



รายงานการวิจัย

โครงการ “การประยุกต์ใช้สาร (1->3)-เบต้า-ดี-กลูแคน: ตัวชี้วัดทางชีวภาพเพื่อการตรวจติดตามโรคพิษโอซิสในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแบบ immunotherapy”

(The application of (1->3)- β -D-glucan: a surrogate biomarker for therapeutic monitoring in pythiosis patients)

สัญญาเลขที่ สวรส. ๖๐-๐๐๓

คณะผู้วิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินตามพร (หัวหน้าโครงการ)
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. อาจารย์ นพ. ดร. อัษฎาศ ลีฬหวนิชกุล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. อาจารย์ พญ. ดร. รังสิมา เจริญบุตรกุล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. น.ส. นวพร วรศิลป์ชัย
สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย ๒๖ ตุลาคม ๒๕๕๙ – ๒๕ ตุลาคม ๒๕๖๐

การประยุกต์ใช้สาร (1->3)-เบต้า-ดี-กลูแคน: ตัวชี้วัดทางชีวภาพเพื่อการตรวจติดตาม
โรคพิษโอซิสในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแบบ immunotherapy

รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินตามพร (หัวหน้าโครงการ)
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๙

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๙ ทำให้การศึกษาวิจัยดำเนินไปได้ตามแผนที่วางไว้

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความร่วมมือของคณาจารย์ แพทย์ พยาบาลและเจ้าหน้าที่สาธารณสุขที่เกี่ยวข้องจากโรงพยาบาลต่างๆ ทั้งหมด ๙ แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย, โรงพยาบาลรามาธิบดี, โรงพยาบาลศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จ. นครนายก, โรงพยาบาลเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ , โรงพยาบาลพุทธชินราช จ. พิษณุโลก, โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จ. ขอนแก่น, โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จ. ขอนแก่น, โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จ. สงขลา และโรงพยาบาลศูนย์อุดรธานี จ. อุดรธานี ในการดูแลแนะนำการรักษาโรคพิษีโอซิสด้วยวิธี immunotherapy โดยใช้ *Pythium insidiosum* antigen (PIA) แก่ผู้ป่วย ตลอดจนการเก็บตัวอย่างโลหิตผู้ป่วยเพื่อการตรวจวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาตามแผนงานของโครงการวิจัย

สุดท้ายคณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณอย่างยิ่งไปยังผู้ป่วยโรคติดเชื้อพิษีโอซิสทุกท่านที่สละเวลาและบริจาคโลหิตเพื่อการศึกษาวิจัย ทางคณะผู้วิจัยได้นำตัวอย่างโลหิตเหล่านั้นไปใช้ศึกษาให้เกิดประโยชน์สูงสุดทั้งแก่วงการแพทย์และสังคมแล้ว

บทคัดย่อ

บทนำ

พิเทียม อินซิดิโอซุม เป็นเชื้อก่อโรคฟิโทโอซิสซึ่งมีอันตรายถึงแก่ชีวิต พยาธิสภาพในหลอดเลือดแดงและกระจกตาเป็นลักษณะอาการทางคลินิกที่พบได้บ่อย โดยกลุ่มที่ติดเชื้อในหลอดเลือดแดงส่วนใหญ่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว การตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อพิเทียม อินซิดิโอซุม ในน้ำเหลือง เป็นวิธีที่ใช้กันและมีความแม่นยำสูงมาก อย่างไรก็ตามก็มีวิธี computer tomography เป็นการวินิจฉัยโรคในหลอดเลือดอีกวิธีหนึ่งที่แพทย์สามารถเห็นตำแหน่งที่หลอดเลือดตีบได้ แต่มีขีดจำกัดเรื่องค่าใช้จ่ายที่สูงมากและมีบริการเฉพาะในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิเท่านั้น ปัจจุบันการรักษายังไม่มีวิธีมาตรฐาน อาศัยการรักษาแบบผสมผสาน ด้วยการผ่าตัด การให้ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อราและการรักษาด้วยวิธีอิมมูโนเทอราปีโดยใช้โปรตีนแอนติเจนที่สกัดจากเชื้อพิเทียม อินซิดิโอซุม (*Pythium insidiosum* antigen, PIA) ซึ่งเป็นแอนติเจนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ด้วยความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และฉีดใต้ผิวหนัง นาร่อง 1 ครั้ง หลังการวินิจฉัย ตามด้วยการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีก 6 ครั้งในเวลา 1 ปี ปัจจุบันการติดตามการดำเนินของโรคและการรักษาอาศัยการเป็นแบบ subjective คือสังเกตรอยโรคและสอบถามจากผู้ป่วย ยังไม่มีเครื่องมือชี้วัดทางชีวภาพที่มีความถูกต้องและติดตามได้ จากเหตุนี้จึงจำเป็นต้องหาเครื่องมือดังกล่าว การตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อพิเทียม อินซิดิโอซุม เป็นการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย และการตรวจวัดปริมาณสาร (1->3)-เบต้า-ดี-กลูแคน (BG) ที่ผนังเซลล์เชื้อพิเทียม อินซิดิโอซุม ซึ่งพบในและรอบข้างชนิดในกระแสเลือด น่าจะเป็นเครื่องมือที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง คณะผู้วิจัยจึงมีสมมติฐานว่า หลังจากการรักษาแบบผสมผสานระดับแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อพิเทียม อินซิดิโอซุม และปริมาณสาร (1->3)-เบต้า-ดี-กลูแคน ในกระแสเลือดน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงและสามารถนำมาเป็นเครื่องมือในการตรวจติดตามการดำเนินโรคและการรักษาได้อย่างน่าเชื่อถือ

วิธีการทดสอบ ตรวจวัดระดับแอนติเจน BG และระดับสารไซโตไคน์ชนิด IFN- γ , IL-17 ในตัวอย่างน้ำเหลืองจากผู้ป่วยโรคฟิโทโอซิสที่ติดเชื้อในหลอดเลือดแดงและติดเชื้อบริเวณดวงตา จำนวนกลุ่มละ 20 ราย โดยตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่เก็บจากก่อนให้ PIA ณ ช่วงเวลาต่างๆ ตามตารางการให้ โดยกลุ่มควบคุมเป็นตัวอย่างน้ำเหลืองจากผู้ป่วยทาลัสซีเมียที่ไม่มีประวัติการติดเชื้อและจากอาสาสมัครสุขภาพดีกลุ่มละ 20 ราย สำหรับผู้ป่วยติดเชื้อในหลอดเลือดแดงและบริเวณกระจกตาตามลำดับ และวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลผู้ป่วยในกลุ่มมีชีวิตรอดและเสียชีวิต การสูญเสียและไม่สูญเสียการมองเห็น

ผลการทดลอง ระดับของสาร BG ของผู้ป่วยกลุ่มติดเชื้อในหลอดเลือดแดงที่มีชีวิตอยู่ได้เกินกว่า 1 ปีหลังเริ่มให้ PIA ทุกคนลดลงตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIA immunotherapy (PIAI) นั้น สาร BG มีระดับที่สูงและมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติจนกระทั่งผู้ป่วยเสียชีวิต โดยระดับเริ่มต้นที่วัดได้ของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีค่าอยู่ในช่วงที่ไม่แตกต่างกัน คือ มากกว่า 523.40 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งตรงกันข้ามกับระดับสารไซโตไคน์ทั้งชนิด IFN- γ และ IL-17 ผู้ป่วยกลุ่มที่รอดชีวิตนั้นมีระดับของสาร IFN- γ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปี สาร IFN- γ มีแนวโน้มลดต่ำลง

อภิปรายผลการทดลอง รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับสาร BG และระดับไซโตไคน์ ทั้งชนิด IFN- γ และชนิด IL-17 นี้เป็นหนึ่งในเครื่องมือชีวภาพ ที่สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจติดตามผลการรักษาและทำนายการดำเนินไปของโรคที่มีหลักฐานชัดเจน สามารถประเมินค่าได้ในเชิงปริมาณ แต่อย่างไรก็ตามสารดังกล่าวมีข้อจำกัดอยู่ที่ความจำเพาะ การเปลี่ยนแปลงของสารเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นได้จากสาเหตุอื่นๆ เช่น การติดเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรียที่มีสาร BG เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการพัฒนายาสารที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. insidiosum* เพื่อใช้ตรวจควบคุมไปด้วยจึงเป็นสิ่งที่ต้องพัฒนาต่อไปในอนาคต

Keyword: (1->3)-เบต้า-ดี-กลูแคน, พิเทียม อินซิดิโอซุม, ฟิโทโอซิส, สารไซโตไคน์

Abstract

Introduction *Pythium insidiosum* is the causative agent of the life threatening pythiosis. The main clinical manifestations are often found in artery (vascular type) and cornea (ocular or corneal type). Among the vascular type, thalassemia is the common underlying disease. The investigation of specific *P. insidiosum* antibody in serum is practical tool and provides high accuracy for diagnosis. Using the high technology, computer tomography angiogram to indicate the occlusion point in artery is another protocol that physicians often requested. However, with the high cost and availability only in tertiary care hospital are the limitation. Presently, the combination treatment, surgery, antifungal agents, and immunotherapy, has been applied since standard treatment has been established yet. Regarding the immunotherapy, 2 mg/ml protein antigen extracted from *P. insidiosum* (PIA) to stimulate host immune response, via subcutaneous route has been performed. The protocol is one prime dose, after diagnosis, and 6 boosters in one year period. To follow up and monitor the patients' illnesses, the physicians investigate by observing and asking the patient directly about the lesion without any biological markers. In addition, no reliable markers regarding the patients's previous symptom for the next visit was shown. Thus, it is dispensable to find the biological evidence base. To examine the specific antibody is to study the host immune response to the specific pathogen. Regarding the pathogen side, the presence of (1→3)- β -D-glucan (BG) is found in the cell wall of *P. insidiosum* and PIA, similar to certain kind of fungi. Therefore BG level monitoring is another attractive marker. We hypothesized that after the combination treatment, the level of both specific antibody against *P. insidiosum* and the BG would change and possible to apply as the monitoring surrogate markers for pythiosis.

Materials and Methods The levels of BG and cytokines: IFN- γ , IL-17 in the sera prior PIA immunotherapy (PIAI) at each time point through out the 1 year regimen from vascular and corneal pythiosis patients (n=20 of each) were examined. The control sera were collected from healthy with thalassemia (n=20) and without thalassemia (n=20) for vascular pythiosis and corneal pythiosis investigation, in order. All results including the patients' data from survivor and death groups for vascular type; visible and invisible from ocular type will be analyzed.

Results All patients who survived more than 1 year after PIA immunotherapy showed the significant declining trend of serum BG (p -value<0.05) whereas the ones who died before 1 year demonstrated the high level of BG with non-significant changing (p -value<0.05) despites both group presented the non-significant difference of >423.4 picogram/ml prior PIA injection. In contrast to the cytokine level: IFN- γ and IL-17, all patients who survived more than 1 year after PIA immunotherapy showed the significant increased trend of cytokines (p -value<0.05) whereas the ones who died before 1 year demonstrated the decreased trend of cytokines' level.

Discussion The pattern of BG and cytokines: IFN- γ and IL-17 are ones of the biological markers (quantitative scale) which can be applied for the disease monitoring and prognosis. However, these biological markers have some limitation in term of their specificity. The pattern of their levels can be presented by several factors such as fungal or bacterial infection which compose of BG. Thus, the development of *P. insidiosum* specific biological marker for testing in parallel need to be investigated in the future.

Keyword: (1→3)- β -D-glucan, *Pythium insidiosum*, Pythiosis, Cytokines

สารบัญ (Table of Contents)

กิตติกรรมประกาศ.....	3
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	4
Abstract (ภาษาอังกฤษ).....	5
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations).....	11
บทนำ (Introduction)	
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	12
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	17
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	19
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	19
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	21
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	21
เนื้อเรื่อง	
กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	22
ข้อมูลและตัวอย่างชีวภาพที่เก็บจากกลุ่มประชากรตัวอย่าง.....	24
จำนวนกลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
สถานที่ทำการทดลอง.....	25
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	25
กิจกรรมตามข้อเสนอโครงการ เป้าหมายตามแผนงานผลการทดลอง.....	28
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	41
ปัญหาและอุปสรรคในการปฏิบัติงาน.....	44
คุณภาพของผลงาน.....	45
การนำไปใช้ประโยชน์.....	47
ประสิทธิภาพของการถ่ายทอดงานวิจัยไปสู่กลุ่มเป้าหมาย.....	49
บรรณานุกรม (Bibliography).....	50

บรรณานุกรม (Bibliography).....	50
ประวัตินักวิจัยและคณะ.....	53

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่ 1 ข้อมูลประวัติผู้ป่วยกลุ่ม vascular pythiosis	30
ตารางที่ 2 ข้อมูลประวัติการรักษาผู้ป่วยกลุ่ม vascular pythiosis	31
ตารางที่ 3 ข้อมูลประวัติผู้ป่วยกลุ่ม ocular pythiosis.....	32
ตารางที่ 4 ข้อมูลประวัติการรักษาผู้ป่วยกลุ่ม ocular pythiosis	33

สารบัญภาพ (List of Illustration)

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะมหสังฐานและจุลสังฐานของเชื้อ <i>P. insidiosum</i>	12
ภาพที่ 2 แสดงแผนการให้ PIA และการเก็บตัวอย่างโลหิตผู้ป่วย pythiosis.....	23
ภาพที่ 3 ระดับของสาร (1->3)- β -D-glucan ในผู้ป่วย vascular pythiosis ที่ได้รับการรักษา ด้วย PIA immunotherapy.....	36
ภาพที่ 4 ระดับของสาร (1->3)- β -D-glucan ในผู้ป่วย ocular pythiosis ที่ได้รับการรักษา ด้วย PIA immunotherapy.....	37
ภาพที่ 5 ระดับของไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และ IL-17 ในผู้ป่วย vascular pythiosis ที่ได้รับการรักษา ด้วย PIA immunotherapy และมีชีวิตรอดนานกว่า 1 ปี	39
ภาพที่ 6 ระดับของไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และ IL-17 ในผู้ป่วย vascular pythiosis ที่ได้รับการรักษา ด้วย PIA immunotherapy และมีชีวิตรอดสั้นกว่า 1 ปี	40
ภาพที่ 7 ระดับของไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และ IL-17 ในผู้ป่วย ocular pythiosis ที่ได้รับการรักษา ด้วย PIA immunotherapy.....	41

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

BA	=	Blood agar
BG	=	(1->3)- β -D-glucan
CFAs	=	Culture filtrate antigens (CFAs)
COXII	=	Cytochrome oxidase
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
EV	=	ELISA value
GM	=	Galactomannan
GMS	=	Gomori's methenamine-silver nitrate stain
H	=	Healthy volunteer without hematological disorder disease
H&E	=	Hematoxylin and Eosin
HRM	=	High resolution melting analysis
HT	=	Healthy volunteer with thalassemia
IgG	=	Immunoglobulin G
IgM	=	Immunoglobulin M
IGS	=	Intergenic spacer
IFN- γ	=	Interferon-gamma
IL-17	=	Interleukin-17
ITS	=	Internal transcribed spacer
KOH	=	Potassium hydroxide
LCB	=	Lactophenol cotton blue
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
mo	=	Month
nm	=	Nanometer
OP	=	Ocular pythiosis
PAS	=	Periodic Acid-Schiff
PBS-T	=	Tween 20-phosphate-buffered saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
PIA	=	<i>Pythium insidiosum</i> antigen
<i>P. insidiosum</i>	=	<i>Pythium insidiosum</i>
<i>Pi</i> -Ab	=	<i>Pythium insidiosum</i> specific antibody
SDA	=	Sabouraud dextrose agar

tHDA-RFLP = Isothermal helicase DNA amplification-restriction fragment length polymorphism

vol/vol = Volume by volume

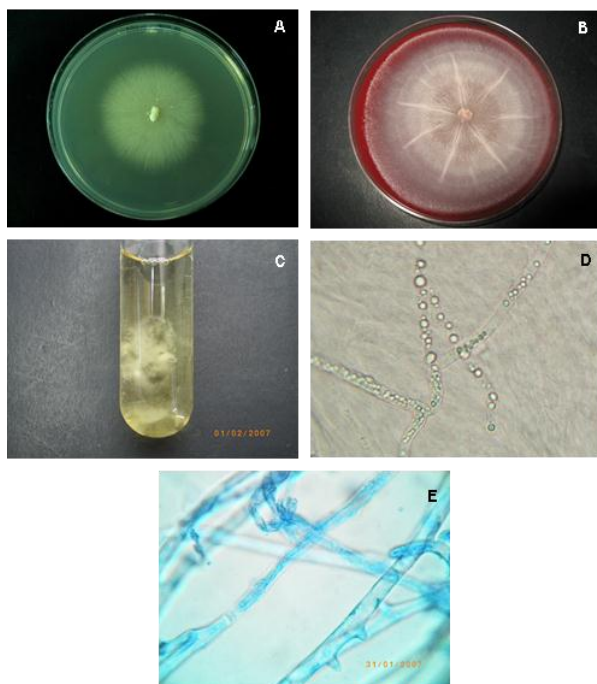
VP = Vascular pythiosis

y = Year

บทนำ (Introduction)

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

โรคพืทิโอซิส (Pythiosis) จัดเป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งที่ก่ออันตรายถึงแก่ชีวิต พบในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมทั้งสัตว์ปีกในแถบประเทศเขตร้อน โดยมีเชื้อ *Pythium insidiosum* (*P. insidiosum*) หรือที่รู้จักกันในชื่อของ “ราน้ำ (Aquatic fungi)” เป็นเชื้อสาเหตุ เชื้อดังกล่าวจัดอยู่ใน class oomycetes, kingdom Stramenopila ลักษณะทางมหสังฐาน (macroscopic morphology) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด sabouraud dextrose agar (SDA) และ blood agar (BA) ณ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส พบเป็นโคโลนีเจริญภายใต้วุ้น (submerge colony) คล้ายขนแมว สีครีม อัตราการเจริญเร็ว (ภาพที่ 1A, B) หรือพบเป็นเส้นสายราฟูเบาในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB ชนิดเหลว (ภาพที่ 1C) ลักษณะทางจุลสังฐาน (microscopic morphology) พบเป็นราเส้นสาย มีผนังกันน้อยมาก (broad rare septate hyphae) (ภาพที่ 1D, E) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยการวิเคราะห์ในระดับสารพันธุกรรมกลับพบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสิ่งมีชีวิตจำพวกสาหร่ายและไดอะตอมมากกว่าเชื้อรา ประกอบกับผลจากการศึกษาวิจัยพบว่าเชื้อ *P. insidiosum* มีองค์ประกอบของผนังเซลล์บางอย่างที่แตกต่างจากเชื้อราทั่วไป ทำให้ในปัจจุบันเชื่อกันถูกจัดจำแนกว่าเป็นเชื้อจุลชีพที่ไม่ใช่เชื้อราแท้จริง (fungus like organism/parafungus) ในธรรมชาติเชื้อ *P. insidiosum* นี้มีถิ่นที่อยู่ในดินที่ชื้นแฉะ แหล่งน้ำทางการเกษตร ตลอดจนแหล่งชลประทานในพื้นที่เขตร้อนชื้น จะอยู่ในรูปแบบที่เป็นเส้นใย (hyphae) มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้าง zoospore ซึ่งมี flagella จำนวน 2 เส้น ทำหน้าที่ในการเคลื่อนไหวและใช้ในการยึดเกาะกับพื้นผิวต่างๆ อาทิเช่น ใบพืช เชื่อกันว่าการเกิดโรคเกิดหลังจากที่ zoospore สลัด flagella และไปยึดเกาะบริเวณบาดแผลของ host จากนั้นเชื้อจะสร้างเส้นใยบุกรุกเข้าไปยัง host ก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่แตกต่างกันขึ้นกับบริเวณที่ติด



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะมหสังฐานและจุลสังฐานของเชื้อ *P. insidiosum* (A) อายุ 3 วัน เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ sabouraud dextrose agar (SDA), (B) อายุ 5 วัน เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar (BA), (C) อายุ 2 วัน เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ sabouraud dextrose broth (SB) ณ อุณหภูมิ 35°C, (D) ลักษณะของเชื้อ *P. insidiosum* ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบลักษณะ broad rare-septate hyphae ใน 10% สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) และ (E) สารละลาย lactophenol cotton blue (LCB)

