

บทคัดย่อ

Blastocystis sp. เป็น โปรโตซัวในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ที่พบได้ทั่วโลก การติดเชื้ออาจทำให้เกิดอาการทางระบบทางเดินอาหารที่หลากหลาย ผู้ติดเชื้อส่วนมากไม่ปรากฏอาการของโรค จากการศึกษาที่โปรโตซัวชนิดนี้ไม่ก่อให้เกิดอาการร้ายแรงในผู้ติดเชื้อ ทำให้เป็นที่ละเลยของผู้ติดเชื้อในการรับการรักษาที่ถูกต้อง ซึ่งสอดคล้องกับได้มีรายงานการตรวจพบผู้ติดเชื้อ *Blastocystis* sp. มากขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบันนี้ จึงอาจมีความเป็นไปได้ว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อ *Blastocystis* sp. ออกไปอย่างรวดเร็ว การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาชนิดย่อยของเชื้อเพื่อศึกษาการระบาดของเชื้อที่คือยาในประเทศไทยต่อไป โดยได้ทำการสำรวจผู้เก็บอุจจาระจากนักเรียนทั้งหมด 1,909 ราย ใน 7 จังหวัดใน 6 ภาคของประเทศไทย จากนั้นตรวจวินิจฉัยโรคปรสิตในลำไส้ ด้วยวิธี simple smear วิธี formalin ethyl-acetate concentration วิธี Boeck and Drbohlav's Locke-Egg-Serum (LES) medium culture และวิธี Harada mori culture พบผู้ติดเชื้อปรสิตในลำไส้ทั้งสิ้นจำนวน 713 ราย (37.3%) โดยปรสิตที่มีอัตราการความชุกสูงที่สุดคือ *Blastocystis* sp. (33.1%) นอกจากนี้ ยังพบว่าอัตราการติดเชื้อปรสิตในแต่ละภาคยังแตกต่างกันไป อาจเนื่องมาจากลักษณะภูมิประเทศ นิเวศน์วิทยา สุขลักษณะ วัฒนธรรม รวมถึงปัจจัยสังคมและเศรษฐกิจ วิธีการวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการสำรวจโรคปรสิตในลำไส้ การศึกษานี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบความไวในการวินิจฉัยโรคโปรโตซัวด้วยวิธี simple smear วิธี formalin ethyl-acetate concentration และวิธี LES culture พบว่าวิธี LES medium culture ให้ผลการวินิจฉัยดีที่สุด (83.1%) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจด้วยวิธี concentration (27.9%) และวิธี simple smear (29.0%) โดยมีผู้ติดเชื้อถึง 53.6% สามารถตรวจวินิจฉัยได้โดยวิธี LES medium culture เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าการวินิจฉัยด้วยวิธี simple smear ไม่เพียงพอต่อการตรวจคัดกรองการติดเชื้อโปรโตซัวในลำไส้ นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้พัฒนาวิธีการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยการเพิ่มจำนวนส่วนของยีน small-subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัยโรคได้ (20.6%) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจด้วยวิธี simple smear (2.7%) และวิธี concentration (5.7%) เพื่อพัฒนาสายพันธุ์คือยาของ *Blastocystis* sp. ในห้องปฏิบัติการ ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยา metronidazole ของ *Blastocystis* sp. โดยเปรียบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ Jones's medium (JM), Locke egg serum medium (LES), LB Broth, IMDM, และ RPMI โดยพบว่าเชื้อเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุดใน LES medium แต่ทำให้เชื้อเกาะกลุ่มกันจนไม่สามารถนับจำนวนได้จึงไม่เหมาะสมกับการทดสอบความไวต่อยา ส่วน RPMI เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการทดสอบความไวของยามากที่สุด จากนั้นผู้วิจัยได้คัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการคือของยา ได้แก่ ยีน ferredoxin (Fd) และได้ทำการออกแบบ primer จากยีน โนมของ *Blastocystis* sp. Singapore isolate B (subtype 7) อย่างไรก็ตาม เมื่อได้ทำการเพิ่มจำนวนยีน ferredoxin และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Fd ที่ได้กับฐานข้อมูล กลับมีความเหมือนกับแบคทีเรีย *Prevotella dentalis* มากที่สุด (74% identity) และไม่ตรงกับลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน ferredoxin ของ *B.hominis* Singapore isolate B (subtype 7) เลย ซึ่งน่าจะเกิดจากความแตกต่างของยีน โนมของเชื้อ *Blastocystis* sp. ที่อยู่ในฐานข้อมูลมีความแตกต่างทางสายพันธุ์กับเชื้อที่พบในไทย ซึ่งจากการศึกษาการกระจายของสายพันธุ์ของเชื้อในประเทศไทยพบว่าสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยคือสายพันธุ์ 3 ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแผนการศึกษา โนมของสายพันธุ์ *Blastocystis* subtype 3 ต่อไป

Abstract

Blastocystis sp. is one of the most common intestinal protozoa of human and animals worldwide. The infections can cause various gastrointestinal symptoms. *Blastocystis* sp. has been found in asymptomatic, acute symptomatic and chronic symptomatic individuals. Because *Blastocystis* infections do not cause serious symptoms, the appropriate treatments are usually ignored resulting in the parasite spread and drug resistance. This study aimed to determine the drug resistance genes of the *Blastocystis* sp. In this study, we studied intestinal parasitic infections among 1,909 school students in 16 schools in 7 provinces in 6 regions of Thailand, including Ang Thong, Nakhonratchasima, Khonkaen, Nan, Chonburi, Kanchanaburi and Pathalung which is located in the Central, Northeastern, Northern, Eastern, Western, and Southern of Thailand. Our study showed that 37.3% of the student harbored at least one intestinal parasite. The most common parasites found in this study were *Blastocystis* sp. (33.1%). Effective diagnosis aids a better surveillance of the intestinal parasitic infections. The highest sensitivity for the detection of protozoa increases by LES medium culture (83.1%), compared to formalin-ether acetate concentration (27.9%) and simple smear (28.9%) technique. Our results showed that 53.6% of the protozoan-infected patients were diagnosed only by the LES medium culture, but not by the simple smear and concentration techniques. Our data suggest that the simple smear technique is insufficiently sensitive to be used alone for screening parasites. We also developed Polymerase chain reaction (PCR) of small-subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) for *Blasocystis* diagnosis. We found that PCR method could increase the sensitivity (20.6%) for diagnosis of *Blasocystis* infection compared to the simple smear (2.7%) and concentration technique (5.7%). We developed the culture system that suitable for metronidazole susceptibility testing for *Blastocystis*. We found that *Blastocystis* grow best in LES medium, but protozoa precipitation was found in this medium. Therefore, LES was not suitable for drug susceptibility test. RPMI was the suitable medium for metronidazole susceptibility testing for *Blastocystis*. Moreover, we selected ferredoxin (Fd) as the candidate gene for the metronidazole resistance gene study. Based on the available *Blastocystis* genome database, we designed primers and amplified Fd gene from DNA extracted from *Blastocystis* we collected from patient. DNA sequencing was performed. Unfortunately, the nucleotide sequence of Fd gene was similar to *Prevotella dentalis* bacteria (74% identity), but not similar to *Blastocystis* in database. This may be due to the difference of the *Blastocystis* genome. The available *Blastocystis* genome are *B.hominis* Singapore isolate B (subtype 7), while the *Blastocystis* subtype found in Thailand was subtype 3. Further studies are undertaken in the study of the genome of *Blastocystis* Thai isolate (subtype 3).