บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เชื้อพยาธิโปรโตซัว *Sarcocystis* spp. เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรค Sarcocystosis ในคน เชื้อนี้ติดต่อสู่คนโดยคนกินระยะติดต่อ (tissue cysts) ในกล้ามเนื้อสัตว์ที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางแบบดิบ หรือสุกๆ ดิบๆ และโรค Sarcocystosis นี้จะทำให้เกิดอาการต่างๆ เช่น ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ท้องเสีย หลังจากนั้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะทำให้เชื้อเปลี่ยนเป็นระยะซิส (tissue cyst) อยู่ในร่างกายคนตลอดชีวิต และในปัจจุบันยังไม่มียาสำหรับรักษาโรคนี้ อย่างไรก็ตามในคนที่มีภูมิคุ้มกันปกติโรคนี้จะไม่ก่อให้มีอาการมากนัก แต่ในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ หรือผู้ป่วยที่ถูกกดภูมิคุ้มกันอาจจะเพื่อเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ หรือให้ยาเคมีบำบัด เชื้อพยาธิโปรโตซัวนี้จะกลับมาก่อให้เกิดอาการที่รุนแรง โดยอาจเกิดเนื้อสมองอักเสบ (encephalitis) เกิดแผล ฝีที่สมอง ปอดอักเสบ หรือ โรคกระจายทั่วร่างกาย ทั้งโดยการบุกรุกเซลล์ที่มีนิวเคลียสทุกเซลล์รวมทั้ง macrophage และไปตามระบบเลือดได้ ซึ่งถ้าไม่ได้รับการวินิจฉัยและให้การรักษาไม่ทันก็มักจะเสียชีวิตทุกราย (ชูเกียรติ, 2549 ; Fayer, 2004; Gutierrez, 2000; Roberts and Janovy, 2005) และในปัจจุบันพบมีผู้ป่วยโรคเอดส์จำนวนมากขึ้น ซึ่งมีแนวโน้มสูงที่จะทำให้มีจำนวนผู้ป่วยโรค Sarcocystosis เพิ่มจำนวนมากขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคนี้ในประเทศไทยโดยเฉพาะการศึกษาในคนยังมีจำนวนน้อยมาก ส่วนใหญ่จะพบรายงานการสำรวจเชื้อนี้ในโฮสต์กึ่งกลาง คือจากกล้ามเนื้อของวัวหรือควาย โดยพบอัตราการติดเชื้อสูงถึง 100 % ในกรุงเทพมหานคร และราชบุรี (Muangyai and Chalermchaikit, 1988) นอกจากนี้ ยังพบในวัวควายที่จังหวัดขอนแก่น 93.4 % (Danseekaew et al., 1990) และที่จังหวัดเชียงใหม่ 100% (Pan-In et al., 1991) ส่วนการศึกษาในคนซึ่งเป็นโฮสต์จำเพาะ (definitive host) มีรายงานวิจัยพบ sporocyst ของเชื้อพยาธินี้จากการตรวจอุจจาระประมาณวันที่ 10 หลังทดลองกินระยะซิส (cyst) ของเชื้อ และจะตรวจไม่พบในอุจจาระในวันที่ 30 หลังการทดลอง และหลังจากนั้นเชื้อจะเปลี่ยนเป็นระยะซิส และอยู่ในร่างกายคนตลอดชีวิต (Li JH et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยการตรวจเชื้อ Sarcocystosis ในคนจากอุจจาระด้วยวิธีพื้นฐานเช่น Formalin ethyl acetate แต่พบในอัตราความชุกที่ต่ำ โดยอัตราการติดเชื้อพบตั้งแต่ร้อยละ 1.10- 23.30 (Ektasaeng et al., 1987 ; Muangyimpong et. al., 1993 ;

Tungtrongchitr et al., 2007; Wilairatana et al., 1996) หรือด้วยเทคนิค Kato thick smear ตรวจพบอัตราการติดเชื้อนี้ร้อยละ 4.6 – 8.0 (Tungtrongchitr et al., 2007) เนื่องจากระยะ oocyst ของเชื้อ *Sarcocystis* spp. มีผนังที่บางและแตกหักได้ง่ายมาก ฉะนั้นจึงเหลือแต่ sporocyst ที่ออกมากับอุจจาระคน การตรวจวินิจฉัยด้วยการดู sporocyst ที่ออกมากับอุจจาระคนนั้นทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจาก sporocyst จะมีลักษณะใสและมีขนาดเล็กมาก ประมาณ 15×9 µm จึงทำให้การตรวจวินิจฉัยผิดพลาดได้ง่าย และปัจจุบันยังไม่มีวิธีใดๆที่สามารถใช้ตรวจหาเชื้อนี้ได้อย่างง่าย และมีประสิทธิภาพ (นิมิต, 2546)

วงจรชีวิตของพยาธิ *Sarcocystis* spp. ในคนซึ่งเป็นโฮสต์จำเพาะนั้นพบว่าผลผลิตที่ได้คือ sporocyst ที่ออกมากับอุจจาระนั้นไม่ได้ออกมาตลอดเวลาเหมือนผลผลิตที่ได้คือจากการติดเชื้อหนอนพยาธิอื่นๆ เช่นพยาธิใบไม้ตับ หรือปากขอ แต่พบว่าการตรวจพบ sporocyst ของเชื้อ *Sarcocystis* spp. ในอุจจาระคนนี้มีระยะเวลาที่จำกัดเพียงช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งในการปนเปื้อนออกมากับอุจจาระ จากรายงานวิจัยของ Bever และคณะ โดยให้อาสาสมัครรับประทานเนื้อวัวที่มีการติดเชื้อ *Sarcocystis hominis* พบว่าจะเริ่มตรวจพบ sporocyst ในอุจจาระวันที่ 18-39 และจะยังคงปรากฏอยู่นาน ถึงวันที่ 179 และหลังจากนั้นจะตรวจไม่พบ sporocystในอุจจาระ (Bever et al., 1984) และเนื่องจากเชื้อ *Sarcocystis* spp. นี้อยู่ใน family เดียวกับเชื้อ *Toxoplasma gondii* ที่ทำให้เกิดโรคทอกโซพลาสโมซิส (toxoplasmosis) หรือโรคขี้แมว และเป็นเชื้อโปรโตซัวที่อยู่ในเนื้อเยื่อและฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเช่นเดียวกับเชื้อ *Sarcocystis* spp. เชื้อ *T. gondii* ซึ่งมีแมวเป็นโฮสต์จำเพาะจะพบเชื้อระยะ oocyst ปะปนออกมากับอุจจาระแมวเพียงช่วงสัปดาห์ที่ 1-3 หลังจากนั้นจะตรวจไม่พบ oocysts แม้ว่าจะยังมีเชื้อ *T. gondii* อยู่ในลำไส้ของแมวตลอดเวลา จนกว่าแมวจะเกิดสภาพภูมิคุ้มกันลดลงจากสาเหตุใดๆ ก็ตาม เช่น ได้รับยาพวกสเตียรอยด์ (Hydrocortisone, Prednisolone และ Dexamethasone) หรือเกิดอาการเครียดจากทำวัคซีนหรือในช่วงผสมพันธุ์ หรือการติดเชื้ออื่น ๆ ในทางเดินอาหารร่วมด้วย เช่น เชื้อบิด (Coccidia) ซึ่งจะทำให้มีการปล่อย oocysts ออกจากอุจจาระแมวอีกครั้ง (สถาพร, www.vet.ku.ac.th) ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นที่รายงานการตรวจพบ sporocyst ของเชื้อ *Sarcocystis* spp. ในอุจจาระของคนเพียงบางช่วงเวลา ประกอบกับวงจรชีวิตในโฮสต์จำเพาะที่มีความสอดคล้องหรือใกล้เคียงกับเชื้อ *T. gondii* จึงน่าจะเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้รายงานที่ผ่านมาตรวจพบ sporocyst ของ *Sarcocystis* spp. ในอุจจาระคนในอัตราความชุกที่ต่ำ แม้ว่าเชื้อ *Sarcocystis* spp. อาจจะยังคงอยู่ในร่างกายก็ตามและจากการศึกษาวิจัยเร็วๆ นี้ (Moré et al., 2008) ได้ศึกษาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Sarcocystis* cruzi ในวัว ควาย โดยใช้ตัวอย่างคือเลือดด้วยเทคนิค IFAT โดยพบว่าเชื้อ *Sarcocystis*

cruzi มีความชุก ร้อยละ 100 จากการตรวจด้วยเทคนิค IFAT และทางเนื้อเยื่อวิทยา ส่วนการตรวจวิเคราะห์ในระดับ DNA (genomic DNA detection) โดยวิธี PCR ได้ถูกนำมาใช้ช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อหลายชนิดที่สัมพันธ์ใกล้ชิดและอยู่ใน Family เดียวกัน เช่น *T. gondii* (Bretágne et al., 1993) และ *Neospora caninum* (Müller et al., 1996; Kaufmann et al., 1996; Yamage et al., 1996) ซึ่งการศึกษาเพื่อแยกเชื้อทั้งสองชนิดคือ *T. gondii* และ *N. caninum* นั้นมีความจำเป็นต้องใช้เทคนิคทาง immunohistochemical staining ร่วมกับ PCR method เพื่อช่วยวินิจฉัยแยกแยะชนิดของเชื้อทั้งสองดังกล่าว (Dubey and Beattie 1988; Dubey and Schares 2006; Ho et al., 1997) ส่วนการศึกษาภาวะการติดเชื้อ *Sarcocystis* spp. โดยวิธี PCR เพื่อทำ DNA detection ร่วมกับการศึกษาทาง microscopic technique ยังไม่พบรายงานการศึกษา

จากข้อมูลการออกหน่วยบริการเคลื่อนที่ของ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ครั้งที่ 4 ปี พ.ศ. 2551 ณ โรงเรียนบ้านห้วยเปล้า อ. ลานสัก จ. อุทัยธานี ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาปรสิตในอุจจาระจากกลุ่มประชากรในหมู่บ้านด้วยวิธีมาตรฐานพื้นฐาน (Modified Formalin-ethyl acetate centrifugation technique) พบว่าเชื้อปรสิตที่พบมากที่สุดคือ พยาธิใบไม้ตับ *(Opisthorchis viverrini)* ร้อยละ 20 โปรโตซัว *Sarcocystis* spp. ร้อยละ 8 โปรโตซัว *Giardia lamblia* ร้อยละ 8 และ พยาธิปากขอ (hookworm) ร้อยละ 4 อย่างไรก็ตามปัญหาการติดเชื้อปรสิตหรือโปรโตซัว ยังคงเป็นปัญหาทางสุขอนามัยของประชากรในชุมชนต่างๆบริเวณใกล้เคียง รวมทั้งของหน่วยงานสาธารณสุขต่างๆที่เกี่ยวข้อง ที่ต้องแก้ไขเพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิตของประชากรที่อาศัยในแหล่งชุมชนเหล่านั้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งจะศึกษาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Sarcocystis* spp. โดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น PCR และ IFAT ในการตรวจหาเชื้อจากเลือด ร่วมกับการตรวจจากอุจจาระ (stool exam) ด้วยวิธีมาตรฐานพื้นฐาน โดยศึกษาในกลุ่มประชากรที่อาศัยในชุมชนหรือหมู่บ้านอื่นๆใกล้เคียงกับ หมู่บ้านห้วยเปล้า อ. ลานสัก จ. อุทัยธานี ดังที่ได้ศึกษาแล้วในเบื้องต้น เพื่อหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Sarcocystis* spp. เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดการด้านสุขอนามัยและพัฒนาคุณภาพชีวิตของประชากรที่อาศัยในชุมชนหมู่บ้านเหล่านั้น อีกทั้งวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานทางด้านคลินิกหรือโรงพยาบาลต่างๆในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Sarcocystis* spp. เนื่องจากการเก็บอุจจาระจากผู้ป่วยบางครั้งโดยเฉพาะที่แผนกผู้ป่วยนอก (OPD) อาจไม่สะดวกรวมทั้งระยะเวลาของเชื้อ *Sarcocystis* spp. ที่ปนเปื้อนในอุจจาระนั้นมีระยะเวลาที่จำกัด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Sarcocystis* spp. จากเลือดคน ด้วยเทคนิค IFAT และ PCR
2. เพื่อหาความชุก (prevalence) ของเชื้อหนอนพยาธิและโปรโตซัว ต่างๆในอุจจาระ ด้วยวิธี Modified formalin-ethyl acetate centrifugation ของประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ตำบลระบำ อ. ลานสัก จ. อุทัยธานี
3. เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการตรวจพบเชื้อ *Sarcocystis* spp. ในประชากร จากการตรวจทั้ง 3 วิธี คือ Modified formalin-ethyl acetate centrifugation, IFAT และ PCR

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้มุ่งศึกษาหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Sarcocystis* spp. โดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น PCR และ Indirect fluorescent antibody test (IFAT) ในการตรวจหาเชื้อจากเลือดร่วมกับการตรวจ จากอุจจาระด้วยวิธีมาตรฐานพื้นฐาน (Modified formalin-ethyl acetate centrifugation technique) โดยศึกษาในกลุ่มประชากรที่อาศัยในหมู่บ้านต่างๆใน ตำบลระบำ อ. ลานสัก จ. อุทัยธานี โดยเก็บจากกลุ่มตัวอย่างที่มีอายุมากกว่า 15 ปี ทั้งหมด 200 ตัวอย่าง เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดการด้านสุขอนามัยและพัฒนาคุณภาพชีวิตของประชากรที่อาศัยในชุมชนหมู่บ้านเหล่านั้น

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ทฤษฎี

เชื้อ *Sarcocystis* spp. เป็นเชื้อโปรโตซัวฉวยโอกาสที่อยู่ใน Phylum apicomplexa เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน และชนิดของเชื้อที่มีคนเป็นโฮสต์จำเพาะคือ *Sarcocystis bovihominis* และ *Sarcocystis suihominis* โดยมีวัว ควาย และหมู เป็นโฮสต์กึ่งกลาง และเชื้อนี้สามารถติดต่อสู่คนได้หากรับประทานเนื้อสัตว์เหล่านี้ที่มีเชื้อระยะติดต่อ (tissue cysts) อยู่ในกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะการรับประทานเนื้อดิบ หรือสุกๆดิบๆ จะทำให้เกิดโรค Sarcocystosis

สมมุติฐาน

เชื้อ *Sarcocystis* spp สามารถตรวจพบได้ โดยใช้ 3 วิธีการคือ Modified formalin-ethyl acetate centrifugation technique, IFAT และ PCR และการตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR และ IFAT จากเลือดผู้ป่วยน่าจะเป็นวิธีที่ดีที่สุด

กรอบแนวความคิด

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะหาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Sarcocystis* spp. จากเลือดผู้ป่วย โดยใช้เทคนิค PCR และ IFAT โดยเปรียบเทียบกับการตรวจจากอุจจาระด้วยวิธี Modified formalin-ethyl acetate centrifugation technique เนื่องจากหลังการติดเชื้อ *Sarcocystis* spp. ในร่างกาย จะสามารถตรวจพบ sporocyst ปะปนออกมากับอุจจาระ ในช่วงเวลาสั้นๆหลังการติดเชื้อหรือในระยะเฉียบพลันเท่านั้น และระยะนี้เชื้อสามารถบุกรุกที่นิวเคลียสของเซลล์รวมทั้ง macrophage และไปตามกระแสเลือดได้ จนกระทั่งร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาตอบสนองการติดเชื้อ ทำให้เชื้อเปลี่ยนตัวเองเป็นระยะ tissue cyst ซึ่งมีกลไกลในการหลบหลีกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ระยะ tissue cyst นี้สามารถอยู่ในร่างกายคนได้ตลอดชีวิตโดยไม่แสดงอาการ และปัจจุบันยังไม่มียารักษา แต่เมื่อไหร่ก็ตามถ้าหากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเกิดภูมิคุ้มกันบกพร่องจากการติดเชื้อ HIV เปลี่ยนถ่ายอวัยวะ หรือได้รับยาเคมีบำบัด ระยะ tissue cyst นี้จะเปลี่ยนเป็นระยะ tachyzoite ที่ active แบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และบุกรุกเซลล์ (reactivate) ได้อีกและสามารถตรวจพบ sporocyst ในอุจจาระได้อีกครั้ง และถ้าหากรักษาไม่ทันคนไข้มักเสียชีวิตทุกราย ฉะนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะหาวิธีที่ดีและเหมาะสมที่สุดในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Sarcocystis* spp.

