จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกับความรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสเด็งกิว

โดย

กัญญา ศุภปีติพร
วรมันต์ ไวดาบ
วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์
อุษา ทิสยากร

ตุลาคม 2552

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ป่วยและครอบครัวของผู้ป่วยที่ให้ความร่วมมือในการศึกษาวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณทีมแพทย์ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การดูแลผู้ป่วยอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณนางสาวศิรประภา ทองกอบเพชร นายเฉลิมพล ศรีจอมทอง นักวิทยาศาสตร์ สำหรับความมุ่งมั่น ทุ่มเททั้งแรงกาย แรงใจและสติปัญญาในการทำวิจัย

ท้ายสุดนี้ ขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุน และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ เช่น สถานที่ เงินทุน และเจ้าหน้าที่

เลขหมู่
เลขทะเบียน 014308
วัน, เดือน, ปี 11 ธ.ค. 52

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกับความรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสเด็งกิว

ชื่อผู้วิจัย พญ.ดร. กัญญา ศุภปีติพร
นพ. วรมันต์ ไวดาบ
นพ. วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์
พญ. อุษา ทิสยากร

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กันยายน 2552

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของยีน (mRNA) ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกับความรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสเด็งกิว ผู้เข้าร่วมการวิจัยประกอบด้วยผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อไวรัสเด็งกิวและได้รับการจำแนกตามความรุนแรงของการติดเชื้อโดยใช้หลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ตัวอย่างเลือดที่นำมาสกัด mRNA และนำมาวิเคราะห์ได้จากผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิวในวันที่ไข้ลง ระดับการแสดงออกของยีน *IL-8, IL-1β* และ *MMP-9* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคไข้เด็งกิว (Dengue fever) จำนวน 30 ราย ผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคไข้เลือดออก (Dengue hemorrhagic fever) จำนวน 19 ราย และผู้ป่วยเด็กที่มีไข้จากการติดเชื้ออื่นจำนวน 10 ราย ถูกนำมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบโดยวิธี real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR)

จากการศึกษา พบว่า ในวันที่ไข้ลง ระดับการแสดงออกของ *MMP-9* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยกลุ่ม DF และกลุ่ม DHF มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในกลุ่ม DHF มีระดับสูงกว่า (p-value < 0.05) ในขณะที่ ระดับการแสดงออกของยีน *IL-8* และ *IL-1β* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษานำร่องนี้พบว่า ระดับการแสดงออกของ *MMP-9* อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคของไข้เลือดออก การศึกษาเพิ่มเติมโดยประเมินและเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *MMP-9* และยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องในส่วนของ mRNA ของเม็ดเลือดขาวตั้งแต่ระยะแรกที่ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเด็งกิวเริ่มมีอาการและติดตามอย่างต่อเนื่องเป็นระยะ จะทำให้เข้าใจถึงกลไกการดำเนินโรคของไข้เลือดออกมากขึ้น และนำไปสู่การพัฒนาวิธีตรวจหาสารบ่งชี้ที่เป็นตัวกำหนดความรุนแรงของโรคได้ง่าย ถูกต้องและรวดเร็วตั้งแต่ระยะเริ่มแรก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title Analysis of gene expression and the severity of dengue virus infection

Name of the Investigators Kanya Suphapeetiporn

Woraman Waidab

Vorasuk Shotelersuk

Usa Thisyakorn

Year September 2552

Abstract

The aim of this study is to elucidate the cellular gene responses to dengue viral infection at the transcriptional level and to correlate expression levels with disease activity and/or clinical manifestation. Clinical diagnosis of dengue infection and its severity were based on World Health Organization criteria. Whole blood mRNA from children with dengue infection was analyzed on the day of defervescence. Expression levels of *IL-8*, *IL-1β*, and *MMP-9* in peripheral blood leukocytes were assayed in 30 children with dengue fever (DF), 19 children with dengue hemorrhagic fever (DHF) and 10 children with other febrile illness (OFI) by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). The results revealed that the mRNA expression levels of *IL-8* and *IL-1β* obtained from peripheral blood leukocytes were not significantly different between children with DF and those with DHF. However, the *MMP-9* mRNA levels were significantly elevated in children with DHF during defervescence.

Our study suggested that the MMP-9 might have an important role in dengue pathogenesis. To gain further insight into the pathogenesis of DF and DHF, serial transcription profiling of the MMP-9 and other relevant genes should be monitored and compared. The expression pattern of these genes in peripheral blood leukocytes might serve as a predictor of dengue disease activity.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)	ii
บทคัดย่อ (Abstracts)	
ภาษาไทย	iii
ภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ (Table of Contents)	v
รายการตารางประกอบ (List of Tables)	vi
รายการภาพประกอบ (List of Figures)	vii
บทนำ (Introduction)	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literature)	3
วิธีการวิจัย (Procedure)	5
ผลการวิจัย (Result)	6
การอภิปรายผล (Discussion)	10
ข้อสรุป (Conclusion)	13
ข้อเสนอแนะ (Suggestion for further work)	13
เอกสารอ้างอิง (References)	13
ส่วนผนวก (Appendix)	16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ (List of Tables)

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเด็งกิว ที่เข้าร่วมในการศึกษา	6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ (List of Figures)

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงระดับการแสดงออกของยีน *IL-8* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยกลุ่ม DF และกลุ่ม DHF	8
ภาพที่ 2 แสดงระดับการแสดงออกของยีน *IL-1β* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยกลุ่ม DF และกลุ่ม DHF	9
ภาพที่ 3 แสดงระดับการแสดงออกของยีน *MMP-9* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยกลุ่ม DF และกลุ่ม DHF	10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ไข้เลือดออกเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกพบว่า มีผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรงต้องรับรักษาตัวไว้ในโรงพยาบาลถึงปีละ 500,000 คน และมีอย่างน้อยร้อยละ 2.5 เสียชีวิต[1] ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยเด็ก นำความสูญเสียทั้งในด้านเศรษฐกิจ และทรัพยากรทั้งทางตรงและทางอ้อมเป็นจำนวนมาก สำหรับประเทศไทย จากข้อมูลจากกองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุขระหว่างปี พ.ศ.2520-2541 พบรายงานผู้ติดเชื้อไวรัสเด็งกิวประมาณ 50,000-170,000 รายต่อปี เป็นผู้ป่วยที่มีภาวะช็อกร่วมด้วยประมาณร้อยละ 5 ของผู้ป่วยทั้งหมด และผู้ป่วยเสียชีวิตประมาณปีละ 100-400 ราย[2] เดิมพบการระบาดของไข้เลือดออกในฤดูฝนระหว่างเดือนมิถุนายน-กันยายนโดยเฉพาะประเทศเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย จากการเปลี่ยนแปลงของลักษณะประชากรที่หนาแน่นมากขึ้น การขยายตัวของชุมชนเมือง และการคมนาคมที่คล่องตัวมากขึ้น ทำให้พบการระบาดของไข้เลือดออกได้เกือบตลอดทั้งปี[3]

โรคไข้เลือดออกเกิดจากเชื้อไวรัสเด็งกิว (Dengue virus) ซึ่งเป็น RNA ไวรัสในกลุ่ม Flavivirus มียุงลาย (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะของโรค ไวรัสเด็งกิว มี 4 ซีโรทัยป์ (serotype) ได้แก่ DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 หลังจากการติดเชื้อ ผู้ป่วยจะมีภูมิคุ้มกันต่อซีโรทัยป์นั้นตลอดชีวิต ไข้เลือดออกส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยเด็กจนถึงวัยรุ่น ผู้ป่วยจะได้รับเชื้อจากการถูกยุงลายที่มีเชื้อไวรัสเด็งกิวกัด หลังจากมีการติดเชื้อผู้ป่วยจะแสดงอาการของโรคแตกต่างกัน ผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการ ผู้ป่วยที่แสดงอาการสามารถจำแนกออกตามความรุนแรงโดยใช้หลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกได้เป็น[4]

