKI ในระยะ D_0 ด้วยวิธี qPCR และวิธี ddPCR พบว่า วิธี qPCR ในกลุ่ม severe AKI มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 15000 (1037, 89304) ตัว/มล. และ กลุ่ม Non- severe AKI มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 3780 (1375, 21627) ค่า p-value เท่ากับ 0.539 จึงไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และวิธี ddPCR กลุ่ม severe AKI มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 2700 (1160, 4400) ตัว/มล. และ กลุ่ม Non- severe AKI มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 375 (150, 1750) ค่า p-value เท่ากับ 0.007 จึงมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
3. การหาปริมาณเชื้อเฉลี่ยจากตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม AKI กับ Non-AKI ในจำนวนวันที่มีไข้ ที่ระยะ D_0 ด้วยวิธี qPCR และวิธี ddPCR พบว่า การเปรียบเทียบปริมาณเชื้อเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม AKI กับ Non-AKI ในกลุ่มที่มีไข้ตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า p-value เป็น 0.017 ด้วยวิธี ddPCR

สรุป

พบว่าปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มคนไข้ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน กับกลุ่มคนไข้ที่ไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน จากการหาปริมาณเชื้อของทั้งสองวิธี แม้ว่าในวิธี qPCR จะไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็มีแนวโน้มของปริมาณเชื้อเลปโตสไปรา ในกลุ่มคนไข้ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน กับกลุ่มคนไข้ที่ไม่มี

ภาวะไตวายเฉียบพลัน สูงกว่า 3-4 เท่า ซึ่งต่างจาก วิธี ddPCR ที่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ข้อดีของการศึกษานี้

ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาขนาดใหญ่ที่มีจำนวนคนไข้ถึง 330 ราย อีกทั้งยังมีการเก็บข้อมูลทางคลินิกของคนไข้ที่สนใจนำเข้ามาศึกษา ตลอดถึงการใช้วิธีของ WHO เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างของผู้ป่วยมีเชื้อเลปโตสไปรา ชนิดก่อโรค สปีชี่ส์ *L. interrogans* อยู่จริง โดยเฉพาะ MAT เข้ามาเป็นวิธีมาตราฐานในการคัดกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสเข้ามาใช้ในการศึกษาหาปริมาณเชื้อเลปโตสไปรา จากยีน *LipL32* เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างของผู้ป่วยมีเชื้อเลปโตสไปรา ชนิดก่อโรค สปีชี่ส์ *L. interrogans* อยู่จริง ด้วยเทคนิคที่ทันสมัยอย่าง วิธี qPCR และ ddPCR ซึ่งเป็นวิธีที่แพร่หลายและเป็นที่นิยมในการเอามาใช้ในการศึกษาหาปริมาณของเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย

ข้อด้อยของการศึกษานี้

ในการศึกษานี้แม้จะเป็นการศึกษาขนาดใหญ่ แต่การติดตามเก็บจำนวนตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย D_7 ยังมีจำนวนน้อยเกินไปทำให้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่ม D_0 ทำให้ตอบผลการวิจัยอะไรไม่ได้ แต่อย่างไรก็ดีเนื่องจากการติดตามตรวจผลปริมาณเชื้อของคนไข้ในกลุ่มที่ให้ผลบวกใน D_0 ตามไปตรวจหาปริมาณเชื้อของคนไข้ในกลุ่มที่ D_7 พบว่าให้ผลลบเป็นจำนวนมาก ผู้ศึกษาจึงเห็นว่า ควรที่จะขยายจำนวนคนไข้ที่สงสัยว่าเป็นโรคเลปโตสโรซิสให้มีขนาใหญ่ขึ้น รวมถึงการติดตามเก็บตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยในระยะ D_7 ให้มีจำนวนมากขึ้นด้วย และเนื่องจากจำนวนผลบวกจากวิธี qPCR และ ddPCR มีจำนวนน้อย โดยเฉพาะในวิธี qPCR ที่มีผลบวก 53 ตัวอย่าง ทำให้การศึกษาความสัมพันธ์ในกรการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มให้ผลได้ไม่ดีนัก

ข้อเสนอแนะและการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำตัวอย่างปัสสาวะมาใช้ในการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสในห้องปฏิบัติการแทนการใช้ตัวอย่างเลือดเพราะสามารถเก็บตตัวอย่างได้ง่ายกว่า ผู้ป่วยให้ความยินยอมในการรักษาดีกว่าการขอเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาใช้ในการวินิจฉัย เนื่องจากในการศึกษานี้แม้จะเห็นถึงความสัมพันธ์ของการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันไม่แน่ชัด แต่ก็พบว่าสามารถตรวจนับปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราได้ตั้งแต่ 7 วันแรกที่คนไข้เข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาล
2. ระหว่างที่แพทย์ทำการรักษาแนะนำให้เก็บตัวอย่างปัสสาวะใน D_0 และ D_7 ให้มากยิ่งขึ้นเพื่อให้มีจำนวนตัวอย่างมีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์

ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปรากับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสให้มีความแม่นยำยิ่งขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1. Tangkanakul W, Smits HL, Jatanasen S, Ashford DA. Leptospirosis: an emerging health problem in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005;36(2):281-8.

2. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2011;17(4):494-501.

3. World Health Organization. Global burden of human leptospirosis and cross-sectoral interventions for its prevention and control 2017 [Available from: http://www.pmaconference.mahidol.ac.th/dmdocuments/2013-PMAC-Poster-P9-Bernadette%20Abela-Ridder.pdf

4. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Medecine et maladies infectieuses. 2013;43(1):1-9.

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

6. Stoddard RA. Detection of pathogenic Leptospira spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2013;943:257-66.

7. Araujo ER, Seguro AC, Spichler A, Magaldi AJ, Volpini RA, De Brito T. Acute kidney injury in human leptospirosis: an immunohistochemical study with pathophysiological correlation. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2010;456(4):367-75.

8. Adler B, de la Pena Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. Vet Microbiol. 2010;140(3-4):287-96.

9. Rahman M, Shad F, Smith MC. Acute kidney injury: a guide to diagnosis and management. American family physician. 2012;86(7):631-9.

10. KDIGO Board Members. Kidney Int Suppl (2011). 2012;2(1):3.

11. Sitprija V, Losuwanrak K, Kanjanabuch T. Leptospiral nephropathy. Seminars in nephrology. 2003;23(1):42-8.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

12. Seguro AC, Lomar AV, Rocha AS. Acute renal failure of leptospirosis: nonoliguric and hypokalemic forms. Nephron. 1990;55(2):146-51.

