

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การตรวจหายีนดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis hominis*
(Detection of metronidazole resistance genes of *Blastocystis hominis*)

ทุนอุดหนุนการวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปี 2557

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง สุรางค์ นุชประยูร
อาจารย์ ดร. วิวรรณ สรรประเสริฐ

หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง และ โรคเขตร้อน
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี งบประมาณ 2557 ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการ และครูนักเรียน โรงเรียนต่างๆ ที่อนุญาตให้ผู้วิจัย ดำเนินการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากเด็กนักเรียน และขอขอบคุณ นางสาวอุทัยทิพย์ บุญเกษม นางสาว สิริพร ศรีรุ่งเรือง นางสาวรุ่งฟ้า บุญเสริม นางสาวนิตยา ศรีไชยพล นางสาวราตรี ชูอ่อน นางสาว ปณิตดา จินต๊ะน้อย นางสาวนฤมล ชัยพัฒน์ นางสาววรรณนา ชูศรีจันทร์ นางสาวอุทัยรัตน์เกิดแก้ว เจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัย โรคเท้าช้างและโรคเขตร้อน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างภาคสนามและการตรวจ วิจัยในห้องปฏิบัติการ

บทคัดย่อ

Blastocystis sp. เป็น โปรโตซัวในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ที่พบได้ทั่วโลก การติดเชื้ออาจทำให้เกิดอาการทางระบบทางเดินอาหารที่หลากหลาย ผู้ติดเชื้อส่วนมากไม่ปรากฏอาการของโรค จากการศึกษาโปรโตซัวชนิดนี้ไม่ก่อให้เกิดอาการร้ายแรงในผู้ติดเชื้อ 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 รวมถึง ปัจจัยสังคมและเศรษฐกิจ 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).

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	8
บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	9
วัตถุประสงค์	10
ขอบเขตการวิจัย	11
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	11
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	12
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	16
วิธีดำเนินการวิจัย	
รูปแบบการวิจัย	17
การกำหนดพื้นที่ และ ประชากรเป้าหมาย	17
วัตถุประสงค์อย่างในการวิจัย	19
สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	19
ขั้นตอนการดำเนินงาน	20
ผลการวิจัย	22
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	56
บรรณานุกรม	60
ประวัตินักวิจัยและคณะ	65

สารบัญตาราง

		หน้า
<u>ตารางที่ 1</u>	ความชุกของการติดเชื้อปรสิตในกลุ่มนักเรียน โดยแยกตามเพศและอายุ	21
<u>ตารางที่ 2</u>	ความชุกของการติดเชื้อปรสิตของนักเรียน จำแนกตามชนิดของเชื้อในแต่ละจังหวัด	22
<u>ตารางที่ 3</u>	ลักษณะการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อปรสิตในนักเรียนจำนวน 1,909 ราย จำแนกด้วยการตรวจวินิจฉัยทางปรสิตวิทยา	23
<u>ตารางที่ 4</u>	การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อโปรโตซัว	24
<u>ตารางที่ 5</u>	การเปรียบเทียบความไวในการวินิจฉัยการติดเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. ด้วยวิธี Simple smear วิธี formalin ethyl acetate concentration และวิธี PCR	27
<u>ตารางที่ 6</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ No. As 15	29
<u>ตารางที่ 7</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ No. As 53	30
<u>ตารางที่ 8</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ No. PK 32	31
<u>ตารางที่ 9</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ No. AS26	32
<u>ตารางที่ 10</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ No. AS79	33
<u>ตารางที่ 11</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ No. AS53 ใน LES ที่ไม่มีแป้งข้าวเจ้า	35
<u>ตารางที่ 12</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ No. PK 32 ใน LES ที่ไม่มีแป้งข้าวเจ้า	36
<u>ตารางที่ 13</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ No. AS 79 ใน LES ที่ไม่มีแป้งข้าวเจ้า	37
<u>ตารางที่ 14</u>	การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	38
<u>ตารางที่ 15</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ No. 88 ใน Jones's medium (JM)	40
<u>ตารางที่ 16</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ No. 55 ใน Jones's medium (JM)	41
<u>ตารางที่ 17</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ No. 16 ใน Jones's medium (JM)	42

สารบัญตาราง

		หน้า
<u>ตารางที่ 17</u>	ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. จากผู้ติดเชื้อ ใน RPMI	46
<u>ตารางที่ 18</u>	สายพันธุ์ของเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. ที่แยกได้จากผู้ติดเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. ที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา metronidazole	47
<u>ตารางที่ 19</u>	primers ที่จำเพาะกับยีน ferredoxin ของเชื้อ <i>B. hominis</i>	53

สารบัญภาพ

		หน้า
<u>รูปที่ 1</u>	พื้นที่ที่ทำการศึกษาในแต่ละภาคของประเทศไทย	18
<u>รูปที่ 2</u>	Venn diagram แสดงจำนวนผู้ตรวจพบเชื้อโปรโตซัวด้วยวิธี Simple smear วิธี formalin ethyl acetate concentration และวิธี Boeck and Drbohlav's Locke-Egg Serum (LES) culture	26
<u>รูปที่ 3</u>	ผลการตรวจหา SSU rDNA ของ <i>Blastocystis</i> sp. ด้วยวิธี PCR	28
<u>รูปที่ 4</u>	Venn diagram แสดงจำนวนผู้ตรวจพบเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. ด้วยวิธี Simple smear วิธี formalin ethyl acetate concentration และวิธี PCR	28
<u>รูปที่ 5</u>	การเกาะกลุ่มกันของ <i>Blastocystis</i> sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Locke egg serum medium (LES)	34
<u>รูปที่ 6</u>	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง ชนิด IMDM และ RPMI	43
<u>รูปที่ 7</u>	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ชนิด IMDM และ RPMI	44
<u>รูปที่ 8</u>	รายละเอียดของ <i>Blastocystis hominis</i> whole genome shotgun sequencing	48
<u>รูปที่ 9</u>	Ferredoxin จัดอยู่ใน 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain	49
<u>รูปที่ 10</u>	โครงสร้างสามมิติของ Ferredoxin	50
	การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของยา metronidazole ให้อยู่ในรูป active form	<u>รูปที่ 11</u> <u>รูปที่ 12</u>
	ตำแหน่ง ferredoxin primer บน reference sequence	53
<u>รูปที่ 13</u>	การเพิ่มปริมาณยีน Ferredoxin ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดย Frd-F และ Frd-R1	54
<u>รูปที่ 14</u>	การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน Ferredoxin ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดย Frd-F และ Frd-R2	55
<u>รูปที่ 15</u>	chromatograms ที่ได้จาก DNA sequencing ของชิ้นส่วนยีน ferredoxin	56
<u>รูปที่ 16</u>	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน ferredoxin	56

บทนำ

□ ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Blastocystis hominis นั้นไม่ใช่โปรโตซัวที่ถูกค้นพบใหม่ แต่บทบาทในการเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอุจจาระร่วงนั้นเป็นที่สนใจศึกษาในช่วงไม่กี่สิบปีที่ผ่านมา โดยพบว่าก่อให้เกิดอาการอุจจาระร่วงได้ และยังพบอาการอื่นๆ อีกหลากหลาย แนวทางการรักษาผู้ตรวจพบเชื้อ *B. hominis* ยังไม่ชัดเจน ผู้ติดเชื้อบางรายหากไม่มีอาการแพทย์อาจไม่ให้การรักษา แต่สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการแพทย์ให้การรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ metronidazole ซึ่งใช้รักษาแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรบิก และโปรโตซัวบางชนิดเช่น *Giardia lamblia* และ *Entamoeba histolytica* ซึ่งมีการใช้ยานี้อย่างแพร่หลายมานานหลายสิบปี ในปัจจุบันได้มีรายงานการดื้อยาชนิดนี้เป็นจำนวนมากในแบคทีเรียต่างๆ และในโปรโตซัว *Giardia lamblia* และ *Entamoeba histolytica* โดยพบว่าเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) และ ferredoxin (Fd) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการดื้อยา metronidazole ในผู้ติดเชื้อ *B. hominis* ในอัตราที่แตกต่างกันในผู้ติดเชื้อแต่ละประเทศ นอกจากนี้ ยังไม่มีรายงานกลไกของการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *B. hominis* คณะผู้วิจัยจึงจะทำการศึกษาความชุกของการดื้อยาของเชื้อ *B. hominis* ในประเทศไทย และศึกษายีนดื้อยาของ *B. hominis* ซึ่งจะ มีประโยชน์เพื่อเป็นแนวทางในการวางแผนการรักษาผู้ติดเชื้อ และวางแผนป้องกันแพร่ระบาดของเชื้อต่อไป

□ วัตถุประสงค์

- 1) ศึกษาความชุกของเชื้อ *Blastocystis hominis* ของกลุ่มตัวอย่างประชากรนักเรียนในแต่ละจังหวัดของประเทศไทย
- 2) เปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัย simple smear formalin ether concentration technique และ Drbohlav's Locke-Egg-Serum (LES) medium culture
- 3) ศึกษาขึ้นคือยา metronidazole ใน *Blastocystis hominis* ซึ่งจะมีประโยชน์เพื่อเป็นแนวทางในการวางแผนการรักษาผู้ติดเชื้อ และวางแผนป้องกันแพร่ระบาดของเชื้อต่อไป
- 4) สร้างงานวิจัยระดับลึกเพื่อเป็นแหล่งอ้างอิงในระดับนานาชาติ และประยุกต์ใช้กับงานสาธารณสุขของประเทศ
- 5) สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาโท-เอกที่มีความรู้คุณธรรม มีความชำนาญในงานวิจัยระดับลึก ซึ่งจะเป็นทรัพยากรบุคคลที่มีคุณค่าแก่สังคม และประเทศชาติ และมีความพร้อมที่จะผลิตผลิตภัณฑ์ เทคโนโลยีทางการแพทย์อื่นๆ ต่อไปในอนาคต อันเป็นการสนับสนุนการดำเนินการตามนโยบายแห่งชาติ ในการพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณธรรมและความรู้
- 6) เจ้าหน้าที่สาธารณสุข อาสาสมัคร มีความรู้และเทคโนโลยีที่ทันสมัย สามารถเฝ้าระวังควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างยั่งยืนแท้จริง และสามารถประยุกต์ใช้กับโรคติดต่ออื่นได้

□ ขอบเขตการวิจัย

การศึกษานี้จะทำการศึกษาค้นคว้าหาความชุกของการติดเชื้อของเชื้อ *B. hominis* ในประเทศไทย โดยทำการสุ่มสำรวจเก็บอุจจาระในพื้นที่ต่างๆ แล้วนำมาหาความชุกของการติดเชื้อ *B. hominis* โดยทำการเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยตัวอย่าง simple smear concentration technique และ LES จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง และทดสอบความไวเชื้อต่อยา metronidazole เพื่อศึกษาหาความชุกของเชื้อที่ดื้อยา จากนั้นจะศึกษายีนดื้อยาของ *B. hominis* โดยนำเชื้อที่ดื้อยา metronidazole มาศึกษาลำดับเบสของยีน pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) และ ferredoxin (Fd) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อที่ไม่ดื้อยาเพื่อหาตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์แล้วทำให้เชื้อ *B. hominis* ดื้อยา metronidazole

□ ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ยาปฏิชีวนะ metronidazole เป็นยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งเพื่อรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรบิก และโรคอุจจาระร่วงจากโปรโตซัว ซึ่งในปัจจุบันได้มีรายงานการดื้อยาดังกล่าวเป็นจำนวนมากในแบคทีเรียและโปรโตซัวต่างๆ ในอดีตนั้น การติดเชื้อ *B. hominis* เป็นที่ละเลย ผู้ติดเชื้อบางคนไม่ได้รับการวินิจฉัยและไม่ได้รับการรักษา จึงทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อออกไป จนในปัจจุบันมีการตรวจพบการติดเชื้อ *B. hominis* เป็นจำนวนมากทั่วประเทศ บางรายไม่เกิดอาการของโรคและบางรายเกิดอุจจาระร่วง นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบการไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา metronidazole จึงอาจเป็นไปได้ที่โปรโตซัว *B. hominis* ที่ระบาค้นพบเป็นสายพันธุ์ที่มีการดื้อยา metronidazole การศึกษาอัตราการดื้อยาของเชื้อในประเทศไทยและกลไกการดื้อยาของเชื้อจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในวางแผนการรักษาการติดเชื้อได้อย่างถูกต้อง และสามารถควบคุมการระบาดของโรคได้

□ การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ภาวะอุจจาระร่วงที่เกิดจากการติดเชื้อนอกจากจะมีสาเหตุจากไวรัสและแบคทีเรียแล้วปรสิตพวกโปรโตซัวที่มีบทบาทในการเกิดอุจจาระร่วงในอดีต เช่น *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* หรือที่เพิ่งค้นพบ เช่น *Cryptosporidium* species ก็มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงในผู้ป่วยโรคเอดส์ นอกจากนี้ยังมีโปรโตซัวอีกชนิดหนึ่งคือ *Blastocystis hominis* ซึ่งเริ่มมีบทบาทในการก่อให้เกิดอุจจาระร่วง *Blastocystis hominis* แม้จะเคยถูกศึกษาถึงระดับวิทยาและการก่อให้เกิดพยาธิสภาพในทางเดินอาหาร แต่การบันทึกเป็นหลักฐานยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ถึงความสำคัญในการก่อให้เกิดโรค⁽¹⁾

Blastocystis hominis ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Brumpt ในปี ค.ศ. 1912 เดิมนั้นเชื่อว่าเป็น cyst ของพวก flagellate บ้างก็ว่าเป็น yeast พวก Schizosaccharomyces ที่ไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพ จนกระทั่ง Zierdt และคณะ ในปี ค.ศ. 1967⁽²⁾ ค.ศ. 1973⁽³⁾ และ ค.ศ. 1976⁽⁴⁾ ได้ทำการศึกษาลักษณะคุณสมบัติต่างๆ ของ *B. hominis* โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง ตลอดจนดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สรุปว่า *B. hominis* เป็นโปรโตซัว ซึ่งมีคุณสมบัติต่างจากยีสต์ โดย *B. hominis* ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อรา ตลอดจนไม่มีการแตกหน่อและสร้าง mycelium ไม่มีผนังเซลล์ มีแต่เยื่อหุ้มเซลล์บางๆ มี pseudopod และมีความสามารถในการจับกินแบคทีเรียและสารอื่น โดยทั่วไปเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรีย และการเลี้ยงเชื้อในภาวะพิเศษ (Axenic cultivation)^(5, 6) ภาวะที่เป็นกลางหรือด่างเล็กน้อยและอุณหภูมิ 37°C จะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต สืบพันธุ์โดยการแบ่งตัว (binary fission) และ Schizogony⁽⁵⁾ นอกจากนี้ *B. hominis* ยังมี microchondria, Golgi apparatus และ endoplasmic reticulum ที่เป็นลักษณะเฉพาะของโปรโตซัว เจริญเติบโตในภาวะไม่มีออกซิเจน^(1, 2) มีการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาซึ่งกันและกัน (mutualism) กับแบคทีเรีย^(5, 7) ดังนั้น Zierdt จึงจัด *B. hominis* อยู่ใน Phylum Protozoa⁽⁷⁾ การศึกษาของ Zierdt และคณะพบว่า *B. hominis* มีด้วยกัน 3 ลักษณะ^(2, 3) ได้แก่

1) vacuolated form เป็นระยะที่พบได้บ่อยที่สุดในอุจจาระ รูปร่างกลม ขนาดประมาณ 8-10 ไมครอน อาจพบนิวเคลียสได้ถึง 4 อัน ตรงกลางเป็น vacuole ขนาดใหญ่ ซึ่งคั่นนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมไปชิดเยื่อหุ้มเซลล์เชื่อว่า vacuole นี้ไม่ได้มีหน้าที่สะสมอาหาร (เนื่องจากย้อมไม่ติดสีของแป้งและไขมัน) ในเซลล์ที่มีอายุมากขึ้นจะพบ lipid granule ได้ ระยะนี้เพิ่มจำนวนได้โดยการแบ่งตัวแบบ binary fission อย่างรวดเร็ว อาจพบ slime capsule ได้