เชื้อ อาการของโรค pythiosis ในคนจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) การติดเชื้อในหลอดเลือดแดง (vascular/systemic pythiosis) 2) การติดเชื้อบริเวณกระจกตา (ocular pythiosis) และ 3) การติดเชื้อบริเวณผิวหนัง (cutaneous/subcutaneous type) โดยที่การติดเชื้อในหลอดเลือดแดงและการติดเชื้อบริเวณกระจกตานั้นพบมากที่สุดของคน ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในหลอดเลือดแดงมักมาพบแพทย์ด้วยอาการมีแผลปวด บวม และที่ปลายระยะยาค์ที่ติดเชื้อมักจะพบเป็น gangrene (chronic swelling, painful granulomatous, gangrenous ulceration) เมื่อทำ angiogram จะพบกลุ่มเชื้อในหลอดเลือดแดงใหญ่ (arterial occlusion) ผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงเหล่านี้ส่วนใหญ่ประกอบอาชีพด้านเกษตรกรรมและ/หรือมีประวัติสัมผัสกับแหล่งน้ำทางธรรมชาติซึ่งสอดคล้องกับรายงานการเพาะแยกเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวได้จากแหล่งน้ำทางการเกษตรและแหล่งชลประทานในประเทศไทยโดย Supabandhu J และคณะ ในปี ค.ศ. 2008 เป็นที่น่าสังเกตว่าผู้ป่วย vascular pythiosis ในประเทศไทยกว่าร้อยละ 99 มีประวัติความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงร่วมด้วย เช่น โรค Thalassemia, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) เป็นต้น ซึ่งประเทศไทยนับเป็นพื้นที่ที่ประชากรมีความผิดปกติของพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างเม็ดเลือดแดงแหล่งใหญ่แห่งหนึ่งของโลก ส่งผลให้พบประชากรที่เป็นโรคดังกล่าวกว่าร้อยละ 1 ของประชากรไทยทั้งหมดหรือคิดเป็นประมาณ 650,000 ราย และพบพาหะของโรค thalassemia ประมาณร้อยละ 30-40 ของประชากรหรือคิดเป็นประมาณ 18-24 ล้านคน โดยสาเหตุของโรคดังกล่าวนี้เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรแถบเอเชียอาคเนย์ รวมถึงประชากรไทยเอง (ข้อมูลจากกระทรวงสาธารณสุข ปี 2556) ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อบริเวณกระจกตามักจะเป็น corneal ulcer หรือ keratitis หลังมีสิ่งแปลกปลอมกระเด็นเข้าตา เช่น เศษกิ่งไม้/ใบไม้ เป็นต้น แล้วล้างตาด้วยแหล่งน้ำธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับด้านเกษตรกรรม ซึ่งหากผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยหรือการรักษาที่ล่าช้า/ไม่ถูกต้อง ด้วยคุณสมบัติการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* ที่รวดเร็วทำให้สามารถลุกลามจาก localize infection เข้าสู่ระบบเลือดไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย นำไปสู่การสูญเสียอวัยวะและก่อให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตในที่สุด

ด้วยปัจจัยต่างๆ ทั้งสภาพอากาศร้อนชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของตัวเชื้อเอง ลักษณะทางพันธุกรรมที่ผิดปกติของกลุ่มประชากร ตลอดจนวิถีชีวิตการประกอบอาชีพใกล้แหล่งน้ำ เหล่านี้ล้วนเอื้ออำนวยต่อความเสี่ยงในการติดเชื้อทั้งสืบส่งผลให้นับแต่มีรายงานโรค pythiosis ในคนครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อปี ค.ศ. 1985 ประเทศไทยก็คงยังเป็นประเทศที่มีรายงานอุบัติการณ์ของโรค pythiosis ในคนสูงที่สุดในโลกจนถึงปัจจุบัน กล่าวคือประมาณ 102 รายเท่าที่มีหลักฐานว่าเป็นโรคนี้จริงทั้งจากการตรวจพบเชื้อในรอยโรค การแยกเชื้อและการจัดจำแนกเชื้อว่าเป็นเชื้อ *P. insidiosum* และการตรวจพบ specific antibody ต่อเชื้อ *P. insidiosum* ในรอบ 18 ปี (ค.ศ.1986-2003) โดยพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยอ้างอิงจากบันทึกการขอรับ *P. insidiosum* antigen (PIA) ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ซึ่งจะได้กล่าวในรายละเอียดของ PIA ต่อไป) พบว่าระหว่างปี ค.ศ. 2011-2015 นั้นมีผู้ป่วยติดต่อขอรับ PIA เพิ่มสูงถึง 92 ราย ในรอบเพียง 6 ปีเท่านั้น ซึ่งแนวโน้มการเพิ่มขึ้นดังกล่าวส่วนหนึ่งอาจเป็นผลสืบเนื่องจากการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการที่พัฒนาขึ้นประกอบกับโรคดังกล่าวเป็นที่รู้จักแพร่หลายในวงการแพทย์มากขึ้น นอกจากนี้ในช่วง 5 ปีหลังมานี้มีรายงานของ ocular pythiosis ในประเทศอินเดีย หลังจากที่ไม่มียาานมานานนับเป็น 10 แล้ว และยังพบผู้ป่วยที่วินิจฉัยได้จาก

ประเทศอื่นในแถบภูมิภาคเอเชีย เช่น สาธารณรัฐมาเลเซีย เป็นต้น ด้วยลักษณะภูมิอากาศและการดำเนินชีวิตของประชากรที่คล้ายคลึงกันในประเทศแถบนี้ทำให้คณะผู้วิจัยเชื่อว่ายังมีผู้ป่วย pythiosis อีกจำนวนหนึ่งในพื้นที่ในประเทศใกล้เคียงบ้านเรา ที่ยังไม่ได้รับการวินิจฉัยและการรักษาที่ถูกต้อง เช่น เวียดนาม กัมพูชา ลาว เป็นต้น

ด้วยลักษณะเฉพาะของตัวเชื้อ *P. insidiosum* ที่เจริญเร็วและก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรง การตรวจวินิจฉัยที่โรคที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วจึงเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่จะเพิ่มโอกาสการรักษาให้กับผู้ป่วย เมื่อผู้ป่วยมาพบแพทย์ด้วยอาการและประวัติที่เข้าข่ายการติดเชื้อ *P. insidiosum* แพทย์จะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณที่ติดเชื้อ ได้แก่ หลอดเลือดที่ได้จากการผ่าตัดอวัยวะติดเชื้อกรณีติดเชื้อแบบ systemic infection หรือชิ้นเนื้อบริเวณกระจกตากรณีติดเชื้อแบบ ocular type เพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งในปัจจุบันวิธีการพิสูจน์ทราบ genus และ species ของเชื้อ *P. insidiosum* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) ก็ยังคงเป็นวิธีมาตรฐานเช่นเดียวกับการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อกลุ่ม oomycetes ที่สามารถสร้าง zoospore ได้เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ทำให้การทดสอบการสร้าง zoospore เป็นอีกหนึ่งวิธีที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ *P. insidiosum* ออกจากเชื้อรากลุ่มอื่น ด้วยความไวต่ออุณหภูมิต่ำและความชื้นน้อย การนำส่งตัวอย่างชิ้นเนื้อในสภาวะที่เหมาะสม นั่นคือ นำส่งในสภาวะปลอดเชื้อ ไม่แช่ตู้เย็น/ไม่แช่น้ำแข็ง เติมน้ำกลั่นและ/หรือน้ำเกลือเล็กน้อยเพื่อให้ความชื้นแก่ตัวเชื้อ ล้วนเป็นการเพิ่มโอกาสการเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ นอกจากการเพาะแยกเชื้อแล้ว ปัจจุบันวิธีการตรวจวินิจฉัยโรค pythiosis หลายวิธีถูกพัฒนาขึ้น อาทิเช่น

1. การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากชิ้นเนื้อตัวอย่าง (direct examination/histopathology)

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ถูกย่อยด้วยสารละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% (10% KOH) จะสังเกตเห็น broad rare-septate hyphae ซึ่งเป็นลักษณะที่พบเห็นได้ทั้งในผู้ป่วยติดเชื้อ *P. insidiosum* และเชื้อราชนิดอื่นๆในกลุ่ม zygomycetes และหากนำชิ้นเนื้อนั้นมาย้อมด้วย Hematoxylin and Eosin (H&E), Gomori's methenamine-silver nitrate stain (GMS) และ Periodic Acid-Schiff (PAS) ก็จะมีการติดสีของเส้นใยลักษณะ broad rare-septate hyphae เช่นเดียวกัน แม้ว่าวิธีการเหล่านี้จะใช้เวลานาน แต่อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยชี้ชัดถึงการติดเชื้อ *P. insidiosum* จากการสังเกตลักษณะทางจุลทรรศณดังกล่าวนี้เป็นเรื่องที่ค่อนข้างยากต้องอาศัยวิธีการอื่นควบคู่ไปด้วย

2. วิธีการทางน้ำเหลืองวิทยา (Serology)

นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1925 นักวิจัยหลายกลุ่มได้เริ่มต้นศึกษาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรค pythiosis โดยอาศัยเทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยา ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกันไป ดังนี้

- 2.1 Immunodiffusion test

วิธีนี้ถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกโดยกลุ่มของ Miller อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีในตัวอย่างน้ำเหลืองกับแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* ใน agar based และอ่านผลจากเส้นสีขาวขุ่นในเนื้อวุ้นที่เกิดจากปฏิกิริยานั้นๆ ในยุคแรกนี้แอนติเจนที่ใช้ถูกเตรียมจากเส้นใยของเชื้อ

P. insidiosum ที่ตายแล้วและทำให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยคลื่นเสียง (sonicated hyphae of killed *P. insidiosum*) แต่อย่างไรก็ตามด้วยความคงตัวที่จำกัดของแอนติเจนนี้ ต่อมากลุ่มของ Mendoza L. ได้พัฒนาแอนติเจนชนิดใหม่ขึ้นซึ่งมีความคงตัวนานกว่า เรียกว่า culture filtrate antigens (CFAs) ด้วยหลักการการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ของเทคนิคดังกล่าว วิธีการนี้จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยติดเชื้อ pythiosis ระยะเริ่มแรก แต่จะให้ผล false negative สำหรับผู้ป่วยเรื้อรัง ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว ทำให้ปัจจุบันวิธีการอื่นที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าถูกพัฒนาขึ้นมาแทนที่

2.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ด้วยข้อจำกัดของเทคนิค immunodiffusion test ในแง่ของระยะเวลาการติดเชื่อ เทคนิค ELISA จึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อก้าวข้ามข้อจำกัดดังกล่าว เทคนิคนี้ถูกพัฒนาภายใต้หลักการของการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG จึงสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื่อได้แม้ในระยะเรื้อรัง ด้วยความไวและความจำเพาะที่สูง ทำให้ในปัจจุบัน ELISA ถูกนำมาใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรค pythiosis ในห้องปฏิบัติการอย่างแพร่หลาย

2.3 Western blot analysis

Western blot เป็นเทคนิคการตรวจหาแอนติบอดีในตัวอย่างน้ำเหลืองเช่นเดียวกับ 2 วิธีที่กล่าวมาข้างต้น เทคนิคนี้มีข้อดีที่สามารถบ่งบอก antigenic immunogens ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ทดสอบได้ แต่ด้วยเป็นเทคนิคแบบ membrane-based จึงมีความไวต่ำกว่า ELISA ซึ่งเป็นเทคนิคแบบ solution-based ปัจจุบันเทคนิคนี้จึงได้รับความนิยมใช้ในงานวิจัยหรือการศึกษาเชิงลึกมากกว่าใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางคลินิก

3. วิธีการทางอณูชีววิทยา (Molecular diagnosis-DNA based)

เทคโนโลยีทางอณูชีววิทยา นับเป็นเทคโนโลยีที่ได้รับการพัฒนามาช้านาน การศึกษาลำดับสารพันธุกรรมมีประโยชน์ยิ่งไม่เพียงเพื่อการตรวจหาเชื้อในสิ่งส่งตรวจเท่านั้น แต่ยังสามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อได้ ในเชื้อ *P. insidiosum* มีการศึกษาพบว่าลำดับสารพันธุกรรมบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) region และ ribosomal intergenic spacer (IGS) มีความสามารถจัดจำแนกเชื้อได้ทั้งในระดับ genus และ species ได้ ในขณะที่ยีน cytochrome oxidase (COXII) นั้นสามารถจัดจำแนกได้ทั้งระดับ genus, species และ sister group หรือระดับ clade ในการประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัยนั้นก็มีหลายรายงาน (Ref.....) เช่น การตรวจหาเชื้อ *P. insidiosum* โดยเทคนิค nested-PCR การตรวจหาและจัดจำแนกเชื้อ *P. insidiosum* ถึงระดับ clade โดยใช้เทคนิค high resolution melting analysis (HRM) และเทคนิค isothermal helicase DNA amplification-restrict fragment length polymorphism (tHDA-RFLP) เป็นต้น

ในด้านของการรักษานั้น ด้วยเชื้อก่อโรค *P. insidiosum* เป็นจุลชีพที่ไม่ใช่เชื้อราแท้จริง การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะต้านเชื้อราเพียงอย่างเดียวจึงให้ผลไม่ดีเท่าที่ควร ปัจจุบันแพทย์มักเลือกใช้การรักษาแบบผสมผสาน (combination therapy) ระหว่างการให้ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อรา (antifungal agent) การผ่าตัดเอาบริเวณที่ติดเชื้อมาก (amputation) และการรักษาแบบ immunotherapy โดยให้ *P. insidiosum* antigen

(PIA) ทางชั้นใต้ผิวหนัง ซึ่งในปัจจุบันผู้ป่วย 1 รายจะได้รับ PIA ทั้งหมด 7 doses ณ ช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ เดือนที่ 0 (1st dose), 0.5 (2nd dose), 1 (3rd dose), 1.5 (4th dose), 3 (5th dose), 6 (6th dose) และ 12 (7th dose) ตามลำดับ ด้วยการให้ PIA immunotherapy (PIAI) ในผู้ป่วยนี้ได้มีการทดลองในมาแล้วพบว่า PIA จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ตอบสนองโดยเปลี่ยนแปลงรูปแบบการหลั่งไซโตไคน์ซึ่งเป็นการตอบสนองผ่านระบบเซลล์ (cell mediated immune response: CMI) ทำให้มาที่ติดเชื่อนั้นมีอาการทางคลินิกที่ดีขึ้น สำหรับการติดตามผลการรักษานั้น ในทุกครั้งผู้ป่วยกลับมาพบแพทย์เพื่อการติดตามการรักษาหรือรับ PIA แพทย์จะประเมินผลการรักษาจากอาการทางคลินิกภายนอกโดยรวม เช่น แผลผ่าตัดที่ดีขึ้นหรือไม่ อาการไข้ลดลงหรือไม่ อย่างไรและการสอบถามผู้ป่วยถึงอาการเจ็บแผลกรณีผู้ป่วย vascular pythiosis / การพัฒนาขึ้นของการมองเห็นในกรณีผู้ป่วย ocular pythiosis ซึ่งการประเมินผลการรักษานี้ขึ้นกับดุลยพินิจของแพทย์แต่ละคน ไม่ได้มีวิธีที่เป็นมาตรฐานชัดเจน ในการรักษาโดยทั่วไป ผู้ป่วยอาจพบแพทย์ที่ไม่ใช่คนเดิม และอาจมีการโอนย้ายโรงพยาบาล ดังนั้นการติดตามการดำเนินโรคที่เป็น subjective จึงเป็นจุดที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งและควรที่จะได้รับการพัฒนาเพื่อประโยชน์ของผู้ป่วย

แม้ว่าในปัจจุบันการตรวจหาสารทางชีวภาพในการตรวจติดตามโรคติดเชื้อราและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอาการที่แสดงออกทางคลินิกและการดำเนินไปของโรคในตัวอย่างน้ำเหลือง (serum biomarkers) ได้มีการพัฒนาแล้วหลายชนิดใน อาทิเช่น การตรวจหาสาร cryptococcus antigen ในผู้ป่วยโรค cryptococcosis, การตรวจหาสาร galactomannan (GM) ในผู้ป่วยโรค aspergillosis, fusariosis, penicilliosis และ histoplasmosis เป็นต้น นอกจากสารทางชีวภาพข้างต้น ปัจจุบันมีสารชีวภาพอีกชนิดหนึ่งที่กำลังเป็นที่นิยมแพร่หลายในวงการแพทย์เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อราและติดตามการดำเนินไปของโรคนั้นคือ สาร (1->3)- β -D-glucan (BG) สารดังกล่าวเป็นสารประกอบกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ หนึ่งในองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์ (cell-wall) ของเชื้อราส่วนใหญ่ รวมถึงเชื้อ *P. insidiosum* ด้วยระหว่างการศึกษาของเส้นใยส่วนประกอบของผนังเซลล์จะหลุดลอกทำให้สามารถตรวจวัดได้ และจากคุณสมบัตินี้ได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาส่วนประกอบของเชื้อหรือแอนติเจนในเลือดหรือสารคัดหลั่งบางชนิด ในกรณีนี้สาร BG ที่เป็นองค์ประกอบโครงสร้างภายนอกเซลล์ก็มีคุณสมบัติเช่นเดียวกัน คือ ระหว่างเซลล์เจริญในเลือดมีผลให้ปริมาณสาร BG ที่สูง จึงเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการปัจจุบันชุดตรวจสารดังกล่าวถูกพัฒนาขึ้นจากหลายบริษัท หนึ่งในนั้นคือ Fungitell assay ซึ่งได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยา ชุดตรวจนี้ทำงานตามหลักการของ ELISA และหลักกลศาสตร์ของกระบวนการทางชีวเคมี กล่าวโดยย่อคือ สาร (1->3)- β -D-glucan จะกระตุ้น substrate factor G (horseshoe crab coagulation factor) ให้กลายเป็น activated factor G พร้อมทำหน้าที่ในการเปลี่ยน proclotting enzyme ให้กลายเป็น clotting enzyme ซึ่ง clotting enzyme ดังกล่าวจะทำการเปลี่ยน chromogenic substrate Boc-Leu-Gly-Arg-p-nitroanilide ซึ่งไม่มีสีให้กลายเป็น p-nitroanilide สีเหลือง จากนั้นติดตามผลโดยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ณ ความยาวคลื่น 405 และ 490 (background) ตามลำดับ

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่านอกจากวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพและการตรวจวินิจฉัยโรคที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็วแล้ว การตรวจติดตามและประเมินผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพนั้นนับเป็นอีกปัจจัย

สำคัญยิ่งที่มีผลต่อโอกาสประสบความสำเร็จในการรักษา ดังนั้นงานวิจัยเพื่อการพัฒนาการตรวจติดตามและประเมินผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพและเป็นมาตรฐานเดียวกันในสถานพยาบาลแต่ละแห่งยังคงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยต่อไป รวมถึงผู้ป่วยโรค pythiosis ซึ่งประเทศไทยเป็นพื้นที่ระบาดและพบมีจำนวนผู้ป่วยสูงขึ้นทุกปี

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคพิติโอซิส (pythiosis) เป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งที่เกิดจากเชื้อรา *P. insidiosum* จุลชีพลักษณะคล้ายเชื้อรา แต่ไม่ใช่เชื้อราแท้จริง นับเป็นเชื้อเพียง species เดียวใน genus *Pythium* ที่ก่อโรคในมนุษย์ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก ส่วนใหญ่เท่าที่มีรายงานจนถึงปัจจุบันเป็นอุบัติการณ์ในประเทศเขตร้อนชื้น รวมถึงประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศที่มีรายงานการเกิดโรค pythiosis ในคนสูงที่สุดในโลก ในปี ค.ศ.2006 มีรายงานรวบรวมผู้ป่วยโรค pythiosis จำนวนกว่า 100 ราย ทั่วทุกภาคในประเทศไทยจาก 9 สถาบันในช่วงปี 1986-2003 จากนั้นมาก็มีรายงานเป็น case report และอ้างอิงจากบันทึกการขอรับ *P. insidiosum* antigen (PIA) ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้รับ authority ในการใช้ PIA พบว่ามีผู้ป่วยอย่างน้อย 5-10 ราย/ปี ที่แพทย์ขอรับ PIA เพื่อการรักษา โดย PIA ที่เตรียมเป็น PIA ที่จดลิขสิทธิ์ของ Michigan State University โดย Dr. L. Mendoza เป็นผู้คิดค้น และไม่มีค่าใช้จ่ายใดๆ สำหรับ PIA ที่ใช้ในการรักษา immunotherapy โดยการใช้ PIAI นั้น ต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยในการรับการรักษา ก่อน ด้วยผู้ป่วยติดเชื้อ *P. insidiosum* ส่วนใหญ่เป็นผู้ที่มีเศษฐานะยากจน ตามที่ได้ตกลงกับทางผู้คิดค้น) ประมาณ 3-5 ปีมานี้ เริ่มมี case report จากประเทศอื่น และคาดว่าในประเทศเราเองยังมีผู้ป่วยอีกจำนวนหนึ่งที่ไม่ได้รับการวินิจฉัย และหรือการรักษาที่ถูกต้อง จะเห็นว่า จำนวนผู้ป่วยนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการที่พัฒนาขึ้นประกอบกับโรคดังกล่าวเป็นที่รู้จักแพร่หลายมากขึ้น การติดเชื้อในคนมักพบเป็นการติดเชื้อในหลอดเลือดแดง (vascular/systemic pythiosis) และการติดเชื้อบริเวณกระจกตา (ocular pythiosis) จากการวินิจฉัยด้วย angiogram ซึ่งเป็นการตรวจหาบริเวณการอุดตันของเส้นเลือดในผู้ป่วย vascular pythiosis และมักพบการอุดตันในหลอดเลือดแดงใหญ่ (arterial occlusion) นั้น เป็นวิธีการ semi-quantitative ที่มีประสิทธิภาพแต่มีค่าใช้จ่ายที่สูงมากประมาณ 50,000 บาท/ครั้ง และยังคงมาวินิจฉัยในสถาบันการแพทย์ที่มีเครื่องมือเท่านั้น จึงถือเป็นขีดจำกัดที่สูง ในปัจจุบันแม้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับโรคติดเชื้อนี้จะพัฒนาไปมาก ทั้งการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน การตรวจหา Antibody และสารพันธุกรรมด้วยวิธี polymerase chain reaction ของเชื้อ แต่ทว่าในด้านการรักษายังมีขีดจำกัดอยู่มาก ยังไม่มีวิธีที่เป็นมาตรฐานชัดเจนด้วยเชื้อสาเหตุก่อโรค *P. insidiosum* ไม่ใช่เชื้อราแท้จริง การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะต้านเชื้อราให้ผลไม่ดีเท่าที่ควรประกอบกับความรู้อย่างเข้าใจในกลไกการเกิดโรคดังกล่าวยังมีอยู่น้อยมาก ในปัจจุบันการรักษาอ้างอิงตามรายงานการวิจัยโดยมักใช้การรักษาแบบผสมผสาน (combination therapy) ระหว่างการให้ยาปฏิชีวนะและการผ่าตัดบริเวณติดเชื้อร่วมกับการให้ PIA ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนของเชื้อ ด้วยสมมติฐานว่า PIA จะไปกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อให้ร่างกายเกิดสมดุลง่ายและสามารถทำลายเชื้อได้ ดังเช่นการศึกษาของ Dr. Mendoza และคณะในม้าที่เป็นโรค pythiosis และได้รับ PIA แต่อย่างไรก็ตามหลักฐานการศึกษาในคนนั้น