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการที่ดีและเหมาะสมที่สุดในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Sarcocystis* spp. จากเลือดคน
2. ทราบถึงความชุกของการติดเชื้อหนอนพยาธิและโปรโตซัวชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในอุจจาระ ด้วยวิธี Modified formalin-ethyl acetate centrifugation ของประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ตำบลระบำ อ. ลานสัก จ. อุทัยธานี

3. สามารถเผยแพร่ผลการศึกษาวิจัยนี้ในที่ประชุมทั้งในและต่างประเทศได้ และสามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยระดับนานาชาติได้

4. ใช้เป็นข้อมูลในการวางแนวทางในการควบคุมและป้องกันโรคติดเชื้อหนอนพยาธิ/โปรโตซัวในพื้นที่ที่ได้ศึกษา และพื้นที่อื่นๆสามารถนำข้อมูลที่ได้นี้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้

5. เพื่อใช้ข้อมูลที่ได้มาสำหรับเป็นข้อมูลที่พื้นฐานในการศึกษาวิจัยอื่นๆต่อไป

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติของ *Sarcocystis* spp.

Sarcocystis ถูกรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1843 โดย Miescher พบเป็น threadlike cyst สีขาว ในกล้ามเนื้อของหนูบ้าน ซึ่งยังไม่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ อีก 20 ปีต่อมา เชื้อปรสิตชนิดนี้จะรู้จักกันในชื่อว่า Meischer's tubules และในปี 1865 พบลักษณะโครงสร้างที่คล้ายกันในกล้ามเนื้อของหมู แต่อีก 34 ปี จึงมีการระบุชื่อเป็น “*Sarcocystis meischeriana*” (Dubey, 1989)

ต่อมาเมื่อ intramuscular cysts พบใน Host ใหม่ ชื่อสายพันธุ์ใหม่จึงถูกเสนอขึ้น ในระหว่างนี้นักวิทยาศาสตร์มีการถกเถียงกันโดยเฉพาะเรื่อง species ของ *Sarcocystis* ว่าเป็นโปรโตซัวร์หรือเชื้อรา เป็นไปได้ว่า *Sarcocystis* เป็นเชื้อราที่เกิดขึ้นเพราะเพียงระยะ sarcocyst เป็นที่รู้จักแล้วเมื่อ sarcocysts และสิ่งที่อยู่ภายในซีสต์มีอยู่ใน culture media ต่างๆ hyphae และ mycelia (ได้รับการยอมรับในขณะนี้จะเป็นผลมาจากการปนเปื้อน) พบว่าในบางครั้งหลายวันต่อมา มันไม่ใช่จนกระทั่งปี 1967, 124 ปีหลังจากรายงานแรกของ *Sarcocystis* that the spindle- or crescent-shaped bodies (bradyzoites) ใน sarcocysts ที่ถูกศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและ organelles ถูกสังเกตเห็น เหมือนกับที่เห็นใน apicomplexan protozoaอื่น ๆ เช่น Toxoplasma และ Eimeria (Senaud , 1967)

วงจรชีวิตและระยะต่างๆยังไม่เป็นที่รู้จัก จนกระทั่งปี 1970 เมื่อ bradyzoites จาก sarcocysts ในกล้ามเนื้อนกที่มีเชื้อเข้าสู่เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและการพัฒนาแบบอาศัยเพศกับ Oocysts (Fayar R 1970, 1972)

การศึกษาการติดต่อของเชื้อ *Sarcocystis fusiformis* ชื่อ species เรียกกันตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบในโค หลังจาก sarcocysts ถูกป้อนเข้าไปในโฮสต์ที่แตกต่างกัน คือ สุนัข แมว และมนุษย์ *S. fusiformis* ถูกพบว่ามี 3 species และ species ใหม่ ชื่อ *S. bovicanis. S. bovifelis*, และ *S. bovihominis* ได้ถูกเสนอขึ้นมา การค้นพบนี้เป็นพื้นฐานสำหรับความเข้าใจในปัจจุบันถึงแหล่งที่มาของการ

ติดเชื้อ กลไกการติดต่อ การตั้งชื่อ species ของ *Sarcocystis* และชีววิทยาที่สำคัญสำหรับการป้องกันและรักษา (Heydorn, 1972; Rommel, 1972)

Sarcocystis hominis

Virchow เป็นผู้พบ sporocyst ของ Sarcocystis ในอุจจาระคนเป็นครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1860 แต่ไม่ทราบว่าเป็นของ *S. hominis* หรือ *S. suihominis* ต่อมาใน ค.ศ. 1972 Rommel และ Heydom พบว่าคนที่รับประทานเนื้อวัวดิบที่มี sarcocyst ทำให้ติดเชื้อ *S. hominis* ได้

ท้องถิ่นที่พบ พบได้ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น

รูปร่างลักษณะ

Sporocyst เป็นระยะที่พบได้ในอุจจาระคน มีขนาดความยาว 13.6-16.4 ไมครอน กว้าง 8.3-10.6 ไมครอน รูปร่างค่อนข้างกลม ผนังบางใส ภายในมี 4 sporozoite รูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว

Sarcocyst เป็นระยะที่พบในกล้ามเนื้อของสัตว์พวก วัว ควาย มีความยาวได้ถึง 5 เซนติเมตร รูปร่างคล้ายกระสวย ผนังหนา ภายในแบ่งเป็นห้องๆ ซึ่งมี metrocyte รูปร่างกลมจำนวนมากบรรจุอยู่ sarcocyst ที่มีอายุ 2 เดือนจะมี merozoite รูปร่างคล้ายกระสวยปะปนอยู่ metrocyte และ sarcocyst ที่มีอายุ 3 เดือนขึ้นไปจะประกอบด้วย merozoite เพียงอย่างเดียว (Beaver, 1984)

Sarcocystis suihominis

Virchow เป็นผู้พบ sporocyst ของ Sarcocystis ในอุจจาระคนเป็นครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1860 ต่อมาใน ค.ศ. 1865 Kuhn อธิบายลักษณะ Sarcocyst ที่พบในกล้ามเนื้อหมู Rommel ทดลองพบว่า หมุติดเชื้อ *S. suihominis* ได้ใน ค.ศ. 1974 และใน ค.ศ. 1977 Heydron พบว่าคนเป็น definitive host

ท้องถิ่นที่พบ พบได้ใน อเมริกา แอฟริกา และเอเชีย

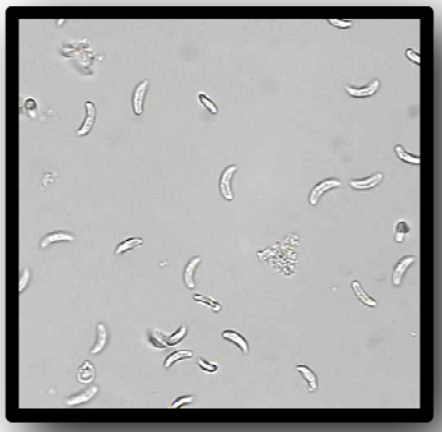
รูปร่างลักษณะ

Sporocyst เป็นระยะที่พบได้ในอุจจาระคน มีขนาดความยาว 13ไมครอน กว้าง 10 ไมครอน รูปร่างกลมรี ผนังบางและใส ภายในมี 4 sporocyst มักอยู่เดี่ยวๆบางครั้งพบอยู่เป็นคู่ได้ ซึ่งจะมีผนัง oocyst ห่อหุ้มและมีรอยคอดตรงกลาง

Sarcocyst เป็นระยะที่พบในกล้ามเนื้อหมู มีความยาวได้ 1.5 มิลลิเมตร รูปร่างคล้ายกระสวย ภายในมีลักษณะเช่นเดียวกับ sarcocyst ของ *S. hominis* (Beaver, 1984)

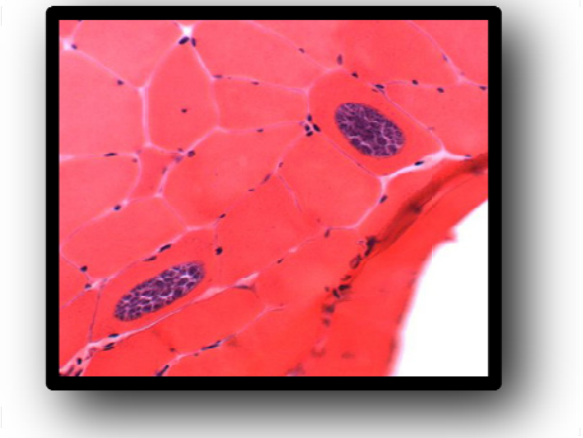
รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะ sporocyst ของ *Sarcocystis* spp.

(ที่มา : http://www.atlas-protozoa.com/gallery.php?SOT_CAP=SARCO#1)



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะ trophozoite ของ *Sarcocystis* spp.

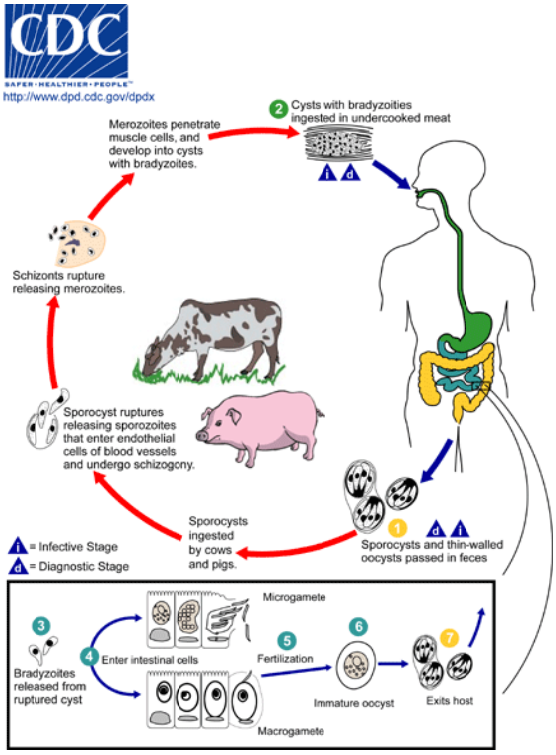
(ที่มา : http://instruction.cvhs.okstate.edu/jcfox/htdocs/DISK1/IMAGES/sarcotrophs.JPG)



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะ cyst ของ *Sarcocystis* spp.

(ที่มา : http://www.e-cleansing.com/parasites/sarcocystis-hominis-2.html)

2.2 วงจรชีวิตของ *Sarcocystis* spp.



รูปที่ 2.4 แสดงวงจรชีวิตของ *Sarcocystis* spp.

(ที่มา : http://dpd.cdc.gov/dpdx/html/Sarcocystosis.htm)

เมื่อคนรับประทาน Sarcocyst ในเนื้อวัวควายดิบๆ เข้าไป จากนั้น Merozoite ออกมาไชเข้าไปอยู่ในชั้น laminar propria เจริญไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย หลังการผสมพันธุ์กัน (Fertilization) ได้เป็น Zygote ซึ่งจะเจริญไปเป็น oocyst ที่แบ่งตัวได้เป็น 2 sporocyst ในแต่ละ 2 sporocyst มี 4 sporozoite เมื่อ cell host แตกให้ oocyst ออกมาใน lumen ของลำไส้และปนออกมาในอุจจาระ แต่เนื่องจากผนัง oocyst บางมาก oocyst จึงมักแตกขณะที่ cell host แตกหรือแตกขณะอยู่ในลำไส้ ในอุจจาระของผู้ป่วยจึงพบแต่ sporocyst เป็นส่วนใหญ่

วัวควายซึ่งเป็น host ตัวกลางได้รับ sporocyst เข้าไปปล่อย sporozoite ออกมา ก็จะไชเข้าไปยัง Endothelial cell ของเส้นเลือด มีการแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศเป็นระยะเพิ่มจำนวนนอกลำไส้ (Extraintertinal schizogony) แล้ว Merozoiteจึงเดินทางไปยังกล้ามเนื้อเพื่อเจริญเป็น sporocyst ตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว พบว่าในวัวควายจะพบปรสิตได้ตั้งแต่ 15 วัน หลังจากได้รับ sporocyst (หรือ oocyst)

2.3 ระบาดวิทยาของโรค Sarcocystosis

โรคนี้มีรายงานในคนพบน้อยมาก สัตว์ที่พบมีอัตราการเป็นโรคนี้สูง ได้แก่ กระบือ โคแกะ สุกร เป็ด และหนู ในบางท้องถิ่นอัตราการเป็นโรคนี้น้อยมากหรือแทบไม่มีเลย ในไทยส่วนมากเป็นในกระบือจากโรงงานฆ่าสัตว์ขององค์การอาหารสำเร็จรูป อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี พบแมโครซิสต์ของ *Sarcocystis* 19.6% จากการตรวจกระบือ 10,000 ตัว ส่วนโคและสุกรไม่พบ (วิพิชญ์, 2516) ต่อมา พ.ศ. 2522 วิพิชญ์ และคณะ ได้ทำการตรวจซากกระบือในโรงงานฆ่าสัตว์แห่งเดียวกันนี้ พบ *Sarcocystis* 99.3% จากการตรวจกระบือ 147 ตัว มีรายงานการตรวจโค 19 ตัว และกระบือ 533 ตัว พบ *Sarcocystis* ในกระบือเท่านั้น จำนวน 298 ตัว (สุรีย์, 2524)ในการตรวจหา *Sarcocystis* ในเนื้อสัตว์จากโรงงานฆ่าสัตว์ส่วนมากจะตรวจดูแมโครสโคพิกซิสต์ ซึ่งสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า คือ มีลักษณะคล้ายเม็ดข้าวสาร ติดอยู่กับหลอดอาหาร หรือแทรกอยู่ตามกล้ามเนื้อสัตว์ ส่วนไมโครสโคพิกซิสต์นั้นไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงทำให้รายงานผลว่าไม่พบ จากรายงานการตรวจเนื้อสุกรจากตลาดต่างๆในเขต กรุงเทพมหานคร โดยนำมาย่อย พบว่ามี *Sarcocystis* 42.59% ซึ่งเป็นไมโครสโคพิกซิสต์ (Keittivuti et al., 1985)

2.4 การก่อโรคของ *Sarcocystis* spp.