2) amoeba form พบได้บ้างในอุจจาระ ไม่มี vacuole ขอบเขตเซลล์ไม่สม่ำเสมอ มีนิวเคลียส 1-2 อัน อาจพบการยึดหดของ pseudopod แต่ไม่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ ระยะนี้เพิ่มจำนวนโดย

การแบ่งตัวแบบ asymmetrical fission ระยะนี้พบมากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทิ้งไว้นานๆ และมีการเจริญของ *B. hominis* ช้าลง

3) granular form พบได้น้อยมากทั้งในอุจจาระและการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบมากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชุ่มชื้นความเข้มข้นสูงๆ รูปร่างกลมขนาด 10-60 ไมครอน ภายในเซลล์เต็มไปด้วย granule เล็กๆ ซึ่งแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ (1) metabolic granules รูปร่างกลม หรือเป็นแท่ง อยู่บริเวณรอบๆ เซลล์ขนาดเท่าๆ กัน พบมากขณะที่เซลล์มีการแตกตัว แต่ไม่พบการเจริญเป็น *B. hominis* (2) reproductive (viable) granules มีขนาดใหญ่ และเจริญใน vacuole เมื่อเซลล์แตกจะพบ granules เหล่านี้ซึ่งมีขนาดเล็ก จนมีขนาดใหญ่ออกเท่า *B. hominis* ทั่วไป (3) lipid granules พบได้ทั้งใน vacuole และไซโตพลาสซึม มีขนาดต่างๆ กัน

การศึกษาเพิ่มเติมของ Yoshikawa และคณะ ในปี 1988⁽⁸⁾ พบว่า membrane ของ *B. hominis* เองรวมทั้งของ organelles อื่นๆ จะมี intramembranous particles กระจายทั่วไป นอกจากนี้ ยังพบว่าการแบ่งตัวจะเริ่มแบ่งนิวเคลียสและ inner membrane ของ *B. hominis* ก่อน หลังจากนั้นจึงจะมีการแบ่ง outer membrane ได้เป็น *B. hominis* 2 ตัว

การศึกษาของ Phillips และ Zierdt⁽⁹⁾ ใน ค.ศ. 1976 โดยให้เชื้อ *B. hominis* ทางปากและลำไส้แก่หนู หนูส่วนหนึ่งและเกิดการถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำมากกว่า 1 สัปดาห์ แต่ตรวจพบว่ามี amoeba forms ของ *B. hominis* ในเซลล์ epithelium ของลำไส้จำนวนเล็กน้อย เมื่อเทียบกับที่พบในช่องว่างของลำไส้ (lumen) อีกทั้งไม่พบปฏิกิริยาการอักเสบที่ชัดเจน จึงยังไม่สามารถสรุปถึง pathogenesis ของ *B. hominis* กับอาการแสดงของโรคที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ ยังสามารถตรวจพบ *B. hominis* ในพวก nonhuman primates อื่นๆ ที่มีอาการอุจจาระร่วงได้เช่นกัน⁽¹⁰⁾

แม้ว่าจะมีรายงานการตรวจพบ *B. hominis* สัมพันธ์กับอาการผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร⁽¹¹⁻¹³⁾ แต่จากการศึกษาของ Markell และคณะ⁽¹⁴⁾ ได้ติดตามตรวจอุจจาระของผู้ป่วยถึง 6 ครั้ง พบว่ามี 27 รายจาก 148 ราย ที่ตรวจพบ *B. hominis* ร่วมกับ *E. histolytica*, *D. fragilis* และ *G. lamblia* เมื่อให้ยารักษาเชื้อก่อโรคเหล่านี้ อาการผิดปกติของระบบทางเดินอาหารก็หายไป แต่ยังคงตรวจพบ *B. hominis* ในอุจจาระของผู้ป่วยได้อีก ผู้ป่วย 5 รายจาก 148 รายที่ตรวจพบเฉพาะ *B. hominis* ซึ่งมีอาการอุจจาระร่วง เมื่อให้ iodoquinol ผู้ป่วยยังคงมีอาการ และตรวจพบ *B. hominis* ต่อมาทั้ง 5 รายได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น irritable bowel syndrome Markell และคณะ จึงสรุปว่า *B. hominis* ไม่ได้เป็นจุลชีพที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพ แต่การตรวจพบ *B. hominis* ในผู้ป่วยที่มีอาการผิดปกติของระบบทางเดินอาหารนั้น น่าจะมีสาเหตุจากจุลชีพอื่นที่ยังไม่สามารถตรวจพบในอุจจาระครั้งแรกๆ หรือมีความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร

จากการผลการศึกษาของ Garcia และคณะ ในปี ค.ศ. 1984 มีผู้ป่วย 191 ราย จาก 2,360 รายที่ตรวจพบเฉพาะ *B. hominis* โดยมี 24 รายที่มีอาการตั้งแต่ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายอุจจาระเหลว บางรายอาจพบว่ามีไข่ หนาวสั่น ปวดศีรษะ ซึ่งระยะเวลาที่เป็นก็แตกต่างกันตั้งแต่หลายชั่วโมง ถึง 3 ปี (เฉลี่ย 3-10 วัน)⁽¹³⁾ สำหรับการศึกษาของ Sheehan และคณะ ในปี ค.ศ. 1986 ผู้ป่วย 23 รายจาก 389 ราย ที่พบเฉพาะ *B. hominis* มากกว่า 5 ตัวต่อ high power field มี 19 ราย จาก 23 รายที่มีอาการเบื่ออาหาร ปวดท้องและอุจจาระร่วง อาการที่มีตั้งแต่ 2 เดือนถึง 1 ปี โดยเฉลี่ยประมาณ 5 เดือน⁽¹²⁾ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ตรวจพบ *E. histolytica* มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบ *B. hominis* อย่างมีนัยสำคัญ

การวินิจฉัยที่แน่นอนอาศัยการตรวจพบ *B. hominis* ในอุจจาระ โดยวิธี fresh smear และ concentration technique อาจใช้การย้อมสี Giemsa สี Trichrome หรือ iodine เพื่อให้เห็นชัดเจน ในผู้ป่วยบางรายอาจพบ eosinophils ในเลือดเพิ่มขึ้น⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ สำหรับในคนนั้น อาการแสดงต่างๆ ของระบบทางเดินอาหาร เช่น อุจจาระจะมีความรุนแรงสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของ *B. hominis* ที่ตรวจพบในอุจจาระ^(4, 12, 18) อนึ่ง เราสามารถตรวจพบ *B. hominis* ได้ในผู้ที่ไม่มีอาการผิดปกติ ในบางครั้งก็พบร่วมกับจุลชีพอื่น⁽¹⁹⁾ Zierdt จึงแนะนำว่าในกรณีที่ไม่พบจุลชีพอื่นที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการทางเดินอาหาร และตรวจพบ *B. hominis* มากกว่า 5 ตัวต่อ oil immersion field (x100) จึงจะให้การวินิจฉัยว่า *B. hominis* อาจเป็นสาเหตุของโรค^(1, 20) และจากการทดลองของ Sheehan ได้พบว่า *B. hominis* ที่ตรวจพบมากกว่า 5 ตัวต่อ high power field (x40) ก็มีความสัมพันธ์กับอาการและความรุนแรงของโรค⁽²⁰⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานตรวจพบ *B. hominis* ในคนไข้โรค AIDS ที่มีอาการอุจจาระได้เช่นกัน^(21, 22)

การศึกษาใน *in vitro* พบว่ายาที่มีประสิทธิภาพดีในการฆ่า *B. hominis* คือ emetin, metronidazole, furazolidone, trimethoprim sulfamethoxazole, 5-chloro-8-hydroxy-7-iodoquinolone (Entero-Vioform) และ pentamidine⁽²³⁾ สำหรับในคนนั้น ยาที่มีประสิทธิภาพดี คือ metronidazole⁽²⁴⁻²⁷⁾ ในขนาดเดียวกับที่ใช้รักษาโรคบิดมีตัวในลำไส้ (intestinal amebiasis) คือ ผู้ใหญ่ให้ยาขนาด 500 mg วันละ 3 ครั้ง นาน 10 วัน เด็กให้ยาขนาดวันละ 35 mg/kg โดยแบ่งให้วันละ 3 ครั้ง นาน 10 วัน ในกรณีที่ไม่ได้ผลอาจใช้ ketoconazole 200 mg ต่อวัน เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์⁽²⁸⁾

ยา metronidazole เป็นยาที่มีฤทธิ์กว้างสามารถต้านเชื้อโปรโตซัวได้หลายชนิด เช่น *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่เจริญเติบโตได้โดยไม่อาศัยออกซิเจน เช่น *Bacteroides*, *Clostridium*, *Helicobacter* เป็นต้น⁽²⁹⁾ โดยยาจะยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของเชื้อ ซึ่งยาที่รับประทานเข้าไปในรูปแบบ inactive form จะถูกเปลี่ยนเป็น active form ใน cytoplasm ในกรณีของการทำลายแบคทีเรีย และ โปรโตซัว *Giardia*

lamblia, *Entamoeba histolytica* แต่จะถูกแปลงเป็นรูป active form ใน organelle พิเศษ คือ hydrogenosome ในกรณีของ *Trichomonas*

การใช้ยา metronidazole ก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ท้องร่วง แน่นหน้าอก ปวดท้อง ปวดหัว อาการแขนขาไม่มีแรง นอกจากนี้ยังมีรายงานความเป็นพิษของยา (toxicity) เกิดขึ้น ถ้าได้รับยาเมโทรนิดาโซลเกินขนาดหรือใช้ยาเมโทรนิดาโซลเป็นเวลานาน เช่น ทำให้เม็ดเลือดขาวต่ำ เป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลาง พบอาการหูหนวกชั่วคราว หูอื้อ การทำงานของกล้ามเนื้อไม่ประสานกัน และการอักเสบของเส้นประสาทตา^(30, 31) และไม่ควรรักษา metronidazole ในหญิงมีครรภ์ เพราะยานี้มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ทำให้พัฒนาการของทารกบกพร่อง (teratogenic) และพบว่าเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic) ในหนู จากข้อจำกัดเหล่านี้ แสดงถึงปัญหาในการใช้รักษาโปรโตซัวในลำไส้จากยาที่สังเคราะห์จากสารเคมีที่เกิดขึ้นกับผู้ไข้ และต่อเชื้อโปรโตซัวในลำไส้

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการดื้อยา metronidazole เกิดขึ้นทั้งในแบคทีเรีย *Bacteroides*, *Clostridium*, *Helicobacter* และในโปรโตซัว *G. lamblia*, *E. histolytica*, *T. vaginalis* ซึ่งมีกลไกการดื้อยาที่แตกต่างกันไป เช่น ในโปรโตซัวพบว่าการลดการทำงานของ pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) และ ferredoxin (Fd) ใน *G. lamblia*^(32, 33) การลดการทำงานของ ferredoxin และ flavin reductase ใน *E. histolytica*⁽³⁴⁾ เป็นต้น สำหรับการดื้อยา metronidazole ของ *B. hominis* มีรายงานพบการดื้อยา metronidazole ใน *B. hominis* ทั้งจากการศึกษาในหลอดทดลองและในเชื้อที่แยกเพาะเชื้อได้จากผู้ป่วย⁽³⁵⁻³⁸⁾ อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกการดื้อยาของ *B. hominis* ยังไม่เป็นที่แน่ชัดในปัจจุบัน

□ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ข้อมูลการระบาดของ *Blastocystis hominis* ซึ่งคือยา metronidazole ในประเทศไทย
- 2) ข้อมูลเชิงเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยของเชื้อปรสิตลำไส้และ เชื้อ *Blastocystis hominis*
- 3) ข้อมูลยีนคือยา metronidazole ใน *Blastocystis hominis* ซึ่งจะมีประโยชน์เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาและป้องกันการแพร่กระจายของโรคต่อไป
- 4) งานวิจัยระดับลึกเพื่อเป็นแหล่งอ้างอิงในระดับนานาชาติ และประยุกต์ใช้ได้กับงานสาธารณสุขของประเทศ
- 5) นักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาโทที่มีความรู้คู่คุณธรรม มีความชำนาญในงานวิจัยระดับลึกซึ่งจะเป็นทรัพยากรบุคคลที่มีคุณค่าแก่สังคม และประเทศชาติ และมีความพร้อมที่จะผลิตผลิตภัณฑ์ เทคโนโลยีทางการแพทย์อื่นๆ ต่อไปในอนาคต อันเป็นการสนับสนุนการดำเนินการตามนโยบายแห่งชาติ ในการพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณธรรมและความรู้
- 6) เจ้าหน้าที่สาธารณสุข อาสาสมัคร มีความรู้และเทคโนโลยีที่ทันสมัย สามารถเฝ้าระวังควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างยั่งยืนแท้จริง และสามารถประยุกต์ใช้กับโรคติดต่ออื่นได้
- 7) ผลงานตีพิมพ์ทั้งระดับชาติและนานาชาติ 1-2 เรื่องตลอดโครงการ
- 8) ผลงานวิชาการเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ 1-2 เรื่องตลอดโครงการ
 - **หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์**
 - กระทรวงสาธารณสุขได้ทราบข้อมูลความชุกของ *Blastocystis hominis* เพื่อช่วยประเมินสถานการณ์การระบาดของโรค และปัญหาการคือยาของเชื้อ *Blastocystis hominis*
 - มหาวิทยาลัยผลิตบุคลากรทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ และสร้างองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นแหล่งอ้างอิงระดับชาติและนานาชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย

❑ รูปแบบการวิจัย (Research design)

การสุ่มแบบหลายขั้นตอน (Multi-stage sampling)

❑ การกำหนดพื้นที่ และ ประชากรเป้าหมาย (Target population)

สำรวจประชากรในจังหวัดต่างๆ ทุกภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคกลาง ภาคตะวันตก และภาคใต้ โดยให้ได้ตัวอย่างเชื้อ *B. hominis* จากผู้ประชากรทั้งหมด อย่างน้อย 380 ราย

โดยใช้สูตรในการคำนวณขนาดของประชากรตัวอย่าง (sample size) ดังนี้

$$\text{สูตร } n = \frac{Z_{\alpha}^2 pq}{d^2} = \frac{1.96^2 \times 0.44 \times 0.56}{0.05^2} = 379 \text{ ราย}$$

$$\alpha \text{ (type I error)} = 0.05 \quad Z_{\alpha} = Z_{0.05/2} = 1.96 \text{ (two tail)}$$

$$p = \text{estimated prevalence} = 44\% \text{ (Taamasri et al., 2002)}$$

$$q = 1 - p$$

$$d = \text{allowable error in estimating prevalence} = 0.05$$

เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้าได้มีรายงานการติดเชื้อปรสิตมากในเด็ก จึงได้ประชากรตัวอย่าง เป็นเด็กนักเรียนตั้งแต่ระดับชั้นอนุบาลถึงมัธยมศึกษา ทั้งนี้ เนื่องจากความชุกของโรคโดยประมาณ คือร้อยละ 40 ดังนั้น เพื่อให้ได้ตัวอย่างโปรโตซัว ทั้งสิ้น 400 ตัวอย่าง จึงต้องดำเนินการเก็บตัวอย่าง อย่างน้อย 1,000 ตัวอย่าง และจากอัตราการได้รับการร่วมมือจากอาสาสมัครในการส่งตัวอย่าง อุจจาระ ประมาณร้อยละ 50 จึงต้องทำการสำรวจนักเรียนทั้งสิ้น 2,000 ราย ทั่วประเทศ โดยแบ่งเป็น 6 ภาค ภาคละ 350 ตัวอย่าง จึงได้ทำการสำรวจนักเรียนทั้งสิ้น 16 โรงเรียน ดังนี้