น้อยมาก จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าประมาณ 2-4 สัปดาห์หลังจากให้ PIA แล้ว จึงจะพบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่เปลี่ยนแปลงจากช่วงก่อนให้ PIA ในปัจจุบัน regimen ของ PIAI จะให้ PIA ทุก 2 สัปดาห์เป็นระยะเวลา 1.5 เดือน จากนั้นจะให้ที่เดือนที่ 3, 6, 12, 18 และทุก 1 ปี กว่า 10 ปีที่มีการใช้ PIA ในคนจวบจนปัจจุบัน ยังไม่พบรายงานการเกิดผลข้างเคียงในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย PIA รายงานที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของการรักษาแบบผสมผสานรวมถึงการให้ PIA มีจำกัดและรายงานว่าประสิทธิภาพในการรักษามีประมาณ 50-60% โดยในรายงานทั้งหลายนี้มีข้อมูลที่ต้องคำนึง คือ ผู้ป่วยมีอาการที่แตกต่างกันในขณะเริ่มการรักษา หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ ความรุนแรงของโรคมีความแตกต่างกัน ในการอภิปรายจะพบว่าผลการรักษาขึ้นอยู่กับ การเริ่มรักษาผู้ป่วยในระยะแรกหรือระยะรุนแรง ดังนั้นการวินิจฉัยได้เร็วและรวมถึงการรักษาที่เร็วจะช่วยลดความเสี่ยงและการเสียชีวิตได้ดี สำหรับการติดตามผลการรักษานั้นจวบจนปัจจุบัน จะใช้วิธีการสอบถามโดยตรงจากผู้ป่วยถึงอาการเจ็บแผลหรือประสิทธิภาพการมองเห็นในผู้ป่วยที่ติดเชื้อบริเวณดวงตาซึ่งไม่มีหลักฐานหรือข้อมูลที่ชัดเจนในการติดตามผลครั้งต่อไป การตรวจติดตามอาการผู้ป่วยด้วย angiogram คงมีความเป็นไปได้เล็กน้อยด้วยค่าใช้จ่ายที่สูงมาก จะเห็นว่ามาจนขณะนี้ยังไม่มีวิธีการตรวจติดตามที่มีประสิทธิภาพ ด้วยข้อจำกัดทั้งหลายทั้งด้านความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการเกิดพยาธิสภาพของโรค การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเมื่อมีการติดเชื้อและได้รับการรักษาด้วย PIA ตลอดจนเครื่องมือในการติดตามผลการรักษาที่เป็นมาตรฐาน คณะผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบองค์รวมในผู้ป่วยโรคติดเชื้อ pythiosis ทั้งก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วย PIA โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของระดับสารชีววัดทางชีวภาพต่างๆ ได้แก่ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. insidiosum*, ไซโตไคน์ที่เป็นตัวแทนการตอบสนองผ่านทาง Th1, Th2, Th17, Th22 และสาร BG ซึ่งเป็นสารที่แสดงถึงเชื้อที่อยู่ในกระแสเลือด

สาร BG เป็นสารองค์ประกอบหลักชนิดหนึ่งในโครงสร้างผนังเซลล์ (cell wall) ของเชื้อรา รวมถึงเชื้อ *P. insidiosum* ทำหน้าที่เป็น immunogen ตัวหลักในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายผ่านทาง dectin-1 receptor สารดังกล่าวจะหลุดออกจากตัวเชื้อเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองของร่างกาย (ผลจาก preliminary study ของคณะผู้วิจัย) ด้วยกระบวนการเจริญของสายใย (hyphae) จะทำให้ส่วนประกอบของผนังเซลล์หลุดลอยในกระแสเลือด ดังนั้นในทางทฤษฎีระดับของสาร BG ในน้ำเหลืองสามารถบ่งชี้ถึงปริมาณของเชื้อ *P. insidiosum* ในร่างกายได้ การปรับชุดตรวจสารนี้มีราคาต่ำกว่าการทำ angiogram ถึงประมาณกว่า 10 เท่า ดังนั้นหากระดับของสาร BG ในตัวอย่างน้ำเหลืองสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การดำเนินโรคได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ป่วย โดยข้อมูลการศึกษาการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแบบองค์รวมนี้จะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจพื้นฐานถึงกลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันเพื่อการศึกษาต่อยอดในอนาคต รวมถึงการพัฒนาแนวทางการรักษาโรค pythiosis ด้วยวิธี immunotherapy ตลอดจนเป็นการพิสูจน์ประสิทธิภาพตัวชีววัดทางชีวภาพเพื่อใช้ในการตรวจติดตามผลการรักษาโรคต่อไป

อนึ่งโรคนี้เป็นโรคที่พบในเขตร้อนชื้นซึ่งเป็นลักษณะภูมิอากาศในเขตเอเชียอาคเนย์เช่นกัน ประเทศไทยมีรายงานการพบผู้ป่วยทุกปี แต่ยังมีรายงานผู้ป่วยจากประเทศข้างเคียงนั้นยังมีน้อยมาก คาดว่าอาจเป็นด้วยข้อมูลเกี่ยวกับการติดเชื้อ การก่อโรค การวินิจฉัยทั้งทางคลินิกและทางห้องปฏิบัติการที่ไม่ถึง ทำให้เกิดความเข้าใจผิดในการวินิจฉัยว่าเป็นโรคติดเชื้อราดังที่ประเทศเราเคยมีประสบการณ์มาก่อน การศึกษานี้อาจเป็นจุด

แข็งหนึ่งภายใต้โครงการ Asean Economic Community (AEC) ที่สามารถช่วยเหลือประเทศข้างเคียงในการ
วินิจฉัยการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อนี้ได้

ด้วยข้อมูลเกี่ยวเนื่องกับการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อ *P. insidiosum* ยังไม่เห็น
รูปแบบที่ชัดเจนและยังมีเพียงการนำเสนอว่ามีการปรับเปลี่ยนรูปแบบของการตอบสนองเพื่อการทำลายเชื้อ
ในที่นี้คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันแบบองค์รวมโดยอาศัย
หลักการการตอบสนองของการติดเชื้อรา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยประจำปี
2556 และทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2559 แต่อย่างไร
ก็ตามเพื่อความสมบูรณ์และการสังเคราะห์ผลที่ถูกต้อง จึงจำเป็นต้องศึกษาตรวจวัดระดับไซโตไคน์ให้ครอบคลุม
เพิ่มเติมอีก 3 ชนิด เป็นอย่างน้อย ได้แก่ IL-12, IFN- γ ตัวแทนของการตอบสนองผ่านทาง Th1 และ IL-
17 ตัวแทนของการตอบสนองผ่านทาง Th17 ด้วยการตอบสนองผ่านทางทั้ง Th1 และ Th17 เป็นเซลล์กลุ่ม
หลักที่มีการตอบสนองและกำจัดเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ ควบคู่ไปกับการทดสอบหาระดับสาร BG และ
ระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. insidiosum* ในตัวอย่างน้ำเหลืองจากผู้ป่วยอีก เพื่อความแม่นยำ ถูกต้อง
และชัดเจนของผลการทดสอบ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อหาตัวชี้วัดทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ มีความไว แม่นยำในการตรวจ การติดตามและพยากรณ์
ผลการรักษาโรคในผู้ป่วย pythiosis ที่รับการรักษาด้วย immunotherapy

ขอบเขตของโครงการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำเหลืองจากผู้ป่วย vascular และ ocular pythiosis ที่ได้รับการตรวจยืนยันการติดเชื้อ
P. insidiosum และให้ผลบวกอย่างน้อย 2 ใน 3 การทดสอบแล้วด้วยวิธีการ

- เพาะแยกเชื้อได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโดยตรง และมีการพิสูจน์ยืนยันเชื้อดังกล่าวว่าเป็น
P. insidiosum จริงด้วยการกระตุ้น zoospores และการวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencing)
 - การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. insidiosum* ด้วยวิธี in-house ELISA
 - เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (PCR) โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ และวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencing)
- ตัวอย่างเหล่านี้ได้จากหลายโรงพยาบาลที่แพทย์ติดต่อขอรับ PIA และผู้ป่วยเข็นตียินยอมในการรับ
PIA เพื่อการรักษาและการให้ตัวอย่างเพื่อการศึกษาวิจัย

การศึกษาวิจัยและการวิเคราะห์ผล

ศึกษากลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบองค์รวมในตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วยโรคติดเชื้อ pythiosis ก่อน/หลังได้รับการรักษาด้วย PIA ณ เวลาต่างๆ (รูปที่ 1) และวิเคราะห์ผลการทดสอบร่วมกับข้อมูลทางคลินิกในแต่ละระยะ โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของระดับสารชี้วัดทางชีวภาพ ดังนี้

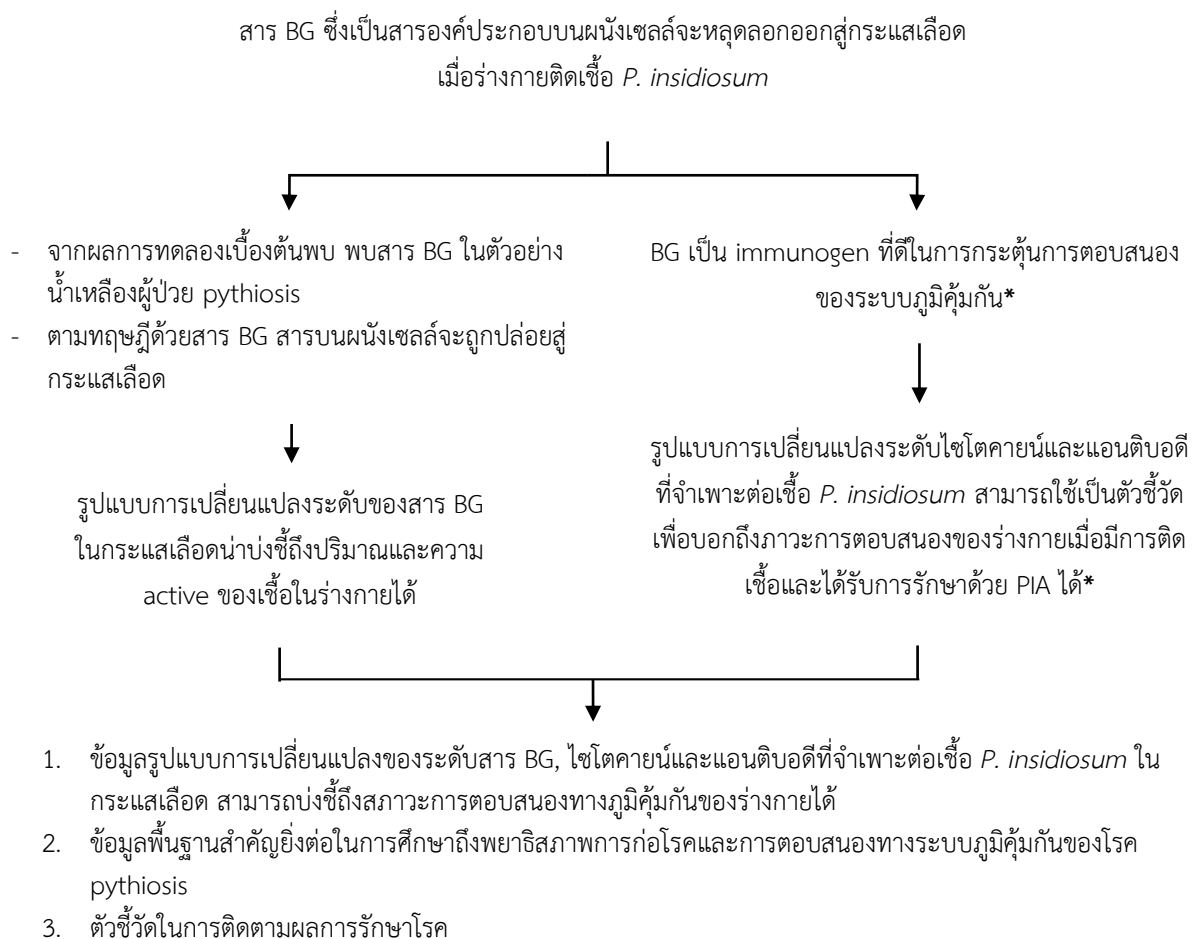
- แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. insidiosum**
- ไซโตคายน์ที่เป็นตัวแทนการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันผ่านทาง
 - Th1: IFN-gamma, IL-2*
 - Th2*: IL-1beta, IL-4, IL-5, IL-6
 - Th17: IL-17
 - Th22*: TNF-alpha
- สาร (1-3)- β -D-glucan
 - * หมายเหตุ อยู่ในขอบเขตการศึกษาในโครงการใหญ่โดยคณะผู้วิจัย

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ทฤษฎี สมมุติฐาน

เมื่อเชื้อ *P. insidiosum* เข้าสู่ร่างกายและเข้าสู่กระแสเลือด จะพบสาร BG ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักบนผนังเซลล์ของเชื้อหลุดออกมาในน้ำเหลือง ซึ่งสารดังกล่าวจะทำหน้าที่กระตุ้นการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันก่อให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ต่อไป ดังนั้นระดับของสาร BG และไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงในกระแสเลือดจึงสามารถนำมาประยุกต์เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพเพื่อพยากรณ์และติดตามผลการรักษาในผู้ป่วย pythiosis ได้

กรอบแนวความคิดของการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 11.1 ความรู้ความเข้าใจพื้นฐานถึงกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพื่อการศึกษาต่อยอดในอนาคต
- 11.2 การค้นพบตัวชี้วัดทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อการตรวจติดตามผลการรักษาโรคที่มีความไวแม่นยำ
- 11.3 การพัฒนาแนวทางการรักษาโรค pythiosis ด้วยวิธี immunotherapy

เนื้อเรื่อง

งานวิจัยนี้กระบวนกรวิจัยทั้งหมดได้รับการรับรองตามหลักจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามข้อกำหนดของ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (หนังสือรับรองโครงการวิจัย COA No. 126/2016, IRB No.531/58)

กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

1. อาสาสมัครผู้ป่วย pythiosis ประกอบไปด้วย 2 กลุ่ม คือ ผู้ป่วย vascular pythiosis (VP) และ ผู้ป่วย ocular pythiosis (OP)

Inclusion criteria

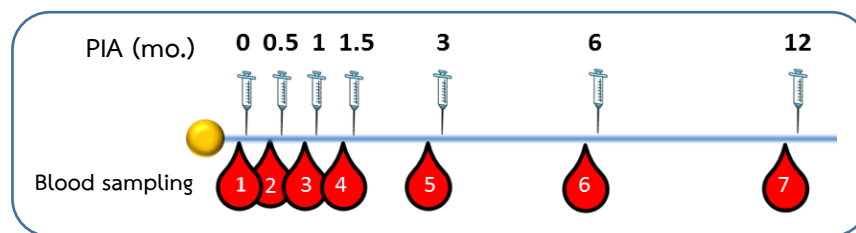
- 1.1 อายุ 18 ปี บริบูรณ์ ขึ้นไป (อ้างอิงอายุตามผู้ป่วยแจ้งไว้กับทางโรงพยาบาลต้นสังกัด)
 - 1.2 มีสติสัมปชัญญะครบถ้วน สามารถลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการได้ด้วยตนเองและสามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับประวัติของตนเองได้
 - 1.3 ไม่มีประวัติเป็นโรคติดเชื้ออื่นภายในระยะเวลา 2 ปี ก่อนเข้าร่วมโครงการ
 - 1.4 ได้รับการตรวจยืนยันการเป็นโรค pythiosis แล้ว และให้ผลการตรวจเป็นบวกอย่างน้อย 2/3 วิธี ได้แก่
 - 1.4.1 วิธีการเพาะแยกเชื้อ (cultivation): เพาะแยกเชื้อได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย และมีการพิสูจน์ยืนยันเชื้อดังกล่าวว่าเป็น *P. insidiosum* จริงด้วยการกระตุ้น zoospores และการวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencing) บริเวณ ITS และ COXII
 - 1.4.2 วิธีการทางน้ำเหลืองวิทยา (serology): การตรวจหา *Pythium* specific antibody ด้วยวิธี ELISA *
 - 1.4.3 วิธีการทางอณูชีววิทยา (molecular technique): เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อ (PCR) ที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม (sequencing)
- * วิธีการนี้ใช้ทดสอบเฉพาะในผู้ป่วย vascular pythiosis
- 1.5 ได้รับการรักษาด้วยวิธี PIAI ตามระยะเวลาที่กำหนด ณ เวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 3, 6, 12 เดือน (ภาพที่ 3) ร่วมกับการรักษาวิธีอื่นๆ เช่น การผ่าตัด (amputation) และการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (antifungal therapy) เป็นต้น ตามเห็นสมควรของแพทย์เจ้าของไข้

Exclusion criteria

- 1.6 อายุต่ำกว่า 18 ปี บริบูรณ์ (อ้างอิงอายุตามผู้ป่วยแจ้งไว้กับทางโรงพยาบาลต้นสังกัด)
- 1.7 มีความบกพร่องทางสติสัมปชัญญะ ไม่สามารถลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการได้ด้วยตนเองหรือไม่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับประวัติของตนเองได้
- 1.8 มีประวัติเป็นโรคติดเชื้ออื่นภายในระยะเวลา 2 ปี ก่อนเข้าร่วมโครงการ
- 1.9 ได้รับการตรวจยืนยันการเป็นโรค pythiosis แล้ว และให้ผลการตรวจเป็นบวกน้อยกว่า 2/3 วิธี ได้แก่

- 1.9.1 วิธีการเพาะแยกเชื้อ (cultivation): เพาะแยกเชื้อได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย และมีการพิสูจน์ยืนยันเชื้อดังกล่าวว่าเป็น *P. insidiosum* จริงด้วยการกระตุ้น zoospores และการวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencing) บริเวณ ITS และ COXII
 - 1.9.2 วิธีการทางน้ำเหลืองวิทยา (serology): การตรวจหา *Pythium* specific antibody (Pi-Ab) ด้วยวิธี ELISA *
 - 1.9.3 วิธีการทางอณูชีววิทยา (molecular technique): เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อ (PCR) ที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม (sequencing)
- * วิธีการนี้ใช้ทดสอบเฉพาะในผู้ป่วย vascular pythiosis

1.10 ปฏิเสธการรักษาด้วยวิธี PIA หรือมารับการรักษาไม่เป็นไปตามระยะเวลาที่กำหนด (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 2 แสดงแผนการให้ PIA และเก็บตัวอย่างโลหิตผู้ป่วย pythiosis

2. อาสาสมัครสุขภาพดี ประกอบไปด้วย 2 กลุ่ม คือ อาสาสมัครที่ไม่มีความผิดปกติของเลือดเป็นโรคประจำตัว (healthy volunteer without hematological disorder disease: H) และอาสาสมัครที่มีโรค thalassemia เป็นโรคประจำตัว (healthy volunteer with thalassemia: HT)

Inclusion criteria

- 2.1 อายุ 18 ปี บริบูรณ์ ขึ้นไป (อ้างอิงวันเกิดตามบัตรประชาชน)
- 2.2 มีสติสัมปชัญญะครบถ้วน สามารถลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการได้ด้วยตนเองและสามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับประวัติของตนเองได้
- 2.3 ไม่มีประวัติเป็นโรคติดเชื้อใดๆภายในระยะเวลา 2 ปี ก่อนเข้าร่วมโครงการ

Exclusion criteria

- 2.4 อายุต่ำกว่า 18 ปี บริบูรณ์ (อ้างอิงวันเกิดตามบัตรประชาชน)
- 2.5 มีความบกพร่องทางสติสัมปชัญญะ ไม่สามารถลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการได้ด้วยตนเองหรือไม่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับประวัติของตนเองได้
- 2.6 มีประวัติเป็นโรคติดเชื้ออื่นภายในระยะเวลา 2 ปี ก่อนเข้าร่วมโครงการ