ทำให้เกิดโรค sarcocystosis หรือ sarcosporidiosis ในสัตว์อาจทำให้เกิดอาการเบื่ออาหาร น้ำหนักลด แท้งลูก และตายได้ เป็นผลเสียต่อผู้ทำปศุสัตว์ คนมีภาวการณ์ติดเชื้อ 2 แบบคือการติดเชื้อที่ลำไส้(Intestinal sarcocystosis) และการติดเชื้อในกล้ามเนื้อ (Muscular sarcocystosis)

1.การติดเชื้อที่ลำไส้ (Intestinal sarcocystosis) คือการติดเชื้อ *Sarcocystis* spp. ที่ลำไส้เกิดจากการกินเนื้อสัตว์ที่มี sporocyst เข้าไป ในกรณีนี้คนหรือ host ที่ได้รับปรสิตจะเป็น host จำเพาะเกิด Sexual development ขึ้นที่เยื่อบุผนังลำไส้และให้ sporocyst ปนออกมาในอุจจาระ ในปี ค.ศ.1972 Rommel และ Heydorn ได้ทดลองให้อาสาสมัครกินเนื้อวัวและหมูดิบๆที่มี sarcocyst และต่อมาตรวจพบ sarcocyst , Oocyst ในอุจจาระ พบว่าอาสาสมัครที่กินเนื้อวัวซึ่งมี *S.hominis* จะปรากฏอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง และท้องเสียภายใน 3-6 ชั่วโมงหลังจากได้รับปรสิตแต่กลุ่มอาสาสมัครที่กินเนื้อหมู (*S.suihominis*) จะปรากฏอาการดังกล่าวรุนแรงกว่าภายใน 6-8 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อ ปรสิตไชเข้าไปอยู่ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ทำให้เซลล์ host ถูกทำลายและก่อให้เกิดการอักเสบตามมา ถ้ามีการติดเชื้อจำนวนมาก Vili จะแบนแฟบลง (villous atrophy)ทำให้การดูดซึมอาหารลดน้อยลง (Malapsorbtion) และยังพบว่าปรสิตในกลุ่มค็อกซิเดียนี้สามารผลิตกรดแล็กติค (lactic acid) ออกมาเป็นจำนวนมากมีผลให้สภาวะความเป็นด่างในลำไส้ลดลง ซึ่งทำให้เกิดอาการท้องเสียและการดูดซึมอาหารลดลง อาการทางคลินิกของผู้ติดเชื้อ *S.hominis* มีตั้งแต่ไม่มีอาการแสดง(Asymptomatic) จนกระทั่งรุนแรงถึงเสียชีวิตได้อาการที่ปรากฏได้แก่ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหารท้องเสียและมีไข้อาการที่ปรากฏจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อที่ได้รับเข้าไปและภาวะภูมิคุ้มกันของ host โดยทั่วไปสามารถตรวจพบ sporocyst ภายใน 14-18วัน หลังจากได้รับเชื้อในผู้ป่วยปกติที่มีอาการปรากฏจะหายได้เองภายใน 48 ชั่วโมง (Self limited disease) แต่ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ภาวะการติดเชื้อจะรุนแรงและเรื้อรังกว่า

2. การติดเชื้อในกล้ามเนื้อ (Muscular sarcocystosis) คนมี sarcocyst ในกล้ามเนื้อได้โดยไม่มีอาการของโรค และซีสต์ไม่ก่อโรค มีรายงานผู้ป่วยที่มีอาการกล้ามเนื้ออักเสบชนิด eosinoplilic และปวดกล้ามเนื้อ (Muscular sarcocystosis) เกิดจากกินอาหารหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของ sporocyst ของ *Sarcocystis* spp. จะเกิดเป็น sarcocyst อยู่ในกล้ามเนื้อต่างๆทั่วทั้งร่างกาย ในปี ค.ศ.1970 Beaver และคณะได้ศึกษาและรวบรวมป่วยที่พบ sarcocyst จากแหล่งต่างๆของโลกทั้งหมด40 คน เป็นผู้ป่วยจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 13 คน อินเดีย 8คนอเมริกากลางและใต้ 5 คน แอฟริกา 4 คน สหรัฐอเมริกา 3

คน จีน 1 คน และอีก 2 คนไม่ทราบสถานที่ในผู้ป่วยเหล่านี้ ส่วนใหญ่พบซาร์โคซีสต์ที่กล้ามเนื้อลายและกล้ามเนื้อหัวใจมักไม่พบการอักเสบหรือการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเด่นชัดในรายที่มีอาการแสดงจะมีการอักเสบบวมแดงของอวัยวะที่ปรสิตอยู่ทำให้มีอาการปวดเจ็บกล้ามเนื้อบวมใต้ผิวหนัง มีไข้ อ่อนเพลีย หายใจขัดได้ (นิมิต, 2539)

2.5 การตรวจวินิจฉัย

การตรวจอุจจาระคนที่เป็น intestinal sarcocystosis จะพบ oocyst หรือ sporocyst ของ *S. bovihominis* หรือ *S. suihominis* แต่ไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างแน่ชัด แม้ว่า sporocyst ของ *S. bovihominis* จะใหญ่กว่า *S. suihominis* เล็กน้อย

คนที่เป็น muscular sarcocystosis ไม่มีอาการของโรค ดังนั้นการวินิจฉัยจึงได้จากการผ่าศพและตัดชิ้นกล้ามเนื้อย้อมสีดูทางจุลพยาธิ ซึ่งจะเห็น sarcocyst รูปร่างหลายแบบ ลักษณะที่พบโดยทั่วไปคือ ยาวรี ภายในมีเชื้ออยู่เป็นกลุ่มๆแยกจากกันโดย septa ซึ่งอาจมองเห็นหรือไม่เห็นก็ได้ (นิมิต, 2539)

2.6 การรักษา

เมื่อวินิจฉัยโรค Sarcocystosis หรือ Sarcosporidiosis ได้ตัวพยาธิในกล้ามเนื้อและลำไส้จะอยู่ในระยะสุดท้าย (Terminal stage) แล้ว และไม่มีการเพิ่มจำนวนของพยาธิในอวัยวะที่ตรวจพบ ดังนั้นการรักษาจำเพาะโดยใช้ยาฆ่าพยาธิจึงได้ผลไม่ดีอย่างไรก็ตามในรายที่มีอาการภูมิแพ้ที่เกิดหลังจากซีสต์แตกอาจใช้ Coticosterroids เพื่อบรรเทาอาการเหล่านี้ได้ เนื่องจาก Intracystic bradyzoites ไม่เพิ่มจำนวนในอวัยวะต่างๆ ดังนั้นจึงไม่พบ Recrudescence ในโรคนี้ (ดาราวรรณ, 2538)

2.7 การป้องกันและควบคุม

หลีกเลี่ยงการกินเนื้อสัตว์ที่ไม่สุกหรือสุกๆดิบๆ เนื้อสัตว์ที่บริโภคควรได้รับการตรวจจากสัตวแพทย์เสียก่อน นอกจากนี้การจัดการทางด้านโรงเรือนของสัตว์ควรถูกสุขาภิบาล เช่นไม่ให้สุนัขและแมวเข้ามาในบริเวณที่เลี้ยงสุกร (ดาราวรรณ, 2538)

2.8 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

หลักการของ PCR

เทคนิค PCR มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการให้มีปริมาณมากตามที่ต้อง การ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยาย DNA ให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้าน เท่า โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่สนในหลอดทดลอง วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการใน สิ่งส่งตรวจ ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1983 โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่ว่าโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอ็นไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สาย DNA ยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด คือ dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับ DNA สายต้นแบบ (Template) ส่วนประกอบต่างๆในการเพิ่มปริมาณ DNA มีดังนี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA), Thermostable DNA polymerase, Deoxynucleotide, Triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, Oligonucleotide primer อย่างน้อย 1 คู่ และบัพเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณ DNA จะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. Denaturation เป็นขั้นตอนที่ทำให้ DNA เส้นคู่กลายเป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-95 °C

2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ให้คู่primerสามารถจับกับ DNA templateได้ เพื่อใช้ในการเริ่มต้นการสังเคราะห์ DNA เส้นใหม่ โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 45-60 °C

3. Extension เป็นขั้นตอนเพิ่มสาย DNA เข้าไปต่อที่ปลาย 3′ ของprimer โดยอาศัย deoxyribonucleotide ที่ใส่เข้าไป นอกจากนี้ยังต้องอาศัย thermostable DNA polymerase enzyme เช่น Taq polymerase อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 °C

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็น DNA สายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ที่เป็นต้น แบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณ DNA ได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสาร DNA ไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า

ส่วนประกอบในปฏิกิริยาของ PCR

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template PCR)

ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีลำดับเบสเป้าหมาย หรือ ดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA target) สามารถจะใช้ในปฏิกิริยาของ PCR ในลักษณะ DNA หรือ DNA สายคู่ก็ได้ แม้ว่าขนาดของ DNA ไม่ใช่จุดที่มีปัญหามากนัก แต่การเพิ่มจำนวน DNA โดย DNA มีขนาดสั้นๆอยู่ในรูปปลายเปิด จะมีประ สิทธิภาพที่ดีกว่า เพราะ Primer จะเข้าไปจับ ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนและลดผลิต DNA ที่ไม่จำเพาะลง โดยทั่วไปควรทดสอบปริมาณ DNA ต้นแบบที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณ DNA ที่ต้องการเพียงพอและมีความไวที่เหมาะสม

2. Primer

การออกแบบ Primer ที่ใช้จะต้องเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงาน โดยอาศัยหลักการจับคู่แบบจำเพาะของ DNA ที่ต้องการตรวจหากับ Primer โดยลำดับ Nucleotide ของ Primer เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในกาสังเคราะห์ DNA ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับเบสที่นำมาสังเคราะห์ Primer

3. Thermostable DNA polymerase

Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ Taq DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อ Thermus aquaticuse (Taq) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน Denature และสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสร้าง DNA ได้ที่อุณหภูมิสูง คือ 70-85 °C และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา คือ 72 °C โดย Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 Kdal ซึ่งไม่มีคุณสมบัติ 3'-5' exonuclase activity จึงขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบที่เรียกว่า Proofreading ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Taq DNA polymerase อยู่ในช่วง 1.0-2.5 Units ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นกับปริมาณและลักษณะของ DNA ต้นแบบ, Primer รวมทั้งสารประกอบอื่นๆด้วย การใช้เอนไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้นทำให้เกิด Nonspecific background มาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยเกินไปก็จะทำให้ผลผลิตน้อย

4. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)

ความเข้มข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200 mM ของแต่ละ dNTP แต่ถ้าเป็น dNTPs ทั้ง 4 ตัว จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 mM ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่มี

ความเข้มข้นสูงเกินไป จะเกิดการต่อลำดับเบสคู่สมที่ผิดพลาด การเตรียม dNTPs ควรเตรียมเป็น Primary stock solution ที่เจือจาง 10 mM แล้วแบ่ง Aiquot เก็บที่ -20 °C

5. บัพเฟอร์

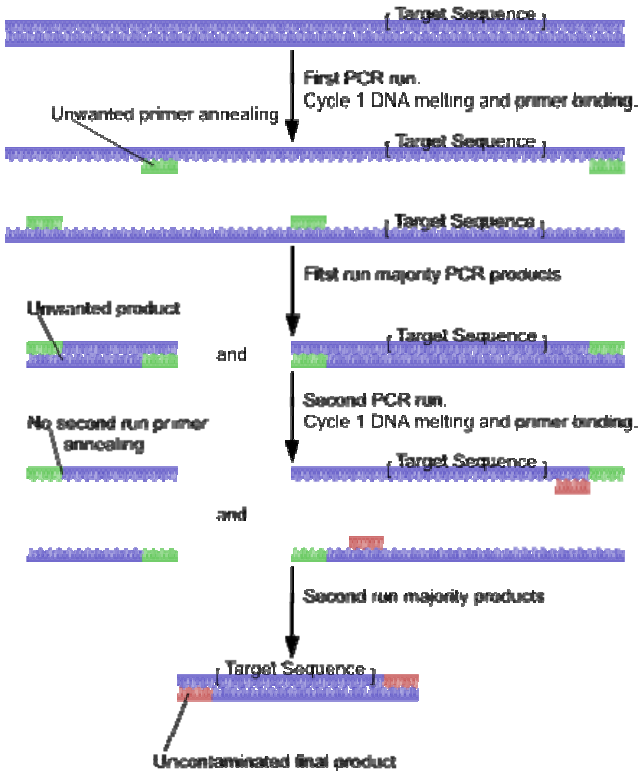
ส่วนประกอบของบัพเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCL, KCL, MgCl2 และ Glycerol ความเข้มข้นและภาวะที่เหมาะสมของส่วนประกอบต่างๆในบัพเฟอร์

Nested PCR

เป็นเทคนิค PCR ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการให้ได้ผลผลิต PCR ที่มากขึ้น เทคนิคนี้ทำได้โดยอาศัยการทำ PCR 2 ขั้นตอนด้วย primer 2 คู่ โดย Primer คู่แรกจะใช้ในตอน PCR ขั้นตอนแรก และ Primer คู่แรกจะอยู่รอบนอกของ DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่า DNA เป้าหมาย แต่มี DNA เป้าหมายอยู่ภายในลำดับเบสของผลผลิตของ DNA หลังจากนั้นนำเอาผลผลิตของ PCR ขั้นตอนแรกไปทำ PCR ขั้นตอนที่สอง โดยใช้ Primer คู่ที่ 2 ซึ่งออกแบบให้สำหรับเพิ่มขยายได้เฉพาะ DNA เป้าหมาย ซึ่งอยู่ถัดเข้าไปจาก Primer คู่แรก การทำ PCR ขั้นตอนที่ 2 นั้นอาจทำปฏิกิริยา 25-30 รอบ ในที่สุดก็ได้ผลผลิต DNA เป้าหมายที่เพิ่มขยายจำนวนมากตามที่ต้องการ เทคนิคนี้นิยมนำไปใช้ในการประยุกต์เรื่องการตรวจวินิจฉัยโรค

เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (PCR machine)

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบ ขึ้นอยู่กับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลายๆ รอบได้ ตั้งโปรแกรมการทำงานได้ และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง



รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนการทำ Nested PCR

(ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nested_PCR.png)

การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหา DNA ผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหา DNA โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ DNA สามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ จะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสง Ultraviolet ซึ่งจะเห็นแถบ DNA เรืองแสงบนแผ่นวุ้น

ประโยชน์ของ PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรค

ปัจจุบันนี้นับได้ว่า PCR เป็นเทคนิคที่สำคัญมากในงานอณูชีวโมเลกุล ทั้งที่เป็นงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการไปจนถึงการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และการเกษตร สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ ทั้ง

โรคติดเชื้อและโรคจากพันธุกรรม ศึกษาความผันแปรหรือกลายพันธุ์ของพันธุกรรมหรือยีน ทำแผนที่ยีนและศึกษาลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด ทั้งนี้เนื่องมาจากเทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวน DNA ที่สนใจศึกษาให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว.และเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย

2.8 เทคนิค Immunofluorescence

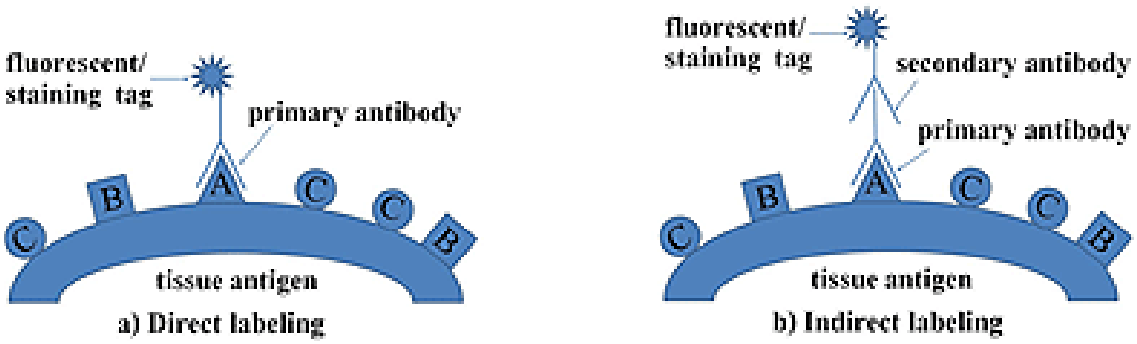
การทดสอบนี้ใช้สารเรืองแสงเป็นสารติดฉลาก โดยทั่วไปจะใช้แอนติบอดีติดฉลากเพื่อการตรวจหาแอนติเจน สารเรืองแสงที่นิยมใช้คือ fluorescein และ rhodamine ซึ่งอยู่ในรูปของ fluorescein isothiocyanate (FITC) และ tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRIYC) ตามลำดับ สารเรืองแสงเหล่านี้มีสมบัติที่สามารถดูดซึมแสงสีหนึ่งที่ปล่อยแสงอีกสีหนึ่งออกมา แสงที่มีสีต่างกัน มีความยาวคลื่นและพลังงานต่างกัน สารเรืองแสงจะดูดซึมแสงที่มีความยาวคลื่นน้อย (คือมีพลังงานสูง) และปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นมากกว่าซึ่งมีพลังงานต่ำกว่าออกมา สารเรืองแสงต่างชนิดกันจะดูดซึมและปล่อยแสงความยาวคลื่นที่ต่างกัน FITC ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490-495 nm และปล่อยแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ซึ่งเป็นแสงสีเขียวได้มากที่สุด ส่วน TRITC ดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 550 nm และปล่อยแสงความยาวคลื่น 580 nm ซึ่งเป็นแสงสีแดงได้มากที่สุด การตรวจสอบดูสารเรืองแสงเหล่านี้ใช้วิธี Immunofluorescence ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งมีหลอดไฟพิเศษสำหรับเป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ส่องผ่านสารเรืองแสงดังกล่าว และมีแผ่นกรองแสงซึ่งกันไม่ให้แสงที่ออกมาโดยตรงจากหลอดไฟนั้นผ่านเข้าตา แต่จะยอมให้แสงที่ปล่อยออกมาจากสารเรืองแสงซึ่งมีความยาวคลื่นยาวกว่านั้นผ่านมาให้มองเห็นได้ ดังนั้นถ้าตำแหน่งใด มีสารดังกล่าวอยู่ก็จะมองเห็นมีแสงเรืองซึ่งมีสีแตกต่างกันไปตามชนิดของสารเรืองแสงที่ใช้ การตรวจพบเช่นนี้เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าการตรวจสอบนั้นให้ผลบวก