ภาคเหนือ

จังหวัดน่าน ได้แก่ โรงเรียนแสนทองวิทยา และโรงเรียนบ้านคอยด้ว

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จังหวัดนครราชสีมา ได้แก่ โรงเรียนอนุบาลค่ายสุรนารี และโรงเรียนภูเขาลาด

จังหวัดขอนแก่น ได้แก่ โรงเรียนบ้านหนองกงใหญ่ และโรงเรียนบ้านฝักหนาม

ภาคกลาง

จังหวัดอ่างทอง ได้แก่ โรงเรียนป่าโมกซ์วิทยาคม

ภาคตะวันออก

จังหวัดชลบุรี ได้แก่ โรงเรียนบ้านคลองสิบแปด และโรงเรียนสวนป่าเขาชะอางค์

ภาคตะวันตก

จังหวัดกาญจนบุรี ได้แก่ โรงเรียนห้วยกบ และโรงเรียนบ้านใหม่พัฒนา

ภาคใต้

จังหวัดพัทลุง ได้แก่ โรงเรียนวัดปิ่นधारาม โรงเรียนอนุบาลศรีบรรพต

โรงเรียนวัดหัวควน โรงเรียนวัดพระเกิด และโรงเรียนวัดฝาละมี



รูปที่ 1 พื้นที่ที่ทำการศึกษาในแต่ละภาคของประเทศไทย

□ วัตถุประสงค์อย่างและการเก็บรวบรวมข้อมูล (Data collection)

- แบ่งเก็บอุจจาระจากผู้เข้าร่วมการวิจัยซึ่งเข้าร่วมโครงการวิจัยมาตรฐานวินิจฉัยการติดเชื้อ *Blastocystis hominis*
- เปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัย simple smear วิธี formalin ether concentration technique และวิธี Drbohlav Locke egg serum medium (LES) culture
- วิเคราะห์และสรุปความชุกของเชื้อ *B. hominis* ในตัวอย่างนักเรียน
- นำอุจจาระส่วนที่มีเชื้อ *B. hominis* มาเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. hominis* โดยวิธี Drbohlav Locke egg serum medium (LES) culture
- ทดสอบความไวยา metronidazole ของเชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลอง
- วิเคราะห์และสรุปอัตราการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *B. hominis*
- นำเชื้อ *B. hominis* ที่แยกบริสุทธิ์จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัด DNA
- ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของยีน pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) และ ferredoxin (Fd)
- วิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ดื้อยาและไม่ดื้อยา
- จัดทำรายงานและเผยแพร่ผลการวิจัย

□ สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

- หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้างและโรคเขตร้อน ศูนย์วิจัย (CHULA-MRC) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พื้นที่ภาคสนาม: จังหวัดอ่างทอง น่าน นครราชสีมา ขอนแก่น พัทลุง กาญจนบุรี ชลบุรี

□ ขั้นตอนการดำเนินงาน

ขั้นที่ 1 การเก็บตัวอย่างอุจจาระนักเรียนภาคสนาม

ดำเนินการเก็บอุจจาระตัวอย่างของนักเรียนในแต่ละจังหวัดที่เป็นตัวแทนประชากรในแต่ละภาคของประเทศไทย ในโรงเรียนที่ให้การตอบรับการเข้าโครงการ โดยทำการแจกกระปุกเก็บตัวอย่าง คนละ 1 กระปุก พร้อมคู่มือการเก็บอุจจาระ

ขั้นที่ 2 บันทึกประวัติ

ทำการซักประวัติและลงบันทึกข้อมูลส่วนบุคคล ระบุรหัสแยกตามห้อง ชั้น โรงเรียน จังหวัด ตามลำดับ เพื่อให้ง่ายแก่การสืบค้น และเพื่อเป็นส่วนประกอบในการวินิจฉัยการติดเชื้อ การจัดจำแนกกลุ่มตามเพศและอายุ ตลอดจนใช้ในการติดตามรักษาในกรณีที่พบการติดเชื้อ

ขั้นที่ 3 การตรวจหาเชื้อโปรโตซัวในลำไส้ด้วยวิธีทางปรสิตวิทยา

นำอุจจาระตัวอย่างทำการตรวจหาเชื้อโปรโตซัวในลำไส้ด้วยวิธีทางปรสิตวิทยา คือวิธี simple smear และ formalin ether concentration technique ส่องดูภายใต้จุลทรรศน์เพื่อแยกจำนวนการติดเชื้อและจำแนกชนิดของโปรโตซัวในลำไส้ในอุจจาระตัวอย่าง บันทึกผล

ขั้นที่ 4 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *B.hominis*

นำตัวอย่างอุจจาระมาตรวจวินิจฉัยเชื้อ *B.hominis* ด้วยวิธี simple smear formalin ether concentration technique และ LES culture ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผล

ขั้นที่ 5 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ *B. hominis*

นำข้อมูลการตรวจวินิจฉัยพบเชื้อ *B. hominis* ที่มีมาทำการวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์ โดยใช้ chi-squared ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจวิเคราะห์ต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ขั้นที่ 6 ทดสอบความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลอง

นำตัวอย่างอุจจาระจากผู้ติดเชื้อมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ Locke egg serum medium (LES), Jone's medium (JM), LB Broth, IMDM broth, RPMI broth, IMDM agar plate และ RPMI agar plate ทดสอบความไวต่อยา metronidazole โดยใช้ความเข้มข้นของยาตั้งแต่ 0 µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml ตามลำดับ

ทำการนับจำนวนเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน โดยให้ความเข้มข้นยาที่ 0 µg/ml เป็นหลอดควบคุม วิเคราะห์และสรุปความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลอง

ขั้นที่ 7 สกัด DNA ของเชื้อ *B. hominis* ที่แยกบริสุทธิ์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการสกัด DNA ของ *Blastocystis* sp. ที่เลี้ยงเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง โดยใช้ชุดสกัด DNA ของ Favor Prep stool DNA Isolation Mini kit (FavorGen Biotech Corporation, Taiwan) แล้วเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 °C เพื่อใช้ในการทำ PCR ต่อไป

ขั้นที่ 8 เพิ่มจำนวนยีน ferredoxin โดยวิธี PCR

ในปฏิกิริยา PCR ที่มีปริมาตรสุทธิ 50 µl ซึ่งประกอบด้วย 1x PCR buffer, 3mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 1U Taq DNA polymerase (Fermentas, USA), 40µg/ml BSA , 0.4µM ของ primer F และ R และตัวอย่างดีเอ็นเอ 200 ng โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 35 รอบดังนี้ denaturation 95 °C 30 วินาที annealing 50 °C 30 วินาที extension 72 °C 30 วินาที โดยใช้ pre-heating denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C 4 นาที และ complete extension 72 °C 5 นาที จากนั้นตรวจสอบ PCR product ขนาด 587 bp โดยใช้ 2% agarose gel กับ 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA) เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้อมด้วย ethidium bromide อ่านผลภายใต้แสง UV (BioLabs, USA)

ขั้นที่ 9 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของยีน ferredoxin (Fd) และวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ดื้อยาและไม่ดื้อยา

ขั้นที่ 10 จัดทำรายงานและเผยแพร่ผลการวิจัย

ผลการวิจัย

• ความชุกของโรคปรสิตในลำไส้ในเด็กนักเรียนทั่วประเทศไทย

การศึกษานี้ได้ดำเนินการสุ่มเก็บอุจจาระจากเด็กนักเรียนชั้นเตรียมอนุบาลถึงชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย มีอายุระหว่าง 1-23 ปี* จำนวน 1,909 ราย ที่อาศัยอยู่ใน 7 จังหวัดใน 6 ภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ (จังหวัดน่าน) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดนครราชสีมาและขอนแก่น) ภาคตะวันออก (จังหวัดชลบุรี) ภาคกลาง (จังหวัดอ่างทอง) ภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรี) และภาคใต้ (จังหวัดพัทลุง) จากนั้นทำการตรวจอุจจาระจากตัวอย่างที่เก็บได้เพื่อตรวจหาปรสิตในอุจจาระด้วยวิธี simple smear วิธี formalin ethyl acetate concentration วิธี Drbohlav's Locke-Egg-Serum (LES) medium culture วิธี Harada mori culture และวิธี agar plate culture พบผู้ติดเชื้อปรสิตในลำไส้ทั้งสิ้นจำนวน 713 ราย คิดเป็นอัตราร้อยละ 37.3 (ตารางที่ 1) โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างอัตราการติดเชื้อในเพศชายและเพศหญิง ($P > 0.05$) เมื่อจำแนกอัตราการติดเชื้อโดยแบ่งตามระดับชั้นของนักเรียน พบว่าอัตราการติดเชื้อสูงที่สุดในนักเรียนชั้นประถมศึกษาที่มีอายุระหว่าง 7-12 ปี โดยพบอัตราการติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 46.5

ตารางที่ 1 ความชุกของการติดเชื้อปรสิตในกลุ่มนักเรียน โดยแยกตามเพศและอายุ

* Significantly difference among the age group 13-23 between male and female ($P < 0.05$)

Age	N (Male: Female: Unknown)	No. of positive (Male: Female: Unknown)	% prevalence (Male: Female: Unknown)
1-6	278 (145:133:0)	79 (43: 36:0)	28.4 (29.7: 27.1:0)
7-12	1,193 (551:642:0)	555 (261:294:0)	46.5 (47.4: 45.8:0)
13-23	403 (207: 196:0)	71 (29: 42:0)*	17.6 (14.0: 21.4:0)*
Unknown	35 (0:0:35)	8 (0:0:8)	22.9 (0:0:22.9)
Total	1,909 (903: 971: 35)	713 (333: 372: 8)	37.3 (36.9: 38.3: 22.9)

* เนื่องจากโรงเรียนบางแห่งเป็นโรงเรียนชายโอกาสสำหรับนักเรียนไทย-กะเหรี่ยง จึงมีนักเรียนที่มีอายุมากกว่าเกณฑ์รวมอยู่ในชั้นเรียนด้วย

• ความชุกและชนิดของปรสิตชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในเด็กนักเรียนทั่วประเทศไทย

จากการสำรวจการติดเชื้อปรสิตในลำไส้ของนักเรียน 1,909 ราย พบผู้ติดเชื้อจำนวน 731 ราย (37.3%) นั้น เมื่อจำแนกชนิดของปรสิตที่ตรวจพบนั้นพบว่าตรวจพบโปรโตซัว *B. hominis* มากที่สุด โดยพบในอาสาสมัครจำนวน 631 ราย คิดเป็นอัตราการติดเชื้อถึง 33.1% นอกจากนี้ยังตรวจพบโปรโตซัว *G. duodenalis* จำนวน 81 ราย (4.2%) พยาธิไส้เดือน (*A. lumbricoides*) จำนวน 69 ราย (3.6%) พยาธิปากขอ (hookworm) จำนวน 30 ราย (1.6%) โปรโตซัว *Entamoeba histolytica* จำนวน 14 ราย (0.7%) พยาธิแส้ม้า (*T. trichiura*) จำนวน 10 ราย (0.5%) พยาธิเข็มหมุด (*E. vermicularis*) จำนวน 10 ราย (0.5%) พยาธิเส้นด้าย (*S. stercoralis*) จำนวน 7 ราย (0.4%) พยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็ก (minute intestinal flukes) จำนวน 4 ราย (0.2%) และพยาธิตัวตืด (*Taenia* sp.) จำนวน 1 ราย (0.1%)

เมื่อจำแนกออกเป็นจังหวัดต่างๆ พบว่าจังหวัดกาญจนบุรีมีอัตราการติดเชื้อสูงสุดถึง 83.1% โดยพบผู้ติดเชื้อถึง 222 ราย จากจำนวนนักเรียนทั้งหมด 267 ราย ตามด้วยจังหวัดน่าน (54.6%) ขอนแก่น (43.6%) พัทลุง (41.0%) ชลบุรี (23.9%) อ่างทอง (14.5%) และนครราชสีมา (0.5%) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม *B. hominis* ยังคงเป็นปรสิตที่ตรวจพบมากที่สุดในทุกจังหวัดที่ทำการสำรวจ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความชุกของการติดเชื้อปรสิตของนักเรียน จำแนกตามชนิดของเชื้อในแต่ละจังหวัด

Province in Thailand	N	No. of positive (%)	Identified parasites (%)									
			Bh	Eh	Tt	Gl	Hw	Mn	Al	Ss	Ev	Tn
Ang Thong	330	48(14.5)	26	6	0	14	8	0	1	0	0	0
Nakhonratchasima	188	1(0.5)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nan	240	131(54.6)	105	2	0	7	2	0	63	1	2	0
Kanchanaburi	267	222(83.1)	220	6	4	45	7	0	4	2	2	0
KhonKaen	188	82(43.6)	80	0	0	2	0	0	0	1	0	0
Pathalung	366	150(41.0)	145	0	2	5	4	0	0	1	1	0
Chonburi	330	79(23.9)	54	0	4	8	9	4	1	2	5	1
Total	1,909	713(37.3)	631(33.1)	14(0.7)	10(0.5)	81(4.2)	30(1.6)	4(0.2)	69(3.6)	7(0.4)	10(0.5)	1(0.1)

[Bh = *Blastocystis hominis*; Eh = *Entamoeba histolytica*; Tt = *Trichuris trichiura*; Gl = *Giardia duodenalis*, Hw = Hookworms; Mn = Minute intestinal flukes; Al = *Ascaris lumbricoides*; Ss = *Strongyloides stercoralis*; Ev = *Enterobius vermicularis*; Tn = *Taenia* sp.]