13. Cerqueira TB, Athanazio DA, Spichler AS, Seguro AC. Renal involvement in leptospirosis--new insights into pathophysiology and treatment. The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2008;12(3):248-52.

14. Herath NJ, Kularatne SA, Weerakoon KG, Wazil A, Subasinghe N, Ratnatunga NV. Long term outcome of acute kidney injury due to leptospirosis? A longitudinal study in Sri Lanka. BMC research notes. 2014;7:398.

15. Teles F, de Mendonca Uchoa JV, Mirelli Barreto Mendonca D, Falcao Pedrosa Costa A. Acute kidney injury in leptospirosis: the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) criteria and mortality. Clinical nephrology. 2016;86 (2016)(12):303-9.

16. Vijayan SAMA. Acute Kidney Injury Due To Leptospirosis-A Cohort Study2017; 8(1):[182-7 pp.].

17. Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC, Vinetz JM. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2012;54(9):1249-55.

18. Tanaka K, Tanabe K, Nishii N, Takiue K, Sugiyama H, Wada J. Sustained Tubulointerstitial Inflammation in Kidney with Severe Leptospirosis. Internal medicine (Tokyo, Japan). 2017;56(10):1179-84.

19. Yang CW. Leptospirosis Renal Disease: Emerging Culprit of Chronic Kidney Disease Unknown Etiology. Nephron. 2018;138(2):129-36.

20. Daher Ede F, de Abreu KL, da Silva Junior GB. Leptospirosis-associated acute kidney injury. Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia. 2010;32(4):400-7.

21. Abreu PAE, Seguro AC, Canale D, Silva A, Matos L, Gotti TB, et al. Lp25 membrane protein from pathogenic Leptospira spp. is associated with rhabdomyolysis and

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

oliguric acute kidney injury in a guinea pig model of leptospirosis. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(5):e0005615.

22. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi. 2013;46(4):245-52.

23. Forbes AE, Zochowski WJ, Dubrey SW, Sivaprakasam V. Leptospirosis and Weil's disease in the UK. QJM : monthly journal of the Association of Physicians. 2012;105(12):1151-62.

24. Fonseca Cde A, Teixeira MM, Romero EC, Tengan FM, Silva MV, Shikanai-Yasuda MA. Leptospira DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. J Infect. 2006;52(1):15-22.

25. Bhatia M, Umapathy BL, Navaneeth BV. An evaluation of dark field microscopy, culture and commercial serological kits in the diagnosis of leptospirosis. Indian J Med Microbiol. 2015;33(3):416-21.

26. Wuthiekanun V, Amornchai P, Paris DH, Langla S, Thaipadunpanit J, Chierakul W, et al. Rapid isolation and susceptibility testing of Leptospira spp. using a new solid medium, LVW agar. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013;57(1):297-302.

27. Wuthiekanun V, Amornchai P, Langla S, Oyuchua M, Day NP, Limmathurotsakul D. Maintenance of leptospira species in leptospira Vanaporn Wuthiekanun agar. J Clin Microbiol. 2014;52(12):4350-2.

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

29. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of Leptospira species in human leptospirosis. FEMS Microbiol Lett. 2005;249(1):139-47.

30. Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H, et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2005;40(3):343-51.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

31. Ganoza CA, Matthias MA, Saito M, Cespedes M, Gotuzzo E, Vinetz JM. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by Leptospira. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(2):e612.

32. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. Analytical chemistry. 2012;84(2):1003-11.

33. Kelley K, Cosman A, Belgrader P, Chapman B, Sullivan DC. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by a duplex droplet digital PCR assay. J Clin Microbiol. 2013;51(7):2033-9.

34. Strain MC, Lada SM, Luong T, Rought SE, Gianella S, Terry VH, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. PLoS One. 2013;8(4):e55943.

35. Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Shi L, Pounds S, et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. J Clin Microbiol. 2013;51(2):540-6.

36. Yang R, Paparini A, Monis P, Ryan U. Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of Cryptosporidium oocysts in faecal samples. International journal for parasitology. 2014;44(14):1105-13.

37. Bian X, Jing F, Li G, Fan X, Jia C, Zhou H, et al. A microfluidic droplet digital PCR for simultaneous detection of pathogenic Escherichia coli O157 and Listeria monocytogenes. Biosensors & bioelectronics. 2015;74:770-7.

38. Terpstra WJ, World Health Organization., International Leptospirosis Society. Human leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: World Health Organization; 2003. v, 109 p. p.

39. Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. Novel TaqMan(R) PCR for detection of Leptospira species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. J Microbiol Methods. 2012;91(1):184-90.

40. Bio-Rad. Droplet Digital™ PCR (ddPCR™) Technology 2017 [Available from: http://www.bio-rad.com/en-as/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology?ID=MDV31M4VY.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

41. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, De Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra WJ. J Clin Microbiol. 1994 Aug; 32 (8):1894-8.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เกณฑ์ต่างๆที่ใช้ในการแบ่งความรุนแรงของโรคไตวายเฉียบพลัน

ตารางที่ 1 การแบ่งความรุนแรงของโรคไตวายเฉียบพลันตามเกณฑ์ของ RIFLE, AKIN และ KDIGO (ดัดแปลงจาก Dager และคณะปี 2014 และ KDIGO ปี 2012)