โดยหลักการสามารถแบ่งวิธีการทดสอบออกได้เป็น 2 แบบคือ

1. Direct Immunofluorescence วิธีการทดสอบมีหลักการดังนี้คือ นำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหามาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง และให้ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่ต้องการตรวจหาแอนติเจน เช่น ต้องการตรวจดู IgG บนผิวของ B lymphocyte ของคน (ในการทดสอบนี้ IgG ทำหน้าที่เป็นแอนติเจน) จะทำได้โดยการตรึง B lymphocyte ให้ติดอยู่บน slide ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ IgG ของคนซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ทิ้งไว้ให้แอนติบอดีได้ทำปฏิกิริยากับ IgG แล้วล้างแอนติบอดีส่วนเกินออก ถ้าบนผิวของ B lymphocyte นั้นมี IgG อยู่ก็จะสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ติดฉลากและทำให้ยังคงมีสารเรืองแสงติดอยู่บนสไลด์ ซึ่งมองเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Fluorescence microscope)

วิธีการทดสอบนี้มีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจน แอนติบอดี และคอมพลีเมนต์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่นการตรวจหา autoantibody ต่อ basement membrane ของผิวหนังในโรค bullous pemphigoid การตรวจหาคอมพลีเมนต์ และ/หรือ แอนติบอดีซึ่งติดอยู่ที่ glomerular basement membrane ในโรคไตบางชนิด เป็นต้น

2. Indirect Immunofluoresence วิธีการทดสอบนี้มีหลักการคือ ให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบทำปฏิกิริยากับแอนติเจนแอนติบอดีที่จำเพาะ และใช้แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกบูลิน ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสงเป็นตัวทำปฏิกิริยาอีกตัวหนึ่ง ซึ่งช่วยบอกว่ามีปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบนั้นเกิดขึ้นหรือไม่ เช่น ต้องการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสพิษสุนัขบ้าในสมองสุนัขที่เป็นโรค จะทำได้โดยการป้ายเนื้อสมองลงบนแผ่นกระจก ย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อไวรัสนี้ ล้างแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ย้อมด้วยแอนติบอดีต่ออิมูโนโกบูลินซึ่งติดฉลากไว้ด้วยสารเรืองแสงอีกครั้ง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออก ถ้าในเนื้อสมองนั้นมีแอนติเจนของเชื้อไวรัสอยู่ แอนติบอดีตัวที่หนึ่งก็จะสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนนี้ และติดอยู่บนแผ่นกระจกได้ แอนติบอดีตัวที่หนึ่งจะจับกับแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากไว้ด้วยสารเรืองแสง ทำให้แอนติบอดีตัวที่สองติดอยู่บนแผ่นกระจกได้ด้วย ดังนั้นเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงก็จะเห็นแสงเรืองบนแผ่นกระจกได้



รูปที่ 2.6 แสดงเทคนิคการย้อม Immunofluorescence

a) Direct Immunofluorescence b) Indirect Immunofluoresence

(ที่มา : http://www.simedbull.com/content.php?content_id)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการศึกษา

3.1 พื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง

เลือกพื้นที่ 3 หมู่บ้านที่ได้รับรายงานจากสถานีอนามัยตำบลระบำ พบว่ามีการตรวจพบปรสิตสูง รวมทั้งหมู่บ้านอื่นๆที่อยู่ใกล้เคียง ดังนี้

1. หมู่ที่ 9 บ้านบึงเจริญ ตำบลระบำ อ.ลานสัก จ.อุทัยธานี เป็นหมู่บ้านที่มีรายงานว่ามีการตรวจพบปรสิตสูงที่สุด

2. หมู่ที่ 6 บ้านห้วยเป้า ตำบลระบำ อ.ลานสัก จ.อุทัยธานี เป็นหมู่บ้านที่มีรายงานว่ามีการตรวจพบเชื้อ *Sarcocystis* spp.

3. หมู่ที่ 10 บ้านใหม่สามัคคี ตำบลระบำ อ.ลานสัก จ.อุทัยธานี เป็นหมู่บ้านที่อยู่ใกล้เคียง

4.หมู่ที่ 12 บ้านโป่งสามสิบ ตำบลระบำ อ.ลานสัก จ.อุทัยธานี เป็นหมู่บ้านที่อยู่ใกล้เคียง

3.2 การเก็บตัวอย่างอุจจาระ และเลือด

เก็บตัวอย่างทั้งหมด 200 ตัวอย่าง จากประชากร 200 คนโดยเก็บทั้งอุจจาระและเลือด จากอาสาสมัครคนเดียวกัน และเลือกกลุ่มตัวอย่างที่มีอายุมากกว่า 15 ปี ซึ่งประชากรกลุ่มตัวอย่างทุกคนจะได้รับทราบข้อมูลถึงการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเรืองอะไร ท่านจะได้ประโยชน์อะไร คำแนะนำการเก็บตัวอย่างอุจจาระ เลือด และการตอบแบสอบถาม จากคณะผู้วิจัย และเจ้าหน้าที่สาธารณสุขที่ร่วมในโครงการการศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ครั้งที่ 9/2551

การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

เก็บตัวอย่างอุจจาระโดยใช้ภาชนะที่เฉพาะและเหมาะสมสำหรับการเก็บปัสสาวะ (กระป๋องพลาสติกฝาเกลียว เบอร์ 2) แจกให้กับกลุ่มประชากร โดยลงรหัสและชื่อของประชากรพร้อมทั้งให้

คำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการเก็บอุจจาระอย่างถูกวิธี โดยให้เก็บคนละ ประมาณ 30 กรัม แล้วเก็บในถังขนาดใหญ่ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C หลังจากนั้นนำมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

การเก็บตัวอย่างเลือด

ประชากรกลุ่มตัวอย่างทุกคนจะถูกเจาะเลือดโดยพยาบาล และเจ้าหน้าที่ของสถานีอนามัยที่มีความชำนาญ ซึ่งจะทำการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำที่แขนจำนวน 1 ครั้ง และเก็บเลือด 6 มล. โดยแบ่งแยกการเก็บเพื่อการวิเคราะห์ดังนี้

1. เก็บเลือด 2 มล. ใส่หลอดที่มีสาร citrate (citrate tube) แล้วนำไปใส่กล่องโฟมที่มี dry ice สำหรับรักษาอุณหภูมิประมาณ -80 °C แล้วนำกลับมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จนกว่าจะนำมาตรวจตรวจด้วยเทคนิค PCR

2. เก็บเลือด 4 มล. ใส่หลอดพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ (sterile tube) เพื่อเก็บ ซีรั่ม โดยปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชม. จากนั้นนำไปแช่ในถังเก็บน้ำแข็ง แล้วนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร นำเลือดมาปั่นที่ 3,000 g นาน 10 นาที ดูดเก็บเฉพาะส่วนซีรั่มแบ่งใส่หลอดปั่นขนาด 1.5 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาตรวจตรวจด้วยเทคนิค IFAT

3.3 การสัมภาษณ์ข้อมูลโดยทั่วๆไป

ใช้แบบสอบถามสัมภาษณ์ประชากรทุกคนที่ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระและเลือด

3.4 การตรวจอุจจาระด้วยเทคนิค Modified Formalin-ethyl acetate centrifugation technique และ Agar Plate Culture technique

3.4.1 การตรวจอุจจาระด้วยเทคนิค Modified Formalin-ethyl acetate centrifugation technique

ตัวอย่างทั้งหมดจะทำการตรวจอุจจาระด้วยวิธีนี้เป็นอันดับแรก ดังนี้

1. อุจจาระทุกรายนำมาชั่ง 2 กรัม

2. ละลายอุจจาระด้วยน้ำเกลือ 10 มล. ในบีกเกอร์แล้วกรองผ่านผ้ากอซ 2 ชั้น

3. นำส่วนที่กรองได้ ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วประมาณ 1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2

นาที

4. เทน้ำส่วนบนออกแล้วเติมน้ำเกลือ 10 มล. ลงไปใหม่และเขย่าเพื่อละลายตะกอน แล้วนำไปปั่นใหม่ ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้งจนส่วนบนใส

5. ละลายตะกอนใน 10% ฟอร์มาลิน ปริมาณ 7 มล. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

6. เติม ethyl acetate ลงไป 2-3 มล. แล้วเขย่าอย่างแรง

7. นำไปปั่นอีกครั้งจะได้สารละลายเป็น 4 ชั้น คือ ชั้นบนสุดเป็น ether หรือ ethyl acetate ชั้นที่ 2 เป็นไขมันและ organic substance ที่ละลายใน ether หรือ ethyl acetate ชั้นที่ 3 เป็นฟอร์มาลิน และชั้นที่ 4 เป็นตะกอนที่มีปรสิตตกอยู่ที่ก้น

8.ใช้ไม้เจาะชั้นไขมันที่ละลายใน ether โดยวนไปรอบ ๆ หลอดแก้ว แล้วจึงเทสารละลายออก

9.ใช้ pastuer pipette ดูดเอาตะกอนไปตรวจหาเชื้อปรสิต โดย smear บนน้ำเกลือ 0.85% และ สารละลายไอโอดีนตามลำดับจนสารละลายเริ่มขุ่น แล้วนำไปตรวจหาปรสิต และนับไข่พยาธิทุกชนิดที่ตรวจพบ

3.4.2 วิธีการตรวจอุจาระด้วยวิธี Agar Plate Culture technique

เป็นวิธีเพาะเลี้ยงหาตัวอ่อนของ *Strongyliodes stercoralis* มีขั้นตอนดังนี้

1.เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยละลาย /2 กรัม nutrient agar ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรแล้วนึ่งฆ่าเชื้อหรือ Auto Clave 10-15 นาที

2.เทอาหารเลี้ยงเชื้อทีเตรียมแล้วลงไปใน plate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ประมาณ 15-20 มิลลิเมตร แล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัว

3.วางอุจาระประมาณ 4 กรัม ลงกลาง plate

4.ตั้ง plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน นำมาตรวจหารอยทางเดินของพยาธิด้วยกล้อง stereo scope ถ้ายังไม่พบ เก็บไว้ตรวจอีกครั้งในวันที่ 7 เติม 10 % ใน Formalin ประมาณ 7-10 มิลลิลิตร ลงใน plate \ เขย่า plate .ให้ทั่วแล้วดูด Formalin มาใส่ในหลอดทดลอง นำไป centrifuge แล้วเอาตะกอนมาตรวจหาเชื้อปรสิต

3.5 การตรวจเลือดด้วยเทคนิค Indirect fluorescent antibody test (IFAT)

ตัวอย่างทั้งหมดทั้งที่ตรวจพบ (positive) และตรวจไม่พบ (negative) sporocyst ในอุจจาระนำมาศึกษาต่อด้วยเทคนิค IFAT โดยประยุกต์วิธีการคล้ายกับของ Gondim et al., 1999 และ Moré et al., 2008 โดยย่อดังนี้

1. นำซีรั่มที่ได้จากคนมาทำ two-fold dilution ด้วย diluent buffer (BSA diluent /blocking solution)

2. นำซีรั่ม (จากข้อ 1) ไปหยดลงในสไลด์ที่ coat ด้วย antigen (tachyzoites of *Sarcocystis*) หลุมละ 20 µl

<u>หมายเหตุ</u> กรณีที่จะทดสอบการมี cross-reaction หรือ negative control ในขั้นตอนนี้จะหยดเฉพาะ diluent buffer (BSA diluent /blocking solution) เท่านั้น

3. ใส่ใน moise chamber แล้วนำไป incubate ที่ 37^0C นาน 1 ชม.

4. นำสไลด์ออกมาล้างด้วย wash buffer 2 ครั้ง, ครั้งแรกนาน 3 นาที, ครั้งที่ 2 นาน 10 นาที

5. นำสไลด์มาเช็ดด้วยกระดาษทิชชู่ แล้วหยด conjugate anti-antibody หลุมละ 10 µl

6. นำไป incubate ใน moise chamber อีกครั้งที่ 37^0C นาน 1 ชม.

7. เอามาล้างด้วย wash buffer 2 ครั้ง, ครั้งแรกนาน 3 นาที, ครั้งที่ 2 นาน 10 นาที แล้วซับด้วยกระดาษทิชชู่

8. mount ด้วย mount fluid หลุมละ 20 ul ปิดด้วย cover slide แล้วดูใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์

3.6 การตรวจเลือดด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ตัวอย่างเลือดทั้งหมด 200 ตัวอย่างนำมาศึกษาต่อด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Semi-nested PCR ดังนี้

3.6.1 ขั้นตอนการแยกสกัด DNA ของเชื้อ *Sarcocystis* spp. จากตัวอย่างเลือด

ขั้นตอนการสกัด DNA จากเลือดโดยใช้Nucleo spin blood DNA kit มีดังต่อไปนี้

1. เตรียม Heating box ที่อุณหภูมิ 70 ˚C เพื่อรอใช้ในข้อที่ 5 และเตรียมน้ำแข็งใส่กล่องพลาสติก เช็ดโต๊ะ รวมถึงเตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด DNA

2. ปิเปตเลือดปริมาตร 200 µL ใส่ใน 1.5 microcentrifuge tube ที่เตรียมไว้(ถ้าเลือดไม่พอให้ใส่ PBS จนปริมาตรถึง 200 µL)

3. ปิเปต Proteinase K ปริมาตร 25 µL ใส่ลงไป ผสมให้เข้ากันโดยใช้ tip และใช้ vortex mixer สักครู่

4. ปิเปต Lysis buffer B3 ปริมาตร 200 µL ใส่ลงใน sample และผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex mixer แรงๆ นาน 20 วินาที

5. นำไปไว้ใน 70 ˚C incubate sample นาน 20 นาที จากนั้นนำมา vortex mixer แรงๆ 2 ครั้ง ขณะเดียวกันทำการเตรียม Elution buffer BE ปริมาตร 100 µL/sample โดยการนำไป incubate 70 ˚C (preheated ที่ 70 ˚C) เพื่อรอใช้ในข้อที่ 17

6. เมื่อเสร็จ สังเกต specimens จะเป็นสีน้ำตาล

7. ปิเปต 100% Ethanol ปริมาตร 210 µL ใส่ลงใน sample และผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex mixer แรงๆ นาน 20 วินาที

8. ปิเปต sample ทั้งหมดใส่ลงใน Nucleo spin blood column ซึ่งอยู่ใน collection tube (ใน set)

9. นำไปปั่นใน centrifuge ที่จำนวนรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที (ถ้า sample ตกลงสู่ด้านล่างของหลอดไม่สมบูรณ์ ให้ปั่นอีกครั้งที่จำนวนรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที)

10. ย้าย Nucleo spin blood column ใส่ลงใน collection tube (2 mL ใน set) อันใหม่ (ทิ้ง collection tube อันเก่าพร้อมกับน้ำที่ได้)

11. ปิเปต Wash buffer BW ปริมาตร 500 µL ใส่ลงไป นำไปปั่นใน centrifuge ที่จำนวนรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

12. ย้าย Nucleo spin blood column ใส่ลงใน collection tube (2 mL ใน set) อันใหม่ (ทิ้ง collection tube อันเก่าพร้อมกับน้ำที่ได้)

13. ปิเปต Wash buffer B5 ปริมาตร 600 µL ใส่ลงไป นำไปปั่นใน centrifuge ที่จำนวนรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

14. ย้าย Nucleo spin blood column ใส่ลงใน collection tube (1.5 microcentrifuge tube ที่เตรียมไว้) อันใหม่ (ทิ้ง collection tube อันเก่าพร้อมกับน้ำที่ได้)

15. นำไปปั่นใน centrifuge ที่จำนวนรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

16. ย้าย Nucleo spin blood column ใส่ลงใน collection tube (1.5 microcentrifuge tube ที่เตรียมไว้) อันใหม่ (ทิ้ง collection tube อันเก่าพร้อมกับน้ำที่ได้)

17. ปิเปต Elution buffer BE (preheated ที่ 70 ˚C) ปริมาตร 100 µL ใส่ลงใน membrane ของ Nucleo spin blood column และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที

18. นำไปปั่นใน centrifuge ที่จำนวนรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

19. นำ Nucleo spin blood column ออก (ทิ้ง)

20. รีบปิเปต elute total DNA ใส่ใน 0.5 mL PCR tube (ที่ได้เตรียมไว้) ทันที ต้องทำบนน้ำแข็ง หรือ label แล้วรีบนำไปเก็บที่อุณหภูมิ-20 ˚C ทันที อาจนำไปลองวัดค่า OD เพื่อดูปริมาณของ DNA ที่สกัดได้ หรือนำไป run gel เพื่อดูband

3.6.2 หลักการทำ Semi-nested PCR

Primary PCR

1. ใช้Sample (DNA template) ดังต่อไปนี้

- ตัวอย่างทั้งหมด

2. ใช้Primer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *Sarcocystis* spp. คือ