ข้อมูลและตัวอย่างชีวภาพที่เก็บจากกลุ่มประชากรตัวอย่าง

1. ข้อมูลประวัติ

1.1 กลุ่ม VP เก็บข้อมูล ดังนี้

อายุ, เพศ, อาชีพ, ประวัติการสัมผัสน้ำตามธรรมชาติใน 3 เดือนย้อนหลัง, ประวัติความผิดปกติของเม็ดเลือด, ค่า ferritin ที่วัดได้ล่าสุด (ng/ml), บริเวณ/อวัยวะที่ติดเชื้อและ/หรือได้รับการผ่าตัด, ผลการรับการผ่าตัด, ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อราที่ได้รับ, ระยะเวลาที่ได้รับยาปฏิชีวนะต้านเชื้อรา, ระยะเวลาที่มีอาการก่อนมาพบแพทย์, ได้รับยาขับเหล็กหรือไม่, ผลการรักษาเมื่อผู้ป่วยได้รับ PIA ครบ 1 ปี และผลการประเมินการดำเนินไปของโรคโดยดูจากอาการที่แสดงออกทางคลินิกระหว่างได้รับการรักษาด้วย PIAI

1.2 กลุ่ม OP เก็บข้อมูล ดังนี้

อายุ, เพศ, บริเวณ/อวัยวะที่ติดเชื้อและ/หรือได้รับการผ่าตัด, ช่วงระยะเวลาที่มีอาการโดยประมาณก่อนมาพบแพทย์ (วัน), ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อราชนิดรับประทานที่ได้รับ (ช่วงเวลาที่ได้รับ; mo), ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อราชนิดยาหยอดตาที่ได้รับ (ช่วงเวลาที่ได้รับ; mo), ผลการรักษาเมื่อผู้ป่วยได้รับ PIA ครบ 1 ปี และผลการประเมินการดำเนินไปของโรคโดยดูจากอาการที่แสดงออกทางคลินิกระหว่างได้รับการรักษาด้วย PIAI

1.3 กลุ่ม H เก็บข้อมูล ดังนี้

อายุ, เพศ และประวัติการติดเชื้อและ/หรือการผ่าตัดตาในช่วง 1 ปีที่ผ่านมา

1.4 กลุ่ม HT เก็บข้อมูล ดังนี้

อายุ, เพศ, ประวัติความผิดปกติของเม็ดเลือด และประวัติการสัมผัสกับน้ำในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ

2. ตัวอย่างเลือด

2.1 กลุ่ม VP และ กลุ่ม OP

เก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 15 ml โดยประมาณ/ครั้ง/คน ทั้งก่อนและหลังผู้ป่วยได้รับ PIA ณ ช่วงเวลาต่างๆ ตามระยะเวลาที่กำหนด (0, 0.5, 1, 1.5, 3, 6, 12 เดือน หลังได้รับ PIA เข็มแรก หรือ prime dose) โดยจะเก็บเลือดจากผู้ป่วยก่อนการให้ PIA ในแต่ละครั้ง ด้วยเทคนิค vacuum blood collection ด้วยหลอดเก็บเลือดชนิดสุญญากาศ (vacuum tube)

2.2 กลุ่ม H และ กลุ่ม HT

เก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 15 ml โดยประมาณ/ครั้ง/คน ด้วยเทคนิค vacuum blood collection ด้วยหลอดเก็บเลือดชนิดสุญญากาศ (vacuum tube)

จำนวนกลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

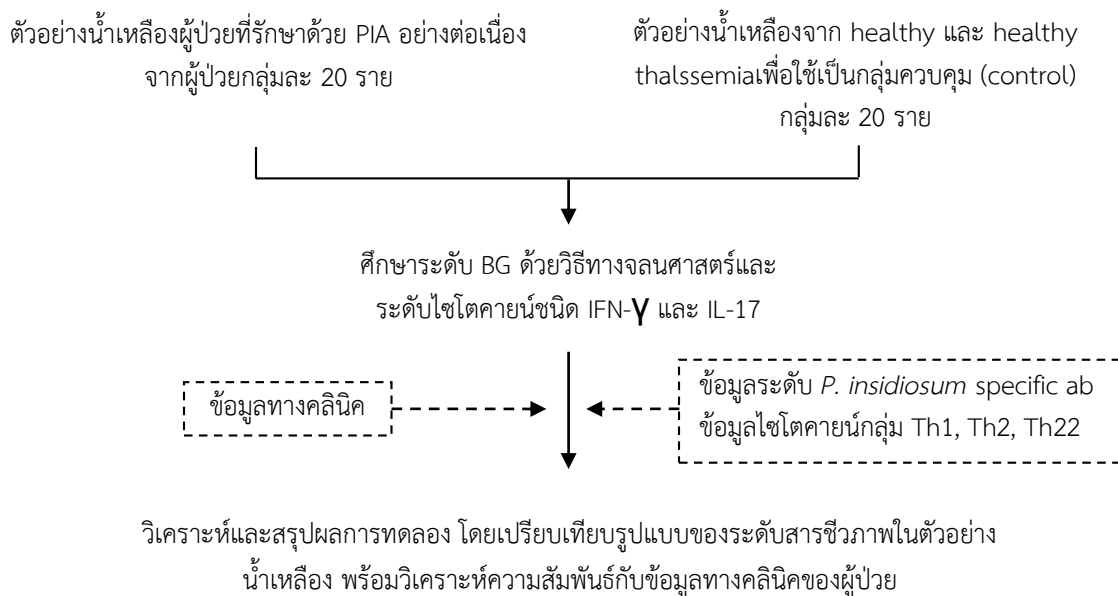
1. กลุ่ม VP จำนวน 20 คน
2. กลุ่ม OP จำนวน 20 คน
3. กลุ่ม H จำนวน 20 คน
4. กลุ่ม HT จำนวน 20 คน

สถานที่ทำการทดลอง

หน่วยวิจัยรามาธิบดี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

แผนผังขั้นตอนการดำเนินงาน



รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงาน

1. คัดกรองอาสาสมัครและเก็บข้อมูลประวัติ

1.1 การคัดกรองอาสาสมัคร

1.1.1 กลุ่ม VP และ กลุ่ม OP

ผู้ป่วยทุกรายที่สมัครร่วมโครงการจะได้รับคำอธิบายรายละเอียดการเก็บตัวอย่างเลือด ขั้นตอนการรักษา ความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการรักษา แนวทางป้องกันแก้ไขและนโยบายช่วยเหลือหากเกิดเหตุฉุกเฉิน ทั้งโดยวาจาจากแพทย์และ/พยาบาลเจ้าของไข้ ณ โรงพยาบาลต้นสังกัด และเอกสารที่จัดทำขึ้นโดยคณะผู้วิจัย ผู้ป่วยและญาติสามารถนำเอกสารกลับบ้านเพื่อพิจารณาได้โดยไม่มีกำหนดเวลาและเป็นไปด้วยความสมัครใจ เมื่อผู้ป่วยตัดสินใจเข้าร่วมโครงการผู้ป่วยทุกรายจะลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมและรับทราบความเสี่ยง* โดยที่ผู้ป่วยกลุ่มนี้สามารถแสดงความจำนงขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการได้ทุกเมื่อตามความสมัครใจ และ/หรือแพทย์ลงความเห็นว่าการยุติการเป็นอาสาสมัคร ทั้งนี้ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาต่อเนื่องเช่นเดิมโดยถือเอาประโยชน์สูงสุดของผู้ป่วยเป็นสำคัญ ขั้นตอนการซักประวัติดำเนินการโดยแพทย์และ/พยาบาลเจ้าของไข้ ณ โรงพยาบาลต้นสังกัด

* เอกสารทุกฉบับได้รับการรับรองตามหลักจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระบุในหนังสือรับรองโครงการวิจัย COA No. 126/2016, IRB No.531/58)

1.1.2 กลุ่ม H และ กลุ่ม HT

กลุ่ม H เป็นอาสาสมัครสุขภาพดีที่แสดงความจำนงบริจาคเลือด ณ ศูนย์บริการโลหิต
สภากาชาดไทย

กลุ่ม HT เป็นผู้ป่วยโรค thalassemia ที่มาตรวจติดตามโรค ณ โรงพยาบาล
จุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

1.2 การเก็บข้อมูลประวัติ

ขั้นตอนการเก็บข้อมูลประวัติของอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม อ้างอิงตามฐานข้อมูลที่อาสาสมัครให้
ไว้กับทางศูนย์บริการโลหิตหรือโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ตามลำดับ

2. เก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่ม VP, OP, H และ HT

2.1 กลุ่ม VP และ กลุ่ม OP

เมื่อผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยยืนยันว่าเป็นโรค pythiosis คณะผู้วิจัยจะขอเก็บตัวอย่างเลือด
ปริมาตร 15 ml โดยประมาณก่อนให้ PIA เข็มที่ 1 (prime dose, 1st PIA) การเจาะเก็บตัวอย่างเลือด
และการให้ PIA นี้ผู้ป่วยสามารถเดินทางกลับบ้านได้ตามปกติ เว้นเสียแต่ว่าแพทย์เจ้าของไข้ลง
ความเห็นให้ผู้ป่วยพักฟื้นในโรงพยาบาลด้วยสาเหตุอื่น เช่น แผลผ่าตัด เป็นต้น จากนั้นแพทย์จะนัด
ผู้ป่วยกลับมา 1) ตรวจติดตามโรคโดยประเมินจากอาการที่แสดงออกทางคลินิกและการซักถามกับ
ผู้ป่วย 2) เจาะเก็บเลือด 3) รับ PIA ตาม immunotherapeutic course นั่นคือ เดือนที่ 0.5, 1,
1.5, 3, 6, 12 (ภาพที่ 3)

2.2 กลุ่ม H และ กลุ่ม HT

ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครกลุ่ม H และ กลุ่ม HT เป็นตัวอย่างทางชีวภาพที่เหลือจากงานวิจัย
ก่อนหน้านี้ และเหลือจากการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
ตามลำดับ ไม่ได้มีการร้องขอเพื่อเจาะเก็บตัวอย่างเลือดเพิ่มเติมจากอาสาสมัครเพื่องานวิจัยโครงการนี้
โดยตรง

2. เตรียมตัวอย่างน้ำเหลือง (plasma)

2.1 ปั่นเก็บน้ำเหลืองจากตัวอย่างเลือดในหลอดเก็บเลือดชนิดสุญญากาศ (vacuum tube) ด้วย
ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 30 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายใน 24 ชั่วโมง

2.2 หลังเจาะเลือดแล้ว เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของระดับสารชีวภาพในตัวอย่างน้ำเหลือง เก็บ
ตัวอย่างน้ำเหลืองที่ปั่นได้ ณ อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส ทันที

3. ศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับ

3.1 ไซโตไคน์ โดยชุดทดสอบ Human cytokine kit (eBioscience, USA) ขั้นตอนการ
ทดสอบโดยย่อ ดังนี้

- 3.1.1 เตรียมตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วยโดยการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างเลือด 2,000 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดเก็บน้ำเหลืองซึ่งจะอยู่ชั้นบนของเม็ดเลือดชนิดต่างๆ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้
- 3.1.2 ตรวจวัดปริมาณไซโตคายน์ ในตัวอย่างน้ำเหลือง ตามวิธีการของชุด Kit
 - 3.1.2.1 เตรียมสารละลายไซโตคายน์มาตรฐาน โดยการเติมบัฟเฟอร์ลงในขวดผงไซโตคายน์ที่ทราบปริมาณ เขย่าเบาๆ ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 5 ระดับโดยวิธี 2-fold dilution พักไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้
 - 3.1.2.2 Coat ELISA plate ด้วยแอนติบอดีต่อไซโตคายน์ชนิดที่เราต้องการตรวจวัด จากนั้น block plate ด้วย Skim milk เพื่อป้องกันการจับของแอนติเจนและแอนติบอดีแบบไม่จำเพาะ
 - 3.1.2.3 เตรียมตัวอย่างน้ำเหลืองที่ต้องการทดสอบด้วยการเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1:10 แล้วหยอดลงในหลุมที่ต้องการทดสอบ
 - 3.1.2.4 เติมสารละลาย substrate บ่มในที่มืดนาน 20 นาที ก่อนจะนำไปวัดผลโดยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่น 490 nm
 - 3.1.2.5 แปลผลความเข้มข้นของไซโตคายน์ที่ทดสอบโดยการเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve)

ทุกการทดลองทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้งเพื่อความแม่นยำของผลการทดสอบและมีกลุ่มควบคุมโดยใช้ตัวอย่างน้ำเหลืองของอาสาสมัครกลุ่ม HT และกลุ่ม H

3.2 สาร BG โดยชุดทดสอบ Fungitell® beta-(1,3)-glucan kit (Cape Cod Ltd., MA) ขั้นตอนการทดสอบโดยย่อ ดังนี้

- 3.2.1 เตรียมตัวอย่างน้ำเหลืองโดยการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างเลือด 2,000 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดเก็บน้ำเหลืองซึ่งจะอยู่ชั้นบนของเม็ดเลือดชนิดต่างๆ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้
- 3.2.2 ตรวจวัดปริมาณสาร BG ในตัวอย่างน้ำเหลือง ตามวิธีการของชุด Kit
 - 3.2.2.1 เตรียมสารละลาย BG มาตรฐาน โดยการเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากสาร BG (BG free water) ลงในขวดผง BG เขย่าเบาๆ ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 5 ระดับโดยวิธี 2-fold dilution ดังนี้ 500, 250, 125, 62.5, 31.25 pg/ml พักไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้
 - 3.2.2.2 เตรียมตัวอย่างน้ำเหลืองที่ต้องการทดสอบด้วย pre-treatment buffer (0.125M KOH/6M KCl) บ่ม ณ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
 - 3.2.2.3 เติมสารละลาย Fungitell reagent (ละลายใน 0.1M Tris HCl, pH 7.4) ลงในสารละลาย BG มาตรฐาน และตัวอย่างน้ำเหลือง
 - 3.2.2.4 อ่านผลโดยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบ kinetic ณ ความยาวคลื่น 405 และ 490 nm ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ด้วยโปรแกรม Gen 5 version 1.4.5.0
 - 3.2.2.5 แปลผลความเข้มข้นของสาร BG (pg/ml) ในตัวอย่างน้ำเหลืองโดยการเทียบค่า OD ที่ได้กับกราฟมาตรฐาน

3.2.2.6 การแปลผล Positive Predictive value ของค่าสาร BG มากกว่า หรือเท่ากับ 80 pg/ml แสดงว่า เป็น fungal infection มีช่วงระหว่าง 74.4-91.7% หากค่า BG น้อยกว่า 60 pg/ml จะมี negative predictive value 65.1-85.1%

ทุกการทดลองทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้งเพื่อความแม่นยำของผลการทดสอบและมีกลุ่มควบคุมโดยใช้ตัวอย่างน้ำเหลืองของอาสาสมัครกลุ่ม HT และกลุ่ม H

4. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

4.1 วิเคราะห์รูปแบบของระดับไซโตคายน์ และ ระดับ BG ที่เปลี่ยนแปลงทั้งก่อน-หลัง ได้รับ PIA ในช่วงเวลาต่างๆ ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.0 และคำนวณสถิติด้วย SPSS statistical software (SPSS 11.5 software system: SPSS, Chicago, USA)

4.2 วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ ไซโตคายน์ และระดับ BG ที่เปลี่ยนแปลงกับลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.0 และคำนวณสถิติด้วย SPSS statistical software (SPSS 11.5 software system: SPSS, Chicago, USA)

4.3 หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วย การดำเนินไปของโรคและรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับสารชีวภาพ ได้แก่ ระดับ ไซโตไคน์ และ ปริมาณ BG

กิจกรรมตามข้อเสนอโครงการ เป้าหมายตามแผนงานและผลการทดลอง

กิจกรรมที่ 1 คัดเลือกกลุ่มผู้ป่วยอาสาสมัคร

กิจกรรมตามข้อเสนอโครงการ ส่ง PIA และรับตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่ยินยอมรักษาด้วย PIAI ในช่วงต่างๆ จากโรงพยาบาลที่แพทย์ติดต่อมา

เป้าหมายตามแผนงาน: กระบวนการวิจัยทั้งหมดได้รับการรับรองตามหลักจริยธรรมการวิจัยในคน (หนังสือรับรองโครงการวิจัย COA No. 126/2016) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มผู้ป่วยอาสาสมัคร pythiosis

ตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วย pythiosis ที่รับการรักษาด้วย PIAI ณ ช่วงเวลาต่างๆ พร้อมทั้งรวบรวมประวัติผู้ป่วยอย่างน้อย 20 ราย รวมทั้งสิ้นไม่ต่ำกว่า 100 ตัวอย่าง

กลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีที่มี/ไม่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว

ตัวอย่างน้ำเหลืองอาสาสมัครสุขภาพดีที่มี/ไม่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว อย่างน้อย 20 ราย

ผลการดำเนินงาน:

1. คัดกรองอาสาสมัคร ข้อมูลประวัติผู้ป่วย การติดต่อรับส่งตัวอย่างและ PIA immunotherapy

- 1.1 ในช่วงเดือนตุลาคม 2559 – เมษายน 2560 มีโรงพยาบาลที่ขอรับ PIA เพื่อ PIAI ทั้งหมดจำนวน 4 โรงพยาบาล ได้แก่ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่, โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา, โรงพยาบาลขอนแก่น และโรงพยาบาลอุดรธานี ซึ่งมีผู้ป่วย pythiosis รวมทั้งสิ้น 4 ราย แบ่งเป็น ผู้ป่วยกลุ่ม VP จำนวน 3 ราย และผู้ป่วย OP จำนวน 1 ราย
- 1.2 หลังจากคณะผู้วิจัยประสานงานกับแพทย์โรงพยาบาลปลายทางข้างต้นเพื่ออธิบายและทำความเข้าใจในรายละเอียดกระบวนการการรักษาด้วยวิธี PIAI ผ่านทางโทรศัพท์และจดหมายอิเล็กทรอนิกส์ (E-mail) ผู้ป่วยทั้ง 4 ราย ยินยอมรับการรักษาด้วย PIAI (การยินยอมรับการรักษาทั้งหมดเป็นไปโดยความสมัครใจของผู้ป่วยภายใต้ดุลยพินิจของแพทย์เจ้าของไข้) และเมื่อแพทย์และผู้ป่วยลงนามในเอกสารเรียบร้อยแล้ว คณะผู้วิจัยได้ประสานงานกับบริษัทขนส่งเอกชนเพื่อจัดส่ง PIAI ไปยังแพทย์โรงพยาบาลปลายทาง โดยตรง
- 1.3 ผู้ป่วยทั้งหมดที่เข้าร่วมโครงการได้รับการตรวจยืนยันการติดเชื้อ *P. insidiosum* ด้วยวิธีต่างๆ ดังรายละเอียดที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น
- 1.4 เนื่องด้วยงานวิจัยนี้วางแผนติดตามการรักษาของผู้ป่วยไปจนครบ 1 ปี หลังจากผู้ป่วยเริ่มรับการรักษาด้วย PIAI นอกจากผู้ป่วย 4 รายข้างต้น ทางคณะผู้วิจัยได้รวบรวมอาสาสมัครผู้ป่วย pythiosis อีก 36 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วยกลุ่ม VP จำนวน 17 ราย และผู้ป่วย OP จำนวน 19 ราย ที่เข้าร่วมโครงการมาตั้งแต่ปี 2558 ทำให้ปัจจุบันโครงการนี้มีอาสาสมัครรวมทั้งสิ้น 40 ราย แบ่งเป็นกลุ่ม VP และ OP กลุ่มละ 20 รายครบตามจำนวนผู้ป่วยที่ได้วางเป้าหมายไว้ โดยมีการเก็บตัวอย่างน้ำเหลืองจากอาสาสมัครรายละ 7 ครั้ง ก่อนได้รับ PIAI และ ณ ช่วงเวลาต่างๆ ตามกำหนด (แผนภาพที่ 2)
- 1.5 ผลจากการรวบรวมประวัติและติดตามอาการทางคลินิกของผู้ป่วยทั้งหมดที่เข้าร่วมโครงการ ทั้งก่อนได้รับการรักษาด้วย PIAI และหลังได้รับ PIAI ณ ช่วงเวลาต่างๆ (ตารางที่ 1-4) พบว่า

ผู้ป่วยกลุ่ม VP

1. จากเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย VP ที่กำหนดไว้ สามารถจำแนกผู้ป่วยนี้ได้เป็น 2 กลุ่ม นั่นคือ
 - กลุ่มผู้ป่วยที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI พบว่ามีจำนวน 18 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 90 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดในการศึกษานี้
 - กลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI พบว่ามีจำนวน 2 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 10 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดในการศึกษานี้
2. ผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับประวัติส่วนตัวและวิธีการรักษาที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% ดังนี้
 - ผู้ป่วยกลุ่มที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI มีอายุน้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI (33.6 ± 11.2 ปี และ 49.2 ± 9.1 ปี โดยเฉลี่ย

ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI มีเพียง 2 คนเท่านั้น

- ผู้ป่วยกลุ่มที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI มีระยะเวลาตั้งแต่มีอาการจนกระทั่งมาพบแพทย์ และได้รับการรักษาด้วยวิธีผสมผสานน้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI (1.9 ± 1.8 เดือน และ 2.5 ± 1.2 เดือน ตามลำดับ)
- ผู้ป่วยกลุ่มที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI ทุกคนได้รับการรักษาแบบ amputation ซึ่งมีผลให้ผู้ป่วยกลุ่มนี้สูญเสียอวัยวะ/พิการตลอดชีวิต ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI ทั้งหมดได้รับการรักษาด้วยวิธี debridement