1. กลุ่มอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ (Undifferentiated fever) มักพบในเด็กเล็ก ผู้ป่วยมีอาการไข้สูงเพียงอย่างเดียว หรืออาจมีผื่นร่วมด้วย
2. โรคไข้เด็งกิว (Dengue fever) มักพบในเด็กโตหรือผู้ใหญ่ มีอาการไข้สูงเฉียบพลัน ปวดศีรษะ ปวดรอบกระบอกตา ปวดกล้ามเนื้อ และปวดกระดูก อาการปวดรุนแรงมากจนมีชื่อเรียกว่าไข้กระดูกแตก (break bone fever) มีจุดเลือดออกตามผิวหนัง การทดสอบทูนิเกต์ให้ผลบวก ผู้ป่วยบางรายอาจพบเลือดออกมากได้
3. โรคไข้เลือดออก (Dengue hemorrhagic fever) ลักษณะสำคัญคือมีการรั่วของพลาสมา สามารถทราบได้จากระดับฮีมาโตคริตที่สูงขึ้น มีสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดหรือในช่องท้อง กรณีที่มีการรั่วของพลาสมามากอาจทำให้ผู้ป่วยเข้าสู่ภาวะช็อก (Dengue shock syndrome, DSS)

พยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออกยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่ชัดในปัจจุบัน ได้มีผู้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไข้เลือดออกและปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรค พบว่าปัจจัยเสี่ยงในการเกิดไข้เลือดออกประกอบด้วย[5-7]

1. ปัจจัยเสี่ยงด้านผู้ป่วย (host)

1.1 อายุ เด็กจะมีความเสี่ยงของการเกิดโรคไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรงมากกว่าผู้ใหญ่ และมีแนวโน้มที่จะพบในเด็กโตและวัยรุ่นมากขึ้น จากการศึกษากลุ่มตัวอย่างในกรุงเทพมหานคร พบว่าอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาเป็นผู้ป่วยในจากไข้เลือดออกมีการเปลี่ยนแปลง จาก 3ปี 10 เดือน ในช่วงพ.ศ.2504-2513 เป็น 5 ปี 7 เดือน ในช่วงพ.ศ. 2514-2523 7ปี 5 เดือนในช่วงพ.ศ.2524-2533 และ 8 ปี ในช่วงพ.ศ.2534-2543

1.2 เพศ เพศหญิงมีอาการไข้เลือดออกรุนแรงกว่าเพศชาย

1.3 ระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาพบว่าความเสี่ยงที่จะเกิดไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรงเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 15 เท่าเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำ (secondary dengue infection) โดยเชื้อเด็งกิวซีโรทัยป์ที่ต่างจากการติดเชื้อครั้งก่อน (primary dengue infection)[8] การตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายเมื่อมีการติดเชื้อ พบว่ามีการหลั่งสาร cytokines และการเปลี่ยนแปลงของลิมโฟซัยท์ชนิดที (T cells) และ บี (B cells) นำไปสู่การผลิต autoantibody ต่อเกล็ดเลือดและเซลล์เยื่อบุ ทำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ และเกิดการรั่วของพลาสมาออกจากหลอดเลือด

เชื้อไข้เลือดออกเข้าสู่เซลล์ macrophage ผ่านทาง virus receptor หรือทาง Fc-receptor กลไกการตอบสนองของร่างกายเมื่อมีการติดเชื้อไข้เลือดออก เริ่มจากการทำปฏิกิริยากันระหว่าง glycoproteins ที่อยู่บน envelope ของเชื้อไวรัสกับตัวรับเฉพาะ (specific entry receptors) และตัวรับร่วม(co-receptors) ปรากฏการณ์ antibody dependent enhancement เป็นสมมติฐานที่ใช้อธิบายสาเหตุที่ผู้ป่วยไข้เลือดออกมักมีการติดเชื้อแบบทุติยภูมิโดยการติดเชื้อไวรัสเด็งกิวต่างซีโรทัยป์มาก่อนทำให้เกิดการสร้าง antibody ต่อเชื้อเด็งกิวที่มีระดับต่ำกว่า neutralizing level ซึ่งเป็นปัจจัยส่งเสริมให้มีการเพิ่มปริมาณไวรัสในเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ ในกรณีที่มีการติดเชื้อซีโรทัยป์ใหม่ โดยไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันได้มากขึ้นผ่านทาง antibody ปรากฏการณ์นี้ยังสามารถอธิบายสาเหตุที่พบโรคไข้เลือดออกรุนแรงในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมากกว่า 1 ซีโรทัยป์[8]

นอกจากขบวนการ antibody dependent enhancement แล้ว ยังมีกลไกอื่นๆที่มีส่วนในพยาธิกำเนิดของไข้เลือดออกได้แก่ immune complex, antibodies cross-reacting with vascular endothelium, complement activation และการสร้างซัยโตไคน์ (cytokines) เชื้อไข้เลือดออกจะแบ่งตัวในลิมโฟซัยท์ชนิดบี (B cells) กระตุ้นให้มีการสร้าง Interleukin 6 (IL-6) และ TNF-alpha จากการศึกษาของ Lin และคณะ พบว่า B cells มีส่วนสำคัญใน

พยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออก[9] ซัยโตไคน์ที่เกิดขึ้นมีบทบาทสำคัญในการทำให้โรคไข้เลือดออกมีความรุนแรงมากขึ้น โดยการเปลี่ยน helper T cells type 1 (Th1) ซึ่งพบในผู้ป่วยที่มีอาการ ไม่รุนแรง เป็น helper T cells type 2 (Th2) ซึ่งพบในผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรง[9] ซัยโตไคน์ที่สำคัญที่อาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงนี้ คือ การเพิ่มขึ้นของ IL-10, IL-4 , TNF-alpha และ tumor growth factor-beta เป็นต้น[10, 11] ระดับของ IL-8 ที่เพิ่มขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดไข้เด็งกิว[12] ในขณะที่ระดับของ IL-12 ที่เพิ่มขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดไข้เลือดออก[13]

1.4 เชื้อชาติและพันธุกรรม พบว่าชนผิวดำเป็นโรคไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรงน้อยกว่าชนผิวขาว มีผู้ทำการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคพบว่ามีปัจจัยทางพันธุกรรมบางอย่างเกี่ยวข้อง ได้แก่ การที่พบ polymorphisms ในยีน HLA class I, *TNFα, Fcγ receptor IIA* และ *CD209*[14-19]

2. ปัจจัยเสี่ยงด้านไวรัส พื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมากกว่า 1 ซีโรทัยป์จะพบไข้เลือดออกได้มากกว่า เชื้อไข้เลือดออกสายพันธุ์เอเชีย ไวรัสเด็งกิวซีโรทัยป์ 2 และการที่มีปริมาณไวรัส(viral load) มากในร่างกาย มีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะทำให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรง

จะเห็นได้ว่า มีกลไกหรือปัจจัยมากมายที่ทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิวบางรายมีอาการไข้เลือดออกรุนแรงจนดำเนินไปสู่ภาวะช็อก ปัจจัยทั้ง host และ virus มีส่วนเกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตามหลักฐานเหล่านี้ยังไม่สามารถอธิบายพยาธิกำเนิดและพยาธิสรีรวิทยาของไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรงได้ทั้งหมด

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literature)

ไข้เลือดออกเป็นโรคติดเชื้อไวรัสที่มียุงลายเป็นพาหะที่สำคัญในประเทศไทย มีการระบาดมากในฤดูฝน หลังจากมีการติดเชื้อผู้ป่วยจะแสดงอาการของโรคแตกต่างกัน อาจจะมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ รับประทานอาหารได้น้อย หรือ อาจพบภาวะเลือดออกผิดปกติ ความดันต่ำจากการรั่วของพลาสมาในรายที่มีอาการรุนแรง ปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายกลไกที่นำไปสู่ภาวะที่รุนแรงได้อย่างชัดเจน เชื่อว่าปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคได้แก่ ปัจจัยทางไวรัส ปัจจัยทางพาหะ และปัจจัยทางผู้ป่วย นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลไกการตอบสนองของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ทางด้านระบบภูมิคุ้มกัน (immune response) และขบวนการการแข็งตัวของเลือดกับความรุนแรงของไข้เลือดออก จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด monocytes และ lymphocytes ในระหว่างที่มีการติดเชื้อ ทำให้มีการผลิต cytokines และ สารตัวกลาง (chemical mediators) ต่างๆ ซึ่งก่อให้เกิดการรั่วของพลาสมาจากหลอดเลือดฝอยและอาจจะนำไปสู่ภาวะช็อกได้ในที่สุด สารที่พบว่ามีระดับความเข้มข้นในพลาสมาสูงขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรง ได้แก่ TNFα, IL-1β, IL-8, IFN-γ , sTNFRs (soluble TNF receptors) เป็นต้น[20, 21] สาร