- การติดเชื้อร่วมกันของปรสิตหลายชนิด

จากการศึกษาการติดเชื้อร่วมกันของปรสิตในนักเรียนจำนวน 1,909 ราย พบนักเรียนที่มีการติดเชื้อปรสิตจำนวน 713 ราย หากจำแนกตามลักษณะการติดเชื้อร่วมกันจะพบว่า single infection จำนวน 592 ราย คิดเป็น 83.0% และ ลักษณะ Mixed infections จำนวน 121 ราย คิดเป็น 17.0% โดยเป็นแบบ 2 Infections มากที่สุด คือ 105 ราย คิดเป็น 86.8% ในกลุ่มนี้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากเปรียบเทียบการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางปรสิตวิทยาพบว่าวิธี Formalin ether concentration ตรวจได้ 284 ตัวอย่าง คิดเป็น 39.8% และ วิธี Simple smear ตรวจได้ 266 ตัวอย่าง คิดเป็น 37.3%

ตารางที่ 3 ลักษณะการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อปรสิตในนักเรียนจำนวน 1,909 ราย จำแนกด้วยการตรวจวินิจฉัยทางปรสิตวิทยา

Infection type	No. of positive (%)		
	Total	Simple smear	Formalin ether concentration
Single infection	592(83.0)	233(39.4)	248(41.9)
Mixed infections	121(17.0)	33(27.0)	36(29.5)
2 infections	105(86.8)*	30(28.3)	2(1.9)
3 infections	14(11.5)	3(21.4)	2(14.3)
4 infections	2(1.6)	0	0
Total	713	266(37.3%)	284(39.8%)

* $P < 0.05$

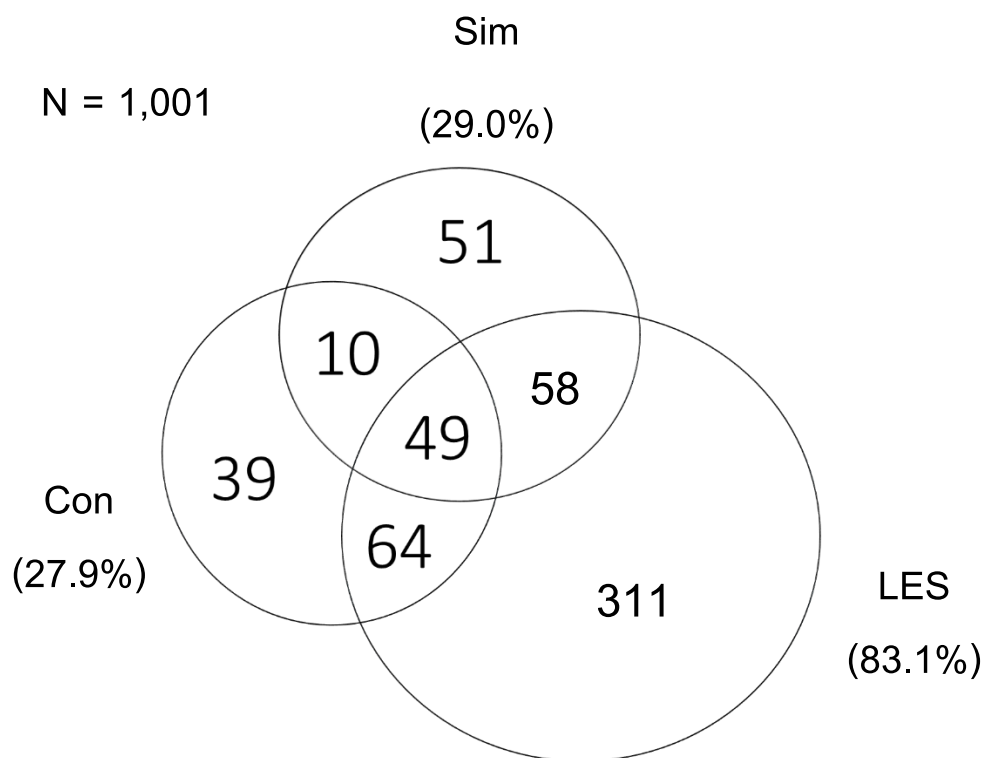
- การเปรียบเทียบความไวในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อโปรโตซัวด้วยเทคนิคทางปรสิตวิทยา

จากตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด 1,909 ตัวอย่าง สามารถทำการตรวจวินิจฉัย ทั้ง 3 วิธี คือ วิธี Simple smear วิธี Formalin ether concentration และ วิธี LES culture ได้ทั้งสิ้น จำนวน 1,001 ราย เป็นตัวอย่างจากเด็กนักเรียนในจังหวัด จำนวนได้ 5 จังหวัด คือ น่าน กาญจนบุรี ขอนแก่น ชลบุรี และพัทลุง ซึ่งจากการเปรียบเทียบความไวในการวินิจฉัยพบว่า วิธี Formalin ether concentration ให้ความไวในการวินิจฉัยไม่แตกต่างจากวิธี simple smear ในขณะที่วิธี LES culture สามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัยได้ โดยตรวจพบได้สูงที่สุด คือ 482 ตัวอย่าง คิดเป็น 83.1% ซึ่งมากกว่าวิธี simple smear และวิธี Formalin ether concentration ถึง 3 เท่า (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ โปรโตซัว

Province	N	No. of positive (%)	No. of positive		
			simple smear	concentration	LES
Nan	240	108 (45.0)	38	34	85
Kanchanaburi	267	222 (83.1)	72	87	198
Khonkaen	188	82 (43.6)	26	17	61
Chonburi	116	35 (30.2)	2	10	24
Pathalung	190	133 (70.0)	30	14	114
Total	1,001	580 (57.9)	168 (29.0)	162 (27.9)	482 (83.1)

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวินิจฉัยทั้ง 3 วิธี จะพบว่า มีผู้ติดเชื้อเพียง 49 ราย (8.4%) จาก 580 ราย ที่ตรวจพบโปรโตซัวได้ทั้ง 3 วิธี โดยมีจำนวน 103 ราย (17.8%) ที่ตรวจพบได้ โดยวิธี concentration แต่ตรวจไม่พบโดยวิธี simple smear ทั้งนี้ เป็นที่น่าสนใจว่ามีผู้ติดเชื้อถึง 311 ราย (53.6%) ที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี simple smear และวิธี formalin ether concentration



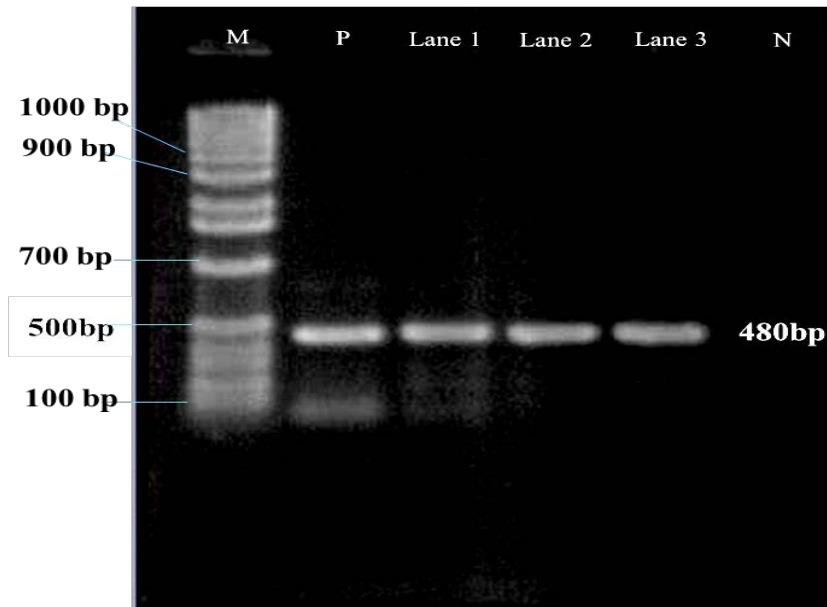
รูปที่ 2 Venn diagram แสดงจำนวนผู้ตรวจพบเชื้อโปรโตซัว ด้วยวิธี simple smear (Sim), formalin ethyl acetate concentration (Con), และ Boeck and Drbohlav's Locke-Egg Serum (LES) medium culture

- การเปรียบเทียบความไวในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

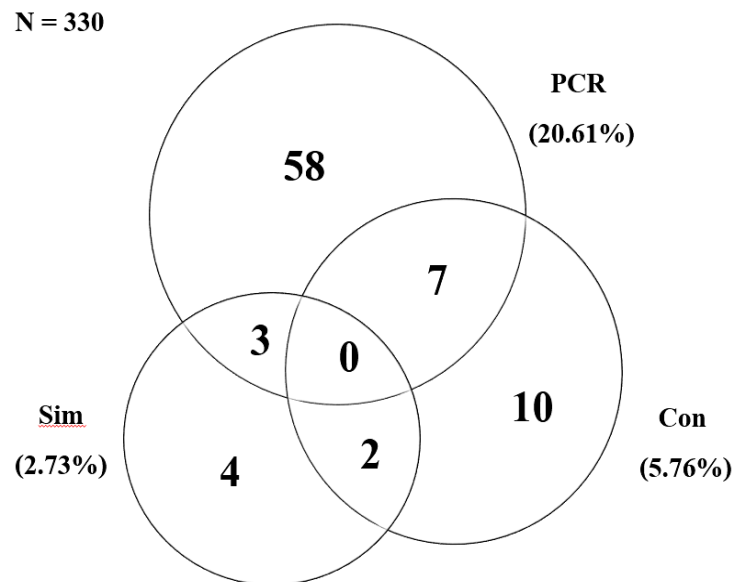
จากตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด 1,909 ตัวอย่าง สามารถทำการตรวจวินิจฉัย ทั้ง 3 วิธี คือ วิธี Simple smear วิธี Formalin ether concentration และ วิธี PCR ได้ทั้งสิ้นจำนวน 330 ราย เป็นตัวอย่างจากเด็กนักเรียนในจังหวัดอ่างทอง เป็นนักเรียนชาย 179 ราย (54.24%) นักเรียนหญิงจำนวน 151 ราย (45.76%) อายุระหว่าง 12-22 ปี เมื่อตรวจอุจจาระด้วยวิธี simple smear พบ *Blastocystis* sp. จำนวน 9 ราย (2.73%) เป็นนักเรียนชาย 4 ราย (1.21%) นักเรียนหญิง 5 ราย (1.52%) เมื่อตรวจด้วยวิธี formalin ethyl-acetate concentration พบ *Blastocystis* sp. จำนวน 19 ราย (5.76%) เป็นนักเรียนชาย 12 ราย (3.64%) นักเรียนหญิง 7 ราย (2.12%) และเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR ตรวจพบ *Blastocystis* sp. 68 ราย (20.61%) เป็นนักเรียนชาย 33 ราย (10.0%) นักเรียนหญิง 35 ราย (10.61%) (ตารางที่ 5) โดยรวมพบผู้ติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ทั้งสิ้นจำนวน 85 ราย (25.76%) และมีถึง 58 ราย (68.24 %) ที่ตรวจไม่พบด้วยวิธี simple smear และ วิธี formalin ethyl-acetate concentration (รูปที่ 4)

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบความไวในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ด้วยวิธี simple smear (sim) วิธี formalin ethyl-acetate concentration (con) และวิธี PCR

Sex	N	No. of positive (%)			Total
		sim	con	PCR	
Male	179 (54.2%)	4 (1.2%)	12 (3.6%)	33 (10.0%)	43 (13.0%)
Female	151 (45.8%)	5 (1.5%)	7 (2.1%)	35 (10.6%)	42 (12.7%)
Total	330 (100%)	9 (2.7%)	19 (5.7%)	68 (20.6%)	85 (25.7%)



รูปที่ 3 ผลการตรวจหา SSU rDNA ของ *Blastocystis* sp. ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR), Lane M : 1 kb DNA ladder; Lane 1- 3 คือเอ็นเอจากตัวอย่างจากนักเรียน; P : Positive control; N : Negative control



รูปที่ 4 Venn diagram แสดงจำนวนผู้ตรวจพบเชื้อ *Blastocystis* sp. โดยวิธี simple smear (Sim) วิธี formalin ethyl-acetate concentration technique (Con) และ วิธี PCR, N คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

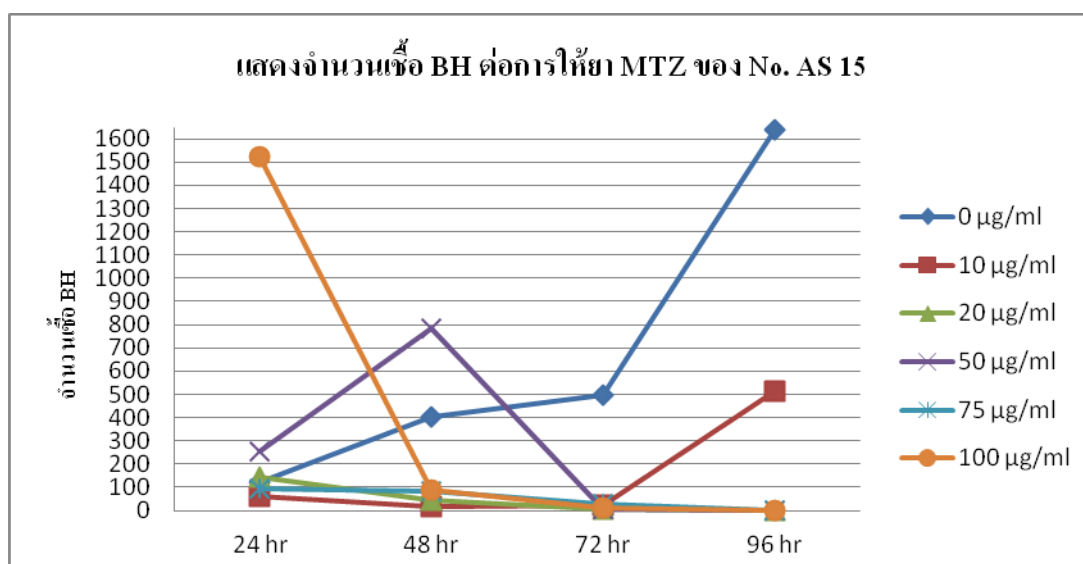
- ศึกษาความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* ในหลอดทดลอง

1. ทดสอบความไวยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* ในหลอดทดลองด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Locke egg serum medium (LES)

คัดเลือกตัวอย่างอุจจาระจากผู้ติดเชื้อมาทดสอบจำนวน 5 ราย ได้แก่ AS 15, AS 53, PK 32, AS 26, AS 79 เพราะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน คือ LES เพื่อทดสอบความไวต่อยา metronidazole โดยใช้ความเข้มข้นของยาตั้งแต่ 0 µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml, 100µg/ml ตามลำดับ ทำการนับจำนวนเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยให้ความเข้มข้นยาที่ 0 µg/ml เป็นหลอดควบคุม

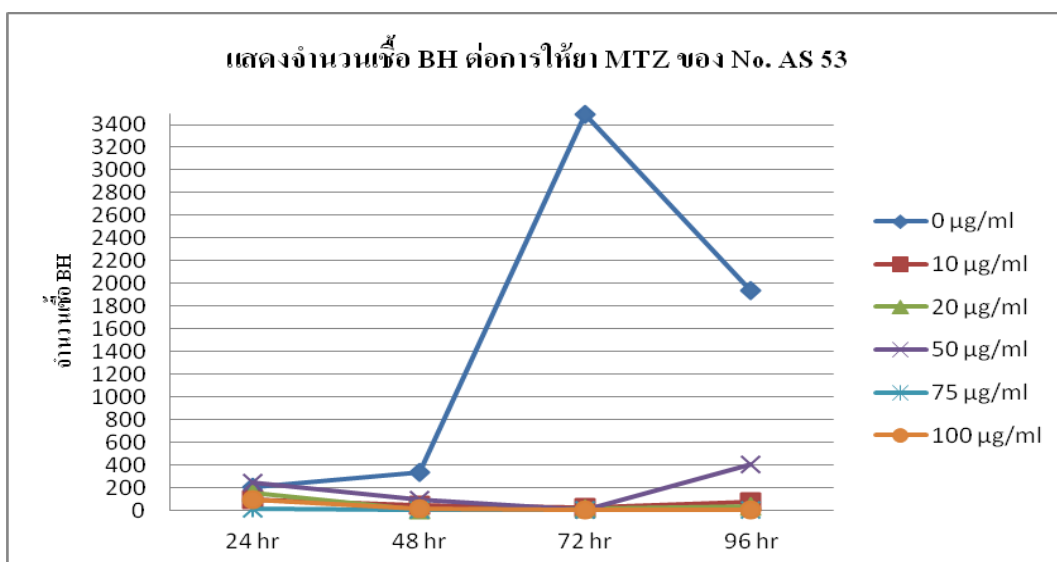
ตารางที่ 6 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ No. As 15

	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH (No.AS 15)					
	0 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml
24 ชั่วโมง	120	62	143	256	92	1526
48 ชั่วโมง	403	16	46	786	85	86
72 ชั่วโมง	496	24	4	6	26	9
96 ชั่วโมง	1640	513	2	2	1	1



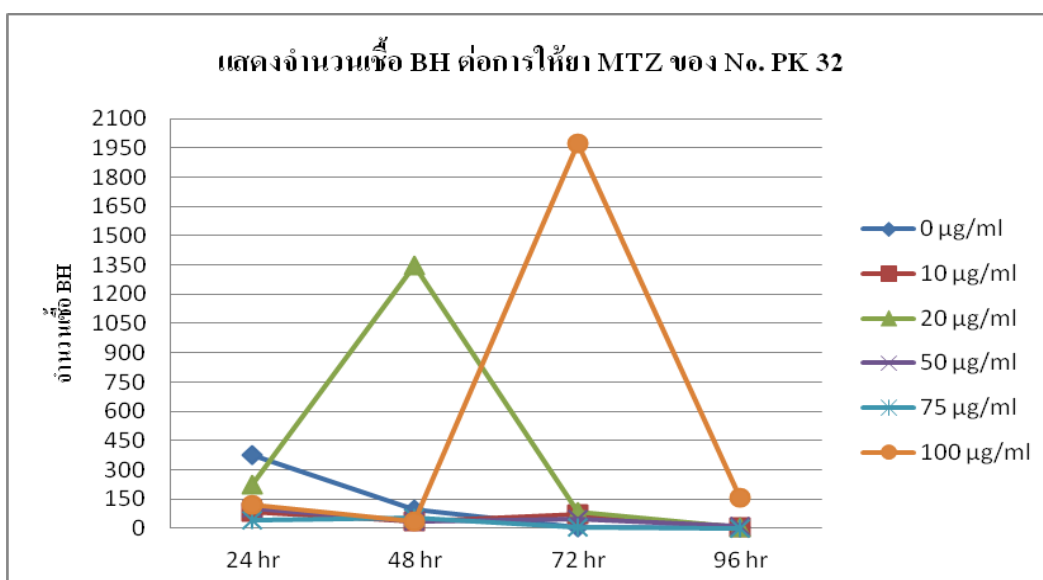
ตารางที่ 7 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ No. AS 53