ตารางที่ 1 ข้อมูลประวัติผู้ป่วยกลุ่ม vascular pythiosis จำนวน 20 คน

ข้อมูลประวัติผู้ป่วย	
อายุ	18-79 ปี; ค่าเฉลี่ย= 35.2 ± 14.9 , ค่ามัธยฐาน=32, ค่าฐานนิยม=32
เพศ	ชาย = 50% (n=10) หญิง = 50% (n=10)
อาชีพ	ชาวนา = 50% (n=10) เกษตรกร = 40% (n=8) รับจ้างทั่วไป = 10% (n=2)
ประวัติการสัมผัสน้ำตามธรรมชาติในช่วง 3 เดือนย้อนหลัง*	มี = 90% (n=18) ไม่มี = 10% (n=2)
ประวัติความผิดปกติของเม็ดเลือด	E-beta = 80% (n=16) Alpha = 5% (n=1) Beta = 5% (n=1) H = 5% (n=1) H-constant spring = 5% (n=1)
ค่า ferritin ที่วัดได้ล่าสุด (ng/ml)	<250 ng/ml = 0% (n=0) >250-1,000 ng/ml = 30% (n=6) >1,000 ng/ml = 70% (n=14)
บริเวณ/อวัยวะที่ติดเชื้อและ/หรือได้รับการผ่าตัด	แขน เหนือข้อศอก = 5% (n=1) ใต้ข้อศอก = 5% (n=1) ขา เหนือเข่า = 40% (n=8) ใต้เข่า = 50% (n=10)

* การสัมผัสน้ำตามธรรมชาติ หมายถึง การลงเล่น ทำกิจกรรมและ/หรือการแช่หรือสัมผัสอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งในน้ำจืดตามธรรมชาติ เช่น ห้วย หนอง คลอง บึง ท้องนา เป็นต้น

ตารางที่ 2 ข้อมูลประวัติการรักษาผู้ป่วยกลุ่ม vascular pythiosis จำนวน 20 คน

ข้อมูลประวัติการรักษา	
ผลการรับการผ่าตัด	Amputation: Free margin = 90% (n=18) Debridement: Free margin = 5% (n=1) Not sterile = 5% (n=1)
ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อราที่ได้รับ	Itraconazole = 15% (n=3) Itraconazole+Terbinafine = 70% (n=14) SSKI+Terbinafine = 15% (n=3)
ระยะเวลาที่ได้รับยาปฏิชีวนะต้านเชื้อรา	1-12 เดือน; ค่าเฉลี่ย=5.46 ± 6.4, ค่ามัธยฐาน=1, ค่าฐานนิยม=6
ระยะเวลาที่มีอาการก่อนมาพบแพทย์	1-5 เดือน; ค่าเฉลี่ย=2.19 ± 2.7, ค่ามัธยฐาน=1.5, ค่าฐานนิยม=2
เคยได้รับยาขับเหล็ก	ใช่ = 100% (n=50)
ผลการรักษาเมื่อผู้ป่วยได้รับ PIA IMMUNOTHERAPY	มีชีวิต = 90% (n=18) เสียชีวิต = 10% (n=2)
ครบ 1 ปี	

ผู้ป่วยกลุ่ม OP

- ตามประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษา ทำให้สามารถจำแนกผู้ป่วย OP ได้เป็น 2 กลุ่ม นั้นคือ
 - กลุ่มผู้ป่วยที่มีประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษา พบว่ามีจำนวน 10 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 50 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดในการศึกษานี้
 - กลุ่มผู้ป่วยที่สูญเสียประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษา พบว่ามีจำนวน 10 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 50 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดในการศึกษานี้เช่นเดียวกัน
- ผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับประวัติส่วนตัวและวิธีการรักษาที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% ดังนี้
 - กลุ่มผู้ป่วยที่มีประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษา มีอายุน้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่สูญเสียประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษา (37.9 ± 10.9 ปี และ 43.3 ± 4.2 ปี โดยเฉลี่ยตามลำดับ)
 - กลุ่มผู้ป่วยที่มีประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษา มีระยะเวลาดังแต่มีอาการจนกระทั่งมาพบแพทย์ และได้รับการรักษาด้วยวิธี combination treatment สั้นกว่า กลุ่มผู้ป่วยที่สูญเสียประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษา (39.7 ± 11.2 วัน และ 47.8 ± 7.1 วัน โดยเฉลี่ย ตามลำดับ)

- กลุ่มผู้ป่วยที่มีประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษาทุกคนได้รับการรักษาโดยการปลูกถ่ายกระจกตา (PK or corneal transplant) ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่สูญเสียประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษาทั้งหมดได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดนำลูกตาออก (glass ball removal or evisceration)

ตารางที่ 3 ข้อมูลประวัติผู้ป่วยกลุ่ม Ocular pythiosis จำนวน 20 คน

ข้อมูลประวัติผู้ป่วย	
อายุ	21-62 ปี; ค่าเฉลี่ย=39.4, ค่ามัธยฐาน=39, ค่าฐานนิยม=34
เพศ	ชาย = 50% (n=10) หญิง = 50% (n=10)
ระยะเวลาที่มีอาการก่อนมาพบแพทย์	19-66 วัน; ค่าเฉลี่ย=40.4 วัน, ค่ามัธยฐาน=38, 40, ค่าฐานนิยม=30

ตารางที่ 4 ข้อมูลประวัติผู้ป่วยกลุ่ม Ocular pythiosis จำนวน 20 คน

ข้อมูลประวัติการรักษา	
การผ่าตัดที่ได้รับ	การเอากระจกตาออก (Penetrating Keratoplasty, PK) /ปลูกถ่ายกระจกตา (corneal transplant) = 50% (n=10) การเอาเข้าตาออก (evisceration/glass ball removal) = 50% (n=10)
ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อราชนิดรับประทานที่ได้รับ	Itraconazole = 5% (n=1) Itraconazole+Terbinafine = 80% (n=16) Itraconazole+Terbinafine+Voriconazole = 5% (n=1) Itraconazole+Terbinafine+Posaconazole = 5% (n=1) Itraconazole+Ketoconazole = 5% (n=1)
ระยะเวลาที่ได้รับยาปฏิชีวนะต้านเชื้อรา	โดยรวมแพทย์จะให้ยาโดยเฉลี่ย 1-13 เดือน ดังนี้ Amphotericin B + Voriconazole = 10% (n=2) Amphotericin B + Fluconazole = 10% (n=2) Amphotericin B + Fluconazole + Natamycin = 30% (n=6) Amphotericin B + Fluconazole + Itraconazole + Voriconazole + Terbinafine = 5% (n=1) Amphotericin B + Fluconazole + Itraconazole + Voriconazole + Terbinafine + Natamycin = 5% (n=1) Amphotericin B + Natamycin + Voriconazole + Terbinafine = 10% (n=2) Amphotericin B + Fluconazole + Ketoconazole + Voriconazole + Terbinafine = 5% (n=1) Amphotericin B + Fluconazole + Terbinafine 5% (n=1) Amphotericin B + Fluconazole + Voriconazole 5% (n=1) Amphotericin B + Fluconazole + Natamycin + Voriconazole 15% (n=3)
ระยะเวลาที่ได้รับยาปฏิชีวนะต้านเชื้อรา	โดยรวมแพทย์จะให้ยาโดยเฉลี่ย 0.5-4 เดือน
ผลการรักษาเมื่อผู้ป่วยได้รับ PIA	สูญเสียประสิทธิภาพในการมองเห็นถาวร = 50% (n=10) มีประสิทธิภาพในการมองเห็น = 50% (n=10)
IMMUNOTHERAPY	
ครบ 1 ปี	

ทางคณะผู้วิจัยได้รวบรวมตัวอย่างเชื้อออสมาศกรสุขภาพดีที่มี (HT) / ไม่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว (H) กลุ่มละ 20 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 40 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกออสมาศกรกลุ่มที่มี อายุ และ เพศ ไม่แตกต่างจากผู้ป่วยกลุ่ม VP และกลุ่ม OP สำหรับออสมาศกรสุขภาพดีกลุ่มที่มีและไม่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัวตามลำดับ

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับสาร BG โดยชุดทดสอบ Fungitell® (1->3)-β-D-glucan kit (Cape Cod Ltd., MA)

กิจกรรมตามข้อเสนอโครงการ ตรวจวัดระดับ BG และวิเคราะห์ผลการตรวจ ทั้งในกลุ่มที่เป็นและไม่เป็นโรค pythiosis และวิเคราะห์ผล

เป้าหมายตามแผนงาน: ตรวจวัดสาร BG ในตัวอย่างน้ำเหลืองกลุ่มออสมาศกรผู้ป่วย pythiosis และออสมาศกรสุขภาพดีที่มี (HT) / ไม่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว (H)

ผลการดำเนินการ:

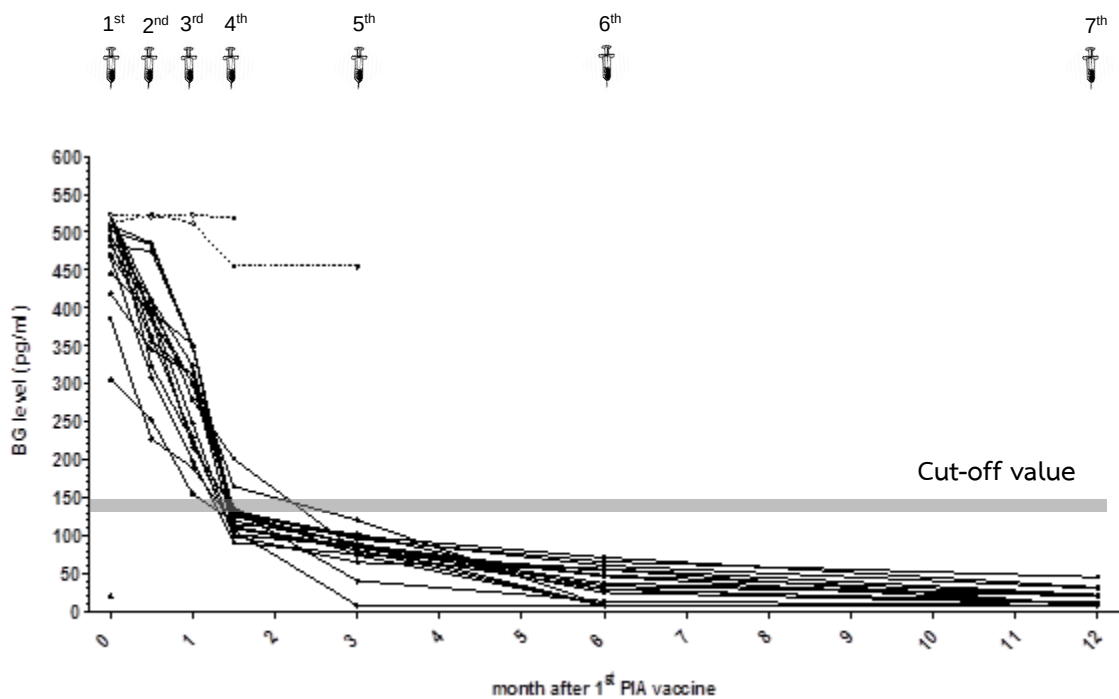
1. ผู้วิจัยได้ validate การตรวจหาสาร BG ด้วย Fungitell commercial kit เพื่อยืนยันวิธีการและการแปลผลกับ Dr. Malcolm Finkelman ผู้อำนวยการฝ่ายวิชาการ บริษัท Associates of CapeCod จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา และพบว่าผลการตรวจวัดระดับสาร BG ในการศึกษาเป็นไปตามมาตรฐานของชุดทดสอบที่ได้รับการรับรองจากหน่วยงาน Food and Drug Administration (FDA) ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. ได้ดำเนินการตรวจวัดระดับสาร BG ในตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วยจำนวน 40 รายทั้งก่อนและหลังได้รับ PIA immunotherapy พร้อมทั้งออสมาศกรจำนวน 40 รายครบถ้วนสมบูรณ์แล้ว พบว่า

2.1 ผู้ป่วยกลุ่ม VP ที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI นั้น ผู้ป่วยกลุ่มนี้ก่อนได้รับ PIAI มีระดับสาร BG ที่สูง โดยมีค่าระหว่าง 523.4-305.7 pg/ml ซึ่งอ้างอิงตามค่า cut-off value ที่กำหนดในชุดทดสอบ ค่าที่ > 80 pg/ml นั้นแปลผลเป็นค่าบวกหรือหมายความว่า ตัวอย่างนั้นได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือด และหลังจากที่ผู้ป่วยได้รับ PIAI ณ ช่วงเวลาต่างๆ ตามกำหนด (แผนภาพที่ 3) พบว่าระดับของสาร BG ในกระแสเลือดลดลงตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% สอดคล้องไปกับอาการทางคลินิกที่ดีขึ้น จากการบันทึกของแพทย์เจ้าของไข้ พบว่าแผลผ่าตัดของผู้ป่วยมีลักษณะที่แห้ง และอาการเจ็บปวดน้อยลงตามลำดับ และไม่มีสัญญาณการกลับเป็นซ้ำของโรค โดยระดับของสาร BG ในกระแสเลือดของผู้ป่วยทุกรายลดลงจนมีค่าเป็น ลบ (cut-off value < 60 pg/ml) โดยเฉลี่ย ณ เวลา 6 เดือนหลังผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย PIAI ในขณะที่รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของสาร BG ในกลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปีหลังเริ่มการ

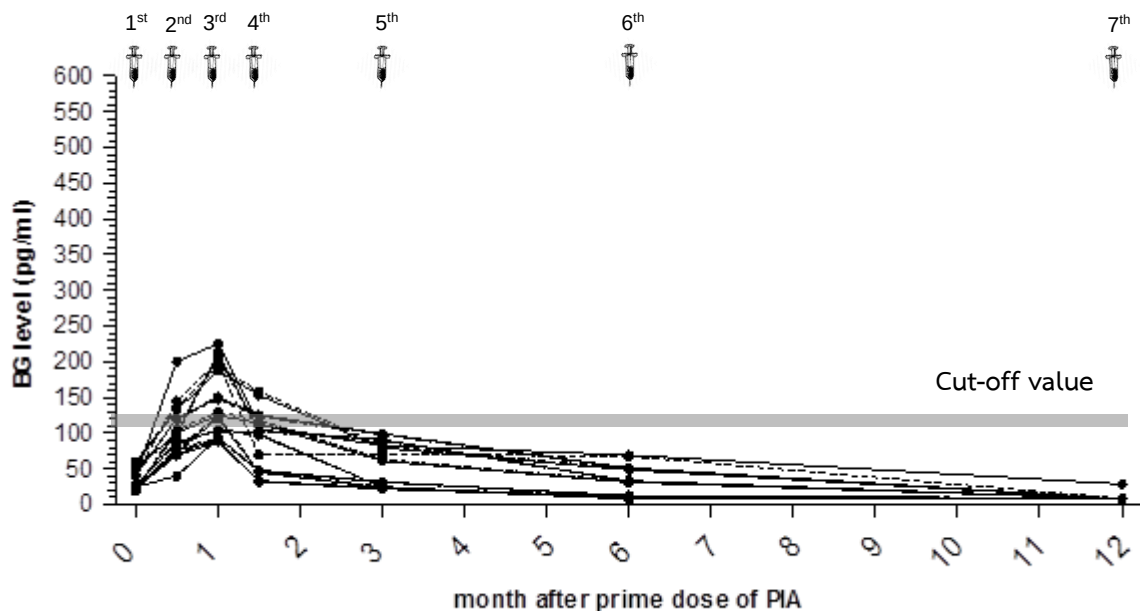
รักษาด้วย PIAI นั้นมีระดับที่สูงและมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จนกระทั่งผู้ป่วยเสียชีวิต (แผนภาพที่ 3)

2.2 ผู้ป่วยกลุ่ม OP มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับสาร BG ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการมองเห็นและกลุ่มที่สูญเสียประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษาแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ก่อนได้รับ PIAI นั้นผู้ป่วยทุกรายมีระดับสาร BG ที่ต่ำหรือมีค่าเป็นลบ (cut-off value < 60 pg/ml) แต่เมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย PIAI แล้ว ระดับของสาร BG เพิ่มขึ้นตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% จนกระทั่งมีระดับอยู่ในช่วง 121- 185 pg/ml โดยเฉลี่ย ณ เวลา 1 เดือน หลังได้รับการรักษาด้วย PIAI จากนั้นระดับของสาร BG ก็เริ่มลดต่ำลงตามลำดับ จนกระทั่งเป็นค่าลบ (cut-off value < 60 pg/ml) อีกครั้ง ณ เวลา 3-6 เดือนหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI (แผนภาพที่ 4)

สำหรับกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีทั้งที่มี/ไม่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว กลุ่มละ 20 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 40 ตัวอย่าง พบว่ามีค่า BG น้อยกว่า 60 pg/ml ถือเป็นค่าลบ (cut-off value < 60 pg/ml) ทั้งหมด (แผนภาพที่ 3 และ 4)



แผนภาพที่ 3 ระดับของสาร (1->3)- β -D-glucan ที่ตรวจวัดด้วยชุดตรวจสาร Fungitell[®] assay (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA, USA) ในช่วง 1 ปี ที่ผู้ป่วยได้รับ PIA ณ ระยะเวลาต่างๆ (🪡) ในผู้ป่วย vascular pythiosis กลุ่มที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIA immunotherapy (●,—) จำนวน 18 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIA immunotherapy (○,—) จำนวน 2 ราย และกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีกลุ่มที่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว (Δ) จำนวน 20 ราย



แผนภาพที่ 4 ระดับของสาร (1->3)- β -D-glucan ที่ตรวจวัดด้วยชุดตรวจสาร Fungitell[®] assay (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA, USA) ในช่วง 1 ปี ที่ผู้ป่วยได้รับ PIA ณ ระยะเวลาต่างๆ () ในผู้ป่วย ocular pythiosis กลุ่มผู้ป่วยที่มีประสิทธิภาพในการมองเห็นได้หลังการรักษา จำนวน 10 ราย (●,—) และกลุ่มผู้ป่วยที่สูญเสียประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษา จำนวน 10 ราย และกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีกลุ่มที่ไม่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว (Δ) จำนวน 20 ราย

กิจกรรมที่ 3 ศึกษาแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับไซโตไคน์ โดยชุดทดสอบ Human cytokine kit (eBioscience, USA)

กิจกรรมตามข้อเสนอโครงการ ตรวจวัดชนิดและระดับไซโตไคน์ในตัวอย่างเดียวกับที่ตรวจวัดระดับ BG และวิเคราะห์ผล

เป้าหมายตามแผนงาน: ตรวจวัดระดับไซโตไคน์ในตัวอย่างน้ำเหลืองกลุ่มอาสาสมัครผู้ป่วย pythiosis และอาสาสมัครสุขภาพดีที่มี/ไม่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว

ผลการดำเนินการ:

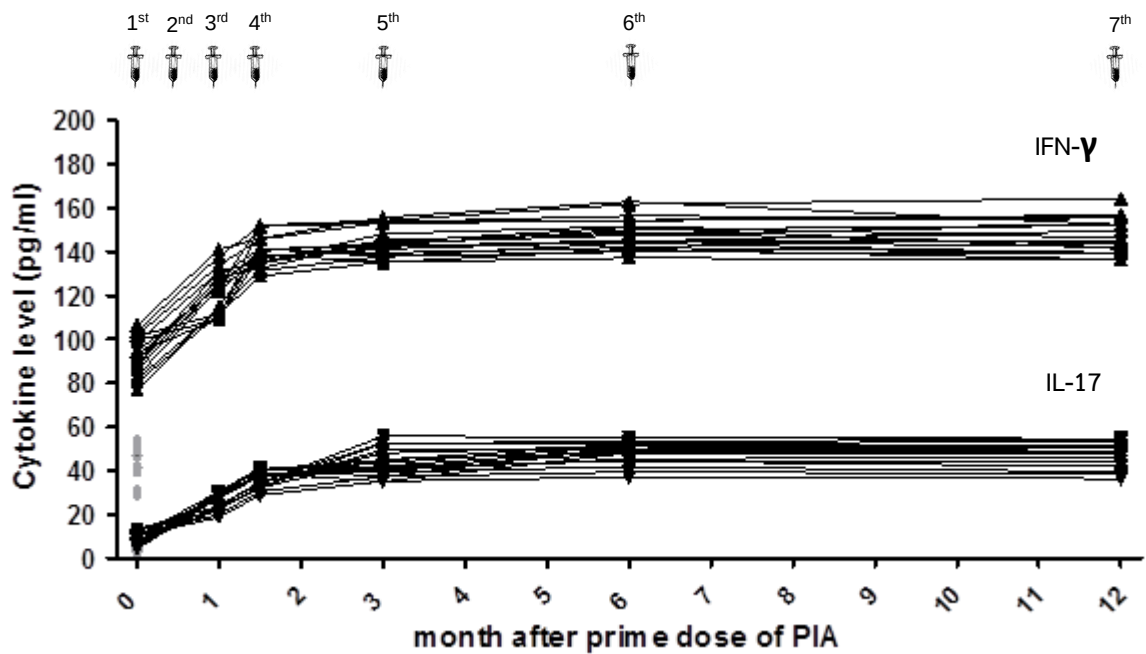
1. ผู้วิจัยได้ validate การตรวจหาไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และชนิด IL-17 ด้วยชุดตรวจสาร human cytokines detection kit โดยพบว่า การตรวจวัดระดับไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และชนิด IL-17 ในตัวอย่างมาตรฐานได้ค่าอยู่ในช่วงที่ชุดทดสอบกำหนด