บางชนิด เช่น IL-6, sICAM-1 ยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ได้ เนื่องจากผลการศึกษาจากกลุ่มผู้วิจัยต่างๆ ได้ผลไม่ตรงกัน[20, 22, 23]

ได้มีผู้ศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ ในเซลล์เป้าหมายเมื่อเซลล์ดังกล่าวได้รับเชื้อไวรัสเด็งกิว (primary targets) เช่น endothelial cells, macrophages เป็นต้น โดยวิธี microarrays [24-26] ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงกลุ่มของยีนที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (immune responses) การอักเสบ (inflammatory responses) การตายของเซลล์ (apoptosis) เป็นต้น และกลุ่มของยีนที่มีการแสดงออกที่ลดลง เช่น กลุ่ม cytoskeletal genes เป็นต้น

Matrix metalloproteinase-9 (*MMP-9*) เป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น protease โปรตีนในกลุ่มนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด vascular permeability และ vascular permeability ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสเด็งกิว ดังนั้น โปรตีนในกลุ่มนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรงได้ จากการศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ ในเซลล์เป้าหมายเมื่อได้รับเชื้อไวรัสเด็งกิว (primary targets) เช่น macrophages โดยวิธี microarrays[25] ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษานี้พบว่ายีน *MMP-9* มีการสร้าง mRNA ที่ลดลง อย่างไรก็ตาม การศึกษาก่อนหน้าพบว่า dendritic cells ที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกิวมีการสร้าง MMP-9 เพิ่มขึ้นและมีความสัมพันธ์กับ endothelial permeability ดังนั้น การศึกษาที่ผ่านมายังไม่สามารถสรุปความสำคัญของ MMP-9 กับการติดเชื้อไวรัสเด็งกิวได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ ยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนนี้กับความรุนแรงของไข้เลือดออก

ในการศึกษาวิจัยนี้ จึงได้พิจารณาเลือกยีนซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มต่างๆ เหล่านี้ ได้แก่ *IL-8*, *IL-1β* และ *MMP-9* เพื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนในส่วนของ mRNA ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิว การศึกษาวิจัยถึงบทบาทของกลุ่มยีนเหล่านี้ต่อการดำเนินโรคและความรุนแรงของโรค อาจจะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจที่เพิ่มขึ้นถึงพยาธิกำเนิดและพยาธิสรีรวิทยาของโรคไข้เลือดออก และอาจจะเป็นข้อมูลในการค้นหาตัวบ่งชี้ (markers) เพื่อที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาผู้ป่วยที่เมื่อได้รับเชื้อเด็งกิวแล้วมีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะเป็นไข้เลือดออกชนิดรุนแรงได้ ทำให้ผู้ป่วยได้รับการทำนายและรักษาได้ทันท่วงที ป้องกันการดำเนินโรคไปสู่ภาวะที่มีเลือดออกอย่างรุนแรงและช็อก

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของโครงการนี้ เพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกับความรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสเด็งกิว โครงการนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะหากลไกการตอบสนองของร่างกายที่นำไปสู่ไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรง ซึ่งอาจเป็นข้อมูลที่ทำให้สามารถค้นหาปัจจัยทางพันธุกรรมที่เป็นตัวกำหนดความรุนแรงของโรคซึ่งแตกต่างกันในแต่ละ

บุคคล และนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจสารบ่งชี้ที่ทำนายความรุนแรงของการติดเชื้อไข้เลือดออกได้อย่างสะดวก ถูกต้องและเชื่อถือได้ในอนาคต

วิธีการวิจัย (Procedure)

<u>กลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม</u>

กลุ่มตัวอย่าง คือ ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกที่มารับการดูแลรักษาที่แผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตั้งแต่แรกเกิดถึงอายุ 15 ปี ผู้ป่วยจะได้รับการติดตามอาการและประเมินความรุนแรงของการติดเชื้อ ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการตรวจยืนยันว่าติดเชื้อไวรัสเด็งกิวโดยวิธี antibody captured ELISA และ serotype-specific RT-PCR assays

การแยกประเภทผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกตามความรุนแรงของโรคใช้หลักเกณฑ์ของ WHO จำนวนผู้ป่วยในกลุ่ม dengue fever (DF) ที่เข้าร่วมการศึกษามีจำนวน 30 คน และผู้ป่วยในกลุ่ม dengue hemorrhagic fever (DHF) ที่เข้าร่วมการศึกษามีจำนวน 19 คน

กลุ่มควบคุม คือ ผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายคลึงกับโรคไข้เลือดออกที่มารับการดูแลรักษาที่แผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งผลการวินิจฉัยไม่เข้ากับโรคไข้เลือดออก (Other febrile illness, OFI) จำนวน 10 คน

<u>การยินยอมเข้าร่วมโครงการ</u>

โครงการนี้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยได้รับจากผู้ป่วยหรือผู้ปกครองทุกรายก่อนที่จะเริ่มทำการวิจัย

<u>การเก็บตัวอย่างเลือดและการสกัดสารพันธุกรรม</u>

เซลล์เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยได้รับการสกัดสารพันธุกรรม RNA

1. การวัดระดับ mRNA ของยีน *IL-8, IL-1β,* และ *MMP-9* โดย real-time quantitative PCR

   กลุ่มผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการวัดระดับ mRNA ของแต่ละยีนจากเม็ดเลือดขาวโดยวิธี real-time quantitative PCR เนื่องจากเป็นวิธีที่เริ่มใช้กันอย่างแพร่หลาย รวดเร็วและเชื่อถือได้ นอกจากนี้การวัดระดับ mRNA สามารถหลีกเลี่ยงผลกระทบที่เกิดจากการรั่วของพลาสมาจากหลอดเลือดฝอยซึ่งทำให้เกิดภาวะ hemoconcentration ซึ่งมีผลต่อการวัดระดับโปรตีนในพลาสมาได้ ระดับ mRNA ของแต่ละยีนในผู้ป่วยไข้เลือดออกแต่ละกลุ่มจะถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนเหล่านี้กับความรุนแรงของโรค

   mRNA จะถูกสกัดจากเม็ดเลือดขาวของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิว เลือดที่นำมาสกัดจะได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิวในวันที่ไข้ลง (defervescence)

2. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลพื้นฐานทางประชากรต่างๆ (demographic data) จะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ SPSS version 13 ข้อมูลทางประชากรที่เป็นข้อมูลเชิงปริมาณชนิดต่อเนื่อง การหาค่าเฉลี่ยจะได้รับการคำนวณเป็น median ถ้าการกระจายข้อมูลมีลักษณะเบ้ (skew distribution) และการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล 2 กลุ่มจะใช้ Mann-Whitney U test

สำหรับข้อมูลเกี่ยวกับระดับการแสดงออกของยีนโดยการวัดระดับ mRNA ของแต่ละยีนจากเม็ดเลือดขาวโดยวิธี real-time quantitative PCR จะถูกคำนวณโดยโปรแกรม Q-gene โดยสามารถดาวน์โหลด (download) ได้จาก http://www.biotechniques.com/softlib/qgene.html. และค่าเฉลี่ยจะแสดงในรูป mean±SD การเปรียบเทียบความแตกต่างจะใช้ Student's *t* test

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะเป็นการศึกษาแบบ 2 sides โดยมี p-value < 0.05

ผลการวิจัย (Result)

การศึกษานำร่องในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิวซึ่งได้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอาการไม่รุนแรง ไม่มีการรั่วของพลาสมา (DF) จำนวน 30 คนและกลุ่มที่มีอาการรุนแรงซึ่งมีการรั่วของพลาสมา (DHF) จำนวน 19 คน

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเด็งกิวที่เข้าร่วมในการศึกษา

Characteristics	Patients with dengue infection without significant signs of serum leakage (DF) (n = 30)	Patients with dengue infection with significant signs of serum leakage (DHF, DSS) (n = 19)	P-value
Age, median years (range)	11 (3-14)	11 (4-11)	>0.05
Sex (M/F)	14:16	11:8	N/A
Illness day at study entry (days)	4.5	4.9	>0.05
Temperature at study entry, °C (range)	38.9 (36.4-41)	38.5 (37-41)	>0.05