เกณฑ์*	Serum creatinine (Scr) หรือ GFR**	ปริมาณปัสสาวะ
RIFLE		
Risk	Scr เพิ่มขึ้น 1.5 เท่าหรือ GFR เพิ่มขึ้นร้อยละ 25 จากค่าพื้นฐานเดิมของผู้ป่วย	น้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรม เป็นเวลามากกว่าหรือเท่ากับ 6 ชั่วโมง
Injury	Scr เพิ่มขึ้น 2 เท่าหรือ GFR เพิ่มขึ้นร้อยละ 50 จากค่าพื้นฐานเดิมของผู้ป่วย	น้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรม เป็นเวลามากกว่าหรือเท่ากับ 12 ชั่วโมง
Failure	Scr เพิ่มขึ้น 3 เท่าหรือ GFR เพิ่มขึ้นร้อยละ 75 จากค่าพื้นฐานเดิมของผู้ป่วย หรือมีค่า Scr มากกว่าหรือเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ร่วมกับการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอย่างน้อย 0.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร	น้อยกว่า 0.3 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม เป็นเวลามากกว่าหรือเท่ากับ 24 ชั่วโมงหรือเกิดภาวะไร้ปัสสาวะ หรือ anuria (ปัสสาวะน้อยกว่า 50 มิลลิลิตรต่อวัน) เป็นเวลามากกว่าหรือเท่ากับ 12 ชั่วโมง
loss	มีการสูญเสียการทำงานของไตอย่างสมบูรณ์หรือได้รับการบำบัดทดแทนไต เป็นเวลามากกว่า 4 สัปดาห์	
ESKD	ได้รับการบำบัดทดแทนไตเป็นเวลามากกว่า 3 เดือน	
AKIN		
ระยะที่ 1	Scr เพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือ 1.5 เท่าถึง 2 เท่า จากค่าพื้นฐานเดิมของผู้ป่วย	น้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรม เป็นเวลามากกว่าหรือเท่ากับ 6 ชั่วโมง
ระยะที่ 2	Scr เพิ่มขึ้นมากกว่า 2 ถึง 3 เท่า จากค่าพื้นฐานเดิมของผู้ป่วย	น้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรม เป็นเวลามากกว่าหรือเท่ากับ 12 ชั่วโมง
ระยะที่ 3	Scr เพิ่มขึ้น 3 เท่าจากค่าพื้นฐานเดิมของผู้ป่วย ร่วมกับการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอย่างน้อย 0.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือมีการเพิ่มขึ้นของระดับ Scr มากกว่าหรือเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือผู้ป่วยที่ต้องการได้รับการบำบัดทดแทนไต	น้อยกว่า 0.3 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม เป็นเวลามากกว่าหรือเท่ากับ 24 ชั่วโมง หรือเกิดภาวะไร้ปัสสาวะเป็นเวลามากกว่าหรือเท่ากับ 12 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เกณฑ์*	Serum creatinine (Scr) หรือ GFR**	ปริมาณปัสสาวะ
KDIGO		
ระยะที่ 1	Scr เพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือ 1.5 เท่าถึง 1.9 เท่า จากค่าพื้นฐานเดิมของผู้ป่วย	น้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรม เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง
ระยะที่ 2	Scr เพิ่มขึ้นมากกว่า 2 ถึง 2.9 เท่า จากค่าพื้นฐานเดิมของผู้ป่วย	น้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรม เป็นว่ามากกว่าหรือเท่ากับ 12 ชั่วโมง
ระยะที่ 3	Scr เพิ่มขึ้น 3 เท่าจากค่าพื้นฐานเดิมของผู้ป่วย ร่วมกับการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอย่างน้อย 0.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือมีการเพิ่มขึ้นของระดับ Scr มากกว่าหรือเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือผู้ป่วยที่ต้องการได้รับการบำบัดทดแทนไต หรือมีค่า eGFR*** น้อยกว่า 35 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อ 1.73 ตารางเมตร ในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 18 ปี	น้อยกว่า 0.3 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม เป็นเวลามากกว่าหรือเท่ากับ 24 ชั่วโมง หรือเกิดภาวะไร้ปัสสาวะเป็นเวลามากกว่าหรือเท่ากับ 12 ชั่วโมง

* เกณฑ์ทั้งสามเกณฑ์ การกำหนดระดับความรุนแรงทั้งสองพารามิเตอร์ให้เลือกพารามิเตอร์ที่ได้รับความรุนแรงของโรคมากที่สุดเป็นตัวกำหนดการวินิจฉัย

** ค่า GFR คำนวณจากสมการ Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)

*** ค่า GFR คำนวณจากสมการ Schwartz

คำย่อ Scr, serum creatine; GFR, glomerular filtration rate; RIFLE, Risk, Injury, Failure, Loss of Kidney Function, and End-Stage Kidney Disease; ESKD, end-stage kidney disease; AKIN, Acute Kidney Injury Network; KDIGO, Kidney Disease: Improving Global Outcomes; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

(ลิขสิทธิ์จาก วีรชัย ไชยจามร. เภสัชบำบัดในภาวะไตผิดปรกติ.--: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม, 2561. 212.)

ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

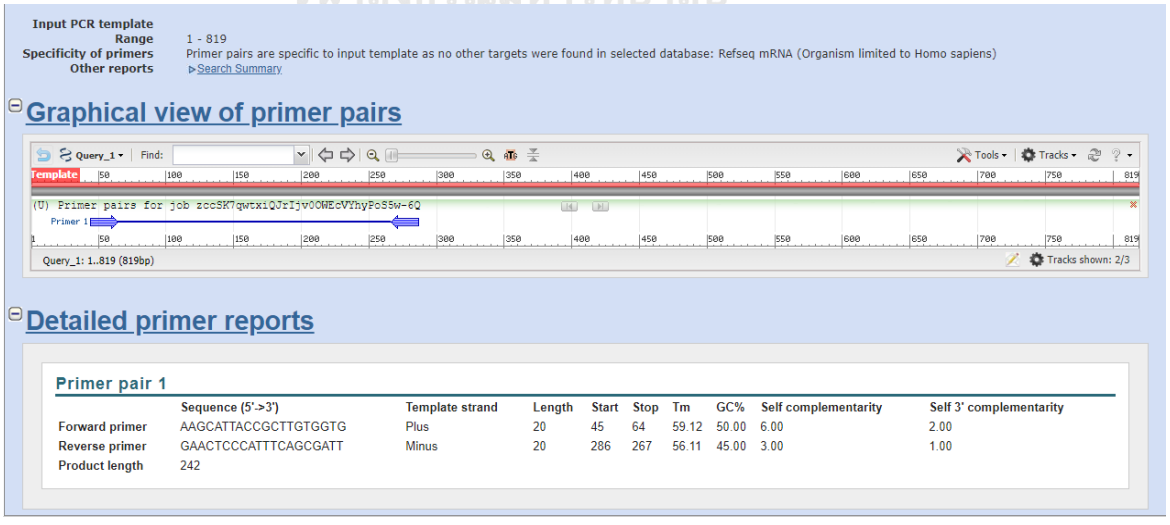
Leptospira interrogans serovar Lai str. 56601 chromosome I, complete sequence

NCBI Reference Sequence: NC_004342.2

GenBank Graphics

>NC_004342.2:2619904-2620722 Leptospira interrogans serovar Lai str. 56601 chromosome I, complete sequence

ATGAAAAAACTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTTGCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCTTT
CGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAACG
AAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAAGCCAGGACA
AGCGCCGGACGGTTTAGTCGATGGAAACAAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCCTGCCGTA
ATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCCAACAGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGA
CTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACT
TGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAA
ACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAA
GTACAACTCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCG
ACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTATAAACCAGGTGAAGTG
AAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGA
TCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGC
TTCTGACGCGACTAAGTAA



รูปภาพ 1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

การหาปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราจากเทคนิค

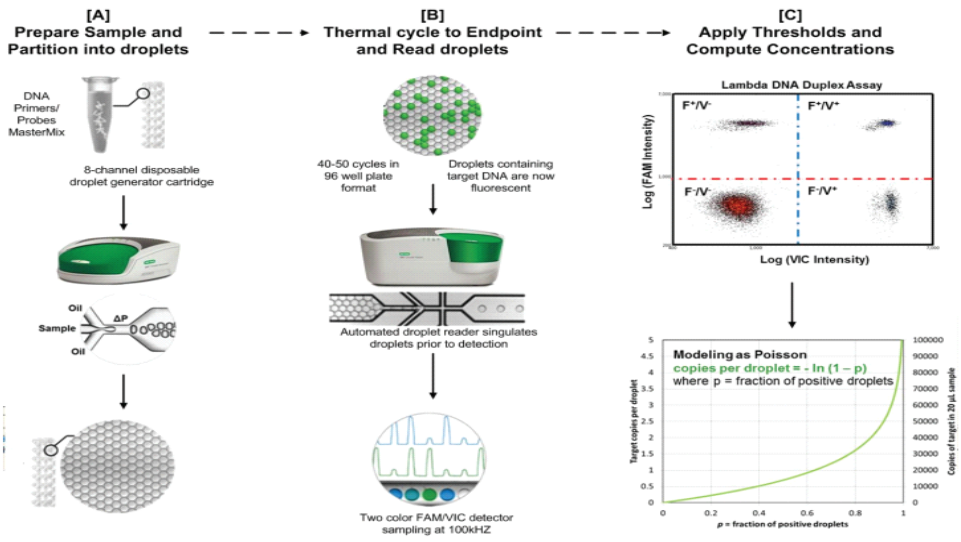
Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR)

หลักการ เป็นการวัดปริมาณที่แท้จริงของเชื้อเลปโตสไปรา โดยการนับโมเลกุลของกรดนิวคลิอิกที่ถูกห่อหุ้มในหยดน้ำที่แขวนลอยอยู่ในน้ำมันซึ่งแยกจากกันเป็นหยดเล็กๆที่มีค่าใกล้เคียง 20,000 หยด มากที่สุด ซึ่งในจำนวน 20,000 หยดนั้นสามารถตรวจสอบได้ว่ามีจำนวนหยดที่มีเชื้อเลปโตสไปราอยู่จำนวนเท่าใด เป็นเครื่องมือวัดจุดสิ้นสุด (End-point) ซึ่งสามารถวัดจำนวนกรดนิวคลิอิกได้โดยไม่ต้องใช้กราฟมาตรฐาน (Standard curves) ในการทดลอง Droplet digital PCR ตัวอย่างจะกระจายแบบสุ่มในส่วนแบ่งซึ่งบางหยดประกอบด้วยส่วนที่ไม่มี Template และส่วนที่มี Template 1 หรือ 2 สำเนา ส่วนแบ่งของหยดเหล่านั้นจะทำปฏิกิริยาคัดลอกเป็น Cycle ด้วยความร้อนเพื่อหาจุดสิ้นสุด (End-point) และอ่านค่าที่วัดได้จากส่วนแบ่งที่ได้ผลบวก จากความเข้มข้นสามารถนำไปคำนวณได้จากสมการของปัวซองค์ ดังรูปที่ 1(32)

$$M = -\ln\left(1 - \left(\frac{P}{R}\right)\right) \text{copy number per droplet}$$

รูปที่ 1 แสดงสมการที่ 1

โดยที่ M คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนโมเลกุลเป้าหมายต่อส่วนแบ่ง
P คือ จำนวนส่วนแบ่งซึ่งประกอบไปด้วยผลผลิตที่มีการคัดลอก DNA
R คือ จำนวนส่วนแบ่งหรือปฏิกิริยาทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์



รูปที่ 2 แสดงภาพประกอบ ส่วนของการทดลอง(32)

ขั้นตอนที่ 1: เตรียมตัวอย่าง PCR ให้พร้อมก่อนที่จะเริ่มทำ ddPCR

เตรียมตัวอย่าง DNA ซึ่งเตรียมเหมือนกับการทดสอบโดยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ primers, fluorescent probes (TaqMan probes คือ FAM) และส่วนผสมของ บริษัท Bio-Rad ให้จำเพาะต่อการสร้างหยดปฏิกิริยา โดยการเตรียม Master mix ใน 1 reaction ในส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 20 μL มีรายละเอียด ดังนี้

2x super mix	จำนวน	10	μL
10 μM Reverse primer	จำนวน	1.8	μL
10 μM forward primer	จำนวน	1.8	μL
10 μM Probe	จำนวน	0.5	μL
Restriction enzyme	จำนวน	1	μL
DNA	จำนวน	1	μL
DW	จำนวน	3.9	μL

(Lepto-LipL32)

TaqMan probe : FAM-5’ -AA AGC CAG GAC AAG CGC CG-3’

primers Lepto Forward : 5’-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3’

primers Lepto Reveres : 5’-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT- 3’(39)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โดยรวมตัวอย่าง DNA ของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส primers และ probe เข้าด้วยกันด้วยเครื่อง Bio-Rad ddPCR supermix เพื่อสร้างตัวอย่างจำนวน 8 ตัวอย่าง ทำการเติมตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาตร 20 μl เข้าไปในแต่ละ wells ของ droplet generator cartridge ที่มี 8 ช่อง

ขั้นตอนที่ 2: การสร้างหยดปฏิกิริยา

ตัวอย่างถูกย้ายที่เข้าไปในเครื่องสร้างหยดที่เรียกว่า QX200 Droplet Generator ซึ่งจะใช้ reagent หลายชนิดและเทคโนโลยีระบบการจัดการของไหลจุลภาค (microfluidics) เพื่อแบ่งส่วนตัวอย่างดั้งเดิมให้เข้าไปอยู่ในหยดปฏิกิริยาขนาดนาโนลิตรจำนวนใกล้เคียง 20,000 หยดให้มากที่สุด ซึ่งหยดที่สร้างโดยเครื่อง QX200 Droplet Generator จะมีขนาดและปริมาตรที่สม่ำเสมอกัน