2. ได้ดำเนินการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และชนิด IL-17 ในตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วยจำนวน 40 รายทั้งก่อนและหลังได้รับ PIAI พร้อมทั้งอาสาสมัครจำนวน 40 รายครบถ้วนสมบูรณ์แล้ว พบว่า

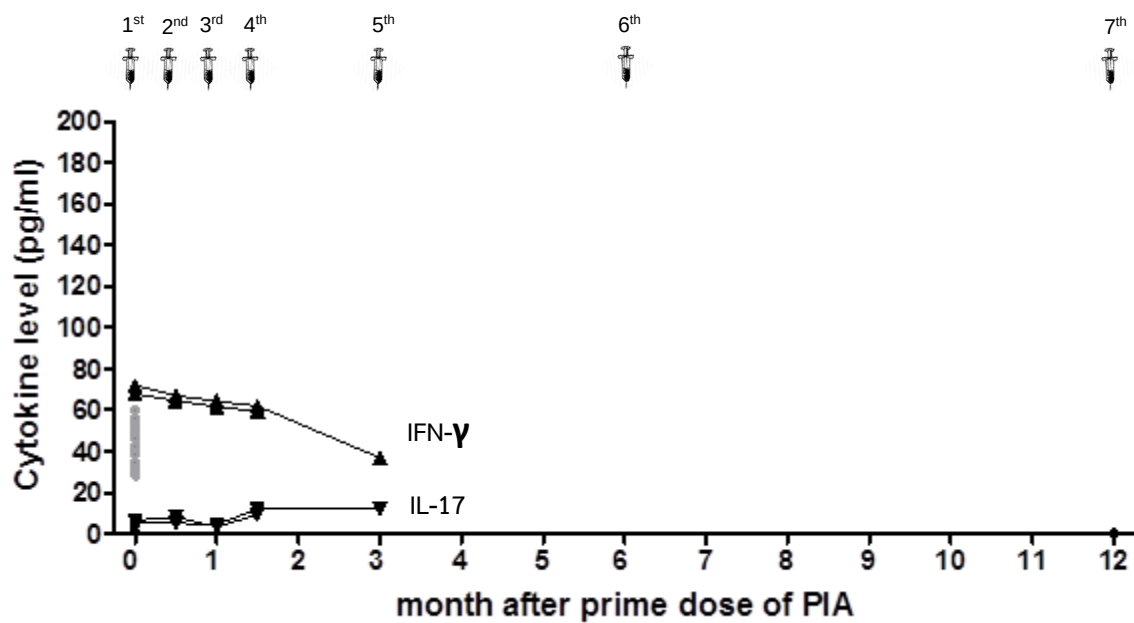
2.1 ผู้ป่วยกลุ่ม VP ทั้ง 2 กลุ่ม มีระดับไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และชนิด IL-17 ที่ต่ำ โดยเฉลี่ย ประมาณ 10 ± 0.43 pg/ml และ 90 ± 11.7 pg/ml ตามลำดับก่อนได้รับวัคซีน และหลังจากที่ผู้ป่วยได้รับ PIAI ณ ช่วงเวลาต่างๆ ตามกำหนด (แผนภาพที่ 2) พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI มีระดับของไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% สอดคล้องไปกับอาการทางคลินิกที่ดีขึ้น จากการบันทึกของแพทย์เจ้าของไข้พบว่าแผลผ่าตัดของผู้ป่วยแห้งดี อาการเจ็บปวดน้อยลงตามลำดับ และไม่มีสัญญาณการกลับเป็นซ้ำของโรค จนถึงเดือนที่ 3 ระดับของไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดจึงเริ่มคงที่และมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จนกระทั่งครบ 1 ปีของการรักษา (แผนภาพที่ 5) สำหรับกลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI นั้น พบว่าไซโตไคน์ชนิด IFN- γ มีแนวโน้มลดต่ำลงซึ่งแตกต่างจากผู้ป่วยกลุ่มที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปีอย่างชัดเจน สำหรับ cytokines ชนิด IL-17 ผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปี นั้นไม่มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน (แผนภาพที่ 6)

2.2 ผู้ป่วยกลุ่ม OP มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และชนิด IL-17 ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการมองเห็นและกลุ่มที่สูญเสียประสิทธิภาพการมองเห็นหลังการรักษาแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติก่อนได้รับ PIAI ผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม มีระดับสารไซโตไคน์ชนิด IFN- γ (55 ± 19.1 pg/ml) และชนิด IL-17 (<10 pg/ml) ที่ต่ำ และเมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย PIAI แล้ว (แผนภาพที่ 2) ระดับของไซโตไคน์ชนิด IFN- γ เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% ตั้งแต่เดือนที่ 1.5 จนถึงเดือนที่ 6 (160 ± 23.8 pg/ml) ก่อนจะลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการรักษาด้วย PIAI ณ เวลา 1 ปี สำหรับไซโตไคน์ชนิด IL-17 หลังผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย PIAI นั้นมีระดับเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% ในช่วงเดือนที่ 1 จากนั้นจึงลดลงและคงที่ ณ ระดับ 18 ± 12.5 pg/ml โดยเฉลี่ย ณ เดือนที่ 3 จนกระทั่งสิ้นสุดการรักษาด้วย PIAI ณ เวลา 1 ปี (แผนภาพที่ 7)

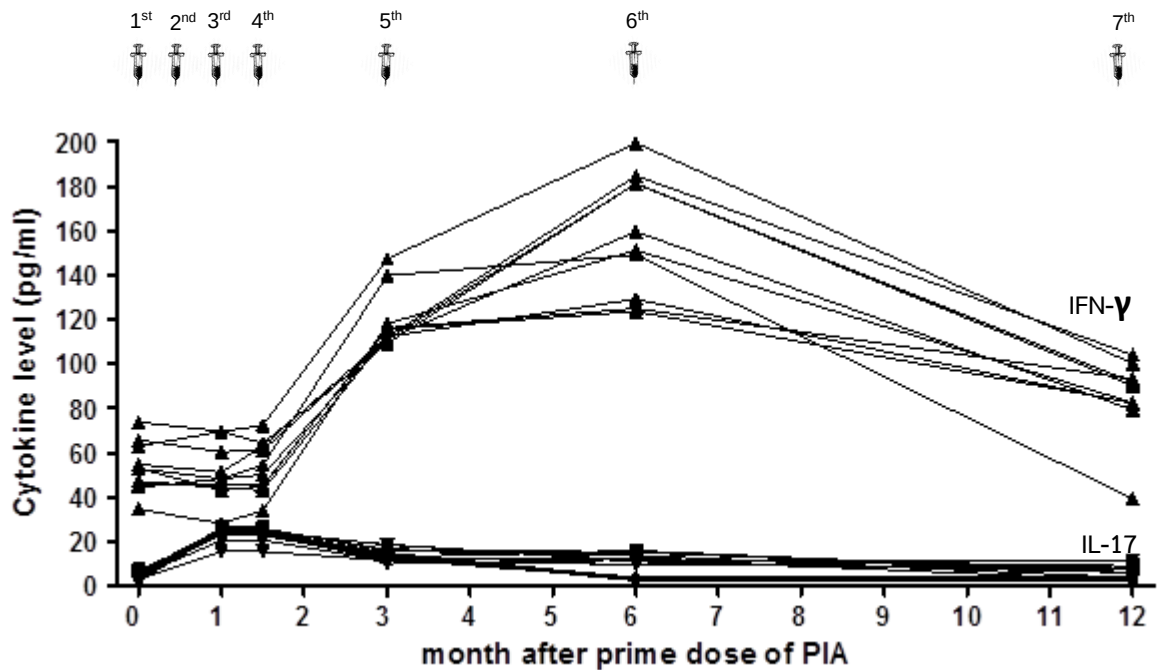
สำหรับกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีทั้งที่มี/ไม่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว กลุ่มละ 20 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 40 ตัวอย่าง พบว่ามีระดับไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และชนิด IL-17 ไม่แตกต่างจากผู้ป่วยก่อนได้รับ PIAI ในทุกราย (แผนภาพที่ 5-7)



แผนภาพที่ 5 ระดับของสารไซโตไคน์ชนิด IFN- γ (▲) และชนิด IL-17 (▼) จากการตรวจด้วยชุดตรวจสาร human cytokines detection kit ในช่วง 1 ปี ที่ผู้ป่วยได้รับ PIAI ณ ระยะเวลาต่างๆ (💉) ในผู้ป่วย vascular pythiosis กลุ่มที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI(—) จำนวน 18 ราย และกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีกลุ่มที่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว (■) จำนวน 20 ราย



แผนภาพที่ 6 ระดับของสารไซโตไคน์ชนิด IFN- γ (▲) และชนิด IL-17 (▼) จากการตรวจด้วยชุดตรวจสาร human cytokines detection kit ในช่วง 1 ปี ที่ผู้ป่วยได้รับ PIAI ณ ระยะเวลาต่างๆ (💉) ในผู้ป่วย vascular pythiosis กลุ่มที่เสียชีวิตก่อน 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI (—) จำนวน 2 ราย และกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีกลุ่มที่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว (■) จำนวน 20 ราย



แผนภาพที่ 7 ระดับของสารไซโตไคน์ชนิด IFN- γ (▲) และชนิด IL-17 (▼) จากการตรวจด้วยชุดตรวจสาร human cytokines detection kit ในช่วง 1 ปี ที่ผู้ป่วยได้รับ PIAI ณ ระยะเวลาต่างๆ (💉) ในผู้ป่วย ocular pythiosis กลุ่มผู้ป่วยที่มีประสิทธิภาพในการมองเห็นได้หลังการรักษา (—) จำนวน 10 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่สูญเสียประสิทธิภาพในการมองเห็นหลังการรักษา (—) จำนวน 10 ราย และกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีกลุ่มที่ไม่มีโรคทาลัสซีเมียเป็นโรคประจำตัว (■) จำนวน 20 ราย

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาในโครงการนี้ พบว่า

4.1 ผู้ป่วยกลุ่ม VP

- 4.1.1 แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปี จำนวน 18 ราย และกลุ่มที่เสียชีวิตก่อน 1 ปี จำนวน 2 ราย หลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI
- 4.1.2 ผู้ป่วยกลุ่มที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปี หลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI นั้นไม่แสดงอาการทางคลินิกใดๆ ที่แสดงถึงความล้มเหลวในการรักษาหรือโอกาสการกลับเป็นซ้ำของโรค ในขณะที่ผู้ป่วยกลุ่มที่เสียชีวิตก่อน 1 ปี หลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI จำนวน 2 ราย แสดงอาการทางคลินิกอันสื่อถึงโอกาสการกลับเป็นซ้ำของโรค ณ เวลา 3 เดือนหลังเริ่มรับการรักษา
- 4.1.3 ระดับของสาร BG ในผู้ป่วย vascular pythiosis ทั้ง 2 กลุ่ม แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% นับตั้งแต่เดือนที่ 0.5 หลังได้รับการรักษาด้วย PIAI เป็นต้นไป จนกระทั่งครบ 1 ปี โดยผู้ป่วยกลุ่มที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปี หลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI

มีระดับของสาร BG ในกระแสเลือดลดลงตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% และลดลงจนมีค่าเป็น ลบ (cut-off value < 60 pg/ml) ณ เดือนที่ 6 หลังผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย PIA immunotherapy ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปี หลังเริ่มการรักษาด้วย PIA immunotherapy นั้น สาร BG มีระดับที่สูงและมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จนกระทั่งผู้ป่วยเสียชีวิต (แผนภาพที่ 3)

4.1.4 ระดับของไซโตไคน์ชนิด IFN- γ (cytokine กลุ่ม Th1) ในผู้ป่วย vascular pythiosis ทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% นับตั้งแต่เดือนที่ 1 หลังผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย PIA immunotherapy เป็นต้นไปจนกระทั่งครบ 1 ปี โดยผู้ป่วยกลุ่มที่รอดชีวิตนานกว่า 1 ปี หลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI มีระดับของไซโตไคน์ชนิด IFN- γ ในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% จนกระทั่งเดือนที่ 3 ระดับของ ไซโตไคน์ชนิด IFN- γ จึงเริ่มคงที่และมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จนกระทั่งครบ 1 ปีของการรักษา (แผนภาพที่ 5) ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตก่อน 1 ปีหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI นั้น ไซโตไคน์ชนิด IFN- γ มีแนวโน้มลดต่ำลง (แผนภาพที่ 6) สำหรับไซโตไคน์ชนิด IL-17 (ไซโตไคน์ กลุ่ม Th17) ก็ให้ผลเป็นไปในทางเดียวกับไซโตไคน์ชนิด IFN- γ (แผนภาพที่ 5-6)

4.1.5 เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์กับลักษณะที่แสดงออกทางคลินิก พบว่าปัจจัยที่แตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม ได้แก่ อายุ, ระยะของโรค และวิธีการรักษา

4.2 ผู้ป่วยกลุ่ม OP

4.2.1 แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการมองเห็นและกลุ่มที่สูญเสียประสิทธิภาพการมองเห็นหลังการรักษาด้วย PIAI จำนวนกลุ่มละ 10 ราย

4.2.2 ผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ BG และไซโตไคน์ทั้งชนิด IFN- γ และ IL-17 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (แผนภาพที่ 4,7)

4.2.3 ในผู้ป่วยทุกรายก่อนได้รับการรักษาด้วย PIAI มีระดับสาร BG เป็นค่าลบ (cut-off value < 60 pg/ml) แต่หลังได้รับ PIAI แล้ว ระดับของสาร BG เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% ตั้งแต่ ณ เวลา 1 เดือน จากนั้นจึงเริ่มลดต่ำลงตามลำดับ จนกระทั่งเป็นค่าลบ อีกครั้ง ณ เวลา 3-6 เดือนหลังเริ่มการรักษาด้วย PIAI (แผนภาพที่ 4)

4.2.4 เป็นไปในทางเดียวกันสำหรับสารไซโตไคน์ชนิด IFN- γ (55 ± 19.1 pg/ml) และชนิด IL-17 (<10 pg/ml) ที่มีค่าต่ำในผู้ป่วยทุกรายก่อนได้รับการรักษาด้วย PIAI แต่หลังจากได้ PIAI แล้วพบว่า ระดับของไซโตไคน์ชนิด IFN- γ เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95% ตั้งแต่เดือนที่ 1.5 จนถึงเดือนที่ 6 (160 ± 23.8 pg/ml) ก่อนจะลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการรักษา ณ เวลา 1 ปี สำหรับ cytokines ชนิด IL-17 หลังผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย PIAI นั้นมีระดับเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ค่าความเชื่อมั่น 95%

ในช่วงเดือนที่ 1 จากนั้นจึงลดลงและคงที่ ณ ระดับ 18 ± 12.5 pg/ml โดยเฉลี่ย ณ เดือนที่ 3 จนกระทั่งสิ้นสุดการรักษาด้วย PIA เช่นเดียวกัน (แผนภาพที่ 7)

4.2.5 จากผลการศึกษาในผู้ป่วยนี้แสดงให้เห็นว่า PIAI มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของสาร BG ในกระแสเลือดและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้หลั่งไซโตไคน์ทั้งชนิด IFN- γ และชนิด IL-17 ได้

4.2.6 เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์กับลักษณะที่แสดงออกทางคลินิก พบว่าปัจจัยที่แตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม ได้แก่ อายุ, ระยะของโรค และวิธีการรักษา

โดยสรุป รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับสาร BG และระดับไซโตไคน์ทั้งชนิด IFN- γ และชนิด IL-17 นี้เป็นหนึ่งในตัวชี้วัดทางชีวภาพที่สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจติดตามผลการรักษาและทำนายการดำเนินไปของโรคที่มีหลักฐานชัดเจน สามารถประเมินค่าได้ในเชิงปริมาณ แต่อย่างไรก็ตามสารดังกล่าวมีข้อจำกัดอยู่ที่ความจำเพาะ การเปลี่ยนแปลงของสารเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นได้จากสาเหตุอื่นๆ เช่น การติดเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรียที่มีสาร BG เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการพัฒนาคำถามที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. insidiosum* เพื่อใช้ตรวจควบคุมไปด้วยจึงเป็นสิ่งที่ต้องพัฒนาต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ด้วยข้อจำกัดของงานวิจัยนี้ที่อาศัยสิ่งตรวจจากผู้ป่วยที่กำลังได้รับการรักษาเป็นหลัก ทำให้ควบคุมปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อการศึกษายเปรียบเทียบได้ลำบากเช่น ระยะของโรค วิธีการรักษา คุณสมบัติของผู้ป่วย และจำนวนผู้ป่วยแต่ละกลุ่ม เป็นต้น นั่นหมายรวมถึงการศึกษานี้ไม่สามารถมีกลุ่มควบคุมที่เป็นโรค pythiosis แต่ไม่ได้รับการรักษาด้วย PIA ได้ด้วยโรคนี้ หากไม่ได้รับการรักษาก็จะถึงแก่ชีวิต จัดเป็นการผิดจริยธรรมด้วย ดังนั้นการสรุปประสิทธิภาพของ PIA ที่ใช้ในการรักษาอาจมีข้อจำกัด แต่อย่างไรก็ตามวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้คือหาตัวชี้วัดทางชีวภาพที่สามารถบ่งชี้ถึงผลการรักษาและการดำเนินไปของโรคหลักการรักษา ดังนั้นการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยดังกล่าวจึงสามารถตอบคำถามงานวิจัยนี้ได้ สำหรับกลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในร่างกายผู้ป่วยหลังได้รับการรักษานั้นเป็นเรื่องที่จะต้องศึกษาต่อไปในอนาคตโดยอาจทำการศึกษาทางด้าน Immunology ในส่วนของ Cell-mediated response ในผู้ป่วยเพิ่มเติม ไม่ว่าจะเป็น innate response เช่น neutrophil function หรือ phagocytic activity ของ Natural killer cells หรือ macrophage function นอกเหนือไปจาก complete cytokine profile study ในส่วนของ pro-inflammatory หรือ anti-inflammatory cytokines

ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน

1. การนำส่งตัวอย่างเลือดจากโรงพยาบาลปลายทางมีการนำส่งที่ไม่เหมาะสม เช่น การนำตัวอย่างเลือดแช่เย็น ณ อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ทำให้ตัวอย่างเกิด hemolysis รบกวนกระบวนการตรวจหาสาร BG และไซโตคายน์ในการวิเคราะห์ผล
2. การนัดหมายผู้ป่วยบางรายไม่เป็นไปตามกำหนด ส่งผลกระทบต่อจำนวนผู้ป่วยในโครงการและกระบวนการนำส่งตัวอย่างซึ่งมากถึง 7 ครั้งต่อผู้ป่วย 1 ราย นอกจากนี้การเลื่อนนัดของผู้ป่วยยังส่งผลถึงกระบวนการนำส่งตัวอย่างด้วย เนื่องจากบริการดังกล่าวเป็นบริการขนส่งบริษัทเอกชน บางครั้งติดวันหยุดราชการ/วันหยุดนักขัตฤกษ์
3. ทางคณะผู้วิจัยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผล BG รุ่นเก่า ด้วย program วิเคราะห์มีราคาสูงมาก ทำให้มีอุปสรรคบ้างระหว่างการศึกษาหรือการวิเคราะห์และการแปลผลกับทางผู้เชี่ยวชาญ/ผู้อำนวยการฝ่ายวิชาการ บริษัท Associates of CapeCod จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

คุณภาพผลงาน

ผลการดำเนินงานตลอดโครงการตามเป้าหมายของผลผลิต (output) และตัวชี้วัด

ผลผลิตที่ตั้งเป้าหมายไว้	ตัวชี้วัด			ผลการดำเนินงานตลอดโครงการ
	เชิงปริมาณ	เชิงคุณภาพ	เวลา	
1. วิธีทางเลือกในการตรวจติดตามการรักษาในผู้ป่วย pythiosis	1 วิธี	สามารถตรวจติดตามโรค pythiosis ใน PIA immunotherapy-treated patients	1 ปี	ได้วิธีทางเลือกใหม่ในการตรวจติดตามการรักษาในผู้ป่วย pythiosis
2. บทความที่สามารถตีพิมพ์ได้	อย่างน้อย 1 เรื่อง	สามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มี impact factor อย่างน้อย 2 ขึ้นไป	1 ปี	อยู่ระหว่างการร่างบทความทางวิชาการเพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารระดับนานาชาติ
3. พัฒนาผู้ช่วยวิจัยจากนิสิตระดับโท/เอก	1 คน	ระดับบัณฑิตศึกษา	1 ปี	นิสิตปริญญาเอกจำนวน 1 คน ซึ่งได้เรียนรู้ประสบการณ์การทำวิจัยและจบการศึกษาภายในระยะเวลาที่หลักสูตรกำหนด ซึ่งจะพัฒนาต่อไปเป็นนักวิจัยที่มีคุณภาพยิ่งขึ้นในอนาคต