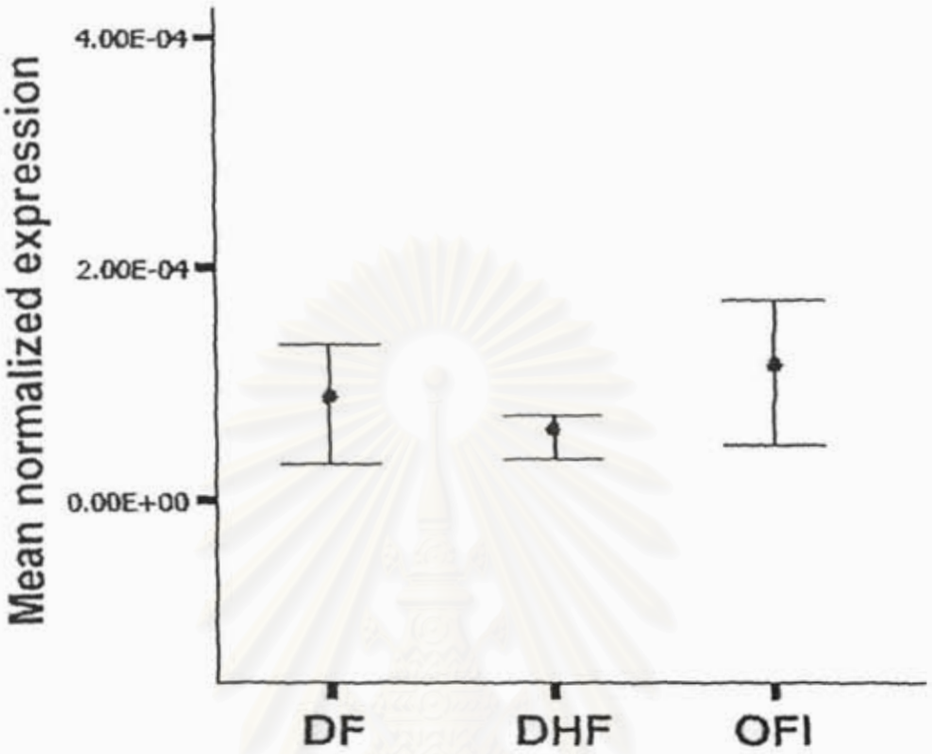
WBC count at study entry, median cells/mm^3	2,445	3,530	<0.05
Hct at study entry, median % (range)	39.5 (30.9-45)	42.5 (35-49.8)	<0.01
Platelet count at study entry, median cells/mm^3 (range)	88,500 (38,000-294,000)	76,000 (14,000-199,000)	>0.05

N/A, not applicable

จะเห็นได้ว่าข้อมูลโดยทั่วไปเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย 2 กลุ่ม พบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นจำนวนเม็ดเลือดขาว และระดับฮีมาโตคริตซึ่งพบสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยกลุ่มที่มีอาการรุนแรง เป็นการบ่งบอกถึงมีการรั่วของพลาสมา

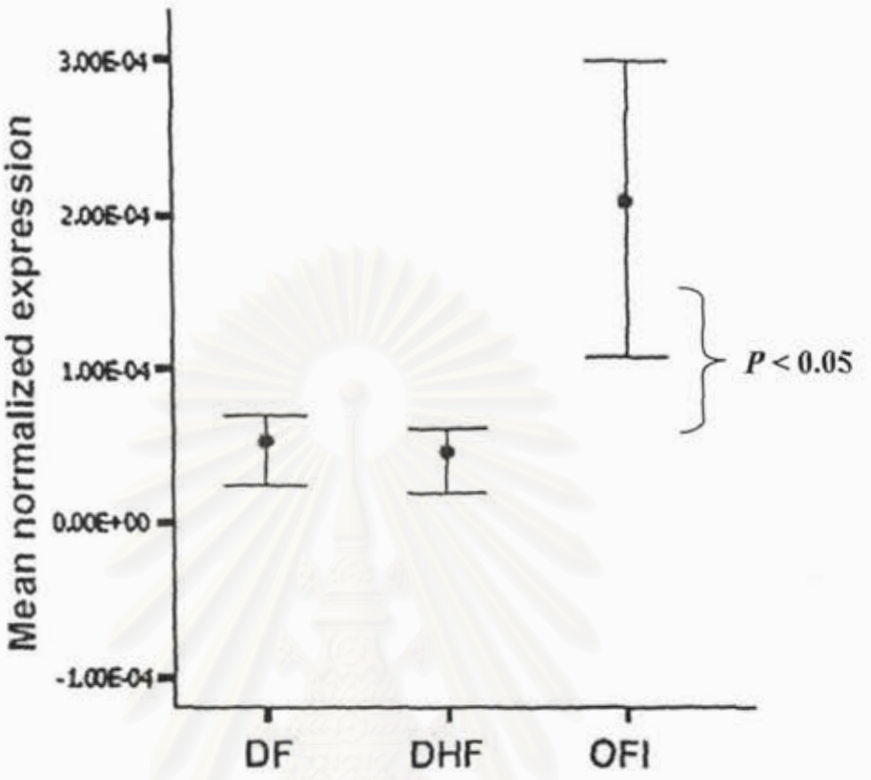
ผลการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน ได้แก่ *IL-8, IL-1β*, และ *MMP-9* โดยการวัดระดับ mRNA ของแต่ละยีนจากเม็ดเลือดขาวโดยวิธี real-time quantitative PCR ดังแสดงในภาพที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



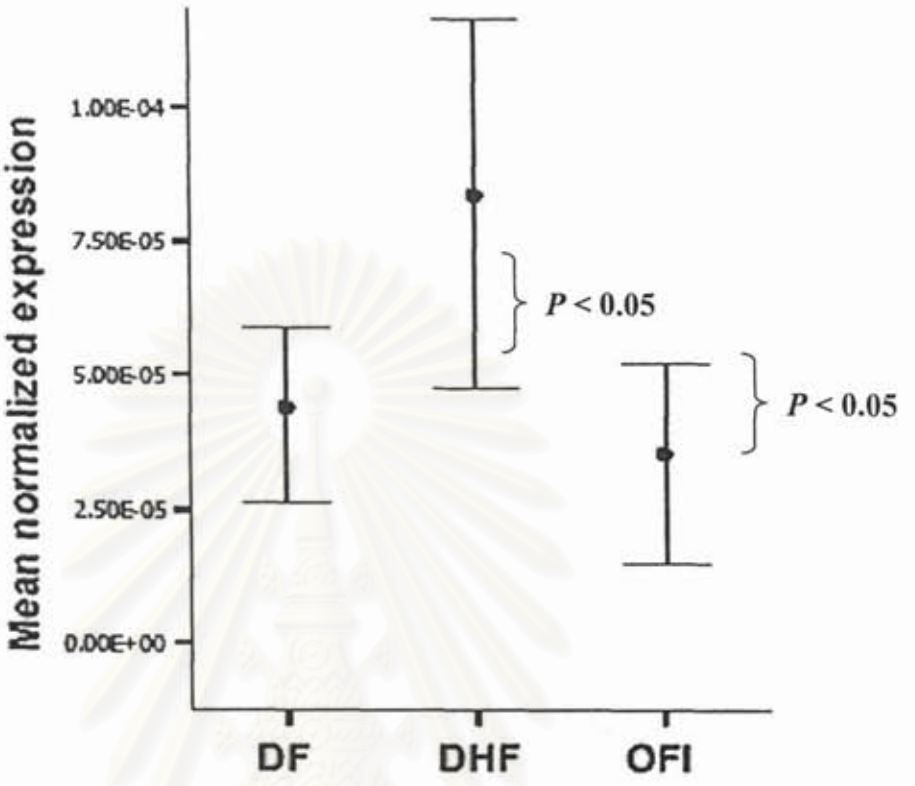
ภาพที่ 1 แสดงระดับ mRNA ของยีน *IL-8* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยกลุ่ม dengue fever (DF), กลุ่ม Dengue hemorrhagic fever (DHF) และกลุ่ม other febrile illness (OFI) (arbitrary units เป็นค่าที่ได้จากระดับการแสดงออกของยีน *IL-8* เปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของ 18SrRNA แสดงในรูปของ mean± SEM)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 แสดงระดับ mRNA ของยีน *IL-1β* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยกลุ่ม dengue fever (DF), กลุ่ม Dengue hemorrhagic fever (DHF) และกลุ่ม other febrile illness (OFI) (arbitrary units เป็นค่าที่ได้จากระดับการแสดงออกของยีน *IL-1β* เปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของ 18SrRNA แสดงในรูปของ mean± SEM)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3 แสดงระดับ mRNA ของยีน *MMP-9* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยกลุ่ม dengue fever (DF), กลุ่ม Dengue hemorrhagic fever (DHF) และกลุ่ม other febrile illness (OFI) (arbitrary units เป็นค่าที่ได้จากระดับการแสดงออกของยีน *MMP-9* เปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของ 18SrRNA แสดงในรูปของ mean± SEM)