ขั้นตอนที่ 3: การคัดลอกสารพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR ของหยดปฏิกิริยา

หยดที่สร้างจะถูกถ่ายโอนเข้าไปใน 96-well plate เพื่อให้เกิดการคัดลอกสารพันธุกรรมโดย PCR ในเครื่อง thermal cycler ที่ทำงานร่วมกันได้ โดยตัวอย่างอิมัลชันที่ใช้ปิเปตดูดมาจาก cartridge ถูกใส่ลงไปใน 96-well plate ปิดปาก well ด้วย PX1™ PCR plate sealer ดำเนินการทำ PCR เพื่อหาผลลัพธ์(40 cycle) โดยการใช้เครื่อง Thermal cycler

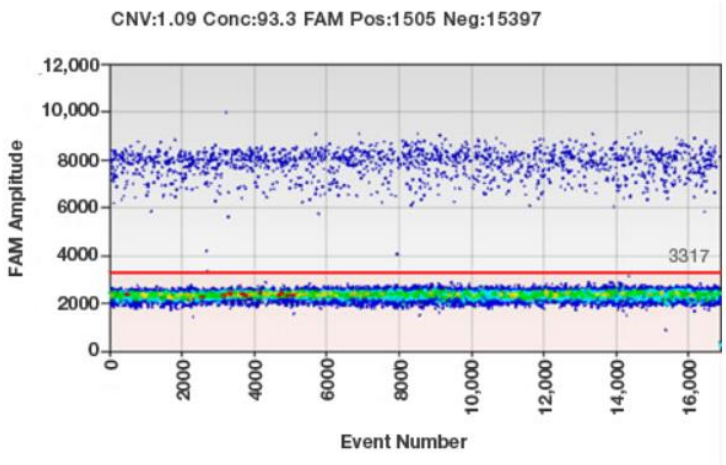
ขั้นตอนที่ 4: การอ่านค่าหยดปฏิกิริยา

เป็นการทำตามเทคนิค PCR เพื่อคัดลอกสารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราในหยดปฏิกิริยา ต้องย้ายตัวอย่างเข้าไปในเครื่องอ่านค่าหยดปฏิกิริยาที่เรียกว่า QX200 Droplet Reader ซึ่งจะวิเคราะห์แต่ละหยดโดยใช้ระบบการตรวจจับสองสี (ตั้งค่าเพื่อตรวจจับสารเรืองแสง FAM) แล้วเปิดใช้งานการวิเคราะห์ที่หลากหลายสำหรับเป้าหมายที่แตกต่างกันในตัวอย่างเดียวกัน เครื่องอ่านค่าหยดและซอฟแวร์ QuantaSoft™ จะนับจำนวนหยดปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกและหยดปฏิกิริยาที่ให้ผลลบ

ขั้นตอนที่ 5: การวิเคราะห์ผลลัพธ์

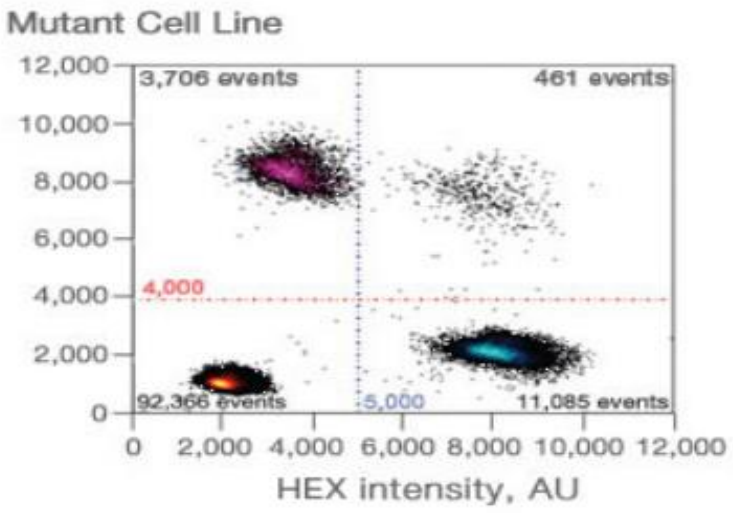
หยดปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก ประกอบด้วยสารพันธุกรรมที่คัดลอกมาจากเชื้อเลปโตสไปราอย่างน้อย 1 ชุด ซึ่งจะแสดงการเรืองแสงของสารเรืองแสงมากกว่าหยดปฏิกิริยาที่ให้ผลลบ ในเทคนิค ddPCR ระบบซอฟแวร์ QuantaSoft จะวัดจำนวนของหยดปฏิกิริยาซึ่งให้ทั้งผลบวกและผลลบสำหรับแต่ละ fluorophor (FAM) ตัวอย่างที่ทำการศึกษา สัดส่วนของหยดปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกถูกทำให้พอดีต่อการกระจายที่เรียกว่า Poisson distribution เพื่อวัดจำนวนการคัดลอกสารพันธุกรรมแท้จริงตอนเริ่มต้นซึ่งคัดลอกมาจากโมเลกุล DNA เป้าหมายที่ใส่เข้ามาเป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาในหน่วย copies/µl

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 3 แสดงหยดปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก

ผลลัพธ์ของตัวอย่างจากการทดลอง ddPCR แต่ละหยดในตัวอย่างถูกวาดลงในผังบนกราฟของความหนาแน่นของสารเรืองแสงเทียบกับจำนวนหยดปฏิกิริยา โดยหยดที่ให้ผลบวก (คือหยดที่อยู่เหนือความหนาแน่นต่ำสุดตรงเส้นสีแดง) ถูกบันทึกไว้ว่าให้ผลบวกหรือ positive และแต่ละจุดจะถูกมอบหมายค่าให้เท่ากับ 1 และหยดที่ให้ผลลบ (หยดที่มีจุดอยู่ต่ำกว่าเส้นสีแดง) ถูกบันทึกว่าให้ผลลบหรือ negative และแต่ละจุดจะถูกมอบค่าให้เท่ากับ 0 เทคนิคการนับจำนวนนี้ให้สัญญาณดิจิตอลจากการคำนวณความเข้มข้นของ DNA เป้าหมายในตอนเริ่มต้น โดยการวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนหยดที่ให้ผลบวกและลบในตัวอย่างDNAของเชื้อเลปโตสไปรา โดยข้อมูล ddPCR จากการทดลองให้ผลในรูปแบบผังสองมิติหรือ 2-D plot