	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH (No.AS 53)					
	0 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml
24 hr	209	96	156	242	13	93
48 hr	337	47	9	96	5	13
72 hr	3490	28	13	7	1	1
96 hr	1940	77	34	406	5	0



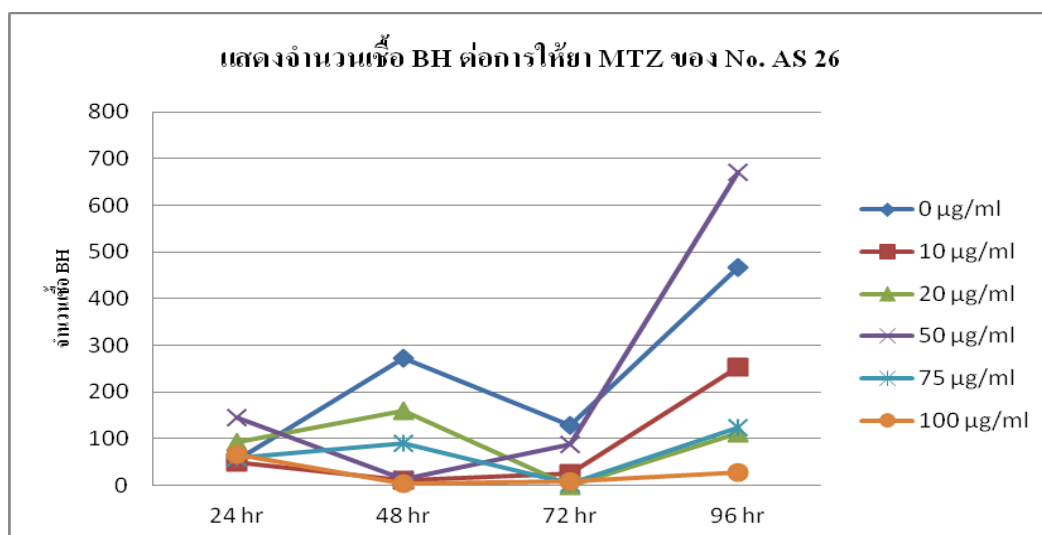
ตารางที่ 8 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ No. PK 32

	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH (No.PK 32)					
	0 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml
24 hr	373	85	223	102	45	123
48 hr	95	35	1350	35	56	37
72 hr	5	72	84	47	6	1973
96 hr	5	6	3	13	0	156



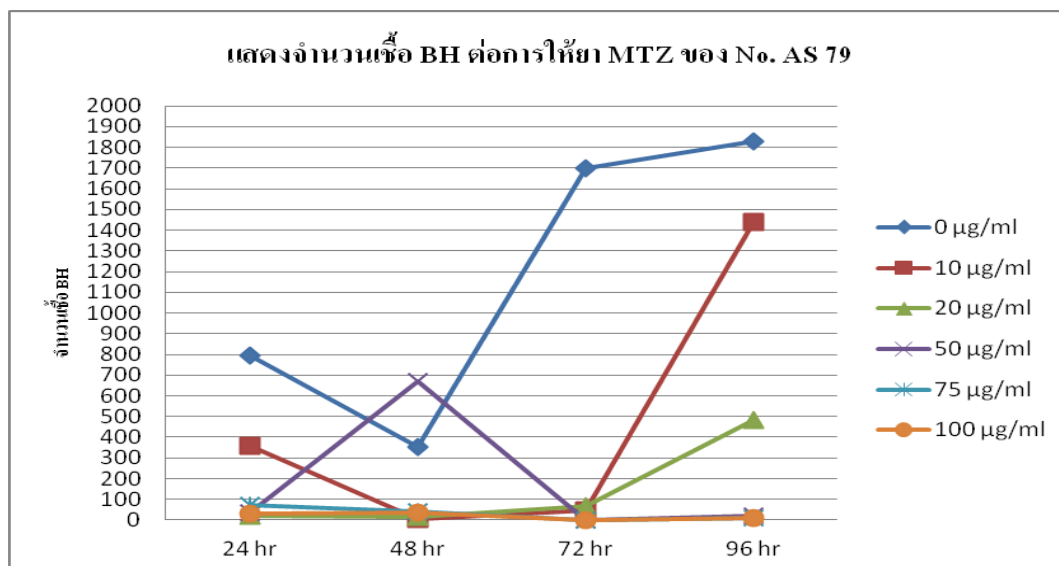
ตารางที่ 9 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ No. AS26

	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH (No.AS 26)					
	0 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml
24 hr	53	49	93	145	59	67
48 hr	273	12	159	13	90	5
72 hr	129	26	0	88	3	9
96 hr	467	253	112	670	123	27

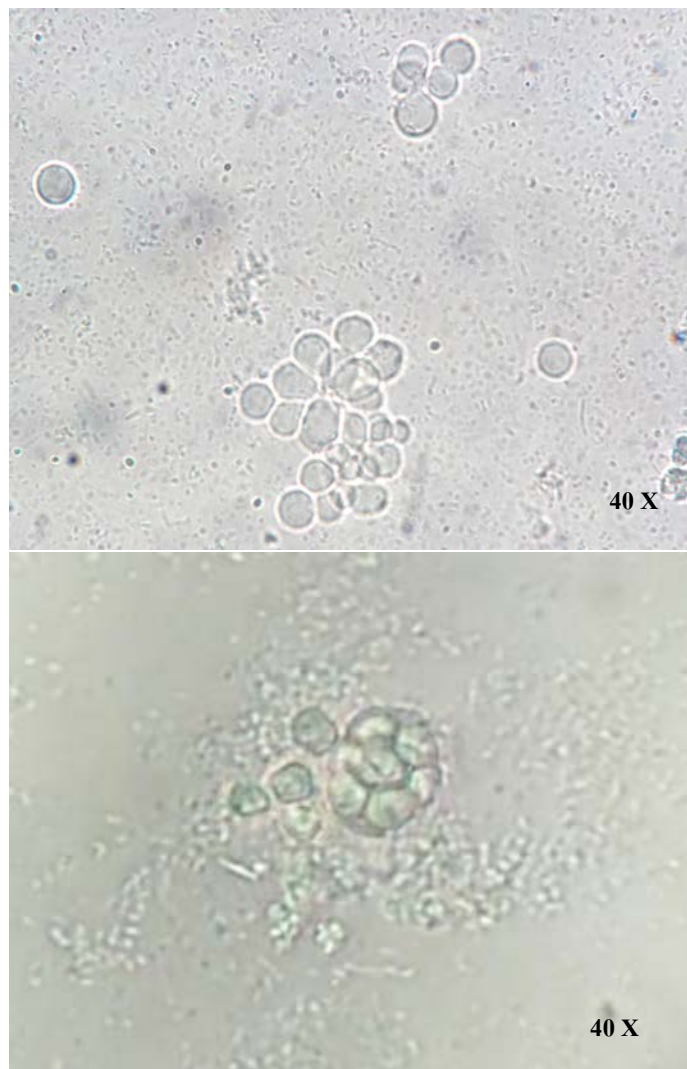


ตารางที่ 10 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ No. AS79

	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH (No.AS 79)					
	0 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml
24 hr	795	357	22	34	73	32
48 hr	354	5	13	672	42	37
72 hr	1700	48	69	1	0	0
96 hr	1829	1437	485	22	11	8



จากผลการทดสอบความไวของยาจะเห็นว่า จำนวนเชื้อ *Blastocystis* ที่นับได้จะแตกต่างกันมากในผู้ป่วยแต่ละราย นอกจากนี้ การปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของยา กลับไม่พบแนวโน้มของจำนวนเชื้อที่ลดลงตามระดับความเข้มข้นของยาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการสังเกตของผู้วิจัยพบว่าการเกาะกลุ่มกันของเชื้อ *Blastocystis* เป็นจำนวนมาก จึงทำให้พบเชื้อ *Blastocystis* ในปริมาณที่มากและนับได้ยาก ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจจะเป็นเชื้อ *Blastocystis* ที่ตายแล้วภายหลังการได้รับยา จึงได้นำเชื้อมาทดสอบคุณสมบัติเป็นเซลล์ตาย ด้วยการย้อมสี trypan blue ปรากฏว่าเชื้อไม่ติดสีของ trypan blue แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่นับเป็นเชื้อที่ยังไม่ตาย จึงสันนิษฐานว่าการเกาะกลุ่มกันของเชื้อน่าจะมีสาเหตุมาจากการที่มีแบ่งข้าวเจ้าเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อชอบกินแบ่งเป็นอาหารทำให้เกิดการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและเกิดการเกาะกลุ่มขึ้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยไม่เติมแบ่งข้าวเจ้าลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อ



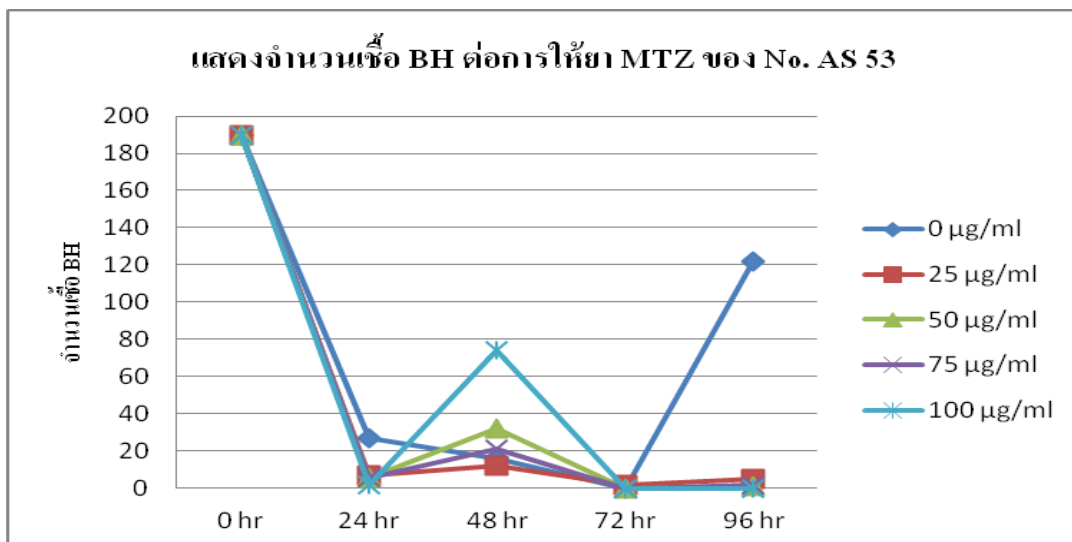
รูปที่ 5 การเกาะกลุ่มกันของ *Blastocystis* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Locke egg serum medium (LES)

2. ทดสอบความไวยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. ในหลอดทดลองด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Locke egg serum medium (LES) โดยไม่ใส่แป้งข้าวเจ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลือกตัวอย่างจากการทดสอบครั้งที่ 1 มาจำนวน 3 ราย ได้แก่ AS 53, PK 32, AS 79 โดยใช้ความเข้มข้นของยา metronidazole ตั้งแต่ 0 µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml, 100µg/ml นับเชื้อทุกๆ 24 hr คูปริมาณที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตรอดชีวิตได้

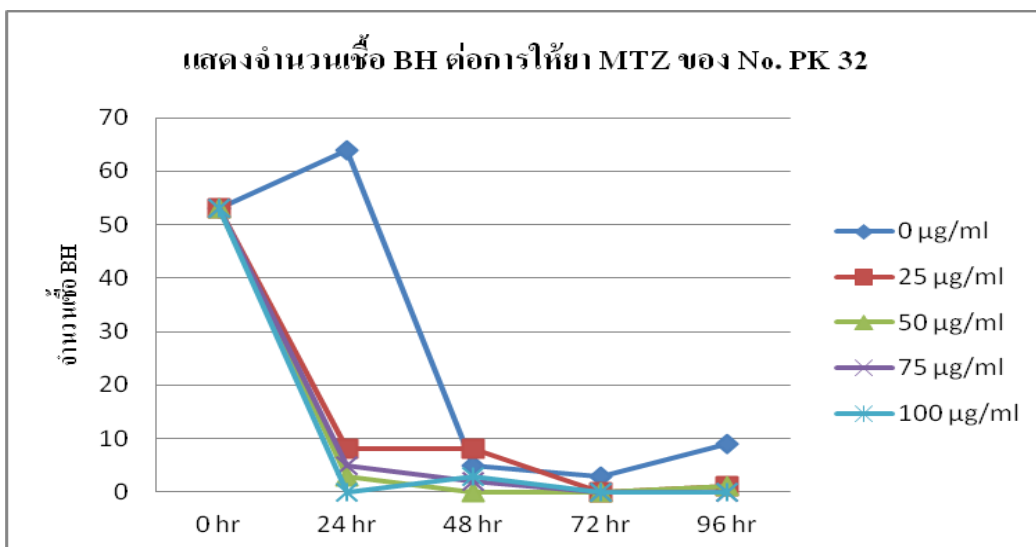
ตารางที่ 11 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ No. AS53 ใน LES ที่ไม่มีแป้งข้าวเจ้า

	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH (No.AS 53)				
	0 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml
0 hr	190	190	190	190	190
24 hr	27	7	6	6	2
48 hr	16	12	32	21	74
72 hr	0	2	0	0	0
96 hr	122	5	1	2	0



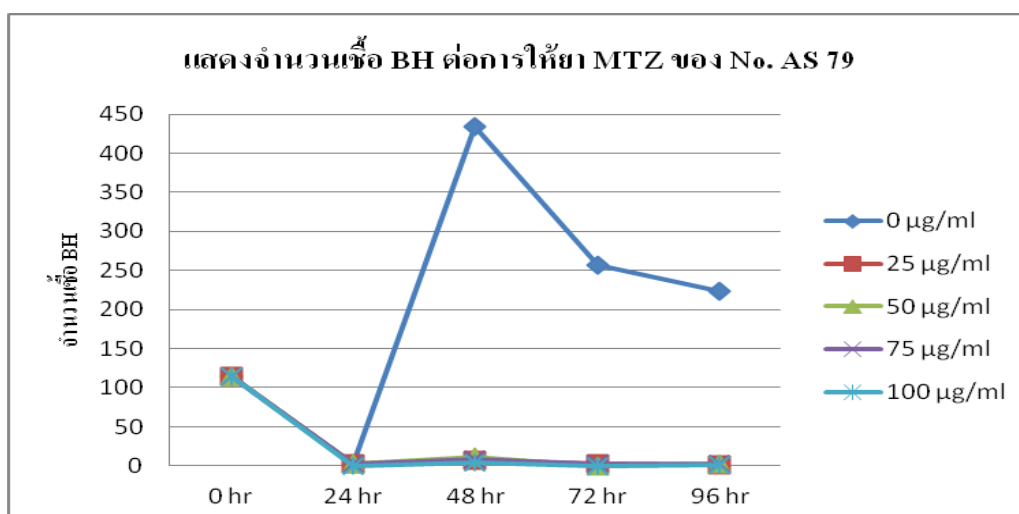
ตารางที่ 12 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ No. PK 32 ใน LES ที่ไม่มีแป้งข้าวเจ้า