จะเห็นได้ว่า ในวันที่ไข้ลง ระดับ mRNA ของยีน *IL-8* และ *IL-1β* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยกลุ่ม DF และกลุ่ม DHF ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ ระดับ mRNAของ *MMP-9* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย 2 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในกลุ่ม DHF มีระดับสูงกว่า (p-value < 0.05) นอกจากนี้ ได้มีการเปรียบเทียบระดับ mRNA ของยีนดังกล่าวในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิวที่มีอาการไม่รุนแรงกับผู้ป่วยที่เป็นไข้ที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกิว พบว่า ระดับ mRNA ของยีน *IL-8* และ *MMP-9* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนระดับ mRNA ของ *IL-1β* ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิวในช่วงที่ไข้ลงมีระดับน้อยกว่าในผู้ป่วยที่เป็นไข้ที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกิว (OFI)

การอภิปรายผล (Discussion)

การศึกษาวิจัยนำร่องนี้เพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในช่วงที่ไข้ลงในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิว (defervescence) ซึ่งในระยะนี้ การตอบสนอง

ของร่างกายต่อการติดเชื้อไวรัสเด็งกิวที่แตกต่างกันในผู้ป่วย สามารถนำไปสู่ความรุนแรงของโรคที่ต่างกันในผู้ป่วยแต่ละคนได้ ผู้ป่วยบางคนอาจจะมีอาการดีขึ้นหลังจากไข้ลง ในขณะที่ผู้ป่วยบางคนอาจจะมีอาการรุนแรงหลังจากไข้ลงได้ ผลการศึกษาพบว่า ยีนที่นำมาศึกษา 3 ยีนในผู้ป่วยกลุ่มที่มีอาการไม่รุนแรง ไม่มีการรั่วของพลาสมา (DF) จำนวน 30 คนและกลุ่มที่มีอาการรุนแรงซึ่งมีการรั่วของพลาสมา (DHF) จำนวน 19 คน ในวันที่ไข้ลง ระดับ mRNA ของยีน *MMP-9* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย DHF สูงกว่าที่พบในผู้ป่วย DF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *IL-8* และ *IL-1β* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับระดับการแสดงออกของยีนที่ศึกษาเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิว และผู้ป่วยที่เป็นไข้ที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกิว พบว่า เฉพาะระดับ mRNA ของ *IL-1β* ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิวในช่วงที่ไข้ลงมีระดับน้อยกว่าในผู้ป่วยที่เป็นไข้ที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกิว ระดับ mRNA ของ *IL-1β* ที่แตกต่างระหว่างการติดเชื้อที่เกิดจากไวรัสเด็งกิวกับการติดเชื้อจากสาเหตุอื่นอาจจะเกิดจากปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องรวมทั้งช่วงเวลาที่นำตัวอย่างเลือดมาศึกษา ซึ่งในผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากไวรัสเด็งกิวเป็นช่วงที่ไข้ลง ในขณะที่ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากสาเหตุอื่นเป็นช่วงที่มีไข้

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด monocytes และ lymphocytes ในระหว่างที่มีการติดเชื้อ ทำให้มีการผลิต cytokines และ สารตัวกลาง (chemical mediators) ต่างๆ ซึ่งก่อให้เกิดการรั่วของพลาสมาจากหลอดเลือดฝอยและอาจจะนำไปสู่ภาวะช็อกได้ในที่สุด สารที่พบว่ามีระดับความเข้มข้นในพลาสมาสูงขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรง ได้แก่ TNFα, IL-1β, IL-8, IFN-γ, sTNFRs (soluble TNF receptors) เป็นต้น[20, 21] นอกจากนี้ ได้มีกลุ่มผู้วิจัย ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนหลายๆ ชนิดในระดับ mRNA เพื่อประเมินภาพรวมของการแสดงออกของยีนต่างๆ (global gene expression) ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิวในช่วงที่มีไข้ (acute phase) โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการดำเนินโรคเป็น DF และกลุ่มที่มีการดำเนินโรคเป็น DHF โดยวิธี expression microarrays พบว่า ยีนในกลุ่ม interferon ซึ่งทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันดั้งเดิม (innate immunity) มีระดับสูงขึ้นในกลุ่ม DF ในขณะที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น T และ B cells และยีนที่ทำหน้าที่เป็น cytokines ซึ่งรวมทั้ง ยีน *IL-8* และยีน *IL-1β* มีระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นในกลุ่ม DHF[27] อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาที่คล้ายคลึงกันโดยเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนต่างๆ ระหว่างกลุ่มที่มีการดำเนินโรคเป็น DF และกลุ่มที่มีการดำเนินโรคเป็น DHF โดยวิธี expression microarrays[28, 29] แต่ตัวอย่างเลือดที่นำมาทดสอบอยู่ในระยะการดำเนินโรคที่ต่างกัน โดยจะได้ตัวอย่างเลือดโดยเฉลี่ยในวันที่ 4 หรือ 5 นับจากที่เริ่มป่วย และผู้ป่วยที่เป็น DHF จะได้ตัวอย่างเลือดในระยะที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการแสดงที่บ่งบอกถึงมีการรั่วของพลาสมาหรือจะเข้าสู่ภาวะช็อก ผลการศึกษาพบว่า

ระดับการแสดงออกของยีน *IL-8* และยีน *IL-1β* ไม่มีความแตกต่างกันในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม สำหรับการศึกษานี้ การที่ไม่พบความแตกต่างของระดับ mRNA ของยีน *IL-8* และยีน *IL-1β* ในช่วงที่ผู้ป่วยเริ่มมีไข้ลง (defervescence) ในกลุ่มที่มีการดำเนินโรคที่เป็น *DF* และในกลุ่มที่มีการดำเนินโรคเป็น DHF อาจจะเป็นไปได้ว่า การแสดงออกของยีนทั้งสองมีระดับสูงมาก่อนหน้านี้ คือในช่วงที่กำลังมีไข้ของผู้ป่วยที่มีการดำเนินโรคเป็น DHF ตามที่พบในการศึกษาก่อนหน้า[27] และเริ่มมีระดับลดลงในช่วงที่ไข้ลง ซึ่งผลการศึกษาใกล้เคียงกับการศึกษาเร็วๆ นี้ที่วัดระดับการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยที่เป็น DHF ซึ่งมีอาการแสดงชี้บ่งถึงการรั่วของพลาสมาในช่วงที่ไม่มีไข้ ดังนั้น ระดับ mRNA ของแต่ละยีนในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยที่วัดได้ขึ้นอยู่กับช่วงระยะของการดำเนินโรค นอกจากนี้ การศึกษาเหล่านี้[28, 29] ได้ให้ข้อสังเกตว่า ระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ (mRNA) ที่แตกต่างกันในผู้ป่วยที่มีการดำเนินโรคเป็น DF และในผู้ป่วยที่มีการดำเนินโรคเป็น DHF น่าจะเกิดขึ้นตั้งแต่ระยะแรกของการมีไข้ นำไปสู่การแสดงออกของโปรตีนและการดำเนินโรคที่รุนแรงแตกต่างกันในระยะเวลาต่อมา ดังนั้น การศึกษาเพื่อหาสารบ่งชี้ในระดับ mRNA ที่จะใช้เป็นตัวกำหนดหรือทำนายความรุนแรงของโรคโดยวิธี real-time PCR น่าจะกระทำได้ตั้งแต่ระยะแรกๆ ในช่วงที่ผู้ป่วยกำลังมีไข้