รูปที่ 4 แสดงผังสองมิติของหยดที่เรืองแสง (2-D plot of droplet fluorescence)(40)

ระบบซอฟแวร์ QuantaSoft พอดีกับสัดส่วนของหยดที่ให้ผลบวกในการกระจายของหยดแบบ Poisson distribution เพื่อวัดจำนวนเชื้อเลปโตสไปราที่คัดลอกเริ่มต้นอย่างแท้จริงของตัวอย่างเชื้อเลปโตในหน่วย copies/µl และรายงานความเข้มข้น DNA ของเชื้อเลปโตสไปรา ในรูปแบบ copies/µl ในตัวอย่าง จากนั้นเราจะนำจำนวนเชื้อที่ได้ไปวิเคราะห์ผลต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตาราง 2 ข้อมูลทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะกับการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส

no	code	lepto	survive	predc_cr	dialysis_dp	feverdays_gr	aki_stage	aki	qpcr_urine	qpcr_urine7	qddpcr_urine	qddpcr_urine7	qpcr_urine_pos0	qddpcr_urine_pos0	qpcr_urine_pos7	qddpcr_urine_pos7
1	RLSS-002	1	1	3.99	0	4-6 days	3	AKI	0		2900		0	1		
2	RLSS-003	1	1	0.84	0	4-6 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
3	RLSS-006	1	0			0-3 days	3	AKI	1036.8		0		1	0		
5	RLSS-008	1	1	0.82	0	7 days or more	2	AKI	147548.88		229000		1	1		
6	RLSS-009	1	1		0	4-6 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
7	RLSS-010	1	0			4-6 days	3	AKI	0		0		0	0		
10	RLSS-013	1	1	0.67	0	0-3 days	2	AKI	0		0		0	0		
11	RLSS-014	1	1	3.54	0	4-6 days	3	AKI	158151.72		22400		1	1		
12	RLSS-015	1	1	1.86	0	0-3 days	3	AKI	0		0		0	0		
13	RLSS-016	1	0			0-3 days	3	AKI								
14	RLSS-017	1	1	0.91	0	7 days or more	0	Non-AKI	0		0		0	0		
16	RLSS-020	1	1	3.72	0	0-3 days	3	AKI	0		0		0	0		
17	RLSS-021	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
18	RLSS-022	1	1	0.9	0	4-6 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
19	RLSS-023	1	1	1.2	0	0-3 days	1	AKI	0		0		0	0		
20	RLSS-024	1	1	0.7	0	4-6 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
22	RLSS-026	1	1	1.2	0	4-6 days	3	AKI	2800		2800		1	1		
23	RLSS-027	1	1	0.9	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
25	RLSS-029	1	1	3.51	0	4-6 days	3	AKI	0		0		0	0		
26	RLSS-030	1	1		0		0	Non-AKI	0		0		0	0		
27	RLSS-031	1	1	1.09	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
28	RLSS-032	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		150		0	1		
29	RLSS-033	1	1		0	4-6 days	0	Non-AKI	0		200		0	1		
30	RLSS-034	1	0			4-6 days	3	AKI								
31	RLSS-038	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	13405.54		2100		1	1		
32	RLSS-039	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	91216.96		8700		1	1		
33	RLSS-040	1	1	0.8	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
35	RLSS-042	1	1	0.83	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
36	RLSS-043	1	1	1.1	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		430		0	1		
37	RLSS-044	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		2400		0	1		
38	RLSS-045	1	1	1.35	0	4-6 days	3	AKI	0		90		0	1		
39	RLSS-046	1	1	1	0	0-3 days	0	Non-AKI	38279.51		4800		1	1		
40	RLSS-047	1	1	0.74	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
41	RLSS-048	1	1		0	7 days or more	0	Non-AKI	0		0		0	0		
42	RLSS-049	1	1	1.13	0	7 days or more	0	Non-AKI	0		580		0	1		
43	RLSS-050	1	1	0.72	0	4-6 days	0	Non-AKI	97273.99		12500		1	1		
44	RLSS-051	1	1	0.83	0	0-3 days	0	Non-AKI	1308.2		150		1	1		
45	RLSS-052	1	1	1.2	0	4-6 days	0	Non-AKI	2480.24		1700		1	1		
46	RLSS-053	1	1	2.32	0	0-3 days	3	AKI	0		440		0	1		

no	code	lepto	survive	predc_cr	dialysis_dp	feverdays_gr	aki_stage	aki	qpcr_urine	qpcr_urine7	qddpcr_urine	qddpcr_urine7	qpcr_urine_pos0	qddpcr_urine_pos0	qpcr_urine_pos7	qddpcr_urine_pos7
47	RLSS-054	1	1	3.47	0	0-3 days	3	AKI								
48	RLSS-055	1	1		0	7 days or more	0	Non-AKI	0		180		0	1		
49	RLSS-056	1	0			0-3 days	3	AKI	89303.73		7300		1	1		
50	RLSS-057	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	1375		320		1	1		
51	RLSS-058	1	1	0.8	0	4-6 days	0	Non-AKI	3849		150		1	1		
53	RLSS-060	1	1		0		0	Non-AKI	0		380		0	1		
54	RLSS-061	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		150		0	1		
55	RLSS-062	1	1	1.01	0	4-6 days	1	AKI	1691.8		0		1	0		
57	RLSS-064	1	1	0.83	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		170		0	1		
58	RLSS-065	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		80		0	1		
59	RLSS-066	1	1	0.72	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
60	RLSS-067	1	1	0.89	0	0-3 days	3	AKI	20069.24		2400		1	1		
61	RLSS-068	1	1	0.42	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
62	RLSS-069	1	1	0.56	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
63	RLSS-070	1	0			0-3 days	3	AKI	0		0		0	0		
64	RLSS-071	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		1600		0	1		
65	RLSS-072	1	1	0.94	0	0-3 days	1	AKI	0		300		0	1		
66	RLSS-073	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	15495.49		2300		1	1		
67	RLSS-074	1	0			0-3 days	3	AKI								
68	RLSS-075	1	1	1.66	0	0-3 days	1	AKI	12937.1		850		1	1		
69	RLSS-076	1	1	0.66	0	4-6 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
70	RLSS-077	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		160		0	1		
71	RLSS-078	1	1	1.02	0	4-6 days	2	AKI	392.77		1500		1	1		
72	RLSS-079	1	1	0.95	0	0-3 days	3	AKI	611.6		1160		1	1		
73	RLSS-080	1	1	1.03	0	4-6 days	3	AKI	1412.03		4400		1	1		
74	RLSS-081	1	1	1.11	0	4-6 days	0	Non-AKI	888.17		6800		1	1		
76	RLSS-083	1	1	1.3	0	0-3 days	0	Non-AKI	49265.9		0		1	0		
77	RLSS-084	1	1		0	4-6 days	0	Non-AKI	0		150		0	1		
79	RLSS-086	1	1	0.8	0	0-3 days	0	Non-AKI	10054.2		0		1	0		
80	RLSS-087	1	1	0.9	0	0-3 days	0	Non-AKI	13622.2		0		1	0		
82	RLSS-089	1	1	0.7	0	4-6 days	0	Non-AKI	0		650		0	1		
83	RLSS-090	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	2939.21		0		1	0		
84	RLSS-091	1	1		0	7 days or more	0	Non-AKI	0		390		0	1		
85	RLSS-092	1	1	1.3	0	4-6 days	1	AKI								
86	RLSS-093	1	1			4-6 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
89	RLSS-096	1	1	1.58	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
90	RLSS-097	1	1	1.16	0	4-6 days	0	Non-AKI	0		370		0	1		
92	RLSS-099	1	1	1.3	0	0-3 days	3	AKI	0		350		0	1		
93	RLSS-100	1	1	1.16	0	4-6 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
94	RLSS-101	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		160		0	1		