ผลการดำเนินงานตลอดโครงการตามเป้าหมายของผลลัพธ์ (outcome) และตัวชี้วัด

ผลลัพธ์ที่ตั้งเป้าหมายไว้	ตัวชี้วัด		ผลการดำเนินงานตลอดโครงการ
	เชิงปริมาณ	เชิงคุณภาพ	
1. BG สามารถใช้ในการวินิจฉัย และตรวจติดตามภาวะภูมิคุ้มกันในผู้ป่วย pythiosis ที่รับการรักษาแบบ immunotherapy และเข้าใจความสำคัญและบทบาท PIA IMMUNOTHERAPY ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในผู้ป่วย pythiosis	- นำเสนอผลงานวิจัยอย่างน้อย 1 ครั้ง - ตีพิมพ์ผลงานวิจัยอย่างน้อย 1 ครั้ง	- นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ - ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารที่มีการประเมินอิสระในวารสารระดับนานาชาติที่มี impact factor > 2 - สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจติดตามผลการรักษาในผู้ป่วย therapeutic pythiosis	- วางแผนในการนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ 2018 : 20th International Society for Human and Animal Mycology, Amsterdam, Netherland. - อยู่ระหว่างการร่างบทความทางวิชาการเพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารระดับนานาชาติที่มี impact factor - ได้วิธีทางเลือกใหม่ในการตรวจติดตามการรักษาในผู้ป่วย pythiosis

การนำไปใช้ประโยชน์

มติ นโยบาย	มติเศรษฐกิจ/ พาณิชย์	มติการพัฒนา สังคม /ชุมชน	มติวิชาการ
-	-	-	1. รศ.ดร. อริยา จินตามพร ผู้วิจัยหลักโครงการ ได้รับเชิญให้เป็นวิทยากรพิเศษบรรยายในหัวข้อ “How to guard <i>Pythium insidiosum</i> infection?” ในงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ “20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM)” Amsterdam, Netherland ในวันที่ 30 มิถุนายน - 4 กรกฎาคม 2561 พร้อมกันนี้งานวิจัยโครงการนี้จะได้นำเสนอในรูปแบบของ oral หรือ poster ในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ ดังกล่าวด้วย ซึ่งการประชุมนี้เป็นการนำเสนอผลงานที่รวบรวมผู้เชี่ยวชาญที่เกี่ยวข้องกับเชื้อราทางการแพทย์จากทั่วโลก ดังนั้นผลงานวิจัยที่ได้จะเป็นประโยชน์ไม่เพียงแต่วงการสาธารณสุขในประเทศไทยเท่านั้น งานวิจัยดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ในระดับนานาชาติด้วย
			2. ในการมองภาพรวมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายหลังการติดเชื้อและการรักษาด้วย PIA immunotherapy ทั้งระบบ Innate และ Adaptive นั้น ด้วยผลของค่าไซโตไคนเพียง 2 ชนิดและสาร BG ในงานวิจัยนี้ เรายังไม่สามารถสรุปผลได้ ดังนั้นเพื่อต่อยอดให้งานวิจัยมีคุณค่าทางวิชาการและสามารถแปลผลได้อย่างแม่นยำ คณะผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องรวบรวมผลการทดลองกับไซโตไคนและสารชีวภาพชนิดอื่นๆ ซึ่งในขณะนี้อยู่ระหว่างการรวบรวมผลการทดลอง เพื่อร่างบทความทางวิชาการที่มีคุณภาพสูงเพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารระดับนานาชาติที่มี impact factor สูงต่อไป
			3. ได้ข้อมูลพื้นฐานถึงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับ cytokine ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย pythiosis

หมายเหตุ

1. การใช้ประโยชน์มิตินโยบาย ได้แก่ การนำข้อมูลไปประกอบการตัดสินใจในการบริหาร/ กำหนดนโยบายโดย 1) ได้รับหนังสือขอข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจในเรื่องใดเรื่องหนึ่ง 2) ได้รับหนังสือเรียนเชิญให้ข้อมูลประกอบการตัดสินใจ/กำหนดนโยบาย
2. การใช้ประโยชน์มิติเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ได้แก่ ได้รับหนังสือหรือหลักฐานอื่น แสดงความสนใจเพื่อเจรจาธุรกิจ, มีการซื้อ-ขาย เทคโนโลยีระหว่างนักวิจัยและผู้นำไปใช้ประโยชน์, การจดลิขสิทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากผลงานวิจัย
3. การใช้ประโยชน์มิติการพัฒนาสังคม /ชุมชน โดยการถ่ายทอดเทคโนโลยีที่ได้จากงานวิจัยในกลุ่มเป้าหมายที่กำหนด (อบรม, คู่มือ, แผ่นพับ, โปสเตอร์, เว็บไซต์ ฯลฯ) หรือได้รับหนังสือเรียนเชิญให้ความรู้จากชุมชน/องค์กร/ หน่วยงานในพื้นที่ต่างๆ
4. การใช้ประโยชน์ทางวิชาการ ได้แก่ ได้มีการอ้างอิงผลงานที่ตีพิมพ์วารสารวิชาการระดับประเทศ/ระดับนานาชาติ, ได้รับหนังสือเรียนเชิญเป็นวิทยากรเพื่อให้ความรู้ในกรอบของผลงานวิจัยจากหน่วยงานต่างๆ รวมทั้งการจัดประชุมวิชาการเพื่อแลกเปลี่ยนความรู้จากงานวิจัย

ประสิทธิภาพของการถ่ายทอดงานวิจัยไปสู่กลุ่มเป้าหมาย

กลุ่มเป้าหมายเพื่อเผยแพร่ (ระบุเป็นหน่วยงาน,สื่อสิ่งพิมพ์,แถลง ข่าว)	หลักฐานการ เผยแพร่	จำนวนกลุ่มเป้าหมาย	
		เป้าหมาย	ผลงาน
- กลุ่มแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคติดเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรค pythiosis ได้แก่ แพทย์โรคติดเชื้อ ศัลยแพทย์และ ศัลยแพทย์หลอดเลือด จักษุแพทย์ - บุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้อง - กลุ่มนิสิตนักศึกษาที่ศึกษาในด้านจุลชีววิทยาทางการแพทย์และภูมิคุ้มกันวิทยา	กำลังร่างบทความทางวิชาการ	นักวิชาการ แพทย์ พยาบาล บุคลากรด้านสาธารณสุขที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนนักวิจัยทั้งภายในประเทศไทยและต่างประเทศ	บทความทางวิชาการจำนวน 1 ฉบับ

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. De Cock AW, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. Journal of clinical microbiology. 1987 Feb;25(2):344-9.
2. Mendoza L, Alfaro AA. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. Mycopathologia. 1986 May;94(2):123-9.
3. Howerth EW, Brown CC, Crowder C. Subcutaneous pythiosis in a dog. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. 1989 Jan;1(1):81-3.
4. Campbell CK. Pythiosis. Equine veterinary journal. 1990 Jul;22(4):227-8.
5. Pesavento PA, Barr B, Riggs SM, Eigenheer AL, Pamma R, Walker RL. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. Veterinary pathology. 2008 Jul;45(4):538-41.
6. Bosco Sde M, Bagagli E, Araujo JP, Jr., Candeias JM, de Franco MF, Alencar Marques ME, et al. Human pythiosis, Brazil. Emerging infectious diseases. 2005 May;11(5):715-8. PubMed PMID: 15890126.
7. Thianprasit M, Chaiprasert A, Imwidthaya P. Human pythiosis. Current topics in medical mycology. 1996 Dec;7(1):43-54.
8. Krajaeun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2006 Sep 1;43(5):569-76.
9. Wanachiwanawin W, Mendoza L, Visuthisakchai S, Mutsikapan P, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, Suwanagool P, Manuskiatti W, Ruangsetakit C, Ajello L. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. Vaccine. 2004 Sep 9;22(27-28):3613-21.
10. Permpalung N, Worasilchai N, Plongla R, Upala S, Sanguankeo A, Paitoonpong L, Mendoza L, Chindamporn A. Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. J Antimicrob Chemother. 2015 Jun;70(6):1885-92.
11. Supabandhu J, Fisher MC, Mendoza L, Vanittanakom N. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. Medical mycology. 2008 Feb;46(1):41-52.

12. Gastra W, Lipman LJ, De Cock AW, Exel TK, Pegge RB, Scheurwater J, et al. *Pythium insidiosum*: an overview. Veterinary microbiology. 2010 Nov 20;146(1-2):1-16.
13. Keoprasom N, Chularojanamontri L, Chayakulkeeree M, Chaiprasert A, Wanachiwanawin W, Ruangsetakit C. Vascular pythiosis in a thalassemic patient presenting as bilateral leg ulcers. Medical mycology case reports. 2012 Dec 8;2:25-8.
14. Thongsri Y, Wonglakorn L, Chaiprasert A, Svobodova L, Hamal P, Pakarasang M, et al. Evaluation for the clinical diagnosis of *Pythium insidiosum* using a single-tube nested PCR. Mycopathologia. 2013 Dec;176(5-6):369-76.
15. Vanittanakom N, Supabandhu J, Khamwan C, Praparattanapan J, Thirach S, Prasertwitayakij N, et al. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. Journal of clinical microbiology. 2004 Sep;42(9):3970-4.
16. Mendoza L, Kaufman L, Standard PG. Immunodiffusion test for diagnosing and monitoring pythiosis in horses. Journal of clinical microbiology. 1986 May;23(5):813-6.
17. Mendoza L, Kaufman L, Mandy W, Glass R. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 1997 Nov;4(6):715-8.
18. Krajaejun T, Kunakorn M, Prachartam R, Chongtrakool P, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, et al. Identification of a novel 74-kiloDalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. Journal of clinical microbiology. 2006 May;44(5):1674-80.
19. Kosirukvongs P, Chaiprasert A, Uiprasertkul M, Chongcharoen M, Banyong R, Krajaejun T, et al. Evaluation of nested pcr technique for detection of *Pythium insidiosum* in pathological specimens from patients with suspected fungal keratitis. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 2014 Jan;45(1):167-73.
20. Chareonsirisuthigul T, Khositnithikul R, Intaramat A, Inkomlue R, Sriwanichrak K, Piomsontikorn S, et al. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2013 May;76(1):42-5. PubMed PMID: 23537786.
21. Tondolo JS, Loreto ES, Denardi LB, Mario DA, Alves SH, Santurio JM. A simple, rapid and inexpensive screening method for the identification of *Pythium insidiosum*. Journal of microbiological methods. 2013 Apr;93(1):52-4.

22. Prasertwitayakij N, Louthrenoo W, Kasitanon N, Thamprasert K, Vanittanakom N. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: case report and literature review. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2003 Dec;33(3):204-14.
23. Mendoza L, Newton JC. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Medical mycology*. 2005 Sep;43(6):477-86.
24. Fungal vaccines and immunotherapeutics. Santos E, Levitz SM. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Nov 3;4(11):a019711
25. A peptide ELISA to detect antibodies against *Pythium insidiosum* based on predicted antigenic determinants of exo-1,3-beta-glucanase. Keeratijarut A, Lohnoo T, Yingyong W, Sriwanichrak K, Krajaejun T. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2013 Jul 4;44(4):672-80.
26. Wright WF, Overman SB. and Ribes JA. (1-3)- β -D-Glucan Assay: A Review of its Laboratory and Clinical Application *LABMEDICINE*. 2011;42:679-85.
27. Ceesay MM, Desai SR, Berry L, Cleverley J, Kibbler CC, Pomplun S, et al. A comprehensive diagnostic approach using galactomannan, targeted B-D-glucan, baseline computerized tomography and biopsy yields a significant burden of invasive fungal disease in at risk haematology patients. *British Journal of Haematology*. 2014.
28. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011 Mar 15;52(6):750-70.

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานที่สังกัด

หัวหน้าโครงการ

1. รศ.ดร. อริยา จินตามพร Assoc. Prof. Ariya Chindamporn, PhD.

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน: 3 1001 001 85 41 3

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลาที่ใช้ทำวิจัย (ชั่วโมง/สัปดาห์) เวลาที่วิจัย: 25 ชั่วโมง/สัปดาห์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 1873 อาคาร อปร. ชั้น 15 ห้อง 1510B

ถ.พระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน จ.กรุงเทพมหานคร 10330

โทรศัพท์ 02-256-4132#611 E-mail: drariya@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

1974-1978 BSc. (General Sciences)

Kasetsart University

1978-1980 MS. (Microbiology)

Mahidol University

(Supported by Graduate Grant, Mahidol University)

1990-1995 Ph.D. (Basic Sciences)

Nagoya University, Japan

(Supported by Hitachi Scholarship Foundation, Japan)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

จุลชีววิทยาทางการแพทย์ (เชื้อรา)

7. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (3 ปีย้อนหลัง)

7.1 Worasilchai N, Permpalung N, Chindamporn A. High-resolution melting analysis: A novel approach for clade differentiation in *Pythium insidiosum* and pythiosis. Med Mycol. 2017 Dec 8.

7.2 Chindamporn A, Chakrabarti A, Li R, Sun PL, Tan BH, Chua M, Wahyuningsih R, Patel A, Liu Z, Chen YC, Chayakulkeeree M. Survey of laboratory practices for diagnosis of fungal infection in seven Asian countries: An Asia Fungal Working Group (AFWG) initiative. Med Mycol. 2017 Sep 20.

7.3 Larsuprom L, Duangkaew L, Kasornchokbua C, Chen C, Chindamporn A, Worasilchai N. Feline cutaneous histoplasmosis: The first case report from Thailand. Med Mycol Case Rep. 2017 Jul 25;18:28-30.

- 7.4 Panpetch W, Somboonna N, Bulan DE, Issara-Amphorn J, Finkelman M, Worasilchai N, Chindamporn A, Palaga T, Tumwasorn S, Leelahavanichkul A. Oral administration of live- or heat-killed *Candida albicans* worsened cecal ligation and puncture sepsis in a murine model possibly due to an increased serum (1→3)- β -D-glucan. PLoS One. 2017 Jul 27;12(7)
- 7.5 Worasilchai N, Chaumpluk P, Chakrabarti A, Chindamporn A. Differential diagnosis for pythiosis using thermophilic helicase DNA amplification and restriction fragment length polymorphism (tHDA-RFLP). Med Mycol. 2017 May 18.
- 7.6 Panpetch W, Somboonna N, Bulan DE, Issara-Amphorn J, Worasilchai N, Finkelman M, Chindamporn A, Palaga T, Tumwasorn S, Leelahavanichkul A. Gastrointestinal Colonization of *Candida Albicans* Increases Serum (1→3)- β -D-Glucan, without Candidemia, and Worsens Cecal Ligation and Puncture Sepsis in Murine Model. Shock. 2017 May 11.
- 7.7 Nitinawarat J, Putcharoen O, Chindamporn A, Rerknimitr P. Subcutaneous *Saksenaea vasiformis* infection presenting as disfiguring facial plaques. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2017 May-Jun;83(3):346-348.
- 7.8 Duangkaew L, Larsuprom L, Kasondorkbua C, Chen C, Chindamporn A. Cutaneous blastomycosis and dermatophytic pseudomycetoma in a Persian cat from Bangkok, Thailand. Med Mycol Case Rep. 2017 Jan 6;15:12-15.
- 7.9 Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Fonseca FM, Ferreira TB, Mora DJ, Andrade-Silva J, Khan A, Dao A, Reis EC, Almeida MT, Maltos A, Junior VR, Trilles L, Rickerts V, Chindamporn A, Sykes JE, Cogliati M, Nielsen K, Boekhout T, Fisher M, Kwon-Chung J, Engelthaler DM, Lazéra M, Meyer W, Silva-Vergara ML. MLST-Based Population Genetic Analysis in a Global Context Reveals Clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI Isolates from HIV Patients in Southeastern Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Jan 18;11(1)
- 7.10 The role of macrophages in the susceptibility of Fc gamma receptor IIb deficient mice to *Cryptococcus neoformans*. Surawut S, Ondee T, Taratummarat S, Palaga T, Pisitkun P, Chindamporn A, Leelahavanichkul A. Sci Rep. 2017 Jan 11;7:40006. doi: 10.1038/srep40006.
- 7.11 Worasilchai N, Tangwattanachuleeporn M, Meesilpavikkai K, Folba C, Kangogo M, Groß U, Weig M, Bader O, Chindamporn A. Diversity and Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus* Isolates in Thailand. Med Mycol. 2016 Dec 3.
- 7.12 Leelahavanichkul A, Worasilchai N, Wannalerdsakun S, Jutivorakool K, Somparn P, Issara-Amphorn J, Tachaboon S, Srisawat N, Finkelman M, Chindamporn A. Gastrointestinal Leakage Detected by Serum (1→3)- β -D-Glucan in Mouse

- Models and a Pilot Study in Patients with Sepsis. *Shock*. 2016 Nov;46(5):506-518.
- 7.13 Tangwattanachuleeporn M, Minarin N, Saichan S, Sermsri P, Mitkornburee R, Groß U, Chindamporn A, Bader O. Prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of Thailand. *Med Mycol*. 2017 Jun 1;55(4):429-435.
 - 7.14 Leelahavanichkul A, Panpetch W, Worasilchai N, Somporn P, Chancharoenthana W, Nilgate S, Finkelman M, Chindamporn A, Tumwasorn S. Evaluation of gastrointestinal leakage using serum (1→3)- β -D-glucan in a *Clostridium difficile* murine model. *FEMS Microbiol Lett*. 2016 Sep;363(18).
 - 7.15 Watanasrisin W, Iwatani S, Oura T, Tomita Y, Ikushima S, Chindamporn A, Niimi M, Niimi K, Lamping E, Cannon RD, Kajiwarra S. Identification and characterization of *Candida utilis* multidrug efflux transporter CuCdr1p. *FEMS Yeast Res*. 2016 Jun;16(4).
 - 7.16 Ruangritchankul K, Chindamporn A, Worasilchai N, Poumsuk U, Keelawat S, Bychkov A. Invasive fungal disease in university hospital: a PCR-based study of autopsy cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Nov 1;8(11):14840-52.
 - 7.17 Panapruksachat S, Iwatani S, Oura T, Vanittanakom N, Chindamporn A, Niimi K, Niimi M, Lamping E, Cannon RD, Kajiwarra S. Identification and functional characterization of *Penicillium marneffei* pleiotropic drug resistance transporters ABC1 and ABC2. *Med Mycol*. 2016 Jul 1;54(5):478-91.
 - 7.18 Leelahavanichkul A, Pongpirul K, Thongbor N, Worasilchai N, Petphuak K, Thongsawang B, Towannang P, Lorvinitnun P, Sukhontasing K, Katavetin P, Praditpornsilpa K, Eiam-Ong S, Chindamporn A, Kanjanabuch T. (1→3)- β -D-Glucan and Galactomannan for Differentiating Chemical "Black Particles" and Fungal Particles Inside Peritoneal Dialysis Tubing. *Perit Dial Int*. 2016 Jul-Aug;36(4):402-9.
 - 7.19 Tan BH, Chakrabarti A, Li RY, Patel AK, Watcharananan SP, Liu Z, Chindamporn A, Tan AL, Sun PL, Wu UI, Chen YC; Asia Fungal Working Group (AFWG). Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: a laboratory-based surveillance study. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Oct;21(10):946-53.
 - 7.20 Worasilchai N, Leelahavanichkul A, Kanjanabuch T, Thongbor N, Lorvinitnun P, Sukhontasing K, Finkelman M, Chindamporn A. (1→3)- β -D-glucan and galactomannan testing for the diagnosis of fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients, a pilot study. *Med Mycol*. 2015 May;53(4):338-46.
 - 7.21 Permpalung N, Worasilchai N, Plongla R, Upala S, Sanguankeo A, Paitoonpong L, Mendoza L, Chindamporn A. Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy

- and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. J Antimicrob Chemother. 2015;70(6):1885-92.
- 7.22 Suankratay C, Dhissayakamol O, Uaprasert N, Chindamporn A. Invasive pulmonary infection caused by *Chrysosporium articulatum*: the first case report. Mycoses. 2015 Jan;58(1):1-3.
- 7.23 Detporntewan P, Chindamporn A, Worasilchai N, Suankratay C. A case of invasive pulmonary infection caused by novel species of *Perenniporia*. Mycoses. 2014 Nov;57(11):703-5.
- 7.24 Issarachaikul R, Lertwannawit O, Detporntewan P, Uaprasert N, Plongla R, Shuangshoti S, Chindamporn A, Suankratay C. Catheter-related bloodstream infections caused by *Trichosporon* species. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2014 Mar;45(2):421-9.