สำหรับยีน *MMP-9* เป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น protease โปรตีนในกลุ่มนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด vascular permeability และขบวนการ vascular permeability มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสเด็งกิว จากการศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ ในเซลล์เป้าหมายเมื่อได้รับเชื้อไวรัสเด็งกิว (primary targets) เช่น macrophages โดยวิธี microarrays[26] ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษานี้พบ *MMP-9* มีการแสดงออกที่ลดลง แต่เมื่อได้ทำการศึกษาเพื่อยืนยันผลดังกล่าวโดยวิธี real-time PCR ไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ดังนั้น การศึกษาที่ผ่านมายังไม่สามารถสรุปความสำคัญของ MMP-9 กับการติดเชื้อไวรัสเด็งกิวได้ นอกจากนี้ ยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนนี้กับความรุนแรงของไข้เลือดออกทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่พบว่าระดับ mRNA ของยีน *MMP-9* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย DHF สูงกว่าที่พบในผู้ป่วย DF เมื่อวัดในช่วงที่ไข้ลง ดังเช่นการศึกษาที่ผ่านมาโดยประเมินการแสดงออกของยีนต่างๆ ในระดับ mRNA ทั้งในผู้ป่วยที่มีการดำเนินโรคเป็น DF และในผู้ป่วยที่มีการดำเนินโรคเป็น DHF พบว่าการเปลี่ยนแปลงน่าจะเกิดขึ้นตั้งแต่ระยะแรกของการมีไข้[28, 29] เพื่อให้เข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของยีน *MMP-9* มากขึ้น การศึกษาเพิ่มเติมโดยเปรียบเทียบระดับ *MMP-9* ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกิวทั้ง 2 กลุ่มในช่วงที่มีไข้ น่าจะทำให้ได้ข้อมูลที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ของยีนนี้กับการดำเนินโรคของไข้เลือดออกได้มากขึ้น นอกจากนี้ การศึกษาเพิ่มเติมโดยประเมินระดับการแสดงออกของยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนตั้งแต่ระยะแรกที่เริ่มมีอาการในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเด็งกิว และติดตามจนกระทั่งผู้ป่วยเข้าสู่

ระยะที่มีการรั่วของพลาสมา จะช่วยในการค้นหาสารบ่งชี้ที่เป็นตัวกำหนดหรือทำนายความรุนแรงของโรคได้ถูกต้องเหมาะสมและรวดเร็วตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของโรค และอาจจะทำให้เกิดความเข้าใจที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองของร่างกายที่นำไปสู่ภาวะไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรงเพื่อหาทางป้องกันการดำเนินโรคไปสู่ภาวะดังกล่าว

ข้อสรุป (Conclusion)

การศึกษานำร่องนี้พบว่า ระดับการแสดงออกของ *MMP-9* อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคของไข้เลือดออก จากการที่พบมีระดับ mRNA ของยีน *MMP-9* ในระยะที่ไข้ลงสูงอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยกลุ่มที่มีการดำเนินโรคเป็น DHF เมื่อเปรียบเทียบกับระดับของยีนดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการดำเนินโรคเป็น DF อย่างไรก็ตาม ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อยืนยันถึงบทบาทของยีนดังกล่าวต่อการเกิดโรคไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรง

ข้อเสนอแนะ (Suggestion for further work)

การศึกษาเพิ่มเติมโดยประเมินและเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *MMP-9* และยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนตั้งแต่ระยะแรกที่เริ่มมีอาการในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเด็งกิว และติดตามเป็นระยะอย่างต่อเนื่องในผู้ป่วยที่มีการดำเนินโรคต่างกัน จะทำให้เข้าใจถึงกลไกการดำเนินโรคของไข้เลือดออกมากขึ้น และนำไปสู่การตรวจหาสารบ่งชี้ที่เป็นตัวกำหนดหรือทำนายความรุนแรงของโรคได้ถูกต้องเหมาะสมและรวดเร็วตั้งแต่ระยะเริ่มแรก

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Department of Child and Adolescent Health and Development, WHO, Dengue Haemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome in the Context of the integrated management of Childhood Illness. 2005.

2. กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค. กรุงเทพฯ:โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึก, 2520-2541.

3. ชิษณุ พันธุ์เจริญ, ดาริน ซอโสตถิกุล, อภิชัย คงพัฒนะโยธิน, วันล่า กุลวิชิต, ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร, อุษา ทิสยากร. โรคติดเชื้อไวรัสเดงกิว: องค์ความรู้ใหม่และแนวโน้มการเปลี่ยนแปลง. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2547;48:253-67.

4. World Health Organization. Dengue Hemorrhagic Fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Second edition 1997, Geneva.

5. อุษา ทิสยากร. Dengue Hemorrhagic Fever: Pitfall in management. ใน: นวลจันทร์ ปราบพาล, ศิริวรรณ วนานุกูล, สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ, พรรณทิพา ฉัตรชาตรี, ธวัชชัย ดีขจรเดช. Interesting Topics in Pediatrics: Implication for general Practice. ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพ: บริษัท บียอนด์ เอนเตอร์ไพรซ์ จำกัด, 2548:67-75.

6. อุษา ทิสยากร. Common Pitfall in management of Dengue Hemorrhagic Fever. ใน: อังกูร เกิดพาณิช, รังสิมา โล่ห์เลขา, ทวี โชติพิทยสุนนท์, บรรณาธิการ. Update on Pediatric Infectious Diseases. สมาคมโรคติดเชื้อในเด็กแห่งประเทศไทย: บริษัท รุ่งศิลป์การพิมพ์ จำกัด, 2548:82-91.

7. สุจิตรา นิมมานนิตย์. ไข้เลือดออก DENGUE. ใน: นลินี อัศวโภคี, สุรภี เทียนกริม, ศศิธร ลิขิตนุกูล, อัษฎา วิภากุล, ประสบการณ์ด้านโรคติดเชื้อในประเทศไทย. สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย: บริษัท โอลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด, 2540:13-26.

8. Halstead SB. Immunological parameters of togavirus disease syndromes. In: Schlesinger RW, ed. The togavirus. Biology, structure, replication. New York: Academic Press 1980:107-73.

9. Lin YW, Wang KJ, Lei HY, et al. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. J Virol 2002;76(23):12242-9.

10. Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol 2000;28(3):183-8.

11. Agarwal R, Kapoor S, Nagar R, et al. A clinical study of the patients with dengue hemorrhagic fever during the epidemic of 1996 at Lucknow, India. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999;30(4):735-40.

12. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. J Med Virol 1998;56(3):280-5.

13. Pacsa AS, Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. FEMS Immunol Med Microbiol 2000;28(2):151-5.

14. Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. Tissue Antigens 2004;64(4):469-72.

15. LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, et al. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. Hum Immunol 2002;63(11):1039-44.

16. Loke H, Bethell D, Phuong CX, et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. Am J Trop Med Hyg 2002;67(1):102-6.

17. Loke H, Bethell DB, Phuong CX, et al. Strong HLA class I--restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? J Infect Dis 2001;184(11):1369-73.

18. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. Nat Genet 2005;37(5):507-13.

19. Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. Tissue Antigens 2002;60(4):309-18.

20. Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, et al. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. J Infect Dis 1998;177(3):778-82.

21. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. J Infect Dis 1999;179(4):755-62.

22. Hober D, Poli L, Roblin B, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. Am J Trop Med Hyg 1993;48(3):324-31.

23. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. Am J Trop Med Hyg 2000;63(1-2):71-5.

24. Liew KJ, Chow VT. Microarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. J Virol Methods 2006;131(1):47-57.

25. Moreno-Altamirano MM, Romano M, Legorreta-Herrera M, Sanchez-Garcia FJ, Colston MJ. Gene expression in human macrophages infected with dengue virus serotype-2. Scand J Immunol 2004;60(6):631-8.

26. Warke RV, Xhaja K, Martin KJ, et al. Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. J Virol 2003;77(21):11822-32.

27. Ubol S, Masrinoul P, Chaijaruwanich J, et al. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. J Infect Dis 2008;197:1459-67.

28 Simmons CP, Popper S, Dolocek, C, et al. Patterns of host genome-wide transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. J Infect Dis 2007;195(8):1097-107.

29. Long HT, Hibberd ML, Hien, TT, et al. Patterns of gene transcript abundance in the blood of children with severe or uncomplicated dengue highlight differences in disease evolution and host response to dengue virus infection. J Infect Dis 2009;199(4):537-46.