no	code	lepto	survive	predc_cr	dialysis_dp	feverdays_gr	aki_stage	aki	qpcr_urine	qpcr_urine7	qddpcr_urine	qddpcr_urine7	qpcr_urine_pos0	qddpcr_urine_pos0	qpcr_urine_pos7	qddpcr_urine_pos7
95	RLSS-102	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0		290		0	1		
96	RLSS-103	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0		140		0	1		
98	RLSS-107	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0		0		0	0		
100	RLSS-110	1	1	2.78	0	4-6 days	3	AKI								
101	RLSS-111	1	1	0.9	0	0-3 days	1	AKI	442645	2202	4200	2400	1	1	1	1
102	RLSS-112	1	1		0	4-6 days	0	Non-AK	0	2115.3	0	0	0	0	1	0
103	RLSS-113	1	1			0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
104	RLSS-114	1	1	0.6	0	0-3 days	0	Non-AK	0		0		0	0		
105	RLSS-115	1	1	0.8	0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
107	RLSS-117	1	1	1.85	0	4-6 days	2	AKI	0	0		0	0		0	0
110	RLSS-120	1	1	1.02	0	0-3 days	0	Non-AK	0		0		0	0		
111	RLSS-121	1	1	1.46	0	0-3 days	2	AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
112	RLSS-122	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
113	RLSS-123	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
115	RLSS-125	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
118	RLSS-128	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	310	0	0	1	0	0
119	RLSS-129	1	1		0	4-6 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
120	RLSS-130	1	1	0.85	0	0-3 days	0	Non-AK	0	170.1	0	0	0	0	1	0
125	RLSS-135	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
126	RLSS-137	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0		0		0	0		
127	RLSS-138	1	1	0.63	0	0-3 days	3	AKI	43304.6		5000		1	1		
128	RLSS-139	1	1	0.73	0	0-3 days	0	Non-AK	0		0		0	0		
129	RLSS-140	1	1	1.01	0	4-6 days	2	AKI	0		0		0	0		
131	RLSS-143	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
132	RLSS-144	1	1		0	4-6 days	0	Non-AK	0	227	0	0	0	0	1	0
138	RLSS-150	1	1	0.77	0	0-3 days	0	Non-AK	49165.8	0	4300	0	1	1	0	0
139	RLSS-151	1	1	5.3	1	0-3 days	2	AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
140	RLSS-152	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
141	RLSS-153	1	1	1.83	0	0-3 days	0	Non-AK	0	9057.3	0	35	0	0	1	1
143	RLSS-156	1	1	0.52	0	0-3 days	0	Non-AK	0		0		0	0		
144	RLSS-157	1	1	0.67	0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
146	RLSS-159	1	0			0-3 days	3	AKI								
148	RLSS-161	1	1	0.66	0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
149	RLSS-162	1	1	0.8	0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
150	RLSS-164	1	1	0.93	0	0-3 days	0	Non-AK	0		0		0	0		
151	RLSS-165	1	1		0	0-3 days	0	Non-AK	0	388	0	2600	0	0	1	1
152	RLSS-166	1	1	1.1	0	0-3 days	0	Non-AK	0	277.3	0	180	0	0	1	1
153	RLSS-167	1	1	0.7	0	0-3 days	0	Non-AK	0	0	0	0	0	0	0	0
154	RLSS-168	1	1	0.9	0	0-3 days	0	Non-AK	0		0		0	0		
155	RLSS-169	1	1	2.31	0	7 days or more	1	AKI	0	0	0	0	0	0	0	0

no	code	lepto	survive	predc_cr	dialysis_dp	feverdays_gr	aki_stage	aki	qpcr_urine	qpcr_urine7	qddpcr_urine	qddpcr_urine7	qpcr_urine_pos0	qddpcr_urine_pos0	qpcr_urine_pos7	qddpcr_urine_pos7
157	RLSS-171	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
158	RLSS-172	1	1	1.69	0	7 days or more	3	AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
162	RLSS-176	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
163	RLSS-177	1	1	1.03	0	0-3 days	3	AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
164	RLSS-178	1	1	0.54	0	4-6 days	2	AKI								
165	RLSS-179	1	1	1.15	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
167	RLSS-181	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
168	RLSS-182	1	1	0.73	0	4-6 days	0	Non-AKI	57663		2200		1	1		
169	RLSS-183	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	583.8	230.2	80	0	1	1	1	0
171	RLSS-185	1	1	1.1	0	4-6 days	2	AKI	717258		1700		1	1		
172	RLSS-186	1	1		0	4-6 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
173	RLSS-187	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	3590.6	150.9	140	0	1	1	1	0
174	RLSS-188	1	1	3.29	0	0-3 days	3	AKI	101614	0	1800	0	1	1	0	0
175	RLSS-189	1	1	0.74	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
176	RLSS-190	1	0			7 days or more	3	AKI	0		0		0	0		
177	RLSS-191	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
179	RLSS-193	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	28	0	0	130	1	0	0	1
180	RLSS-194	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
181	RLSS-195	1	1	0.8	0	4-6 days	2	AKI		0		0			0	0
183	RLSS-197	1	1	0.58	0	0-3 days	1	AKI	2016		0		1	0		
184	RLSS-198	1				7 days or more	0	Non-AKI	0		0		0	0		
185	RLSS-199	1	1		0	0-3 days	3	AKI								
186	RLSS-200	1	1	1.04	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0	210	0	0		1
187	RLSS-201	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
188	RLSS-202	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	125.4	0	0	0	1	0	0	0
189	RLSS-203	1	1			0-3 days	0	Non-AKI	0	0		0	0		0	0
190	RLSS-204	1	1			0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	70	0	0	0	1
194	RLSS-208	1	0			4-6 days	3	AKI	15000		2700		1	1		
195	RLSS-209	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
196	RLSS-210	1	1		0	0-3 days	2	AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
197	RLSS-211	1	1		0	7 days or more	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
200	RLSS-214	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
201	RLSS-215	1	0			0-3 days	3	AKI								
205	RLSS-219	1	1		0	7 days or more	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
208	RLSS-222	1	0			0-3 days	3	AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
209	RLSS-223	1	1	0.59	0	0-3 days	2	AKI								
214	RLSS-228	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
215	RLSS-229	1	1	1.3	0	0-3 days	0	Non-AKI	2021.235	0	1800	0	1	1	0	0
216	RLSS-230	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	80	0	0	1	0	0
217	RLSS-231	1	1	1.25	0	7 days or more	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0