	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH (No.PK 32)				
	0 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml
0 hr	53	53	53	53	53
24 hr	64	8	3	5	0
48 hr	5	8	0	2	3
72 hr	3	0	0	0	0
96 hr	9	1	1	0	0



ตารางที่ 13 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ No. AS 79 ใน LES ที่ไม่มีแป้งข้าวเจ้า

	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH (No.AS 79)				
	0 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml
0 hr	115	115	115	115	115
24 hr	3	2	2	3	0
48 hr	434	7	12	9	4
72 hr	257	3	0	2	0
96 hr	224	1	3	2	1



จากผลการทดสอบความไวของยา metronidazole ในผู้ติดเชื้อทั้ง 3 ราย พบว่า เมื่อไม่มีแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อ *Blastocystis* sp. ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วหรือตายเกือบหมด ภายใน 24 ชั่วโมง ทำให้ไม่สามารถแปรผลได้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบหาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ที่สามารถเลี้ยงเชื้อได้ โดยไม่ทำให้เชื้อเกาะกลุ่มกัน

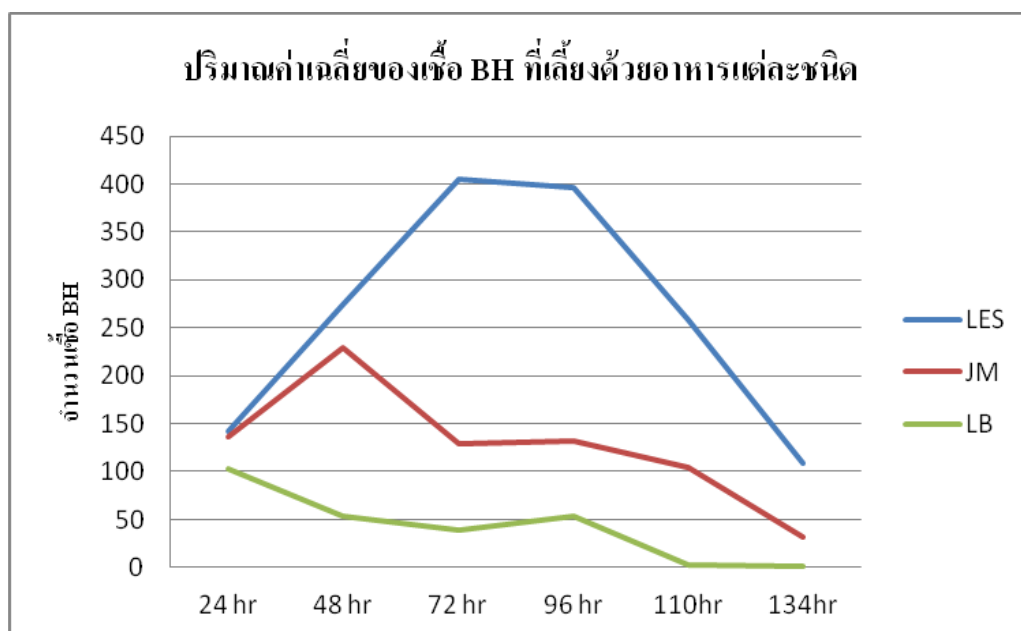
3. ทดสอบการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis* sp. ชนิด Jones's medium (JM)

Locke egg serum medium (LES) และ LB Broth

เลือกตัวอย่างมาจำนวน 5 ราย ได้แก่ No.62, No.82, No.96, No.115, No.116 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis* sp. ชนิด Jones's medium (JM), Locke egg serum medium (LES) และ LB Broth นับเชื้อทุกๆ 24 hr คูปริมาณเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ (คำนวณหาค่าเฉลี่ย) แสดงดังตาราง

ตารางที่ 14 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Blastocystis* sp ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

	ชนิดอาหาร		
	LES	JM	LB
24 hr	142.2	135.6	103.2
48 hr	273.6	229.6	54
72 hr	405	128.4	39.4
96 hr	396	131.4	53.8
110hr	257.6	104.2	3.2
134hr	109	31.4	1



จากการเปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Locke egg serum medium (LES) สามารถเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis* sp. ได้ดีที่สุด โดยเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนเชื้อได้มากและนานถึง 72 ชั่วโมง ก่อนที่จำนวนเชื้อจะค่อยๆ ลดลง ในขณะที่อาหารชนิด Jones's medium (JM) ทำให้เชื้อเพิ่มปริมาณได้น้อยกว่า และมีจำนวนมากที่สุดที่ 48 ชั่วโมง ส่วนการใช้ LB Broth แม้เชื้อจะสามารถเลี้ยงเชื้อได้ แต่ก็ไม่สามารถทำให้เชื้อเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ ทำให้เชื้อค่อยๆ ลดจำนวนลงและตายทั้งหมด ที่ 110 ชั่วโมง

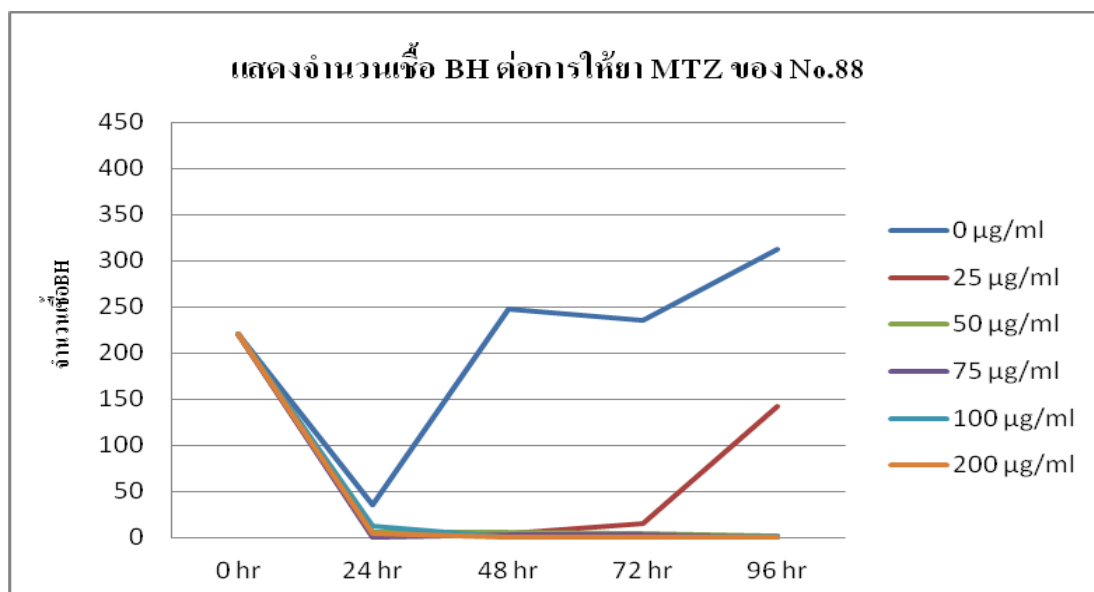
แม้ว่าอาหารชนิด Locke egg serum medium (LES) จะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแก่การเพิ่มปริมาณเชื้อให้มีปริมาณมาก แต่ทำให้เชื้อเกิดการเกาะกลุ่มกัน เชื้อไม่กระจายทั่วเท่ากันภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ การคูณเชื้อมานับจำนวนแต่ละครั้งจึงนับจำนวนได้ยาก และได้จำนวนที่แตกต่างกัน จึงไม่เหมาะสมกับการศึกษาการดื้อยาของเชื้อ อาหารชนิด Jones's medium (JM) จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นอาหารเพื่อที่จะทดสอบความไวต่อยาของเชื้อมากกว่าผู้วิจัยจึงเรียกอาหาร JM เป็นอาหารสำหรับในการศึกษาต่อไป

4. ทดสอบความไวยา metronidazole ของเชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลองด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Jones's medium

จากการทดสอบเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Jones's medium ได้ผลดีกว่า จึงทำการทดสอบความไวยา เลือกตัวอย่างมาจำนวน 3 ราย ได้แก่ No.16, No.55, No.88 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด Jones's medium (JM) โดยใช้ความเข้มข้นของยา metronidazole ตั้งแต่ 0 µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml, 100µg/ml นับเชื้อทุกๆ 24 hr คูปริมาณที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตรอดชีวิตได้

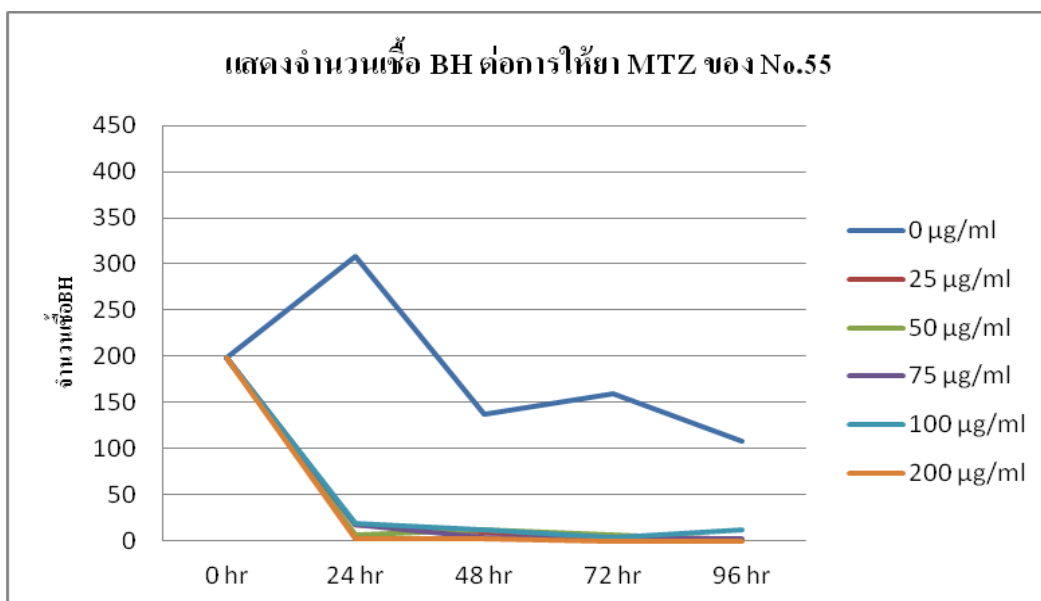
ตารางที่ 15 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ No. 88 ใน Jones's medium (JM)

	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH (No.88)					
	0 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
0 hr	220	220	220	220	220	220
24 hr	36	2	6	0	12	4
48 hr	248	4	6	3	0	0
72 hr	235	15	4	3	1	0
96 hr	312	142	2	1	2	0



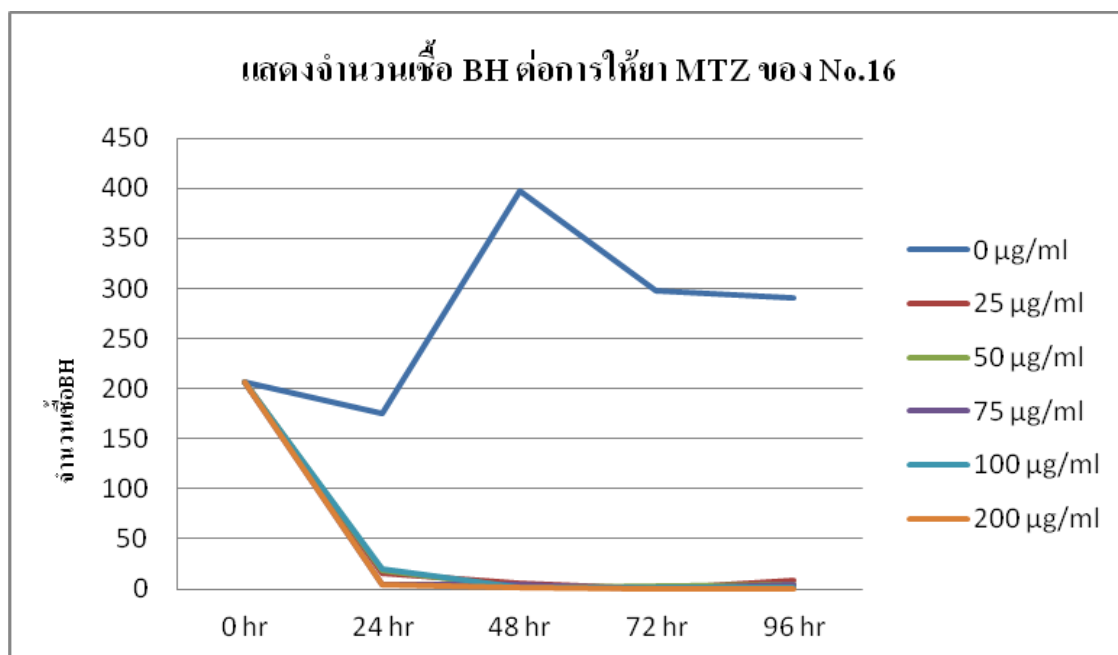
ตารางที่ 16 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ No. 55 ใน Jone's medium (JM)

	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH (No.55)					
	0 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
0 hr	198	198	198	198	198	198
24 hr	309	18	7	18	19	2
48 hr	138	9	13	4	12	2
72 hr	160	3	7	4	4	0
96 hr	108	1	1	2	12	0



ตารางที่ 17 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ No. 16 ใน Jone's medium (JM)

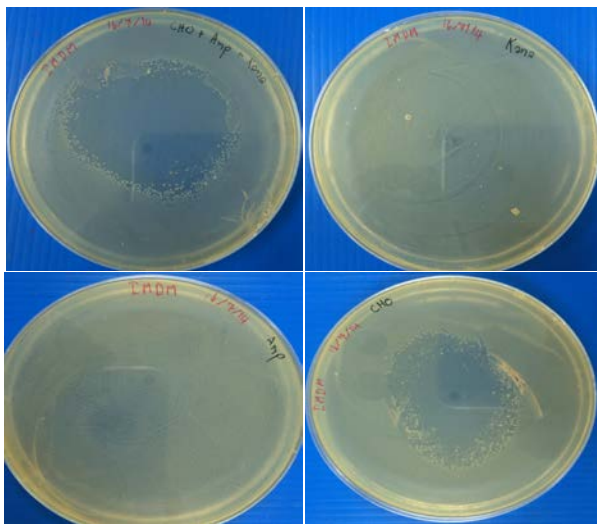
	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH (No.16)					
	0 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
0 hr	206	206	206	206	206	206
24 hr	175	16	18	4	20	4
48 hr	397	6	2	5	2	2
72 hr	298	0	3	0	1	0
96 hr	290	8	4	4	1	0



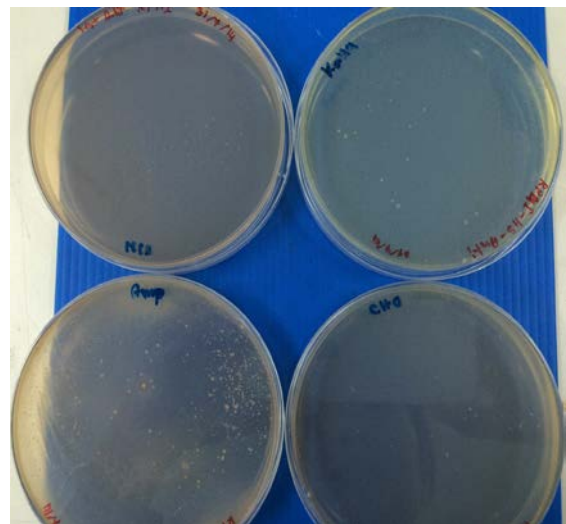
จากการทดสอบความไวยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. ในหลอดทดลองด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Jone's medium พบว่าเชื้อ *Blastocystis* sp. ตายหมดอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงในทุกความเข้มข้นของยา นอกจากนี้ยังพบว่า ในหลอดควบคุมซึ่งไม่มียา metronidazole ให้ผลการเจริญเติบโตของเชื้อแตกต่างกัน จึงทำให้ไม่สามารถสรุปผลความไวของยาได้แน่ชัด ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีการทดสอบความไวของยาในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด agar แทน เพื่อทดสอบความไวโดยดู clear zone รอบแผ่นยา

5. ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar plate) เปรียบเทียบกับอาหารแบบเหลว (broth) โดยใช้อาหารชนิด IMDM กับอาหารชนิด RPMI

5.1 ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Blastocystis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ agar plate โดยใช้อาหารชนิด IMDM เทียบกับอาหารชนิด RPMI ที่ผสมยายับยั้งแบคทีเรีย Ampicillin Kanamycin Chloramphenicol และรวมทั้ง 3 ชนิด เพื่อศึกษาว่าอาหารชนิดใดที่เชื้อ *Blastocystis* sp. สามารถเจริญเติบโตและกระจายตัวได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนน้อยที่สุด เพื่อนำไปมาทดสอบความไวต่อยา metronidazole โดยดูบริเวณ clear zone ที่ยาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ต่อไป



อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Agar plate ชนิด IMDM

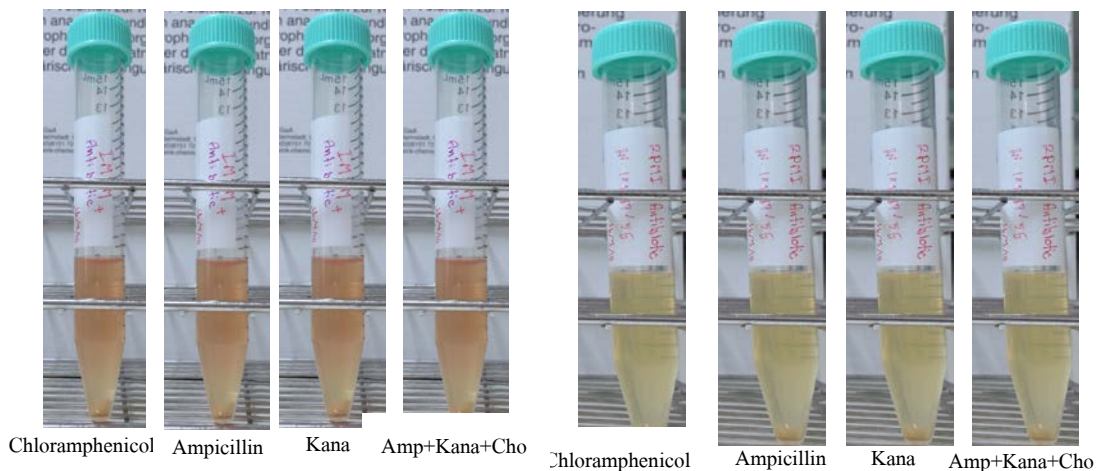


อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Agar plate ชนิด RPMI

รูปที่ 6 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง ชนิด IMDM และ RPMI

จากการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ agar plate โดยใช้อาหารชนิด IMDM เทียบกับอาหารชนิด RPMI พบว่าไม่สามารถบอกได้ว่าอาหารชนิดใดทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดีกว่ากัน เนื่องจากเชื้อ *Blastocystis* sp. เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในอาหารทั้ง 2 ชนิดได้น้อยมาก และไม่กระจายตัวทั่วทั้ง plate อีกทั้งยังพบเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนเจริญเติบโตเป็นจำนวนมาก อาจเป็นสาเหตุให้เชื้อแบคทีเรียแย่งการเจริญเติบโตของ เชื้อ *Blastocystis* sp.

5.2 ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ broth โดยใช้อาหารชนิด IMDM เปรียบเทียบกับอาหารชนิด RPMI ที่ผสมยาขยับยั้งแบคทีเรีย Ampicillin Kanamycin Chloramphenicol และรวมทั้ง 3 ชนิด ว่าอาหารชนิดใดที่เชื้อ *Blastocystis* sp. สามารถเจริญเติบโตแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และกระจายตัวได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนน้อยที่สุด เพื่อสามารถนำไปวัดหาค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Blastocystis* sp. (minimum inhibitory concentration; MIC) ต่อไป



อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Agar plate ชนิด IMDM

อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Agar plate ชนิด RPMI

รูปที่ 7 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ชนิด IMDM และ RPMI

ผลการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ broth โดยใช้อาหารชนิด IMDM เทียบกับอาหารชนิด RPMI ว่าอาหารชนิดใดที่เชื้อ *Blastocystis* sp. ผลปรากฏว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด IMDM เลี้ยงเชื้อ *Blastocystis* sp. ได้ดีกว่าอาหารชนิด RPMI โดยอาหารชนิด IMDM สามารถเลี้ยงเชื้อได้ 3.13×10^6 cell/ml และอาหารชนิด RPMI เลี้ยงเชื้อได้ 2.92×10^6 cell/ml แต่อย่างไรก็ตาม อาหารชนิด IMDM มีปริมาณแบคทีเรียเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นด้วยมากกว่าปริมาณในอาหารชนิด RPMI ดังนั้น อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI จึงเหมาะแก่การนำมาทดสอบความไวยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp.

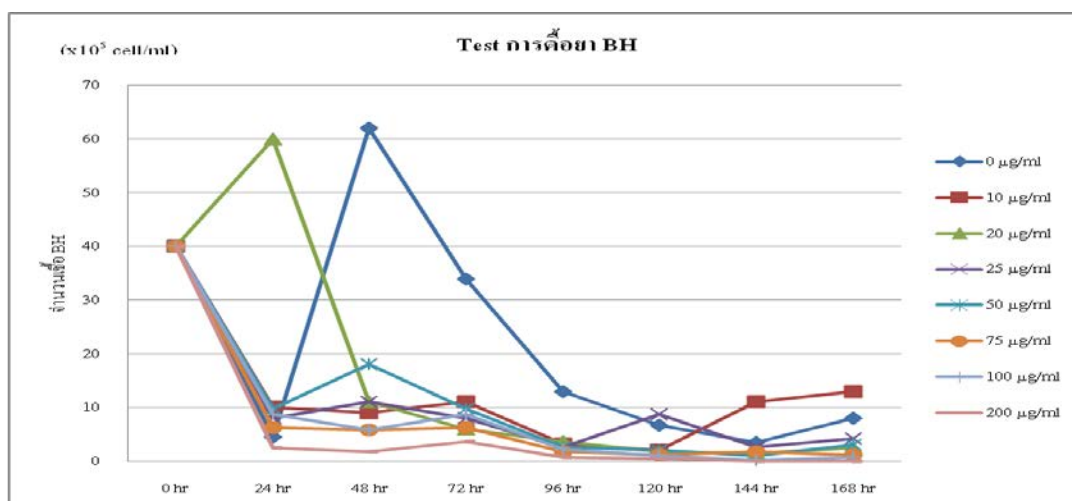
6. ทดสอบความไวยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI

จากการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar plate) เทียบกับอาหารแบบเหลว (broth) โดยใช้อาหารชนิด IMDM กับอาหารชนิด RPMI พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ broth ชนิด RPMI เหมาะสมในการทดสอบยามากกว่าชนิด IMDM จึงทำการทดสอบความไวต่อยา metronidazole โดยเลือกตัวอย่างผู้ติดเชื้อมา 1 ราย เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI โดยใช้ความเข้มข้นของยา metronidazole ตั้งแต่ 0 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ และ 200 $\mu\text{g/ml}$ นับจำนวนเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ดูปริมาณเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตรอดชีวิตได้จากการย้อมสี trypan blue เพื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC)

จากการทดสอบความไวยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ broth ชนิด RPMI เพื่อดูปริมาณที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตรอดชีวิตได้ ผลปรากฏว่าไม่สามารถนำไปวัดหาค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Blastocystis* sp. ได้

ตารางที่ 17 ความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. จากผู้ติดเชื้อ
ใน RPMI

	ตารางแสดงผลการรอดชีวิตของเชื้อ BH							
	0 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
0 hr	40	40	40	40	40	40	40	40
24 hr	4.5	10	60	8	9.8	6.3	8.8	2.5
48 hr	62	9	11	11	18	5.8	5.8	1.7
72 hr	34	11	6	8	9.8	6.3	8.8	3.7
96 hr	13	3.2	3.7	2.7	2.7	1.7	2.2	0.7
120 hr	6.7	2	1.7	8.7	2	1.2	1	0.5
144 hr	3.5	11	1.5	2.7	1	1.7	0.2	0
168 hr	8	13	2.5	4.2	3	1.2	0.7	0



7. การสำรวจหาผู้ติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ที่มีการดื้อยา metronidazole

จากการพัฒนาระบบเพื่อพัฒนาการทดสอบความไวต่อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. ในหลอดทดลอง เพื่อหาค่า MIC และสร้าง *Blastocystis* sp. สายพันธุ์ดื้อยาในหลอดทดลอง พบว่าการใช้เทคนิคที่ใช้กับแบคทีเรียไม่สามารถพัฒนาสร้าง *Blastocystis* sp. สายพันธุ์ดื้อยาในหลอดทดลองได้เหมือนกับแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงได้รวบรวมตัวอย่างเพิ่มเติมจากผู้ติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่มีอาการทางคลินิก รวมทั้งสิ้น 25 ราย พบผู้ติดเชื้อที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา metronidazole ซึ่งสงสัยว่ามีการดื้อยาจำนวน 3 ราย จึงได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อและสกัด DNA จากผู้ติดเชื้อทั้ง 25 รายเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ferredoxin เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อ *Blastocystis* sp. ที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาต่อไป

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยา methonidazole กับสายพันธุ์ของเชื้อ *Blastocystis* sp. พบว่าเชื้อ *Blastocystis* sp. ที่ไม่ดื้อยามี subtype 2 จำนวน 1 รายจากทั้งหมด 23 ราย และเป็น subtype 3 จำนวน 22 ราย ในขณะที่เชื้อ *Blastocystis* sp. ที่ดื้อยาเป็น subtype 3 ทั้งหมด โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสายพันธุ์ในระหว่างกลุ่มเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยา ($P>0.05$) ดังนั้น จึงไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยา methonidazole กับสายพันธุ์ของเชื้อ *Blastocystis* sp.

ตารางที่ 18 สายพันธุ์ของเชื้อ *Blastocystis* sp. ที่แยกได้จากผู้ติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา metronidazole

กลุ่มผู้ป่วย	Subtype ของ <i>Blastocystis</i> sp.			รวม
	Subtype 1	Subtype 2	Subtype 3	
ตอบสนองต่อยา	0	1	22	23
ไม่ตอบสนองต่อยา	0	0	2	2
รวม	0	1	24	25

- ศึกษายีนดื้อยา metronidazole ใน *Blastocystis hominis*

ทำการศึกษารูปร่างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของเชื้อ *B. hominis* จาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากการเผยแพร่ข้อมูลของ Wincker,P. ในปี 2010 จากโครงการ “whole genome shotgun sequencing project” โดยเป็นฐานข้อมูล genomic DNA ของ *B. hominis* เพื่อทำการศึกษาในระดับโมเลกุล (Molecular) ได้ดียิ่งขึ้น โดย *B. hominis* (Taxonomy ID: 12968) มาจากสาย Singapore isolate B (subtype 7) ซึ่งจัดเป็น *B. hominis* เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Stramenopile เช่นเดียวกับ algae และ diatom [1] โดย *B. hominis* นี้มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 18.8 Mb (รูปที่ 8)

ASM15166v1

Organism name: [Blastocystis hominis](#)
 Submitter: Genoscope - Institut de Genomique - CEA
 Date: 2010/07/06
 Assembly level: Scaffold
 Genome representation: full
 GenBank Assembly ID: GCA_000151665.1 (latest)
 RefSeq Assembly ID: n/a
 RefSeq Assembly and GenBank Assembly Identical: n/a
 WGS Project: [CABX01](#)
 IDs: 175048 [UID] 175048 [GenBank]

History ([Show revision history](#))

Global statistics

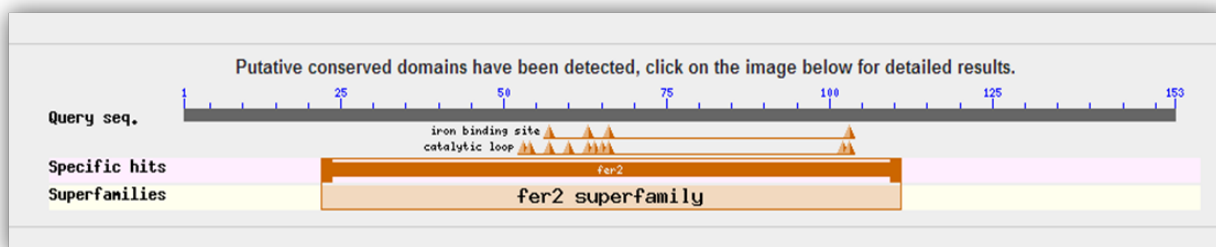
Total sequence length	18,817,245
Total assembly gap length	73,536
Gaps between scaffolds	0
Number of scaffolds	54
Scaffold N50	900,598
Number of contigs	155
Contig N50	296,810
Total number of chromosomes and plasmids	0

รูปที่ 8 : รายละเอียดของ *Blastocystis hominis* whole genome shotgun sequencing project

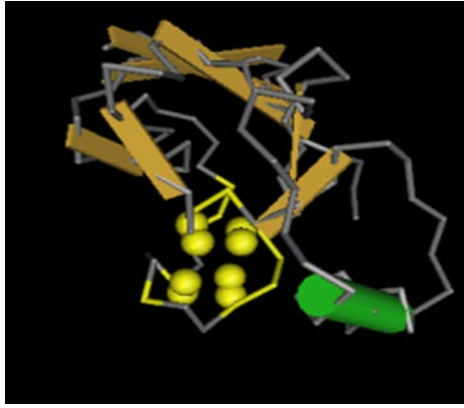
จากฐานข้อมูลสามารถทราบตำแหน่งและนิวคลีโอไทด์ของ Ferredoxin gene ซึ่งเป็นยีนดีออกซา Metronidazole ยีนแรกที่เราสนใจ คือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 828169 ถึง 828758 จากนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด โดย Ferredoxin นี้ประกอบด้วย Coding sequence 5 exons จำนวน 153 amino acid (รูปที่ 9) โดย Ferredoxin จัดอยู่ใน 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain (รูปที่ 10) ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transfer processes) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron carrier) ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นตัวร่วมในปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox reaction) ในกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ต่างๆภายในเซลล์

จากพื้นฐานความรู้ดังกล่าวทำให้นักวิจัยสนใจศึกษาหาความสัมพันธ์ของ ferredoxin นี้ต่อการดื้อยา metronidazole ที่ใช้รักษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ anaerobic microorganisms โดยกลไกการเปลี่ยนแปลง metronidazole ที่เข้าสู่เซลล์เป้าหมายและถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป active form โดยโมเลกุลของยาจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing agent) จากหมู่นิโตรเจน (Nitro group) โดยมี ferredoxin เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron carrier) (รูปที่ 11) กระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transport chain) นี้เกิดภายใน mitochondria บริเวณ hydrogenosome โดยยา metronidazole จะออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อโดยการทำลายสายดีเอ็นเอ (strand DNA breakage) ของเชื้อ [2][3]

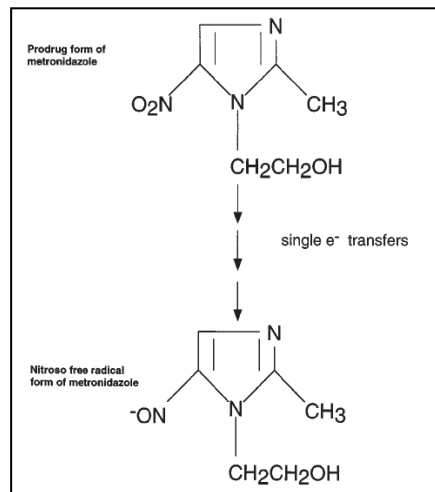


รูปที่ 9 : Ferredoxin จัดอยู่ใน 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain
(ที่มา NCBI>protein>BLAST)



