

พยาธิ *Strongyloides stercoralis* เป็นพยาธิตัวกลมในลำไส้ที่ก่ออันตรายในคน ทำให้เกิดภาวะการดูดซึมอาหารเสียไป ร่างกายขาดสารอาหารที่จำเป็น ในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยเฉพาะจากการได้รับยาในกลุ่มสเตียรอยด์ พยาธิสามารถเพิ่มจำนวนในคนได้เองอย่างมากมาย แม้ไม่ได้รับพยาธิเข้าไปใหม่ นอกจากนั้นยังมีปัญหาการรักษาให้หายยาก การรักษาด้วยยาที่ไม่มีประสิทธิภาพทำให้ไม่หายจากโรคและยังเป็นการสูญเสียค่าทางเศรษฐกิจ และทำให้พยาธิสายพันธุ์ที่ดื้อยาแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อม ซึ่งยากต่อการควบคุม การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจสอบการดื้อยา albendazole และยา ivermectin ของพยาธิ *S. stercoralis* ในหลอดทดลอง เพื่อใช้ประเมินโอกาสการดื้อยา albendazole ของพยาธิในคน เพื่อการรักษาโรคอย่างมีประสิทธิภาพและสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ในเวลาเดียวกัน

ได้ทำการตรวจหาการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ในอาสาสมัครจากตำบลโพธิ์ อำเภอดำม่วง จังหวัดกาฬสินธุ์ และตำบลบ้านเป็ด อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น รวม 704 คน โดยวิธีตรวจอุจจาระอย่างง่าย (simple smear technique) พบมีการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* 17.5% (123/704) เป็นชาย 48% หญิง 52% ทำการนับจำนวนและคำนวณหาค่าเฉลี่ยตัวอ่อนพยาธิ *S. stercoralis* ต่อสไลด์ (larva per slide, LPS) ทำการพัฒนาชุดตรวจหาการดื้อยาในหลอดทดลองโดยนำตัวอย่างอุจจาระที่พบพยาธิ *S. stercoralis* ทุกรายมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี test tube filter paper strip culture ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น หรือยา albendazole ความเข้มข้นหลอดละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มก./มล. หรือยา ivermectin ความเข้มข้นหลอดละ 7.5, 15 และ 30 มก./มล. ละลายในน้ำกลั่น ตรวจหาตัวอ่อน filariform และ/หรือตัวเต็มวัย ของพยาธิ *S. stercoralis* ภายใน 3 - 5 วัน ได้กล้องจุลทรรศน์สามมิติ ในรายที่ตรวจไม่พบพยาธิในหลอดน้ำกลั่นจะไม่นำข้อมูลมาวิเคราะห์ แปลผลพยาธิมีการดื้อยาในหลอดทดลองเมื่อตรวจพบพยาธิอย่างน้อย 1 ตัว ในหลอดทดลอง สัมภาษณ์เพื่อคัดเลือกว่าผู้เข้าเกณฑ์รักษาด้วยยา สอบถามอาการแสดงของผู้ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ก่อนการรักษาด้วยยา albendazole ทำการสัมภาษณ์อาการไม่พึงประสงค์จากยาหลังการรักษาครบ 2 สัปดาห์ และประเมินผลการรักษาหรือการดื้อยา albendazole ในคน โดยวิธี test tube filter paper strip culture การแปลผลพยาธิมีการดื้อยา albendazole ในคนเมื่อตรวจพบพยาธิอย่างน้อย 1 ตัว ในหลอดน้ำกลั่น

ตัวอย่างอุจจาระ 123 รายที่ตรวจพบพยาธิ *S. stercoralis* ด้วยวิธี simple smear สามารถเพาะเลี้ยงได้โดยวิธี test tube filter paper strip culture ในหลอดน้ำกลั่น จำนวน 101 ราย (82.1%) ในการศึกษาครั้งนี้ มีผู้ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* จำนวน 95 คน ที่เข้าเกณฑ์นับเข้าศึกษาและนำมาวิเคราะห์ข้อมูล โดยเป็นเพศชาย 73.7% เพศหญิง 26.3% มีอายุตั้งแต่ 10 ถึง 82 ปี อายุเฉลี่ย 48.4 ปี (SD \pm 12.9) จำนวน LPS พบตั้งแต่ 1 ถึง 59 ตัวต่อสไลด์ ค่าเฉลี่ย 3 ตัวต่อสไลด์ แยกเป็น LPS เท่ากับ 1, 2, 3, 4, และ 5 ตัวต่อสไลด์ พบ 53.7%, 15.8%, 7.4%, 5.3% และ 5.3% ตามลำดับ LPS เท่ากับ 6, 8 และ 20 ตัวต่อสไลด์ พบอย่างละ 2.1% และ LPS เท่ากับ 7, 9, 11, 16, 17 และ 59 ตัวต่อสไลด์ พบอย่างละ 1.1% หากแบ่งกลุ่มผู้ติดเชื้อตามค่า LPS พบว่าส่วนใหญ่ (87.4%, 83/95) อยู่ในกลุ่ม $LPS \leq 5$ และ 12.6% (12/95) อยู่ในกลุ่มที่มีค่า $LPS > 5$ และจากการ