no	code	lepto	survive	predc_cr	dialysis_dp	feverdays_gr	aki_stage	aki	qpcr_urine	qpcr_urine7	qddpcr_urine	qddpcr_urine7	qpcr_urine_pos0	qddpcr_urine_pos0	qpcr_urine_pos7	qddpcr_urine_pos7
219	RLSS-233	1	1	0.56	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		70		0	1		
220	RLSS-234	1	1	1.07	0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
221	RLSS-235	1	1	0.85	0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	220	0	0	1	0	0
222	RLSS-236	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	21626.515	0	3900	0	1	1	0	0
229	RLSS-243	1	1	1.1	0	0-3 days	2	AKI	0	0	80	0	0	1	0	0
230	RLSS-244	1	1	1	0	4-6 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
231	RLSS-245	1	1	1.2	0	4-6 days	0	Non-AKI	0	0	90	0	0	1	0	0
232	RLSS-246	1	1	1	0	7 days or more	0	Non-AKI	12478.3		1300		1	1		
233	RLSS-247	1	ไม่มีเอกสาร				2	AKI								
237	RLSS-251	1	1		0	4-6 days	0	Non-AKI	0	0	80	0	0	1	0	0
244	RLSS-258	1	1			4-6 days	0	Non-AKI	8963.4	0	1100	0	1	1	0	0
245	RLSS-259	1	1			0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
246	RLSS-260	1	1	1	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
253	RLSS-268	1	1	1	0	4-6 days	1	AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
257	RLSS-272	1	1	1.43	0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0	0	0	0		0
266	RLSS-281	1	ไม่มีเอกสาร			0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
267	RLSS-282	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
274	RLSS-289	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
276	RLSS-291	1	1	5.79	0	0-3 days	3	AKI		0		0			0	0
278	RLSS-293	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
281	RLSS-296	1	1	0.69	0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
282	RLSS-297	1	1		0	4-6 days	0	Non-AKI	637.8	374	0	0	1	0	1	0
283	RLSS-298	1	1	2.39	0	4-6 days	3	AKI	0		0	2000	0	0		1
285	RLSS-300	1	1	0.8	0	4-6 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
289	RLSS-305	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
290	RLSS-306	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	2322.5	0	0	0	1	0	0	0
292	RLSS-308	1	1	0.8	0	4-6 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
293	RLSS-309	1	1	0.7	0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	150	0	0	0	1
294	RLSS-310	1	1	1.1	0	0-3 days	0	Non-AKI	3414.6	0	0	0	1	0	0	0
296	RLSS-312	1	1	1.19	0	0-3 days	2	AKI	3710.9	0	0	0	1	0	0	0

no	code	lepto	survive	predc_cr	dialysis_dp	feverdays_gr	aki_stage	aki	qpcr_urine	qpcr_urine7	qddpcr_urine	qddpcr_urine7	qpcr_urine_pos0	qddpcr_urine_pos0	qpcr_urine_pos7	qddpcr_urine_pos7
297	RLSS-313	1	1		0	4-6 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
298	RLSS-314	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0	0	0	0	0	0	0	0
299	RLSS-315	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	1500	0	1500	370	1	1	0	1
303	RLSS-319	1	1		0	4-6 days	0	Non-AKI	414.59	0	0	0	1	0	0	0
307	RLSS-323	1	1	1.37	0	0-3 days	0	Non-AKI	128278.3		16400		1	1		
308	RLSS-324	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		720		0	1		
309	RLSS-325	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	4268.52	0	140	0	1	1	0	0
311	RLSS-327	1	1	0.69	0	0-3 days	0	Non-AKI		0		0			0	0
313	RLSS-329	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	256.8		70		1	1		
314	RLSS-330	1	0			0-3 days	3	AKI								
316	RLSS-332	1	1	0.71	0	0-3 days	0	Non-AKI								
318	RLSS-334	1	1		0	0-3 days	0	Non-AKI	0		0		0	0		
320	RLSS-336	1	1	0.85	0	0-3 days	0	Non-AKI	6971.7		210		1	1		
321	RLSS-337	1	0			0-3 days	3	AKI								
322	RLSS-338	1	1	5.55	1	7 days or more	3	AKI								
324	RLSS-340	1	0			0-3 days	3	AKI								
328	RLSS-344	1	1	0.65	0	0-3 days	0	Non-AKI	652.8	320	0	0	1	0	1	0
329	RLSS-345	1	1			0-3 days	3	AKI	659.5	0	0	0	1	0	0	0

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	น.ส.เกศรินทร์ ศรีรุ่งเรือง
วัน เดือน ปี เกิด	30 ตุลาคม พ.ศ. 2534
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลศิริราช ถนน วังหลัง แขวง ศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร 10700
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี หลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	75/1 ม.9 ต.ทุ่งหลวง อ.ปากท่อ จ.ราชบุรี 70140
ผลงานตีพิมพ์	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะ กับการเกิดภาวะล้มเหลวของระบบอวัยะต่างๆในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส The study correlation of the amount of leptospires in the urine and Organ Dysfunction in leptospirosis patients
รางวัลที่ได้รับ	-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University