Primary PCR

Primer 2L Forward GGATAAACCGTGGTAATTCTATG 156-178 = 23 bp

Primer 2H Reward ACCTGTTATTGCCTCAAACTTC 1530-1551 = 22 bp

3. ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ทำในหลอดทดลองพลาสติกขนาดเล็ก (หลอด PCR) ปริมาตร 0.5 ml โดยในหลอดมีปริมาณสารทั้งหมด 25 µl ซึ่งประกอบด้วย (Jittapalapong *et al*., 2008)

- Master mix 12.5 µl (ประกอบด้วย Buffer, $MgCl_2$, dNTPs (dTTP, dGTP, dCTP, dATP) และเอนไซม์ Taq Polymerase)
- Primer 2L 1 µl
- Primer 2H 1 µl
- DNA template 2 µl
- Distilled water 8.5 µl

หมายเหตุ การทดลองครั้งนี้ในหลอด PCR จะเตรียมปริมาณสารทั้งหมดเพียง 25 µl เท่านั้น

4. ทำการขยายยีน (Amplification) โดยนำหลอด PCR ข้างต้นใส่ในเครื่อง Thermal cycler ซึ่งจะให้ความร้อน 3 ขั้นตอน ประกอบด้วย (Jittapalapong *et al*., 2008)

- **Stage 1 (Denature):**

- Step 1 ที่ 95 ˚C ประมาณ 2 นาที } 1 cycle

- **Stage 2 (Primer annealing):**

  - Step 1 ที่ 94 ˚C ประมาณ 30 วินาที
  - Step 2 ที่ 53 ˚C ประมาณ 30 วินาที
  - Step 3 ที่ 72 ˚C ประมาณ 40 วินาที
  } 35 cycles

- **Stage 3 (Extension):**

  - Step 1 ที่ 72 ˚C ประมาณ 10 นาที } 1 cycle

หมายเหตุ หลอด PCR ซึ่งประกอบด้วยสารผสม จะถูกให้ความร้อน 3 ขั้นตอนข้างต้นแบบซ้ำๆ จนครบ 35 รอบ

Secondary PCR

1. ใช้ Sample (DNA template) จาก product ที่ได้จากครั้งที่ 1
2. ใช้Primer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *Sarcocystis* spp. คือ

Secondary PCR

Primer 2L Forward GGATAAACCGTGGTAATTCTATG 156-178 = 23 bp

Primer 3H Reward GGCAAATGCTTTCGCAGTAG 1040-1070 = 20 bp

3. ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ทำในหลอดทดลองพลาสติกขนาดเล็ก (หลอด PCR) ปริมาตร 0.5 ml โดยในหลอดมีปริมาณสารทั้งหมด 25 µl ซึ่งประกอบด้วย (Jittapalapong *et al*., 2008)

- Master mix 12.5 µl (ประกอบด้วย Buffer, MgCl2, dNTPs (dTTP, dGTP, dCTP, dATP) และเอนไซม์ Taq Polymerase)
- Primer 2L 1 µl
- Primer 3H 1 µl
- DNA template 2 µl
- Distilled water 8.5 µl

หมายเหตุ การทดลองครั้งนี้ในหลอด PCR จะเตรียมปริมาณสารทั้งหมดเพียง 25 µl เท่านั้น

4. ทำการขยายยีน (Amplification) โดยนำหลอด PCR ข้างต้นใส่ในเครื่อง Thermal cycler ซึ่งจะให้ความร้อน 3 ขั้นตอน ประกอบด้วย (Jittapalapong *et al*., 2008)

- **Stage 1 (Denature):**

  - Step 1 ที่ 95 ˚C ประมาณ 2 นาที } 1 cycle

- **Stage 2 (Primer annealing):**

  - Step 1 ที่ 94 ˚C ประมาณ 30 วินาที
  - Step 2 ที่ 53 ˚C ประมาณ 30 วินาที } 35 cycles
  - Step 3 ที่ 72 ˚C ประมาณ 40 วินาที

- **Stage 3 (Extension):**

  - Step 1 ที่ 72 ˚C ประมาณ 10 นาที } 1 cycle

หมายเหตุ หลอด PCR ซึ่งประกอบด้วยสารผสม จะถูกให้ความร้อน 3 ขั้นตอนข้างต้นแบบซ้ำๆ จนครบ 35 รอบ

3.6.3 ขั้นตอนการนำสารผลผลิต (PCR Product) ที่ได้ไปแยกบน 1.2% Agarose gel electrophoresis

1. ชั่งผง Agarose น้ำหนัก 1.2 กรัม ใส่ลงในขวดขนาด 500 ml

2. ตวง 1x TBE buffer ปริมาตร 100 ml ใส่ลงในขวดขนาด 500 ml

3. นำไปต้มใน Microwave ที่ 400 W ประมาณ 3-4 นาที

4. ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงอยู่ที่ 50 °C

5. นำเจลที่ได้เทลงในถาดที่มี Comb เสียบรอไว้

6. ตั้งทิ้งไว้ รอจนกว่าเจลจะแข็ง

7. เมื่อเจลแข็งแล้ว ยก comb ขึ้น จะได้Well ที่ใช้สำหรับบรรจุตัวอย่างและ Marker

8. นำเจลที่อยู่บนถาดวางบน Chamber ให้ด้านที่มี well อยู่ทางด้านขั้วลบ (ปลั๊กสีดำ)

9. เท 1x TBE buffer ลงใน Chamber ให้buffer ท่วมเจล

10. Load ตัวอย่างและ Marker ลงในแต่ละ Well และปิดฝาครอบ

11. เปิดเครื่อง ใช้กระแสไฟฟ้า 120 Volts นาน 45 นาที

12. เมื่อ Dye เคลื่อนที่มาใกล้ถึงขอบของเจล จึงปิดเครื่อง

3.6.4 ขั้นตอนการดูด้วย Gel document

1. นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสาร Ethidium bromide นาน 10 นาที

2. ล้างออกด้วย Distilled water นาน 5 นาที

3. นำแผ่นเจลมาส่องดูด้วย Gel document ภายใต้แสง Ultraviolet เพื่อดูขนาดของ DNA แล้วทำการบันทึกผลการทดลอง

3.7 การรักษา

ข้อมูลการตรวจพบปรสิต จะถูกรายงานไปที่สถานีอนามัยตำบลระบำ เพื่อทำการรักษาตามชนิดของปรสิตที่ตรวจพบ

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกบันทึกโดยเครื่องคอมพิวเตอร์ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ผลการตรวจเชื้อปรสิตในอุจาระด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique และ Agar plate culture technique

จากการสำรวจเพื่อหาความชุก (prevalence) จากจำนวนประชากรตำอย่าง 200 ราย จาก 4 หมู่บ้าน ของ ตำบลระบำ อ.ลานสัก จ.อุทัยธานี ด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique พบการติดเชื้อปรสิตทั้งหมดจำนวน 75 คน คิดเป็นร้อยละ 37.5 และ วิธี Agar plate culture technique พบการติดเชื้อปรสิตทั้งหมดจำนวน 12 คน ร้อยละ 6

4.1.1 ผลการตรวจเชื้อปรสิตในอุจาระด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique

แสดงความชุกการติดเชื้อปรสิตด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique พบว่าเป็นพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini)* จำนวน 59 คน คิดเป็นร้อยละ 29.5 เชื้อโปรโตซัว *Entamoeba coli* จำนวน 10 คน คิดเป็นอยละ 5 เชื้อโปรโตซัว *Sacocystis* spp จำนวน 5 คน คิดเป็นร้อยละ 2.5 และ เชื้อพยาธิ *Strongyloides stercoralis* จำนวน 1 คน คิดเป็นร้อยละ 0.5 ดังแสดงตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1-4.3

ตารางที่ 4.1 แสดงความชุก(prevalence) การติดเชื้อปรสิตจำแนกตามหมู่บ้านตัวอย่าง

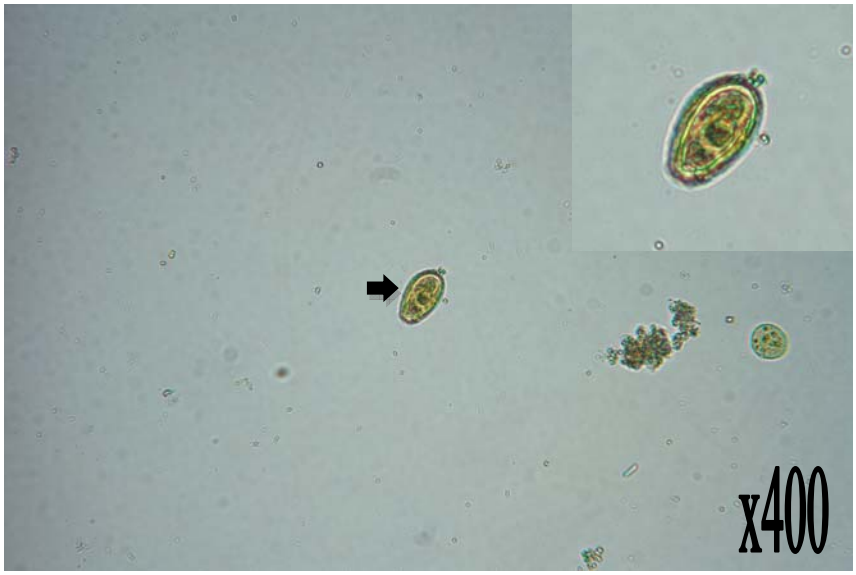
กลุ่มตัวอย่าง	เชื้อปรสิตแสดงจำนวน(ร้อยละ)				
	(O. viverrini)	*(S.stercoralis)*	*E. coli*	*Sacocystis* spp.	รวม
หมู่บ้านห้วยเป้า	2 (1)	_	4 (2)	_	6 (3)
หมู่บ้านบึงเจริญ	33 (16.5)	1(0.5)	6 (3)	1 (0.5)	41 (20.5)
หมู่บ้านใหม่สามัคคี	16 (8)	_	_	_	16 (8)
หมู่บ้านโป่งสามสิบ	8 (4)	_	_	4(2)	12 (6)
รวม	59 (29.5)	1 (0.5)	10 (5)	5 (2.5)	75 (37.5)

4.1.2 ผลการตรวจเชื้อปรสิตในอุจาระด้วยวิธี Agar plate culture technique

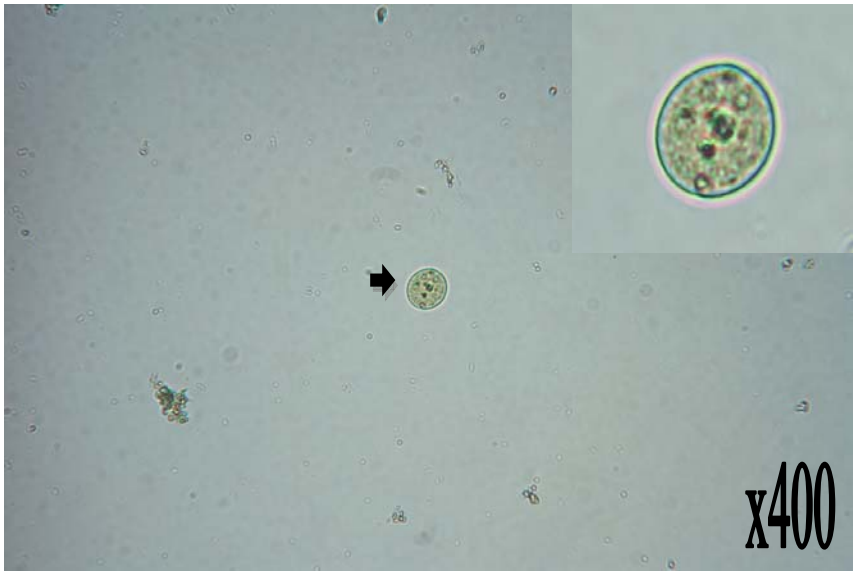
แสดงความชุกการติดเชื้อปรสิตด้วยวิธี Agar plate culture technique พบว่าเป็น พยาธิสตรองจีลอยด์ (*S. stercoralis*) จำนวน 12 คนคิดเป็นร้อยละ 6.5 ดังแสดงตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 แสดงความชุก (prevalence) การติดเชื้อปรสิตจำแนกตามหมู่บ้านตัวอย่าง

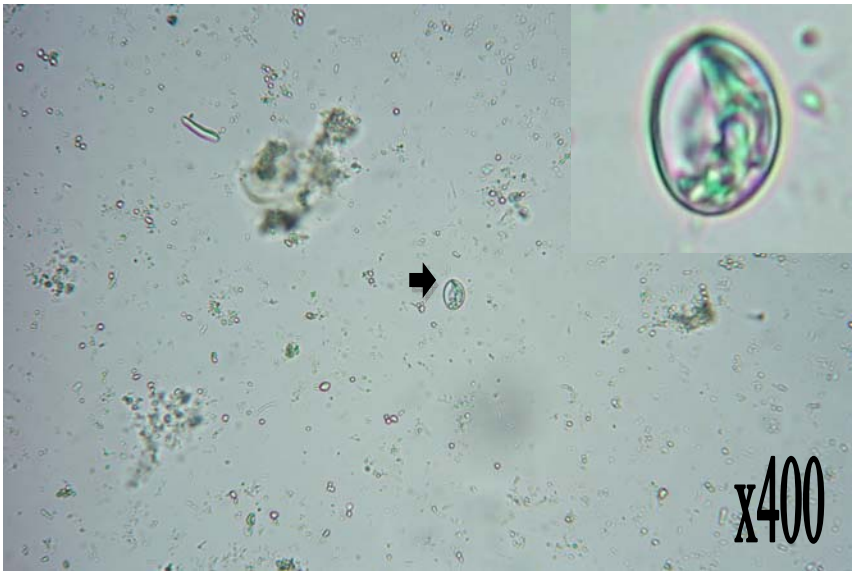
กลุ่มตัวอย่าง	เชื้อปรสิตแสดงจำนวน(ร้อยละ)				
	(O.viverrini)	*(S. stercoralis)*	*E. coli*	*Sacrocystis* spp.	*รวม*
หมู่บ้านห้วยเป้า	–	4(2)	–	–	4(2)
หมู่บ้านบึงเจริญ	–	3(1.5)	–	–	3(1.5)
หมู่บ้านใหม่สามัคคี	–	3(1.5)	–	–	3(1.5)
หมู่บ้านโป่งสามสิบ	–	2(1)	–	–	2(1)
รวม	–	12(6)	–	–	12(6)



รูปที่ 4.1 แสดงไข่พยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchorchis viverrini*) ในลำไส้คน (ลูกศรชี้)



รูปที่ 4.2 แสดงระยะซีสต์ของ *Entamoeba coli* ในลำไส้คน (ลูกศรชี้)

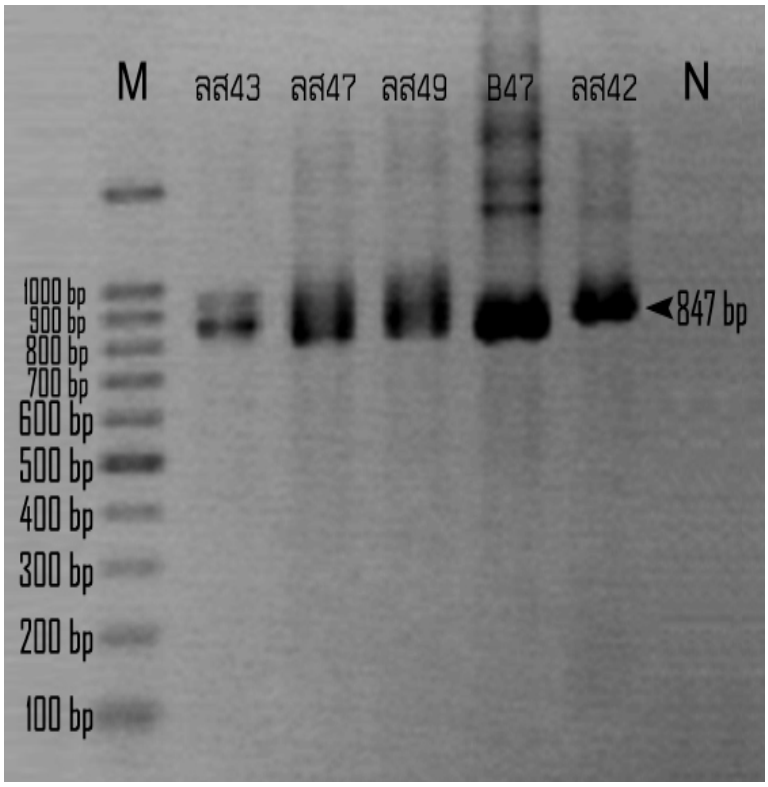


รูปที่ 4.3 แสดงระยะซีสต์ของ *Sacocystis* spp. ในลำไส้คน (ลูกศรชี้)

รูปที่ 4.4 แสดงตัวอ่อนพยาธิสตรองจีลอยด์ (*Strongyloides stercoralis*) ในลำไส้คน (ลูกศรชี้)

4.2 ผลการตรวจเชื้อปรสิตในเลือดคนด้วยวิธี PCR โดยใช้ Semi-Nested PCR

จากการศึกษาเพื่อหาเชื้อ *Sarcocystis* spp. ในตัวอย่างเลือดคน ด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR รวมทั้งหมด 200 ตัวอย่าง พบว่ามีแถบ DNA ขนาด 847 bp เกิดขึ้นจำนวน 5 คน คิดเป็นร้อยละ 2.5 ในพื้นที่เขต ตำบลระบำ อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี ซึ่งผลการศึกษาด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR แสดงผล ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 รูปแสดงผล Semi-Nested PCR ของเชื้อ *Sarcocystis* spp.