ส่วนผนวก (Appendix)

- Association of cytokine-related gene expression with dengue infection severity. (2007) Oral Presentation at the 25th International Congress of Pediatrics. Athens, Greece
- Association of cytokine-related gene expression with dengue infection severity. Woraman Waidab, Kanya Suphapeetiporn, Chalumporn Srichomthong, Sriraprapa Tongkobpetch, Vorasuk Shotelersuk, Usa Thisyakorn. Pediatrics 2008; 121; S132
- Cytokine-related gene expression in the peripheral blood and dengue infection severity. (2008) Poster Presentation at the 57th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. New Orleans, Louisiana, USA
- Cytokine-related gene expression in the peripheral blood and dengue infection severity. Woraman Waidab, Kanya Suphapeetiporn, Usa Thisyakorn. Am J Trop Med and Hyg 2008; 79; S142

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

25th International Congress of Pediatrics

"for the health and well-being of our children"

August 25-30, 2007, Athens - Greece

Under the auspices of H.E. the President of the Hellenic Republic,
Mr. Karolos Papoulias

www.icp2007.gr

Tuesday, August 28th, 2007

ORAL PRESENTATIONS - INFECTIOUS DISEASES 2

Time: 08:00-09:00
Hall: The Alexandra Trianti Hall
Moderator: *Kafetzis Dimitris, Greece*

OP051
PERIPHERAL BLOOD COUNT FOR DENGUE SEVERITY PREDICTION: A PROSPECTIVE STUDY IN THAI CHILDREN
Nanthakorn Eu-ahsunthornwattana [1], Jakris Eu-ahsunthornwattana [2], Usa Thisyakorn [1]
1. King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkong, Thailand
2. Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Thailand

OP052
NASOPHARYNGEAL CARRIAGE AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE IN HEALTHY CHILDREN
Maria Rosario Z. Capeding [1], Rowena Tan [2], Nerissa C. Calimon [3], Milani M. Alpon [1], Jolenita F. Sepulveda [3], , Armon B. Zeta [1], Lydia T. Sombrero [1]
1. Research Institute for Tropical Medicine
2. Bayanan Health Center
3. Wyeth Philippines, Inc.
4. Research Institute for Tropical Medicine, Muntinlupa City, Philippines

OP053
SEMI-QUANTITATIVE D-DIMER ASSAY AS A PREDICTOR OF DENGUE SEVERITY
Nipasiri Voraphani, Kittiya Setrkraising, Chansuda Bongsebandhu-phubhakdi, Chitsanu Pancharoen, Usa Thisyakorn, Chule Thisyakorn
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkong, Thailand

OP054
HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME IN CHILDREN: REVIEW OF 36 CASES IN A TERTIARY CARE CENTER OF MEXICO CITY
Gonzalez Napoleon, Zepeda Gabriela, Aquino Luis, Macias Mercedes
Instituto Nacional de Pediatria, Mexico

OP055
ASSOCIATION OF CYTOKINE-RELATED GENE EXPRESSION WITH DENGUE INFECTION SEVERITY
Woraman Waidab, Kanya Suphapeetiporn, Chalurmpon Srichomthong, Siraprapa Tongkobpetch, Chitsanu Pancharoen, Vorasuk Shotelersuk, Usa Thisyakorn
King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkong, Thailand

PEDIATRICS®
OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS

ASSOCIATION OF CYTOKINE-RELATED GENE EXPRESSION WITH DENGUE INFECTION SEVERITY

Woraman Waidab, Kanya Suphapeetiporn, Chalurmpon Srichomthong, Siraprapa Tongkobpetch, Chitsanu Pancharoen, Vorasuk Shotelersuk and Usa Thisyakorn

Pediatrics 2008;121;S132
DOI: 10.1542/peds.2007-2022UUUU

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:
http://www.pediatrics.org

PEDIATRICS is the official journal of the American Academy of Pediatrics. A monthly publication, it has been published continuously since 1948. PEDIATRICS is owned, published, and trademarked by the American Academy of Pediatrics, 141 Northwest Point Boulevard, Elk Grove Village, Illinois, 60007. Copyright © 2008 by the American Academy of Pediatrics. All rights reserved. Print ISSN: 0031-4005. Online ISSN: 1098-4275.

American Academy of Pediatrics
DEDICATED TO THE HEALTH OF ALL CHILDREN™

Downloaded from www.pediatrics.org by on April 15, 2009

600 000 of those deaths. Eighty-five percent of these deaths occur in sub-Saharan Africa and southeast Asia.
OBJECTIVE: We aimed to review rotavirus prevalence studies of children in Africa from 1975 to 2006.
METHODS: Three multilingual Medline searches (limited to humans) were performed: "RV," country/Africa, and epidemiology/diarrhea. Additional inclusion criteria included children <5 years of age, conducted over >3 months, and including >50 children. Data were analyzed in 4 periods.
RESULTS: Of the initial 189 studies identified, 75 in 18 countries met the additional inclusion criteria (Table 1). More than half of the studies were hospital based. In all studies the most common serotypes were G1 (25%), G4 (16%), G2 (13%), G3 (12%), P[8] (37%), P[6] (35%), and P[4] (11%). From 1996 to 2006 the common serotypes were G1 (22%), G4 (17%), G2 (13%), G3 (13%), P[6] (37%), P[8] (35%), and P[4] (11%).

TABLE 1. Results of 75 Studies on Rotavirus Prevalence in Children <5 Years Old in Africa

	All Studies	1976–1985	1986–1995	1996–2006
Total No. of studies	75	12	39	24
Duration, mo	12 (8.0–15.5)	12 (8.0–12.5)	12 (8.0–12.5)	14 (11–24)
Rotavirus-positive, %	26	25	25	30
Studies with serotyping, n	18	0	2	16
Rotavirus-positive with serotyping, %	24	—	5	67

— indicates that data were not available.

CONCLUSIONS: The current prevalence rate is 30% (range: 17%–38%). Present serotypes include G1 through G4, G8, G9, P[8], P[6], and P[4]. Rotavirus diarrhea represents a significant disease burden. Current rotavirus prevalence studies are important, because there are effective rotavirus vaccines available to prevent mortality and severe disease.

ASSOCIATION OF CYTOKINE-RELATED GENE EXPRESSION WITH DENGUE INFECTION SEVERITY

Submitted by Woraman Waidab
Woraman Waidab, Kanya Suphapeetiporn, Chalurmpon Srichomthong, Siraprapa Tongkobpetch, Chitsanu Pancharoen, Vorasuk Shotelersuk, Usa Thisyakorn
King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand

INTRODUCTION: Dengue is the most prevalent mosquito-borne viral disease and one of the most serious infectious diseases worldwide. Infection by any of the serotypes of dengue viruses (DEN-1–DEN-4) may result in different severities ranging from a relatively benign fever, called dengue fever (DF), to fatal dengue shock syndrome. The pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome is thought to be mediated by various host factors. Previous reports have suggested an involvement of immunoresponse mediators as well as apoptosis-related molecules in the severity of dengue infection.
OBJECTIVE: Our aim was to elucidate the cellular gene responses to dengue viral infection at the transcriptional level and to correlate expression levels with disease activity and/or clinical manifestation.
METHODS: Expression levels of interleukin 8 (IL-8), IL-1β, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), and Fas in peripheral blood cells were assayed for 10 children with DF, 10 children with DHF, and 5 healthy controls by using real-time reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction.
RESULTS: Expression levels of IL-8, IL-1β, MMP-9, and Fas were higher in children who developed DHF than in those with DF.
CONCLUSIONS: The messenger RNA expression levels of IL-8, IL-1β, MMP-9, and Fas were significantly elevated in children with DHF, which suggests that these mediators are involved in the pathogenesis. The messenger RNA expression level might serve as a predictor of dengue disease activity. Reverse-transcription polymerase chain reaction has a potential to be another rapid and useful tool in assessing disease severity, leading to a proper therapeutic plan.