สัมภาษณ์ผู้ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* จำนวน 95 คน พบว่าส่วนใหญ่ (75.8%) ไม่ปรากฏอาการแสดงของโรค มีเพียง 24.2% ที่มีอาการแสดงของโรค strongyloidiasis ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอาการทางระบบทางเดินอาหารที่ไม่รุนแรง

จากการพัฒนาชุดทดสอบการคัดแยก albendazole ในหลอดทดลอง พบว่าการมีชีวิตรอดของพยาธิ *S. stercoralis* ในหลอดทดลองค่อยๆ ลดลงจาก 71.6%, 64.2%, 53.7% และเป็น 54.7% เมื่อความเข้มข้นของยา albendazole เพิ่มขึ้นจาก 0.5, 1.0, 2.0 และเป็น 5.0 มก./มล. ตามลำดับ ($R = -0.742$) นับว่ายังมีค่าค่อนข้างสูง น่าจะเป็นผลจากยา albendazole ละลายน้ำได้ไม่ดี หากใช้ตัวทำละลายยา albendazole ที่ไม่มีผลต่อพยาธิมาใช้ละลายยาน่าจะให้ผลการศึกษาที่ดี ในขณะที่การพัฒนาชุดทดสอบการคัดแยก ivermectin ในหลอดทดลอง ให้ผลค่อนข้างดีกว่า โดยพบว่าการมีชีวิตรอดของพยาธิ *S. stercoralis* ในหลอดทดลองมีค่าลดลงเป็นสัดส่วนที่สูงกว่าใน albendazole จาก 48.4%, 31.6% และเป็น 13.7% เมื่อความเข้มข้นของยา ivermectin เพิ่มขึ้นจาก 7.5, 15 และเป็น 30 มก./มล. ตามลำดับ ($R = -0.985$)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการมีชีวิตรอดในยา albendazole ของพยาธิ *S. stercoralis* ในหลอดทดลองในแต่ละความเข้มข้น (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 มก./มล.) กับจำนวน LPS ในแต่ละราย พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.033$) เฉพาะที่ความเข้มข้น 2.0 มก./มล. และหากวิเคราะห์ตามกลุ่มค่า LPS พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($P = 0.028$) โดยอัตราการมีชีวิตรอดใน albendazole ในหลอดทดลองของพยาธิ *S. stercoralis* ในกลุ่มตัวอย่างที่มีค่า LPS > 5 จะสูงเป็น 5.122 เท่าของกลุ่มที่มีค่า LPS ≤ 5 (95% CI = 1.057 – 24.817) และการศึกษาทำนองเดียวกันใน ivermectin ที่ความเข้มข้น 15 และ 30 มก./มล. พบว่าจำนวน LPS มีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดใน ivermectin ของพยาธิ *S. stercoralis* ในหลอดทดลองแต่ละราย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.029$ และ 0.000 ตามลำดับ) และหากวิเคราะห์ตามกลุ่มค่า LPS พบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน โดยพบว่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างอัตราการมีชีวิตรอดในยา ivermectin ของพยาธิ *S. stercoralis* ในหลอดทดลองกับค่า LPS โดยกลุ่มตัวอย่างที่มีค่า LPS > 5 จะมีอัตราการมีชีวิตรอดในยา ivermectin สูงเป็น 3.652 เท่า (95% CI = 1.052 – 12.674) และ 6.696 เท่า (95% CI = 1.719 – 26.080) ของกลุ่มที่มีค่า LPS ≤ 5 ตามลำดับ

ผลการรักษาในคนด้วยยา albendazole ขนาด 800 มก./วัน ติดต่อกัน 3 วัน พบว่าอาสาสมัครทนต่อยาได้ดี มีอาการไม่พึงประสงค์เพียงเล็กน้อยและไม่รุนแรง ยาดังกล่าวสามารถรักษาโรคติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ให้หายได้ 77.9% (74/95) หรืออีกนัยหนึ่งพบพยาธิมีการคัดแยก albendazole 22.1% ซึ่งได้ผลดีกว่าผลการทดสอบ albendazole ในหลอดทดลองซึ่งพบการคัดแยก 46.3% ที่เป็นเช่นนั้น เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการคัดแยก albendazole ในคน กับค่า LPS พบว่าจำนวน LPS มีผลต่อการรักษาหายในคนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.000$) เช่นเดียวกันเมื่อแบ่งกลุ่มตามค่า LPS พบว่าผู้ที่มีค่า LPS > 5 หากรักษาด้วยยา albendazole ในขนาดดังกล่าวจะมีโอกาสคัดแยก albendazole สูงเป็น 10.769 เท่าของผู้ที่มีค่า LPS ≤ 5 (95% CI 2.825-41.056) ดังนั้นจึงควรพิจารณาหายา ivermectin ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าพยาธิ *S. stercoralis* ได้ดีกว่ามาใช้รักษาแทนโดยเฉพาะผู้ติดเชื้อพยาธิจำนวนมาก (hyperinfection)

Strongyloides stercoralis is the nematodes caused serious intestinal diseases i.e. malabsorption, malnutrition and fatal disseminated infection in immunosuppressed patients. Moreover, anthelmintic drugs resistance are still shown. Inappropriate drug treatments fail to complete the effective cure and causes economic loss as well as emerge of drug resistance. Thus, the aim of this study was to develop an *in vitro* test for evaluation of drugs (albendazole and ivermectin) resistance of *S. stercoralis* and for detection of *S. stercoralis* as well.