ผลการทดลองที่ได้พบว่ามีแถบ DNA ของเชื้อ *Sarcocystis* spp. จำนวน 5 รายเกิดขึ้น จากการทำ Semi-Nested PCR ใช้ primary primer (2L+2H)และ secondary primer (2L+3H) ซึ่ง PCR product ที่ได้มีขนาดของ band 847 bp

4.3 ผลการตรวจเชื้อปรสิตในเลือดคนด้วยวิธี Indirect fluorescent antibody test (IFAT)

จากการศึกษาการตรวจตัวอย่างเซรั่ม เพื่อหาผู้ติดเชื้อ *Sarcocystis* spp. ของประชากรในพื้นที่อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี ด้วยเทคนิค Immunofluorescence พบว่ามีผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดนี้ทั้งหมด 30 คน จาก 200 คน คิดเป็นร้อยละ 15 กล่าวคือให้ผลบวกในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าว ซึ่งผลการศึกษาได้แสดงผล ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการย้อม Immunofluorescence เพื่อหาเชื้อ *Sarcocystis* spp. ในเซรั่มของประชากรในพื้นที่อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี

ลำดับ	เซรั่ม (รหัส)	ผล	ลำดับ	เซรั่ม (รหัส)	ผล
1	ลส 43	+++	16	B28	++
2	ลส42	+++	17	B30	++
3	ลส47	+++	18	B31	++
4	ลส49	+++	19	B35	++
5	A6	++	20	B40	++
6	A9	+	21	B42	+
7	A12	++	22	B47	+++
8	A15	++	23	C1	++
9	A25	++	24	C4	+
10	A36	+	25	C8	+
11	B1	++	26	C11	++
12	B12	++	27	C18	+

13	B20	++	28	C21	+
14	B24	++	29	C30	+
15	B26	+	30	C41	++

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการย้อม Immunofluorescence เพื่อหาเชื้อ *Sarcocystis* spp. ในเซรั่มของประชากรในพื้นที่อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี

จากการตรวจเซรั่มด้วยวิธี Immunofluorescence เพื่อตรวจหาผู้ติดเชื้อ *Sarcocystis* spp. ของประชากรในพื้นที่อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี พบว่า

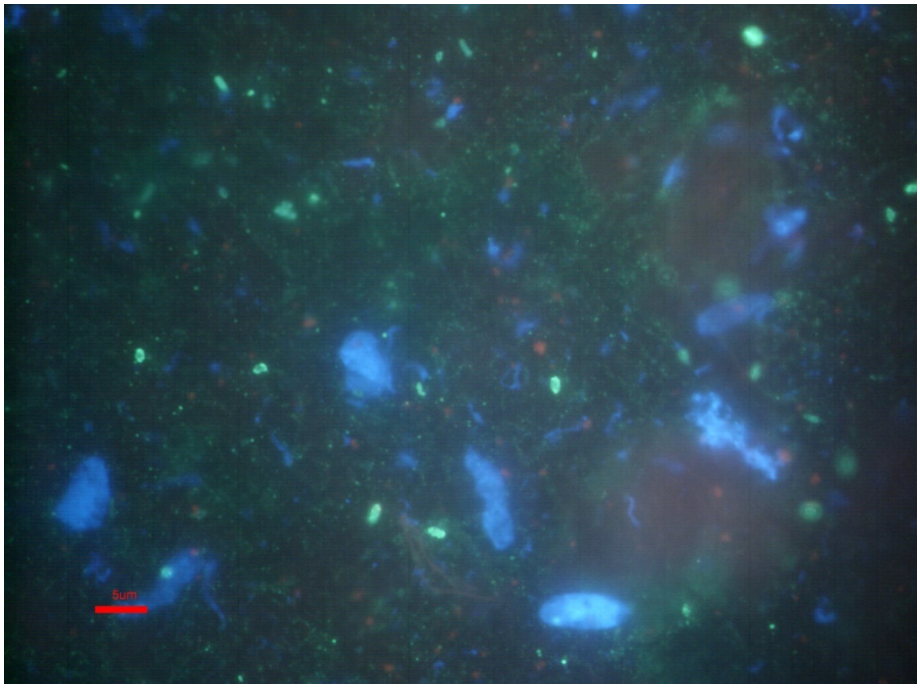
มีผู้ติดเชื้อ *Sarcocystis* spp. ทั้งหมด 30 คน จาก 200 คน คิดเป็นร้อยละ 15 โดยที่ระดับความรุนแรง 3 (+++), ระดับความรุนแรง 2 (++) และระดับความรุนแรง 1 (+) มีจำนวนผู้ติดเชื้อ 5, 16 และ 9 คน ตามลำดับ

หมายเหตุ: เกณฑ์การประเมินระดับความรุนแรงของการติดเชื้อปรสิต

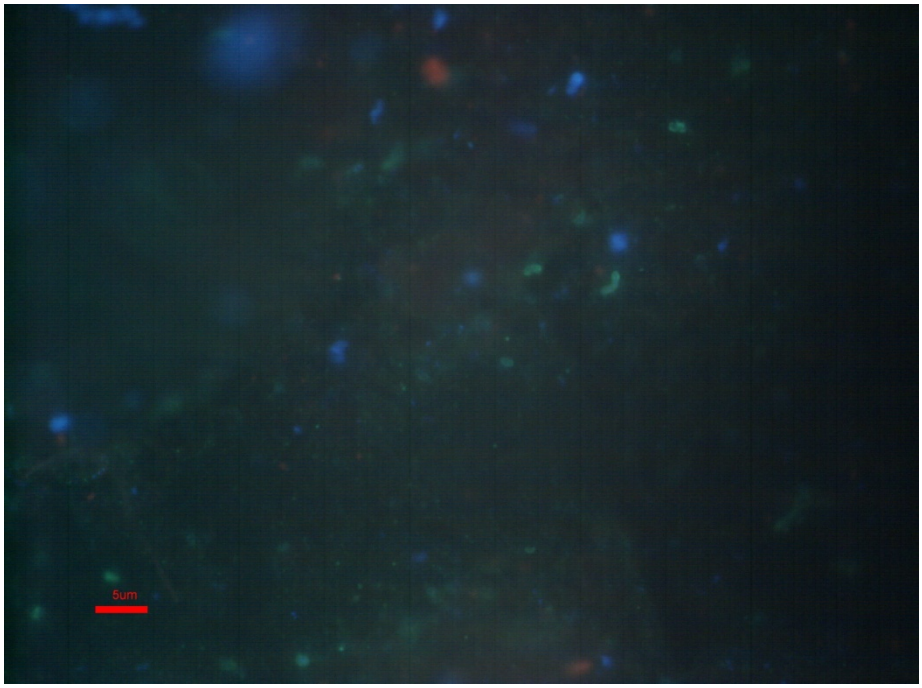
ความรุนแรงระดับที่ 3 หมายถึงเมื่อตรวจด้วยเทคนิค Immunofluorescence แล้ว จะพบการติดเชื้อมาก กล่าวคือให้ผลบวกต่อการวิเคราะห์ และเมื่อนับจำนวน bradyzoite ที่เรืองแสงใน 10 บริเวณ จะได้จำนวนเฉลี่ยมากกว่า 5 ตัว

ความรุนแรงระดับที่ 2 หมายถึงเมื่อตรวจด้วยเทคนิค Immunofluorescence แล้ว จะพบการติดเชื้อปานกลาง กล่าวคือให้ผลบวกต่อการวิเคราะห์ และเมื่อนับจำนวน bradyzoite ที่เรืองแสงใน 10 บริเวณ จะได้จำนวนเฉลี่ยระหว่าง 3-5 ตัว

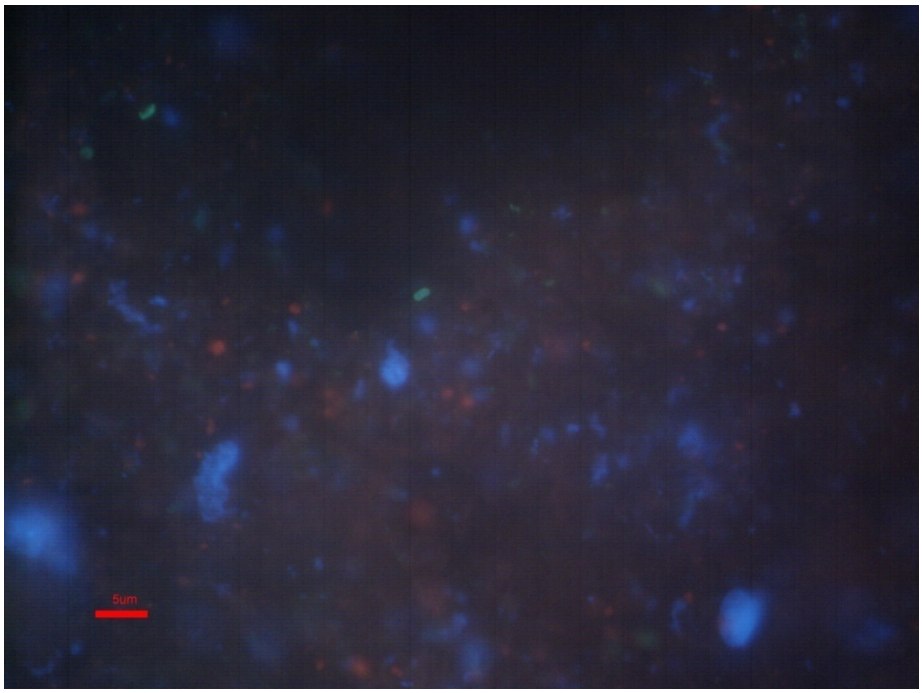
ความรุนแรงระดับที่ 1 หมายถึงเมื่อตรวจด้วยเทคนิค Immunofluorescence แล้ว จะพบการติดเชื้อน้อย กล่าวคือให้ผลบวกต่อการวิเคราะห์ และเมื่อนับจำนวน bradyzoite ที่เรืองแสงใน 10 บริเวณ จะได้จำนวนเฉลี่ยน้อยกว่า 3 ตัว



รูปที่ 4.6 แสดงตัวอย่างที่มีความรุนแรงระดับที่ 3 ของการติดเชื้อปรสิต



รูปที่ 4.7 แสดงตัวอย่างที่มีความรุนแรงระดับที่ 2 ของการติดเชื้อปรสิต



รูปที่ 4.8 แสดงตัวอย่างที่มีความรุนแรงระดับที่ 1 ของการติดเชื้อปรสิต

4.4 ผลการศึกษาด้วยแบบสอบถาม

4.4.1 ประชากรที่ติดเชื้อ หนอนพยาธิใบไม้ตับ *(Opisthorchorchis viverrini)*

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 59 คน ในคำถามว่าทำอาชีพใดบ้าง ซึ่งส่วนมากจะพบอาชีพเกษตรกรรม ร้อยละ 16.5 รองลงมาเป็นอาชีพรับจ้างทั่วไป ร้อยละ 10 ส่วนอาชีพค้าขาย ร้อยละ 1.5 และ อื่นๆ ร้อยละ 1.5 ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงอาชีพประชากร

อาชีพประชาชน แสดงจำนวนและร้อยละ								
รับจ้างทั่วไป	รับราชการ/พนักงานรัฐวิสาหกิจ	นักเรียน/นักศึกษา	ค้าขาย	เกษตรกรรม	อื่น ๆ	ไม่ตอบแบบสอบถาม	รวม	
20	_	_	3	33	3	_	59	จำนวนคน
10	_	_	1.5	16.5	1.5	_	29.5	ร้อยละ

ในการสำรวจด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 59 คน ว่าเคยได้รับการตรวจเชื้อปรสิตมาก่อนหรือไม่ ซึ่งส่วนใหญ่ตอบไม่เคย คิดเป็นร้อยละ 19 รองลงมาก็จะเคยมากว่า 6 เดือน ร้อยละ 8.5 และ เคย น้อยกว่า 6 เดือน ร้อยละ 2 ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงการเข้ารับการตรวจโรคพยาธิ

การเข้ารับการตรวจพยาธิแสดงจำนวนและร้อยละ					
ไม่เคย	เคย น้อยกว่า 6 เดือน	เคย มากกว่า 6 เดือน	ไม่ตอบแบบสอบถาม	รวม	
38	4	17	_	59	จำนวนคน
19	2	8.5	_	29.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 59 คน ในเรื่องของการล้างมือก่อนรับประทานอาหารนั้นพบว่าส่วนมากจะล้างมือทุกครั้ง ร้อยละ 26 ส่วนการล้างมือบางครั้ง ร้อยละ 3.5 ไม่ติดเชื้อหนอนพยาธิ ร้อยละ 9 ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงการล้างมือก่อนรับประทานอาหาร

การล้างมือก่อนรับประทานอาหารแสดงจำนวนและร้อยละ					
ทุกครั้ง	บางครั้ง	ไม่เคย	ไม่ตอบแบบสอบถาม	รวม	
52	7	_	_	59	จำนวนคน
26	3.5	_	_	29.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 59 คน ถึงลักษณะของอาหารที่รับประทาน ซึ่งส่วนมากจะกินอาหารสุกดิบ ร้อยละ 23.5 อาหารสุก ร้อยละ 4.5 และ ไม่ตอบแบบสอบถาม ร้อยละ 1.5 ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงลักษะของอาหารที่รับประทาน

ลักษะของอาหารที่รับประทานแสดงจำนวนและร้อยละ				
อาหารสุกดิบ	อาหารสุก	ไม่ตอบ แบบสอบถาม	รวม	
47	9	3	59	จำนวนคน
23.5	4.5	1.5	29.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 59 คน ในเรื่องของการใส่รองเท้าออกนอกบ้าน ส่วนมากจะทุกครั้ง ร้อยละ 27.5 ส่วนบางครั้ง ร้อยละ 1.5 และ ไม่เคย ร้อยละ 0.5 ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงการตอบสอบถามถึงการใส่รองเท้าเมื่อออกนอกบ้าน

การใส่รองเท้าเมื่อออกนอกบ้านแสดงจำนวนและร้อยละ					
ทุกครั้ง	บางครั้ง	ไม่เคย	ไม่ตอบ แบบสอบถาม	รวม	
55	3	1	_	59	จำนวนคน
27.5	1.5	0.5	_	29.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 59 คน ในเรื่องของการถ่ายอุจจาระนอกบ้านลงพื้นดิน/พื้นหญ้า ส่วนมากจะไม่เคย ร้อยละ 14 ส่วนบางครั้ง ร้อยละ 9 และ ทุกครั้ง ร้อยละ 6.5 ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงการถ่ายอุจจาระนอกบ้านลงพื้นดิน/พื้นหญ้า

การถ่ายอุจจาระนอกบ้านลงพื้นดิน/พื้นหญ้าแสดงจำนวนและร้อยละ					
ทุกครั้ง	บางครั้ง	ไม่เคย	ไม่ตอบแบบสอบถาม	รวม	
13	18	28	_	59	จำนวนคน
6.5	9	14	_	29.5	จำนวนร้อยละ

4.4.2 ประชากรที่ติดเชื้อ หนอนพยาธิสตรองจีลอยด์ (*Strongyloides stercoralis*)

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิสตรองจีลอยด์ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 13 คนในคำถามว่าทำอาชีพใดบ้าง ซึ่งส่วนมากจะพบอาชีพเกษตรกรรม ร้อยละ 5.5 อาชีพรับจ้าง ร้อยละ 0.5 อาชีพค้าขาย ร้อยละ 0.5 ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงอาชีพประชาชน

อาชีพประชาชนแสดงจำนวนและร้อยละ								
รับจ้างทั่วไป	รับราชการ/พนักงานรัฐวิสาหกิจ	นักเรียน/นักศึกษา	ค้าขาย	เกษตรกรรม	อื่น ๆ	ไม่ตอบแบบสอบถาม	รวม	
1	_	_	1	11	_	_	13	จำนวนคน
0.5	_	_	0.5	5.5	_	_	6.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิสตรองจีลอยด์ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 13 คน ว่าเคยได้รับการตรวจเชื้อปรสิตมาก่อนหรือไม่ ซึ่งส่วนใหญ่ตอบไม่เคย คิดเป็นร้อยละ 0.5 เคย น้อยกว่า 6 เดือน คิดเป็นร้อยละ 1.5 ดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงการเข้ารับการตรวจโรคพยาธิ

การเข้ารับการตรวจพยาธิแสดงจำนวนและร้อยละ					
ไม่เคย	เคย น้อยกว่า 6 เดือน	เคย มากกว่า 6 เดือน	ไม่ตอบแบบสอบถาม	รวม	
10	3	_	_	13	จำนวนคน
5	1.5	_	_	6.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิสตรองจีลอยด์ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 13 คน ในเรื่องของการล้างมือก่อนรับประทานอาหารนั้นพบว่าการล้างมือทุกครั้ง ร้อยละ 5.5 บางครั้ง ร้อยละ 1 ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงการล้างมือก่อนรับประทานอาหาร

การล้างมือก่อนรับประทานอาหารแสดงจำนวนและร้อยละ					
ทุกครั้ง	บางครั้ง	ไม่เคย	ไม่ตอบแบบสอบถาม	รวม	
11	2	_	_	13	จำนวนคน
5.5	1	_	_	6.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิสตรองจีลอยด์ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 13 คน ถึงลักษณะของอาหารที่รับประทาน ซึ่งส่วนมากจะกินอาหารสุกดิบ ร้อยละ 6.5 อาหารสุก ร้อยละ 0.5 ไม่ตอบแบบสอบถาม ร้อยละ 1 ดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงลักษะของอาหารที่รับประทาน

ลักษะของอาหารที่รับประทานแสดงจำนวนและร้อยละ				
อาหารสุกดิบ	อาหารสุก	ไม่ตอบ แบบสอบถาม	รวม	
10	1	2	13	จำนวนคน
5	0.5	1	6.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิสตรองจีลอยด์ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 13 คน ในเรื่องของการใส่รองเท้าออกนอกบ้าน ส่วนมากจะทุกครั้ง ร้อยละ 2.5 บางครั้ง ร้อยละ 2.5 ไม่เคย ร้อยละ 1.5 ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 แสดงการตอบสอบถามถึงการใส่รองเท้าเมื่อออกนอกบ้าน

การใส่รองเท้าเมื่อออกนอกบ้านแสดงจำนวนและร้อยละ					
ทุกครั้ง	บางครั้ง	ไม่เคย	ไม่ตอบ แบบสอบถาม	รวม	
5	5	3	_	13	จำนวนคน
2.5	2.5	1.5	_	6.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อหนอนพยาธิสตรองจีลอยด์ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 13 คน ในเรื่องของการถ่ายอุจจาระนอกบ้านลงพื้นดิน/พื้นหญ้า ไม่เคย คิดเป็นร้อยละ 3 บางครั้ง ร้อยละ 2.5 ทุกครั้ง ร้อยละ 1 ดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงการถ่ายอุจจาระนอกบ้านลงพื้นดิน/พื้นหญ้า

การถ่ายอุจจาระนอกบ้านลงพื้นดิน/พื้นหญ้าแสดงจำนวนและร้อยละ					
ทุกครั้ง	บางครั้ง	ไม่เคย	ไม่ตอบแบบสอบถาม	รวม	
2	5	6	_	13	จำนวนคน
1	2.5	3	_	6.5	จำนวนร้อยละ

4.4.3 ประชากรที่ติดเชื้อโปรโตซัว *Sacrocystis* spp.

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถาม สอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อโปรโตซัว *Sacrocystis* spp ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 5 คนในคำถามว่าทำอาชีพใดบ้าง ซึ่งส่วนมากจะพบอาชีพเกษตรกรรม ร้อยละ 2.5 ดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงอาชีพประชาชน

อาชีพประชาชนแสดงจำนวนและร้อยละ								
รับจ้างทั่วไป	รับราชการ/พนักงานรัฐวิสาหกิจ	นักเรียน/นักศึกษา	ค้าขาย	เกษตรกรรม	อื่น ๆ	ไม่ตอบแบบสอบถาม	รวม	
_	_	_	_	5	_	_	5	จำนวนคน
_	_	_	_	2.5	_	_	2.5	ร้อยละ

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถาม สอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อโปรโตซัว *Sacrocystis* spp ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 5 คน ถามถึง ว่าเคยได้รับการตรวจเชื้อปรสิตมาก่อนหรือไม่ ซึ่งส่วนใหญ่ตอบไม่เคย คิดเป็นร้อยละ 1.5 รองลงมาก็จะเคยมากว่า 6 ร้อยละ 1 ดังตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงการเข้ารับการตรวจโรคพยาธิ

การเข้ารับการตรวจพยาธิแสดงจำนวนและร้อยละ					
ไม่เคย	เคย น้อยกว่า 6 เดือน	เคย มากกว่า 6 เดือน	ไม่ตอบแบบสอบถาม	รวม	
3	_	2	_	5	จำนวนคน
1.5	_	1	_	2.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถาม สอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อโปรโตซัว *Sacrocystis* spp ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 5 คน ในเรื่องของการล้างมือก่อนรับประทานอาหารนั้นพบว่าส่วนมากจะล้างมือทุกครั้ง ร้อยละ 2.5 ดังตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงการล้างมือก่อนรับประทานอาหาร

การล้างมือก่อนรับประทานอาหารแสดงจำนวนและร้อยละ					
ทุกครั้ง	บางครั้ง	ไม่เคย	ไม่ตอบแบบสอบถาม	รวม	
5	_	_	_	5	จำนวนคน
2.5	_	_	_	2.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถาม สอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อโปรโตซัว *Sacrocystis* spp ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 5 คน ถึงลักษณะของอาหารที่รับประทาน ซึ่งส่วนมากจะกินอาหารสุกดิบ ร้อยละ 2.5 ดังตารางที่ 4.19

ตารางที่ 4.19 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงลักษะของอาหารที่รับประทาน

ลักษะของอาหารที่รับประทานแสดงจำนวนและร้อยละ				
อาหารสุกดิบ	อาหารสุก	ไม่ตอบ แบบสอบถาม	รวม	
_	5	_	5	จำนวนคน
_	2.5	_	2.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถาม สอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อโปรโตซัว *Sacrocystis* spp ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 5 คน ในเรื่องของการใส่รองเท้าออกนอกบ้าน ส่วนมากจะทุกครั้ง ร้อยละ 2.5 ดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 แสดงการตอบสอบถามถึงการใส่รองเท้าเมื่อออกนอกบ้าน

การใส่รองเท้าเมื่อออกนอกบ้านแสดงจำนวนและร้อยละ					
ทุกครั้ง	บางครั้ง	ไม่เคย	ไม่ตอบ แบบสอบถาม	รวม	
5	_	_	_	5	จำนวนคน
2.5	_	_	_	2.5	จำนวนร้อยละ

ในการสำรวจประชากรด้วยแบบสอบถาม สอบถามผู้ที่เข้ารับการตรวจแล้วพบการติดเชื้อโปรโตซัว *Sacrocystis* spp ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 5 คน ในเรื่องของการถ่ายอุจจาระนอกบ้านลงพื้นดิน/พื้นหญ้า ส่วนมากจะไม่เคย ร้อยละ 2 ส่วนบางครั้ง. ร้อยละ 0.5 ดังตารางที่ 4.21

ตารางที่ 4.21 แสดงการตอบแบบสอบถามถึงการถ่ายอุจจาระนอกบ้านลงพื้นดิน/พื้นหญ้า

การถ่ายอุจจาระนอกบ้านลงพื้นดิน/พื้นหญ้าแสดงจำนวนและร้อยละ					
ทุกครั้ง	บางครั้ง	ไม่เคย	ไม่ตอบ แบบสอบถาม	รวม	
_	1	4	_	5	จำนวนคน
_	0.5	2	_	2.5	จำนวนร้อยละ

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาได้สุ่มตัวอย่างประชาชนในพื้นที่อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี มา 200 ราย โดยแบ่งออกเป็นหมู่บ้านห้วยเป้า 35 คน หมู่บ้านบึงเจริญ 50 คน หมู่บ้านใหม่สามัคคี 55 คน หมู่บ้าน โป่งสามสิบ 60 คน หมู่บ้านตัวอย่างทั้งหมดติดเชื้อปรสิต 75 คนคิดเป็นร้อยละ 37.5 และนำมาตรวจอุจจาระด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique พบพยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*) ร้อยละ 29.5 ซึ่งเป็นการพบในอัตราที่ค่อนข้างสูงเมื่อกับการศึกษาก่อนหน้าเช่นจากแผนพัฒนาสาธารณสุขแห่งชาติฉบับที่ 9 พ.ศ. 2545-2549 พบว่านี้ พบพยาธิใบไม้ตับ ร้อยละ 9.6 และจากรายงานสาธารณสุขจังหวัดเลยในปี 2547 พบความชุกการติดเชื้อปรสิตในเด็กนักเรียน ร้อยละ 5.34 โดยพบพยาธิใบไม้ตับ ร้อยละ1.86 และส่วนพยาธิสตรองจีลอยด์ *(S. stercoralis)* ร้อยละ 6.5 พบความชุกที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าเคยมีการรายงาน พบพยาธิสตรองจีลอยด์ ร้อยละ 1.1 ที่ อ.ท่าลี่ จ. เลย (Sirima et al.,2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจอุจาระเด็กนักเรียนในภาคใต้ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช พบความชุก ร้อยละ 1.8 เมื่อปี พ.ศ 2546 (Anatapruti et al., 2003) และจากแบบสอบถามพบว่าประชากรส่วนใหญ่มีอาชีพเป็นเกษตรกร จากแบบสอบถามพบว่าประชากรมีพฤติกรรมการรัยประทานอาหารสุกๆดิบๆเช่น ลาบปลา, ก้อยปลา ส่วนการเข้ารับการตรวจโรคพยาธิ การล้างมือก่อนรับประทานอาหาร การใส่รองเท้าออกนอกบ้าน การขับถ่ายอุจจาระลงในส้วม ไม่พบความพันธ์ที่ชัดเจนของการติดเชื้อปรสิต และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการตรวจอุจาระด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique เหมาะสำหรับการตรวจเชื้อ *O. viverri*ni, *E. coli* และ *Sacrocystis* spp. ส่วนวิธีการตรวจอุจาระด้วยวิธี Agar Plate Culture technique เหมาะสำหรับการตรวจเชื้อสตรองจีลอยด์ *(S. stercoralis)* ส่วนการตรวจหาเชื้อ *Sacrocystis* spp. จากอุจจาระด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique ในการศึกษาครั้งนี้พบผู้ติดเชื้อจำนวน 5 คน คิดเป็นร้อยละ 2.5 คล้ายกับการศึกษาที่ผ่านมาโดยอัตราการติดเชื้อพบตั้งแต่ร้อยละ 1.10-23.30 (Ektasaeng et al., 1987; Muangyimpong et. al., 1993 ; Tungtrongchitr et al., 2007; Wilairatana et al., 1996)

จากการศึกษาเพื่อตรวจหาเชื้อ *Sarcocystis* spp. จากตัวอย่างเลือดคน โดยใช้เทคนิค Semi-Nested PCR ซึ่งเป็นการประยุกต์วิธีการตรวจโดยใช้ ระยะ cyst ของ *Sarcocystis hominis* จากเนื้อวัว (Zheng et.al,2009) ซึ่งอาศัยหลักการของการทำ PCR โดยอาศัย PCR 2 ขั้นตอนด้วย Primer 2 คู่ โดยคู่แรก (2L+2H) จะใช้ในตอน PCR ขั้นตอนแรก หลังจากนั้นนำเอาผลผลิตของ PCR ขั้นตอนแรก ไปทำPCR

ขั้นตอนที่สอง โดยใช้ Primer คู่ที่ 2 (ซึ่งจะใช้ Primer ตัวเดิม (2L) 1 ตัว และ Primer ตัวใหม่ (3H) 1 ตัว) นั่นคือ (2L+3H) ไปใช้ในตอน PCR ขั้นตอนที่สอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายนั้นๆ ซึ่งตัวอย่างเลือด ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้มาจากประชากรในพื้นที่อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี จำนวนรวมทั้งหมด 200 ตัวอย่างพบว่ามีแถบ DNA ปรากฏจำนวน 5 คน คิดเป็นร้อยละ 2.5 โดยทั้งหมด 5 คนนี้ให้ผลการตรวจอุจจาระพบว่าติดเชื้อ *Sacrocystis* spp. ด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่คล้ายกัน (Zheng et.al,2009) ซึ่งรายงานว่า DNA ที่มีขนาด 847 bp. เป็นขนาดแถบ DNA ของเชื้อ *Sarcocystis hominis* อย่างไรก็ตามเพื่อความแน่นอน เพื่อใช้ในการยืนยันผลการศึกษาในครั้งนี้จึงควรจะทำการส่งแถบ DNA ไปทำการSequening gene เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องแม่นยำและน่าเชื่อถือมาก

จากการศึกษาเพื่อตรวจหาผู้ติดเชื้อ *Sarcocystis* spp. จากตัวอย่างเซรั่มคน โดยใช้เทคนิค Immunofluorescence ซึ่งอาศัยหลักการของการจับกันอย่างจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยจะใช้แอนติบอดีสองตัว ซึ่งแอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) จะมีความจำเพาะต่อแอนติเจน ส่วนแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) จะมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตัวแรก แต่ไม่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน การตรวจจะวัดจากการทำปฏิกิริยาของสารเคมีซึ่งติดฉลากอยู่ที่แอนติบอดีตัวที่สอง ซึ่งตัวอย่างเซรั่มที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้มาจากประชากรในพื้นที่อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี จำนวนทั้งหมด 200 ตัวอย่าง แล้วนำมาตรวจด้วยเทคนิค Immunofluorescence พบว่ามีผู้ติดเชื้อ *Sarcocystis* spp. ทั้งหมด 30 คน คิดเป็นร้อยละ 15 โดยที่ระดับความรุนแรง 3 (+++), ระดับความรุนแรง 2 (++) และระดับความรุนแรง 1 (+) มีจำนวนผู้ติดเชื้อ 5, 16 และ 9 คน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการตรวจด้วยเทคนิค Immunofluorescence กับการตรวจด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique ซึ่งเป็นวิธีตรวจเบื้องต้นที่ใช้กันในปัจจุบัน พบว่าการตรวจด้วยเทคนิค Immunofluorescence จะมีความไวมากกว่า สามารถตรวจได้ครั้งละหลายตัวอย่าง และมีความจำเพาะมากกว่า เนื่องจากใช้หลักการการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี ส่วนการตรวจอุจจาระด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique ต้องอาศัยผู้ชำนาญในการตรวจ เพราะระยะซีสต์ของเชื้อมีขนาดค่อนข้างเล็ก และในจำนวน 5 คนที่ติดเชื้อ *Sacrocystis* spp. ในอจจาระด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique นั้นให้ผลการตรวจ Immunofluorescence ระดับความรุนแรง 3 ทั้งหมด ส่วนวิธีการตรวจจากเลือดด้วยเทคนิค Semi-

Nested PCR นั้นอาจเป็นเพราะเชื้อปรสิตนี้มีวงจรชีวิตที่ซับซ้อนและมีช่วงที่อยู่ในกระแสเลือดช่วงสั้นๆจึงอาจทำให้ผลการตรวจได้เฉพาะในรายที่มีการติดเชื้อที่รุนแรง อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Sacrocystis* spp. จากเลือดคนได้ ทั้งเทคนิค Semi-Nested PCRและเทคนิค Immunofluorescence

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

6.1 ผลการตรวจเชื้อปรสิตในอุจาระด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique และ วิธี Agar Plate Culture technique