HIGH SEROPREVALENCE OF HUMAN METAPNEUMOVIRUS INFECTION IN CHILDREN IN THE CHONGQING, CHINA, AREA

Submitted by Xiaodong Zhao
Xiaodong Zhao, Zhang Qin
Division of Immunology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, China

INTRODUCTION: Human metapneumovirus (hMPV), first isolated in 2001 in the Netherlands, was identified as a respiratory etiologic agent in a variety of regions. A number of reports have described evidence of hMPV infection on mainland China. However, the description of the seroepidemiology of hMPV infection remains limited.
OBJECTIVE: We aimed to define the seropositivity of hMPV immunoglobulin G (IgG) antibodies in different age groups of children in Chongqing, China.
METHODS: The specificity of the enzyme-linked immunosorbent assay was first validated by using respiratory syncytial virus (RSV)-infected cell lysates subtracted sera and Western blotting based on anti-hMPV animal serum. This assay was subsequently used to determine the presence of IgG antibodies to hMPV and RSV in 325 serum samples from children aged 0 to 6 years.
RESULTS: There was no cross-reaction between the hMPV and RSV enzyme-linked immunosorbent assays observed in our system. Seropositivity of anti-hMPV IgG antibodies in children aged 0 to 5 months was 74.5%,

Downloaded from www.pediatrics.org by on April 15, 2009

THE AMERICAN JOURNAL OF
Tropical Medicine and Hygiene
Official Journal of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene
Volume 79 December 2008 Number 6

Abstract Book

American Society of Tropical Medicine and Hygiene

57th Annual Meeting

57TH ASTMH ANNUAL MEETING

December 7—11, 2008

Sheraton New Orleans

New Orleans, Louisiana USA

Supplement to

The American Journal of
Tropical Medicine and Hygiene

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

480

DETECTION OF SPOTTED FEVER GROUP *RICKETTSIA* IN IXODID TICKS COLLECTED IN LOS ANGELES COUNTY, CALIFORNIA

Michele M. Sturgeon[1], Emily Beeler[2], Laura Krueger[3], Renjie Hu[4], Gail Vangordon[5], Michael Rood[5], Robyn Spano[5], Sergio Bermudez[1], Gregory A. Dasch[1], Marina E. Eremeeva[1]

[1]Center for Disease Control, Atlanta, GA, United States, [2]Veterinary Public Health and Rabies Control Program, Los Angeles Department of Public Health, Downey, CA, United States, [3]Orange County Vector Control District, Garden Grove, CA, United States, [4]Vector-Borne Disease Section, California Department of Public Health, Ontario, CA, United States, [5]Los Angeles County Department of Public Health, Environmental Health, Vector Management Program, Baldwin Park, CA, United States

Dogs are commonly attacked by the same species of ixodid ticks that bite humans and can become infected with spotted fever group rickettsiae (SFG), so they can serve as sentinels for human rickettsial diseases. Several cases of canine Rocky Mountain spotted fever (RMSF) were identified in Los Angeles County, CA during 2006-2007 based on clinical diagnosis and serological testing. Detection and identification of SFG in ticks was conducted to improve our understanding of the epidemiology of rickettsial diseases in the county. 445 questing ticks, including 285 *Dermacentor occidentalis* and 160 *Ixodes pacificus*, were collected from vegetation along seven hiking trails visited by sick dogs and their owners. DNA was extracted from individual ticks and rickettsial screening was conducted using a SYBR-Green PCR assay detecting a fragment of the OmpA gene of the SFG. Semi-nested PCR was performed for positive specimens to amplify a 70-602 nt fragment of *omp*A which was used for species identification of rickettsiae detected by DNA sequencing. In total, 83% of *I. pacificus* and 37% of *D. occidentalis* were found positive for SFG rickettsiae using SYBR-Green PCR. All of the *I. pacificus* tested were from the same site and were positive for DNA of a SFG rickettsia whose *omp*A sequence is closest to that of the rickettsial endosymbiont of *I. scapularis*, which is believed to be non-pathogenic. *Dermacentor occidentalis* positive for SFG rickettsiae were found at 6 of 7 collection sites, with a detection rate ranging from 16% to 80%. DNA of *Rickettsia rhipicephali* was detected most frequently in *D. occidentalis* and it was found in 4 locations. SFG genotype 364D was found in 5 ticks collected at 3 of the 4 locations which also had *R. rhipicephali*. In conclusion, our study provides the first molecular data on the prevalence and species identification of SFG rickettsiae in *Ixodes pacificus* and corroborates our previous findings with *Dermacentor occidentalis* from other sites in Los Angeles County of California. Since *R. rickettsii* was not found in these ticks, either the unique genotypes of *R. rhipicephali* found in *D. occidentalis* (as reported previously) cause canine disease or 364D genotype may be the cause of spotted fever infections in dogs and possibly humans.

481

CYTOKINE-RELATED GENE EXPRESSION IN THE PERIPHERAL BLOOD AND DENGUE INFECTION SEVERITY

Woraman Waidab, Kanya Suphapeetiporn, Usa Thisyakorn

King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand

Dengue is the most prevalent mosquito-borne viral disease and has become one of the most important public health problems worldwide. Infection by any of the serotypes of dengue viruses (DEN-1, -2, -3 and -4) can produce a wide spectrum of clinical manifestations ranging from a simple febrile illness, dengue fever (DF) to a severe form with plasma leakage, bleeding and shock. The pathogenesis of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome (DHF/DSS) is thought to be mediated by various host factors. However, the mechanism underlying disease severity is not fully understood. Previous studies have suggested an involvement of immune response mediators in the severity of dengue infection. The aim of this study was to elucidate the cellular gene responses to dengue viral infection at the transcriptional level and to correlate expression levels with disease activity and/or clinical manifestation. Whole blood mRNA from children with dengue infection was analyzed on the day of defervescence. Expression levels of IL-8, IL-1β, MMP-9 and IL-10 in peripheral blood leukocytes were assayed in 30 children with DF, 19 children with DHF and 10 healthy controls by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). Compared to controls, the expression levels of IL-8, IL-1β, MMP-9 and IL10 were higher in children with dengue infection. IL-8 mRNA levels were also elevated in patients with DHF compared to those of DF. However, there was no statistically significant difference between patients with DF and DHF in the expression levels of IL-1β, MMP-9 and IL10. In conclusion, the expression levels of IL-8, IL-1β, MMP-9 and IL10 were higher in children with dengue infection suggesting that these mediators may be involved in the disease pathogenesis. The mRNA expression levels of IL-8 were elevated in DHF compared to those of DF while the others were not. The expression pattern of these genes in peripheral blood leukocytes might serve as a predictor of dengue infection as well as disease activity.

482

CLIMATIC FACTORS, ENTOMOLOGIC ATTRIBUTES AND EPIDEMICS OF DENGUE IN TAIWAN, 1998 - 2006

Chuin-Shee Shang[1], Chi-Tai Fang[1], Chung-Ming Liu[2], Fu-Chang Hu[3], Chwan-Chuen King[1]

[1]Institute of Epidemiology, National Taiwan University, Taipei City, Taiwan, [2]Global Change Researching Center, National Taiwan University, Taipei City, Taiwan, [3]National Center of Excellence for General Clinical Trial and Research, NTU Hospital, Taipei City, Taiwan

Dengue has seasonal trends like most of other mosquito-borne diseases. Meteorological factors affect on not only the biology of dengue viruses and mosquito vectors, but also the viral transmission between mosquitoes and humans. The mechanism of climate influencing the occurrence of dengue is very complicated and controversial. This study intended to simplify the correlations among meteorological factors, mosquito measurements and biweekly dengue data in southern Taiwan from 1998 to 2006 using regression model. We hope to make the meteorological knowledge more informative and helpful in predicting the epidemics of dengue for making best public health decision. The preliminary results found that previous biweekly number of dengue cases, temperatures and El Nino southern oscillation index were very good predictors for subsequent dengue cases. Other meteorological factors like wind, sunshine were also found explainable for the followed-up trends of dengue and they were worthy for further investigation. The uniqueness of this study is to consider meteorological factors in a more comprehensive way integrating with the statistical predication models that well fit assumptions of the distribution of variables. Future efforts include simulating the occurrence of disease with climatic and entomologic data to better predict the impact of global warming on the epidemics of dengue with more international perspectives.

483

DETECTION AND IDENTIFICATION OF BIOMARKERS FOR DENGUE FEVER (DF) AND DENGUE HEMORRHAGIC FEVER (DHF) USING PLASMA SAMPLES FROM THAI CHILDREN AND SELDI-TOF-MS TECHNOLOGY

Alexa Gilbert[1], Takol Chareonsirisuthigul[2], Maike Milkreit[1], Sukathida Ubol[2], Brian J. Ward[1], Momar Ndao[1]

[1]McGill University, Montreal, QC, Canada, [2]Mahidol University, Bangkok, Thailand

Surface-Enhanced, Laser-Desorption and Ionization, Time-Of-Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF MS) permits the study of the protein/peptide content of diverse biological fluids such as serum, plasma, urine, cell lysates and tissue extracts. This high throughput proteomic platform has been used to identify biomarkers for a wide range of inflammatory, infectious and neoplastic conditions. The promising results obtained in