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1

1. ผศ.นพ.ดร. อัษฎาศรี ลีฬหวนิชกุล Asada Leelahavanichkul, MD, PhD
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3100601653835
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
 อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เวลาที่ใช้ทำวิจัย (ชั่วโมง/สัปดาห์) เวลาที่วิจัย: 20 ชั่วโมง/สัปดาห์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
 33/239 หมู่บ้านกัสสร 1 ถ.เลียบคลองสาม ต.คลองสาม อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี
 โทรศัพท์: 02-504-1035 E-mail: a_leelahavanit@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา
 2553 ดุษฎีบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
 2548-2553 Visiting fellow National institute of Health (NIH), Maryland, USA
 2547 Board of Nephrology จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
 2545 Board of Internal Medicine จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
 2539 แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
 โรคไตวายจากภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด
7. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (3 ปีย้อนหลัง)

- 7.1 Chancharoenthana W, Leelahavanichkul A, Taratummarat S, Wongphom J, Tiranathanagul K, Eiam-Ong S. Cilostazol attenuates intimal hyperplasia in a mouse model of chronic kidney disease. PLoS One. 2017 Dec 5.
- 7.2 Tangtanatakul P, Thammasate B, Jacquet A, Reantragoon R, Pisitkun T, Avihingsanon Y, Leelahavanichkul A, Hirankarn N. Transcriptomic profiling in human mesangial cells using patient-derived lupus autoantibodies identified miR-10a as a potential regulator of IL8. Sci Rep. 2017 Nov 6;7(1):14517.
- 7.3 Panpetch W, Chancharoenthana W, Bootdee K, Nilgate S, Finkelman M, Tumwasorn S, Leelahavanichkul A. Lactobacillus rhamnosus L34 Attenuates Gut Translocation-Induced Bacterial Sepsis in Murine Models of Leaky Gut. Infect Immun. 2017 Dec 19.
- 7.4 Satirapoj B, Kitiyakara C, Leelahavanichkul A, Avihingsanon Y, Supasynndh O. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin to predict renal response after induction therapy in active lupus nephritis. BMC Nephrol. 2017 Aug 4;18(1):263.
- 7.5 Panpetch W, Somboonna N, Bulan DE, Issara-Amphorn J, Finkelman M, Worasilchai N, Chindamporn A, Palaga T, Tumwasorn S, Leelahavanichkul A. Oral administration of live- or heat-killed *Candida albicans* worsened cecal ligation and puncture sepsis in a murine model possibly due to an increased serum (1→3)- β -D-glucan. PLoS One. 2017 Jul 27;12(7)
- 7.6 Panpetch W, Somboonna N, Bulan DE, Issara-Amphorn J, Worasilchai N, Finkelman M, Chindamporn A, Palaga T, Tumwasorn S, Leelahavanichkul A. Gastrointestinal Colonization of *Candida Albicans* Increases Serum (1→3)- β -D-Glucan, without Candidemia, and Worsens Cecal Ligation and Puncture Sepsis in Murine Model. Shock. 2017 May 11
- 7.7 Cannizzaro L, Rossoni G, Savi F, Altomare A, Marinello C, Saethang T, Carini M, Payne DM, Pisitkun T, Aldini G, Leelahavanichkul A. Regulatory landscape of AGE-RAGE-oxidative stress axis and its modulation by PPAR γ activation in high fructose diet-induced metabolic syndrome. Nutr Metab (Lond). 2017 Jan 13;14:5.
- 7.8 Surawut S, Ondee T, Taratummarat S, Palaga T, Pisitkun P, Chindamporn A, Leelahavanichkul A. The role of macrophages in the susceptibility of Fc

- gamma receptor IIb deficient mice to *Cryptococcus neoformans*. Sci Rep. 2017 Jan 11;7:40006.
- 7.9 Panich T, Chanchaoenthana W, Somparn P, Issara-Amphorn J, Hirankarn N, Leelahavanichkul A. Urinary exosomal activating transcriptional factor 3 as the early diagnostic biomarker for sepsis-induced acute kidney injury. BMC Nephrol. 2017 Jan 7;18(1):10.
 - 7.10 Ondee T, Surawut S, Taratummarat S, Hirankarn N, Palaga T, Pisitkun P, Pisitkun T, Leelahavanichkul A. Fc Gamma Receptor IIB Deficient Mice: A Lupus Model with Increased Endotoxin Tolerance-Related Sepsis Susceptibility. Shock. 2017 Jun;47(6):743-752.
 - 7.11 Leelahavanichkul A, Worasilchai N, Wannalerdsakun S, Jutivorakool K, Somparn P, Issara-Amphorn J, Tachaboon S, Srisawat N, Finkelman M, Chindamporn A. Gastrointestinal Leakage Detected by Serum (1→3)- β -D-Glucan in Mouse Models and a Pilot Study in Patients with Sepsis. Shock. 2016 Nov;46(5):506-518.
 - 7.12 Kanjanabuch T, Lumlertgul N, Pearson LJ, Chatsuwan T, Pongpirul K, Leelahavanichkul A, Thongbor N, Nuntawong G, Praderm L, Wechagama P, Narenpitak S, Wechpradit A, Punya W, Halue G, Naka P, Jeenapongsa S, Eiam-Ong S. Peritoneal Dialysis-Related Peritonitis Due to Melioidosis: A Potentially Devastating Condition. Perit Dial Int. 2017 Mar-Apr;37(2):183-190.
 - 7.13 Leelahavanichkul A, Panpetch W, Worasilchai N, Somparn P, Chanchaoenthana W, Nilgate S, Finkelman M, Chindamporn A, Tumwasorn S. Evaluation of gastrointestinal leakage using serum (1→3)- β -D-glucan in a *Clostridium difficile* murine model. FEMS Microbiol Lett. 2016 Sep;363(18).
 - 7.14 Kritmetapak K, Peerapornratana S, Srisawat N, Somlaw N, Lakananurak N, Dissayabuttra T, Phonork C, Leelahavanichkul A, Tiranathanagul K, Susantithapong P, Loaveeravat P, Suwachittanont N, Wirotwan TO, Praditpornsilpa K, Tungsanga K, Eiam-Ong S, Kittiskulnam P. The Impact of Macro-and Micronutrients on Predicting Outcomes of Critically Ill Patients Requiring Continuous Renal Replacement Therapy. PLoS One. 2016 Jun 28;11(6)
 - 7.15 Kupatawintu P, Tatawatorn A, Premasathian N, Avihingsanon Y, Leelahavanichkul A, Hirankarn N. Association between flow cytometric

- crossmatching and graft survival in Thai cadaveric-donor kidney transplantation. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2016 Mar;34(1):86-93.
- 7.16 Leelahavanichkul A, Somparn P, Issara-Amphorn J, Eiam-ong S, Avihingsanon Y, Hirankarn N, Srisawat N. Serum Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) Outperforms Serum Creatinine in Detecting Sepsis-Induced Acute Kidney Injury, Experiments on Bilateral Nephrectomy and Bilateral Ureter Obstruction Mouse Models. *Shock*. 2016 May;45(5):570-6.
 - 7.17 Chanchaoenthana W, Townamchai N, Leelahavanichkul A, Wattanatorn S, Kanjanabuch T, Avihingsanon Y, Praditpornsilpa K, Eiam-Ong S. Rituximab for recurrent IgA nephropathy in kidney transplantation: A report of three cases and proposed mechanisms. *Nephrology (Carlton)*. 2017 Jan;22(1):65-71.
 - 7.18 Leelahavanichkul A, Pongpirul K, Thongbor N, Worasilchai N, Petphuak K, Thongsawang B, Towannang P, Lorvinitnun P, Sukhontasing K, Katavetin P, Praditpornsilpa K, Eiam-Ong S, Chindamporn A, Kanjanabuch T. (1→3)- β -D-Glucan and Galactomannan for Differentiating Chemical "Black Particles" and Fungal Particles Inside Peritoneal Dialysis Tubing. *Perit Dial Int*. 2016 Jul-Aug;36(4):402-9.
 - 7.19 Townamchai N, Chanchaoenthana W, Vadcharavivad S, Chariyavilaskul P, Pongpirul K, Leelahavanichkul A, Watanatorn S, Avihingsanon Y, Praditpornsilpa K, Srisawat N. A Simple Novel Technique to Estimate Tacrolimus Dosages During the Early Post Kidney Transplantation Period. *Transplant Proc*. 2015 Oct;47(8):2433-8.
 - 7.20 Tantivitayakul P, Benjachat T, Somparn P, Leelahavanichkul A, Kittikovit V, Hirankarn N, Pisitkun T, Avihingsanon Y. Elevated expressions of myeloid-related proteins-8 and -14 are danger biomarkers for lupus nephritis. *Lupus*. 2016 Jan;25(1):38-45.
 - 7.21 Benjachat T, Tongyoo P, Tantivitayakul P, Somparn P, Hirankarn N, Prom-On S, Pisitkun P, Leelahavanichkul A, Avihingsanon Y, Townamchai N. Biomarkers for Refractory Lupus Nephritis: A Microarray Study of Kidney Tissue. *Int J Mol Sci*. 2015 Jun 23;16(6):14276-90.
 - 7.22 Leelahavanichkul A, Somparn P, Bootprapan T, Tu H, Tangtanatakul P, Nuengjumnong R, Worasilchai N, Tiranathanagul K, Eiam-ong S, Levine M,

- Chinampon A, Srisawat N. High-dose ascorbate with low-dose amphotericin B attenuates severity of disease in a model of the reappearance of candidemia during sepsis in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015 Aug 1;309(3)
- 7.23 Suwanpen C, Nouanthong P, Jaruvongvanich V, Pongpirul K, Pongpirul WA, Leelahavanichkul A, Kanjanabuch T. Urinary podocalyxin, the novel biomarker for detecting early renal change in obesity. *J Nephrol*. 2016 Feb;29(1):37-44.
- 7.24 Worasilchai N, Leelahavanichkul A, Kanjanabuch T, Thongbor N, Lorvinitnun P, Sukhontasing K, Finkelman M, Chindamporn A. (1→3)- β -D-glucan and galactomannan testing for the diagnosis of fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients, a pilot study. *Med Mycol*. 2015 May;53(4):338-46.
- 7.25 Leelahavanichkul A, Somporn P, Panich T, Chanchaoenthana W, Wongphom J, Pisitkun T, Hirankarn N, Eiam-Ong S. Serum miRNA-122 in acute liver injury induced by kidney injury and sepsis in CD-1 mouse models. *Hepatol Res*. 2015 Dec;45(13):1341-52.
- 7.26 Dillenburg-Pilla P, Patel V, Mikelis CM, Zárate-Bladés CR, Doçi CL, Amornphimoltham P, Wang Z, Martin D, Leelahavanichkul K, Dorsam RT, Masedunskas A, Weigert R, Molinolo AA, Gutkind JS. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/G α i/mTORC1 axis. *FASEB J*. 2015 Mar;29(3):1056-68.
- 7.27 Chanchaoenthana W, Townamchai N, Pongpirul K, Kittiskulnam P, Leelahavanichkul A, Avihingsanon Y, Suankratay C, Wattanatorn S, Kittikowit W, Praditpornsilpa K, Tungsanga K, Eiam-Ong S. The outcomes of kidney transplantation in hepatitis B surface antigen (HBsAg)-negative recipients receiving graft from HBsAg-positive donors: a retrospective, propensity score-matched study. PMID: *Am J Transplant*. 2014 Dec;14(12):2814-20.
- 7.28 Huebner AR, Somporn P, Benjachat T, Leelahavanichkul A, Avihingsanon Y, Fenton RA, Pisitkun T. Exosomes in urine biomarker discovery. *Adv Exp Med Biol*. 2015;845:43-58.
- 7.29 Leelahavanichkul A, Souza AC, Street JM, Hsu V, Tsuji T, Doi K, Li L, Hu X, Zhou H, Kumar P, Schnermann J, Star RA, Yuen PS. Comparison of serum creatinine

and serum cystatin C as biomarkers to detect sepsis-induced acute kidney injury and to predict mortality in CD-1 mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2014 Oct 15;307(8):F939-48.

- 7.30 Leelahavanichkul K, Amornphimoltham P, Molinolo AA, Basile JR, Koontongkaew S, Gutkind JS. A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. Mol Oncol. 2014 Feb;8(1):105-18.

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

1. อ.พญ.ดร. รังสิมา เจริญตระกูล Rungsima Reantragoon, MD, PhD.
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 1-1014-00379-994
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เวลาที่ใช้ทำวิจัย (ชั่วโมง/สัปดาห์)เวลาที่วิจัย: 20 ชั่วโมง/สัปดาห์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1873 ถนนพระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
หมายเลขโทรศัพท์ 0-2256-4132 #623 โทรสาร 0-2252-5952
5. ประวัติการศึกษา
2557 Postdoctoral training, Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, Parkville, VIC, Australia
2553 Ph.D. in Microbiology and Immunology, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Parkville, VIC, Australia
2546 แพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Medical immunology
7. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
7.1 Tangtanatakul P, Thammasate B, Jacquet A, Reantragoon R, Pisitkun T, Avihingsanon Y, Leelahavanichkul A, Hirankarn N. Transcriptomic profiling in

- human mesangial cells using patient-derived lupus autoantibodies identified miR-10a as a potential regulator of IL8. *Sci Rep*. 2017 Nov 6.
- 7.2 Apinun J, Sengprasert P, Yuktanandana P, Ngarmukos S, Tanavalee A, Reantragoon R. Immune Mediators in Osteoarthritis: Infrapatellar Fat Pad-Infiltrating CD8+ T Cells Are Increased in Osteoarthritic Patients with Higher Clinical Radiographic Grading. *Int J Rheumatol*. 2016
 - 7.3 Reantragoon R, Boonpattanaporn N, Corbett AJ, McCluskey J. Mucosal-associated invariant T cells in clinical diseases. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2016 Mar;34(1):3-10. Review.
 - 7.4 Li J, Reantragoon R, Kostenko L, Corbett AJ, Varigos G, Carbone FR.
 - 7.5 The frequency of mucosal-associated invariant T cells is selectively increased in dermatitis herpetiformis. *Australas J Dermatol*. 2017 Aug;58(3):200-204.
 - 7.6 Eckle SB, Birkinshaw RW, Kostenko L, Corbett AJ, McWilliam HE, Reantragoon R, Chen Z, Gherardin NA, Beddoe T, Liu L, Patel O, Meehan B, Fairlie DP, Villadangos JA, Godfrey DI, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Rossjohn J. A molecular basis underpinning the T cell receptor heterogeneity of mucosal-associated invariant T cells. *J Exp Med*. 2014 Jul 28;211(8):1585-600.
 - 7.7 Corbett AJ, Eckle SB, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, Chen Z, Reantragoon R, Meehan B, Cao H, Williamson NA, Strugnell RA, Van Sinderen D, Mak JY, Fairlie DP, Kjer-Nielsen L, Rossjohn J, McCluskey J. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature*. 2014 May 15;509(7500):361-5.
 - 7.8 Reantragoon R, Corbett AJ, Sakala IG, Gherardin NA, Furness JB, Chen Z, Eckle SB, Uldrich AP, Birkinshaw RW, Patel O, Kostenko L, Meehan B, Kedzierska K, Liu L, Fairlie DP, Hansen TH, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J, Kjer-Nielsen L. Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J Exp Med*. 2013 Oct 21;210(11):2305-20.
 - 7.9 Patel O, Kjer-Nielsen L, Le Nours J, Eckle SB, Birkinshaw R, Beddoe T, Corbett AJ, Liu L, Miles JJ, Meehan B, Reantragoon R, Sandoval-Romero ML, Sullivan LC, Brooks AG, Chen Z, Fairlie DP, McCluskey J, Rossjohn J. Recognition of vitamin B metabolites by mucosal-associated invariant T cells. *Nat Commun*. 2013;4:2142.
 - 7.10 Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, Bhati M, Chen Z, Kostenko L, Reantragoon R, Williamson NA, Purcell AW, Dudek NL, McConville MJ, O'Hair RA, Khairallah GN, Godfrey DI, Fairlie DP, Rossjohn J, McCluskey J. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*. 2012 Nov 29;491(7426):717-23. doi: 10.1038/nature11605. Epub 2012 Oct 10.

- 7.11 Reantragoon R, Kjer-Nielsen L, Patel O, Chen Z, Illing PT, Bhati M, Kostenko L, Bharadwaj M, Meehan B, Hansen TH, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J. Structural insight into MR1-mediated recognition of the mucosal associated invariant T cell receptor. *J Exp Med*. 2012 Apr 9;209(4):761-74.
- 7.12 Klaewsongkram J, Reantragoon R. Asthma research performance in Asia-Pacific: a bibliometric analysis by searching PubMed database. *J Asthma*. 2009 Dec;46(10):1013-20.
- 7.13 Reantragoon S, Arrigo LM, Dweck HS, Rosenfeld L. Suppression of endothelin-1 production in cultured human umbilical vein endothelial cells by heparin fractions separated by strong anion exchange chromatography. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Mar 15;327(2):234-8.
- 7.14 Reantragoon S, Arrigo LM, Seoud MM, Dweck HS, Rosenfeld L. Specific heparin fractions suppress endothelin-1 production in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Arch Biochem Biophys*. 1994 Nov 1;314(2):315-22.
- 7.15 Reantragoon S, Chivers RC. A procedure for cutting soft tissue specimens of regular shape. *Ultrasound Med Biol*. 1987 Jun;13(6):L364-7.

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 3

1. นวพร วรศิลป์ชัย Navaporn Worasilchai, MS.
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 1-2001-00128-83-8
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
 นิสิตปริญญาโทชั้นปีที่ 2 หลักสูตรสหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เวลาที่ใช้ทำวิจัย (ชั่วโมง/สัปดาห์) เวลาที่วิจัย: 50 ชั่วโมง/สัปดาห์
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 1873 อาคาร อปร. ชั้น 15 ห้อง 1515
 ถ.พระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน จ.กรุงเทพมหานคร 10330
5. ประวัติการศึกษา

2005 – 2008	B.Sc. (Medical Technology) Chulalongkorn University, Thailand
2009 – 2012	M.Sc. (Medical Microbiology) Chulalongkorn University, Thailand (Partially supported by Chula Research Assistant Grant)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Medical mycology

7. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- 7.1 Worasilchai N, Permpalung N, Chindamporn A. High-resolution melting analysis: A novel approach for clade differentiation in *Pythium insidiosum* and pythiosis. Med Mycol. 2017 Dec 8.
- 7.2 Larsuprom L, Duangkaew L, Kasorndorkbua C, Chen C, Chindamporn A, Worasilchai N. Feline cutaneous histoplasmosis: The first case report from Thailand. Med Mycol Case Rep. 2017 Jul 25;18:28-30.
- 7.3 Panpetch W, Somboonna N, Bulan DE, Issara-Amphorn J, Finkelman M, Worasilchai N, Chindamporn A, Palaga T, Tumwasorn S, Leelahavanichkul A. Oral administration of live- or heat-killed *Candida albicans* worsened cecal ligation and puncture sepsis in a murine model possibly due to an increased serum (1→3)- β -D-glucan. PLoS One. 2017 Jul 27;12(7)
- 7.4 Worasilchai N, Chaumpluk P, Chakrabarti A, Chindamporn A. Differential diagnosis for pythiosis using thermophilic helicase DNA amplification and restriction fragment length polymorphism (tHDA-RFLP). Med Mycol. 2017 May 18.
- 7.5 Panpetch W, Somboonna N, Bulan DE, Issara-Amphorn J, Worasilchai N, Finkelman M, Chindamporn A, Palaga T, Tumwasorn S, Leelahavanichkul A. Gastrointestinal Colonization of *Candida Albicans* Increases Serum (1→3)- β -D-Glucan, without Candidemia, and Worsens Cecal Ligation and Puncture Sepsis in Murine Model. Shock. 2017 May 11.
- 7.6 Worasilchai N, Tangwattanachuleeporn M, Meesilpavikkai K, Folba C, Kangogo M, Groß U, Weig M, Bader O, Chindamporn A. Diversity and Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus* Isolates in Thailand. Med Mycol. 2016 Dec 3.
- 7.7 Leelahavanichkul A, Worasilchai N, Wannalerdsakun S, Jutivorakool K, Somparn P, Issara-Amphorn J, Tachaboon S, Srisawat N, Finkelman M, Chindamporn A. Gastrointestinal Leakage Detected by Serum (1→3)- β -D-Glucan in Mouse Models and a Pilot Study in Patients with Sepsis. Shock. 2016 Nov;46(5):506-518.
- 7.8 Leelahavanichkul A, Panpetch W, Worasilchai N, Somparn P, Chancharoenthana W, Nilgate S, Finkelman M, Chindamporn A, Tumwasorn S. Evaluation of gastrointestinal leakage using serum (1→3)- β -D-glucan in a *Clostridium difficile* murine model. FEMS Microbiol Lett. 2016 Sep;363(18).

- 7.9 Ruangritchankul K, Chindamporn A, Worasilchai N, Poumsuk U, Keelawat S, Bychkov A. Invasive fungal disease in university hospital: a PCR-based study of autopsy cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Nov 1;8(11)
- 7.10 Leelahavanichkul A, Pongpirul K, Thongbor N, Worasilchai N, Petphuak K, Thongsawang B, Towannang P, Lorvinitnun P, Sukhontasing K, Katavetin P, Praditpornsilpa K, Eiam-Ong S, Chindamporn A, Kanjanabuch T. (1→3)- β -D-Glucan and Galactomannan for Differentiating Chemical "Black Particles" and Fungal Particles Inside Peritoneal Dialysis Tubing. *Perit Dial Int*. 2016 Jul-Aug;36(4):402-9.
- 7.11 Kangogo M, Bader O, Boga H, Wanyoike W, Folba C, Worasilchai N, Weig M, Groß U, Bii CC. Molecular types of *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex from clinical and environmental sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses*. 2015 Nov;58(11):665-70.
- 7.12 Leelahavanichkul A, Somparn P, Bootprapan T, Tu H, Tangtanatakul P, Nuengjumnong R, Worasilchai N, Tiranathanagul K, Eiam-ong S, Levine M, Chinampon A, Srisawat N. High-dose ascorbate with low-dose amphotericin B attenuates severity of disease in a model of the reappearance of candidemia during sepsis in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015 Aug 1;309(3)
- 7.13 Worasilchai N, Leelahavanichkul A, Kanjanabuch T, Thongbor N, Lorvinitnun P, Sukhontasing K, Finkelman M, Chindamporn A. (1→3)- β -D-glucan and galactomannan testing for the diagnosis of fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients, a pilot study. *Med Mycol*. 2015 May;53(4):338-46.
- 7.14 Permpalung N, Worasilchai N, Plongla R, Upala S, Sanguankeo A, Paitoonpong L, Mendoza L, Chindamporn A. Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(6):1885-92.
- 7.15 Detporntewan P, Chindamporn A, Worasilchai N, Suankratay C. A case of invasive pulmonary infection caused by novel species of *Perenniporia*. *Mycoses*. 2014 Nov;57(11):703-5.