จากการที่ได้ทำการสำรวจความชุกของโรคติดเชื้อปรสิตในตำบลระบำ อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี โดยใช้วิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique และ วิธี Agar Plate Culture technique ซึ่งทำการสำรวจข้อมูลและเก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคม 2553 โดยตรวจจากอุจจาระจากกลุ่มตัวอย่าง 200 ราย ด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate concentration technique พบการติดเชื้อปรสิตทั้งหมดจำนวน 75 คน คิดเป็นร้อยละ 37.5 จำแนกได้เป็น พยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*) จำนวน 59 คน คิดเป็นร้อยละ 29.5 พยาธิสตรองจีลอยด์ *(S. stercoralis*) จำนวน 1 คน คิดเป็นร้อยละ 0.5 เชื้อโปรโตซัว *E. coli* จำนวน 10 คน คิดเป็น ร้อยละ 5 เชื้อ *Sacrocystis* spp. จำนวน 5 คน คิดเป็นร้อยละ 2.5 ส่วนวิธี Agar Plate Culture technique พบเป็นการติดเชื้อพยาธิสตรองจีลอยด์ทั้งหมดจำนวน 12 คน คิดเป็นร้อยละ 6 และจากแบบสอบถามพบว่าประชากรส่วนใหญ่มีอาชีพเป็นเกษตรกร จากแบบสอบถามพบว่าประชากรมีพฤติกรรมการรับประทานอาหารสุกๆดิบๆเช่น ลาบปลา, ก้อยปลา ส่วนการเข้ารับการตรวจโรคพยาธิ การล้างมือก่อนรับประทานอาหาร การใส่รองเท้าออกนอกบ้าน การขับถ่ายอุจจาระลงในส้วม ไม่พบความพันธ์ที่ชัดเจนของการติดเชื้อปรสิต

6.2 ผลการตรวจเลือดด้วยวิธี Semi-Nested PCR

จากการตรวจเลือดของประชากรที่สุ่มเก็บจาก อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี โดยใช้เทคนิค Semi-Nested PCR (Polymerase Chain reaction) พบว่ามีแถบ DNA ปรากฏจำนวน 5 แถบจากตัวอย่างเลือดทั้งหมด 200 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.5 โดยแถบของ DNA ทั้ง 5 แถบ มีขนาด 847 bp. ซึ่งมีขนาดเท่ากับ DNA ของเชื้อ *Sarcocystis hominis*

6.3 ผลการตรวจเลือดด้วยวิธี Indirect fluorescent antibody test (IFAT)

จากการตรวจเลือดเซรั่มของประชากร ที่สุ่มเก็บจากอำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี โดยใช้เทคนิค immunofluoresence พบว่ามีผู้ติดเชื้อปรสิตจำนวน 30 คน จากทั้งหมด 200 คน คิดเป็นร้อยละ 15 แบ่งเป็นผู้ที่ติดเชื้อระดับความรุนแรง 3 (+++) จำนวน 5 คน, ระดับความรุนแรง 2 (++) จำนวน 16 คน และระดับความรุนแรง 1 (+) จำนวน 9 คน ตามลำดับ

บทที่ 7

เอกสารอ้างอิง

1. ชูเกียรติ ศิริวิชยกุล ศรชัย หลูอารีย์สุวรรณ และ ประยงค์ ระดมยศ (2549) *ตำราปรสิตวิทยาทางการแพทย์* พิมพ์ ครั้งที่ 2 กรุงเทพมหานคร : เมดิคัล มีเดีย

2. ดาราวรรณ วนะชิวนาวิน (2538) โปรโตซัวทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: เรือนแก้วการพิมพ์

3. นิมิตร มรกต (2546) *ปรสิตวิทยาทางการแพทย์ (โปรโตวัวและหนอนพยาธิ)* พิมพ์ครั้งที่ 2 โครงการตำราคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. นิมิตร มรกต, เกตรัตน์ สุขวัจน์ (2539) ปรสิตวิทยาทางการแพทย์ โปรโตซัวและหนอนพยาธิ.พิมพ์ครั้งที่ 2.เชียงใหม่คณะแพทย์ศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5. *สถาพร* จิตตปาลพงศ์ บทความ Toxoplasmosis "โรคที่อยู่ในวิถีชีวิตของคนไทย" ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ *http//: www.vet.ku.ac.th*

6. วิพิชญ์ ไชยศรีสงคราม (2516) โรคสัตว์ที่ตรวจพบในโรงฆ่าสัตว์.สัตวแพทยสาร ,2,52-55.

7. Bever, PC., Gadgil RK., Morera P. (1979). *Sarcocystis* in man: A review and report of five cases. *Am J Trop Med Hyg*, 28, 819-844.

8. Bever, PC., Jung RC., Cupp EW. (1984). *Clinical parasitology* (9 th ed) Philadelphia: Lea&Febiger.

9. Bretágne S, Costa JM, Vidaud M, Van Nhieu JT, Fleury-Feith J. (1993). Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. *J Infect Dis,168*,1585–1588.

10. Danseekaew, W., Maleewong, W., Kaewkes, S. (1990). Prevalence of *Sarcocystis* infection in cattle in Khon Kaen Province , Thailand*. Journal Trop Med Parasitol, 13,* 47-49.

11. Dubey JP, Beattie CP. (1988). Toxoplasmosis in cattle. Toxoplasmosis of animals and man. *CRC Press,* Boca Ratón, FL, pp 107–115**.**

12. Dubey JP, Schares G. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol, 141*,1–34**.**

13. Ektasaeng, U., Bhaibulaya, M., Suwankul, S., Koewmanee, S., Bhandhuprapas, P. (1987). Incidence of intestinal parasitic infections in some provinces in the northeast, central and north of Thailand. *Journal Parasit Trop Med Assoc Thai, 10*, 15-27.

14. Fayer, R. (2004). *Sarcocystis* spp. in human infections*. Clinical Microbiology Reviews, Oct, 17*, 894-902.

15. Gondim LF, Sartor IF, Hasegawa M, Yamane I. (1999). Seroprevalence of Neospora caninum in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet Parasitol,86*,71-75.

16. Gutierrez, Y. (2000). *Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations* (2 nd ed.). New York Oxford : Oxford University Press.

17. http://www.simedbull.com/content.php?content_id

18. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nested_PCR.png

19. http://dpd.cdc.gov/dpdx/html/Sarcocystosis.htm

20.http://www.e-cleansing.com/parasites/sarcocystis-hominis-2.html

21.http://instruction.cvhs.okstate.edu/jcfox/htdocs/DISK1/IMAGES/sarcotrophs.JPG

22.http://www.atlas-protozoa.com/gallery.php?SOT_CAP=SARCO

23. Ho MS, Barr BC, Rowe JD, Anderson ML, Sverlow KW, Packham A, Marsh AE, Conrad PA. (1997). Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *J Parasitol, 83*,508–514.

24. Kaufmann H, Yamage M, Roditi I, Dobbelaere D, Dubey JP, Holmdahl OJ, Trees A, Gottstein B. (1996). Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol Cell Probes*, 10,289–297.

25.Keittivutti A , Keittivutti B, Sapuarum T. (1985). A survey of prevalence of *Sarcocystis* spp. Infection from swine from markets in Bangkok. J Parastiol Trop Med Assoc Thai, 8:18-19.

26. Li, JH., Lin, Z., Du, JF., Qin, YX. (2007). Experimental infection of *Sarcocystis suihominis* in pig and human volunteer in Guangxi. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, Dec, 25*, 66-68.

27. Moré G, Basso W, Bacigalupe D, Venturini MC, Venturini L. (2008.) Diagnosis of Sarcocystis cruzi, Neospora caninum, and Toxoplasma gondii infections in cattle. *Parasitol Res,102*,671-675.

28. Muangyai, M., Chalermchaikit, T. (1988). *Sarcocystis* in Thailand. The incidence of *Sarcocystis* in cattle and buffaloes. *Thai Journal Vet Med, 18*, 319-328.

29. Muangyimpong, Y., Piangjai, S., Arthansri, P., Tipawangkosol, P., Choochote, W. (1993). Prevalence of *Sarcocystis* infection in primary school childrean in Chiangwat Chiang Mai, Northern Thailand. *Journal Trop Med Parasitol, 16,* 22-24.

30. Müller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. (1996). Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J Clin Microbiol 34,*2850–2852**.**

31. Pan-In, S., Muangyimpong, Y., Arthansri, P., Choochote, W. (1991). Prevalence of *Sarcocystis* and *cysticercus* infections in cattle in Chiang Mai Province, Northern Thailand. *Journal Trop Med Parasitol, 14*, 57-61.

32. Roberts, L. S. & Janovy, J.R. (2005). *Foundations of Parasitology* (7 th ed.). Boston: Mc Graw Hill Higher Education.

33. Rommel M, Heydorn AO. (1972). *Isospora hominis* (Railliet und Lucet , 1981) Wenyon, 1928, eine Dauer form der Sarkosporidien des Rindes und des Schweins. Berl Munch Tierarztl Wachr, 85:143-145.

34. Sirima K, Pochong R. (2007) Helminth lnfections in some Areas of Thailand where Strongyloides is Prevalent. *Southeast Asian Journal Trop Med Public Health,38*, 250-255.

35. Tungtrongchitr, A., Chiworaporn, C., Praewanich, R., Radomyos, P., Boitano, JJ. (2007). The potential usefulness of the modified Kato thick smear technique in the detection of intestinal sarcocystosis during field surveys. *Southeast Asian Journal Trop Med Public Health, Mar, 38*, 232-238.

36. Wilairatana, P., Radomyos, P., Radomyos, E. (1996). Intestinal sarcocystosis in Thai labourers. *Southeast Asian Journal Trop Med Public Health, 27,* 43-46.

37.Xiang Z, Chen X, Yang L, He Y, Jiang R, Rosenthal BM. (2009) Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis* spp. from definitive hosts. Parasitol Int, 58(3):293-96.

38. Yamage M, Flechtner O, Gottstein B. (1996). *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J Parasitol, 82*, 272–279.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. เตรียมสาร 0.85% Normal saline

   - ใช้ Normal saline 8.5 กรัม น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

2. Rapid DMSO Modified Acid-Fast stain

   - ส่วนประกอบของสีย้อม

A. Carbol Fuchsin DMSO stain 4.0 g

Basic fuchsin crystals 25.0 ml

Ethyl alcohol 12.0 g

Phenol crystal (แช่ในน้ำอุ่นให้ละลายก่อนใช้ผสม ผสมสารทั้ง 3 ให้เข้ากันดีแล้วเติมสารละลายต่อไปนี้)

Glycerol 25.0 ml

DMSO (Dimethyl sulfoxide) 25.0 ml

น้ำกลั่น 75.0 ml

กวนสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที กรองใส่ขวดสีชาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

B. Decolourizer-counterstain

Malachite green 2% 220.0 ml

Glacial actic acid 30.0 ml

ผสมให้เข้ากันดี เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. วิธีเตรียม Agar plate culture technique

- Nutrient agar
- Beef extract 3 g
- Peptone 5 g
- Agar 15 g
- Distill water 1,000 cc / ml

4. TE buffer, pH 8.0

2M Tris-HCL pH 8	5 ml.
0.5M EDTA pH 8	2 ml.
Add distilled water to a final volume of	1000 ml.

5. 1.2 % agarose gel

Agarose powder	1.2 g
Add TBE buffer, pH 8.0 to final volume of	1000 ml.

6. 1X TBE Buffer

10X TBE buffer	50 ml.
Add distilled water to a final volume of	450 ml.

ภาคผนวก ข

แบบสอบถาม

ชื่อ-สกุล ผู้ให้สัมภาษณ์ .....

อายุ.....เพศ.....ศาสนา.....สัญชาติ.....

น้ำหนัก.....กิโลกรัม ส่วนสูง.....เซนติเมตร

ที่อยู่(ภูมิลำเนาเดิม).....

ประวัติการเจ็บป่วย.....

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

1.1 การศึกษา

( ) ไม่ได้เรียน ( ) ประถมศึกษา ( ) มัธยมศึกษา

( ) ปวช-ปวส. ( ) ปริญญาตรี ( ) อื่นๆระบุ.....

1.2 อาชีพ

( ) รับจ้างทั่วไป ( ) รับราชการ /พนักงานรัฐวิสาหกิจ ( ) นักเรียน/นักศึกษา

( ) ค้าขาย ( ) เกษตรกรรม ( ) อื่นๆระบุ

1.3 รายได้ต่อเดือน

( ) ต่ำกว่า 5,000 บาท ( ) 5,000 - 10,000 บาท

( ) 10,000-15,000 ( ) มากกว่า 15,000 บาท

ส่วนที่ 2 ประวัติการเคยรักษาโรคพยาธิ

2.1 เคยได้รับการตรวจพยาธิมาก่อนหรือไม่

( ) เคยน้อยกว่า 6 เดือน ( ) เคยมากกว่า 6 เดือน ( ) ไม่เคย

(ถ้าไม่เคยตรวจโรคพยาธิให้ข้ามไปทำข้อ 2.4)

2.2 ท่านเป็นโรคพยาธิชนิดใด

( ) ไม่เป็น ( ) เป็นระบุ.....

2.3 ท่านได้รับยาในการรักษาพยาธิชนิดใด (ตอบได้มากกว่า 1 คำตอบ)

( ) พยาธิตัวกลม ( ) พยาธิตัวแบน

2.4 ท่านเคยกินยาถ่ายพยาธิชนิดใดมาก่อนในรอบ 6 เดือน (ตอบได้มากกว่า 1 คำตอบ)

( ) พยาธิตัวกลม ( ) พยาธิตัวแบน

ส่วนที่ 3 สุขภาพ อนามัย การปฏิบัติตน

3.1 ท่านล้างมือก่อนรับประทานอาหารหรือไม่

( ) ทุกครั้ง ( ) บางครั้ง ( ) ไม่เคย

3.2 ท่านใช้ช้อนในการรับประทานอาหารหรือไม่

( ) ทุกครั้ง ( ) บางครั้ง ( ) ไม่เคย

3.3 ลักษณะของอาหารที่รับประทาน(ตอบได้มากกว่า 1 คำตอบ)

( ) อาหารดิบ ( ) อาหารสุกๆดิบๆ ( ) อาหารสุก

3.4 ท่านบริโภคน้ำดื่มจากแหล่งใด(ตอบได้มากกว่า 1 คำตอบ)

( ) น้ำประปา ( ) น้ำบาดาล ( ) น้ำฝน น้ำต้มสุก ( ) น้ำดื่มสำเร็จรูป

3.5 หลังจากการถ่ายอุจจาระ ก่อนออจากห้องน้ำ ท่านล้างมือหรือไม่

( ) ทุกครั้ง ( ) บางครั้ง ( ) ไม่เคย

3.6 ทุกครั้งที่ออกนอกบ้านท่านสวมรองเท้าหรือไม่

( ) ทุกครั้ง ( ) บางครั้ง ( ) ไม่เคย

3.7 ท่านเคยถ่ายอุจจาระนอกบ้านลงพื้นดิน/พื้นหญ้า หรือไม้

( ) ทุกครั้ง ( ) บางครั้ง ( ) ไม่เคย

3.8 ท่านเคยมีอาการท้องร่วงนานติดต่อกัน 1-2 สัปดาห์หรือไม่

( ) เคย ( ) ไม่เคย

3.9 ที่บ้านของท่านเลี้ยงสัตว์หรือไม่

( ) เลี้ยง ( ) สุนัข ( ) แมว ( ) อื่นๆระบุ.....

( ) ไม่ได้เลี้ยงสัตว์

ส่วนที่ 4 สภาพแวดล้อมรอบๆ ตัวท่าน

4.1 ลักษณะของบ้าน

( ) ตึกแถว ( ) บ้านเดี่ยวปูน ( ) บ้านไม้

4.2 สิ่งแวดล้อมรอบๆบ้าน

( ) ติดริมน้ำ ( ) ติดโรงเลี้ยงสัตว์ ( ) ติดสวน/ไร่/นา/ป่าไม้

4.3 สถานที่ในการรับประทานอาหาร

( ) โต๊ะอาหาร ( ) พื้น

ภาคผนวก ค

การเผยแพร่ผลการวิจัย

1. **Molee W P,** Aunsalee S, Sakulsak N. Prevalence of parasitic infection of the population in Amphoe Lan Sak, Uthaithani Province. Proceeding of the international conference on Sciences and social sciences: Rajabhat Maha Sarakham University, Maha Sarakham, Thailand 2011, 21-22 July: 1180-1184.
2. **Molee W P,** Aunsalee S, Sakulsak N. High prevalence of *Opisthorchis viverrini* in Lan Sak, Uthaithani Province, Thailand. Poster presentation of the international congress of liver flukes, Khon Kaen, ThaiLand. 2011, 7-8 March: 123.