Stool specimens from a total of 704 subjects from Tambol Pone, Amphur Kham Moun, Kalasin Province and Tambol Ban Pet, Amphur Muang, Khon Kaen Province were collected and examined by simple smear technique for the detection of rhabditiform larvae of *S. stercoralis*. The technique found 17.5% (123/704; 48% for male and 52% for female) *S. stercoralis* infection. *S. stercoralis* larvae were counted and calculated for number of larvae per slide (LPS). The positive stool specimens were used to develop *in vitro* drug resistance test using test tube filter paper culture technique.

The experiments were done in a series of drug dilutions, in distilled water (for albendazole, dilutions were 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/ml respectively; for ivermectin, dilutions were 7.5, 15. and 30 ug/ml respectively). Control experiments were done in distilled water. The *S. stercoralis* filariform larvae and/or adult worms were examined under dissecting microscope within 3-5 days. Samples of control tube without worm development were excluded as well as drug resistance findings were recorded when demonstration at least one worm in an experimental tubes. All strongyloidiasis cases were interviewed for clinical symptoms, history of drug allergy or underlying diseases before albendazole treatment. All adverse drug effects were recorded 2 weeks after treatment. The efficacy of albendazole treatment were assessed by using test tube filter paper culture method and *in vivo* drug resistance findings were evaluated by demonstration at least one worm in distilled water tubes.

One hundred and one cases out of 123 (82.1%) *S. stercoralis* positive stools by simple smear technique were successfully cultured in control tubes and the total of 95 subjects with complete study criteria were analysed. This population composed of 73.7% of male and 26.3% of female with age range between 10-82 years (48.4 ± 12.9). The LPS were found between 1-59 (mean = 3/slide) with larval numbers were 1 (53.7%), 2 (15.8%), 3 (7.4%), 4 (5.3%), 5 (5.3%), 6 (2.1%), 7 (1.1%), 8 (2.1%), 9 (1.1%), 11 (1.1%), 16 (1.1%), 17 (1.1%), 20 (2.1%) and 59 (1.1%) respectively. Strongyloidiasis cases which classified base on larval intensity with $LPS \leq 5$ -group and $LPS > 5$ -group were 87.4% and 12.6%, respectively. The clinical spectrum of all 95 subjects varies from asymptomatic (75.8%) to mild intestinal symptoms (24.2%).

For *in vitro* albendazole resistance, worm viability was 71.6%, 64.2%, 53.7% and 54.7% at a serial dilutions of 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/ml, respectively ($R = -0.742$). The viability probable high and this possible be due to the poor solubility of albendazole. Whereas, for *in vitro* ivermectin resistance, worm viability was 48.4%, 31.6% and 13.7% at a serial dilutions of 7.5, 15 and 30 μ g/ml, respectively ($R = -0.985$).

The correlation between worm viability in albendazole was not statistical significant with the LPS from each samples except at the diluted concentration of 2.0 mg/ml ($P = 0.033$). While the LPS was classified from ≤ 5 to > 5 , the positive correlation was statistical significant ($P = 0.028$) with the same concentration. The worm viability was 5.122 times higher in > 5 LPS-group (95% CI = 1.057-24.817) than in ≤ 5 LPS-group. While *in vitro* ivermectin resistance test, the positive correlation between worm viability with LPS number at diluted concentration of 15 and 30 μ g/ml were statistical significant ($P = 0.029$ and $P = 0.000$, respectively). In addition, the LPS was classified as above, the positive correlations were significant ($P = 0.033$ and $P = 0.003$, respectively). The worm viability was 3.652 times (95% CI = 1.052-12.674) and 6.966 times (95% CI = 1.719-26.080) higher in > 5 LPS-group than in ≤ 5 LPS-group at diluted concentration of 15 and 30 μ g/ml, respectively.

Albendazole treatment of all 95 subjects in dosage of 800 mg/day for three consecutive days gave few adverse effects. The cure rate was 77.9% (74/95) and this result meaning showed the resistance rate was 22.1%. As well, the *in vivo* albendazole resistance rate was lower than *in vitro* (46.3%). The positive correlations between *in vivo* albendazole resistance with LPS number were statistical significant either calculation for individual subjects or for > 5 LPS-group ($P = 0.000$). The albendazole resistance in > 5 LPS-group was 10.769 times higher than ≤ 5 LPS-group (95% CI = 2.825-41.056). We suggest that ivermectin supplement therapy should be considered especially in hyperinfected strongyloidiasis.