รูปที่ 10 : โครงสร้างสามมิติของ Ferredoxin

(ที่มา <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>)



รูปที่ 11 : การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของยา metronidazole ให้อยู่ในรูป active form

(ที่มา Land, K.M. และคณะ, 1999)

จากการศึกษาการดื้อยา metronidazole ในเชื้อ *Trichomonas vaginalis* ของ Quon DV และคณะในปี 1992 ด้วยวิธี nuclear run-on assays พบว่า ferredoxin gene transcription ลดลง 40-65% ในสายพันธุ์ดื้อยา (resistant strains) และเมื่อทำการศึกษาต่อพบว่าความผิดปกติของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ทางปลาย 5' ของ resistant strains โดยพบ point mutations 2 ตำแหน่งคือ -178 และ -239 ซึ่งเป็นบริเวณเริ่มต้นของ DNA transcription [4] ดังนั้นหาก DNA มีความผิดปกติที่บริเวณดังกล่าวอาจส่งผลให้กระบวนการ transcription ของ ferredoxin ลดลง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาความสัมพันธ์ของยีน ferredoxin ต่อการดื้อยา metronidazole ในเชื้อ *B. hominis*

- **ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ferredoxin (Fd) ใน *Blastocystis* sp.**

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *B. hominis* ใน NCBI database ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและออกแบบ primer ที่จำเพาะกับยีน ferredoxin ของเชื้อ *B. hominis* ด้วย NCBI/Primer-Blast program ดังภาพที่ 12 บริเวณสีชมพูคือตำแหน่งของ primer ต่างๆ ที่แสดงบนลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (reference sequence) ของ *B. hominis* Singapore isolate B (subtype 7) โดยออกแบบ forward primer (primer Frd-F) ย้อนไกลขึ้นมาจากปลาย 5' ไป 420 base ให้ครอบคลุมบริเวณที่เป็น transcription domain ด้วย (บริเวณสีเหลือง) เพื่อให้สามารถตรวจวัดความผิดปกติของนิวคลีโอไทด์ที่มีผลต่อกระบวนการ transcription ทั้งบริเวณ encoding และ non-encoding protein และออกแบบ reverse primer (primer Frd-R1) ให้ครอบคลุมจนหมด exon 5 โดย PCR product ที่ได้จะมีขนาด 1056 bp

จากความพยายามเพิ่มจำนวน ยีน ferredoxin แบบเต็มยีนนี้หลายครั้ง ผู้วิจัยสามารถเพิ่มจำนวนยีนดังกล่าวได้จากผู้ติดเชื้อเพียง 1 ราย (รูปที่ 13) แต่พบ band ที่บางและไม่บริสุทธิ์ แม้ผู้วิจัยได้พยายามเพิ่มจำนวนซ้ำ (re-amplification) กลับไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนดังกล่าวได้อีก นอกจากนี้ จากการพยายามเพิ่มจำนวนในผู้ติดเชื้อรายอื่นๆ โดยใช้ DNA ที่ได้ทั้งจากการสกัดจากอุจจาระสด DNA ที่สกัดจากเชื้อ *B. hominis* ที่เพิ่มจำนวนในการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LES รวมถึงเชื้อ *B. hominis* ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ โดยวิธี Ficoll hypaque gradient centrifugation ก็ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีน ferredoxin แบบเต็มยีนได้ (รูปที่ 13) อาจเนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมจาก DNA ที่สกัดจากอุจจาระมักจะมี PCR inhibitor ปนเปื้อน นอกจากนี้ในขั้นตอนการสกัด DNA จากอุจจาระจะมีการใช้ glass bead เพื่อแยกเชื้อออกจากกากอุจจาระจึงมีโอกาสที่ genomic DNA จะแตกหักเสียหายได้ง่าย ทำให้ genomic DNA ที่ได้มีคุณภาพดีไม่เพียงพอ ไม่สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่มีขนาดใหญ่ได้ นอกจากนี้ ยีน ferredoxin เป็นยีนที่เป็น single copy gene ทำให้ยากต่อการเพิ่มจำนวนในสภาวะจำกัดเช่นนี้ แม้จะพยายามปรับสภาวะของ PCR หลายครั้ง รวมทั้งการเติม BSA เพื่อเพิ่มความสามารถของ PCR แต่ก็ยังไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีน ferredoxin ได้ หรือสันนิษฐานว่า primer ที่ออกแบบมาจากยีนของ *B. hominis* Singapore isolate B (subtype 7) ไม่สามารถจับกับ *Blastocystis* ที่พบในประเทศไทยได้

ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบ reverse primer เพิ่มอีก 1 เส้น (primer Frd-R1) อยู่ในบริเวณ exon 2 (รูปที่ 12) เพื่อให้ได้ PCR product ขนาด 587 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR โดยภายหลังการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนดังกล่าว พบ PCR product ขนาด 886 bp เป็น single band อย่างชัดเจน (รูปที่ 14) แม้ว่าขนาดที่พบจะไม่ตรงใช้ขนาดที่คาดการณ์ไว้ก็ตาม แต่เนื่องจาก primer ที่ใช้ได้ออกแบบมาจากเชื้อ *B. hominis* Singapore isolate B (subtype 7) ซึ่งอาจจะมีความแตกต่างกับ *Blastocystis* sp. ในประเทศไทย ผู้วิจัยจึงทำการสกัด DNA จาก agarose gel จากนั้นส่งตรวจสอบ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) (รูปที่ 15) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ferredoxin (Fd) มาวิเคราะห์โดยทำการ blast sequence ในฐานข้อมูล Genbank ของ NCBI เพื่อเทียบลำดับ sequence ที่ได้กับของยีน ferredoxin (Fd) ในฐานข้อมูล อย่างไรก็ตาม พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กลับมีความเหมือนกับแบคทีเรีย *Prevotella dentalis* มากที่สุด (74% identity) และไม่ตรงกับลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน ferredoxin ของ *B.hominis* Singapore isolate B (subtype 7) เลย (รูปที่ 16) ซึ่งทำให้ยืนยันได้ว่าน่าจะมีการแตกต่างของยีนโนมของเชื้อ *Blastocystis* sp. ที่อยู่ในฐานข้อมูลซึ่งเป็น *B.hominis* Singapore isolate B (subtype 7) กับสายพันธุ์ของเชื้อ *Blastocystis* sp. ที่พบในไทย ซึ่งจากการศึกษาของผู้วิจัยในการศึกษาการกระจายของสายพันธุ์ของเชื้อ *Blastocystis* sp. ทั่วประเทศพบว่าสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยคือสายพันธุ์ 3 ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแผนการศึกษาจีโนมของสายพันธุ์ *Blastocystis* subtype 3 ต่อไป

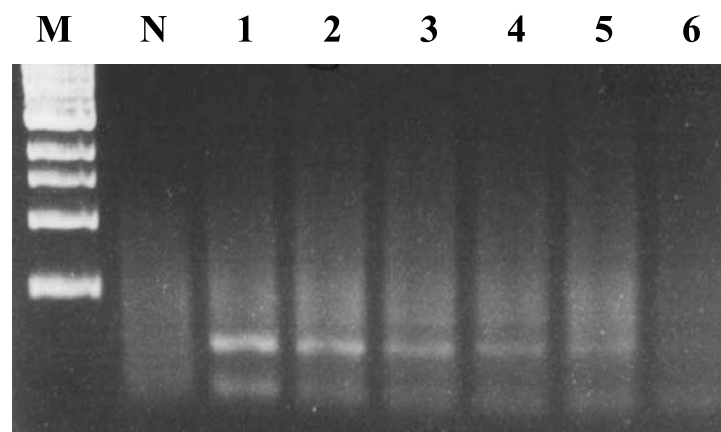
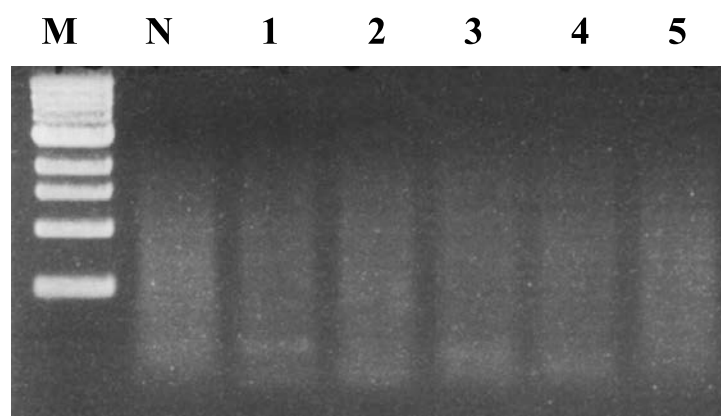
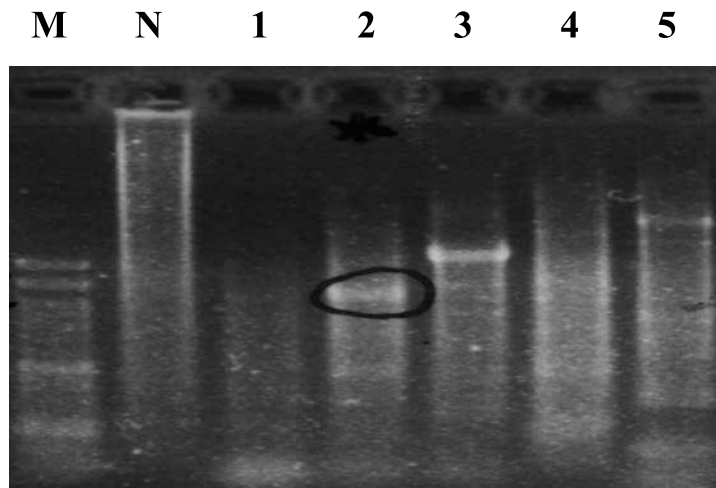


รูปที่ 12: ตำแหน่ง ferredoxin primer บน reference sequence

[*Blastocystis hominis*, Singapore isolate B (sub-type 7)]

ตารางที่ 19 primer ที่จำเพาะกับยีน ferredoxin ของเชื้อ *B. hominis*

Primer Name	Oligonucleotide (5' to 3')
Frd-F	5'- GGC TCA CTC CCC TTC TCT TGC -3'
Frd-R1	5' – GGC GCC TAT GTT GGG TAT GTG -3'
Frd-R2	5'- CGG GTT CTG CCT TCA CTG TC -3'

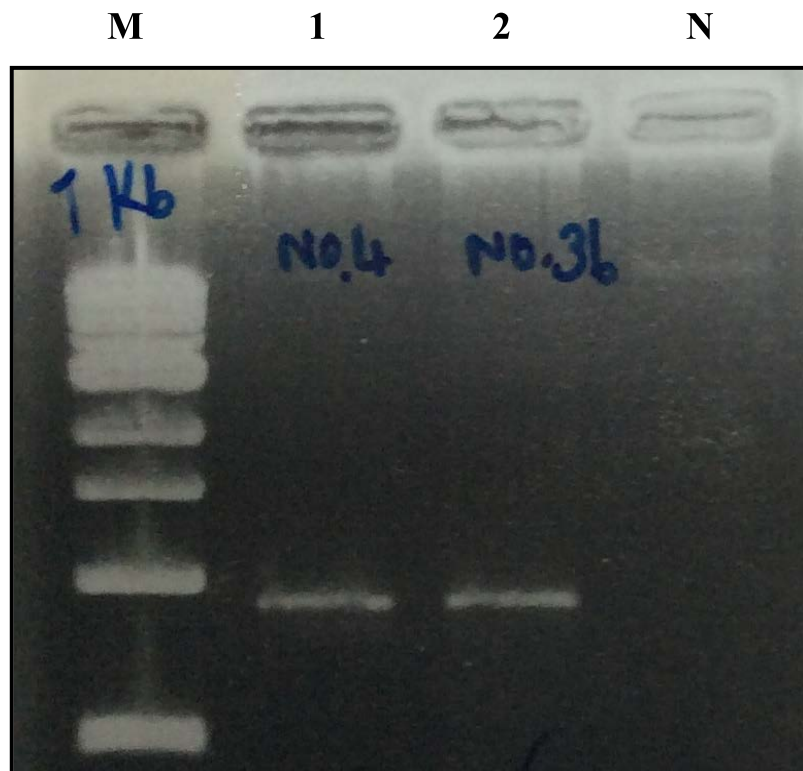


รูปที่ 13

การเพิ่มปริมาณยีน Ferredoxin ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)
โดย Frd-F และ Frd-R1 primer

Lane M : 1 kb DNA ladder; N: Negative control;

Lane 1- 6 DNA จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ซึ่ง
สามารถเพิ่มจำนวน small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) ได้



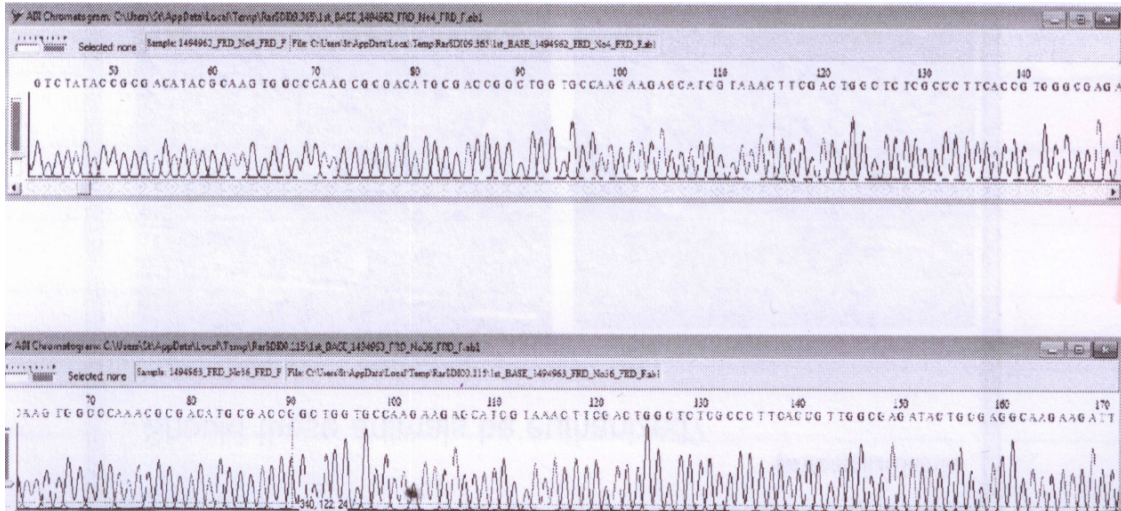
รูปที่ 14

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน Ferredoxin

ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดย Frd-F และ Frd-R2

Lane M : 1 kb DNA ladder; Lane 1- 2 DNA จากตัวอย่างอุจจาระ

ของผู้ติดเชื้อ *Blastocystis* sp.; N: Negative control



รูปที่ 15 chromatograms ที่ได้จาก DNA sequencing ของชิ้นส่วนยีน Ferredoxin

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments: [Downward Arrow] GenBank Graphics Distance from results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Prevotella distalis DSM 5088 chromosome 2, complete sequence	396	396	74%	3e-106	74%	CP003289.1
Prevotella intermedia F0209, complete genome	311	311	73%	9e-81	70%	CP002588.1
Prevotella intermedia ATCC 29845 chromosome II, complete sequence	205	273	54%	9e-49	75%	CP002123.1
Prevotella carnisalis 23, complete genome	196	196	83%	5e-46	67%	CP002800.1
Prevotella intermedia 17, chromosome II, complete sequence	93.3	93.3	19%	4e-15	74%	CP003503.1
Mouse 129/SvEvEvms genome (MG24:17751 on chromosome 4, complete sequence)	51.8	51.8	3%	0.012	94%	U014955.8

รูปที่ 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน ferredoxin ในฐานข้อมูล Genbank

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจผู้ตรวจโรคปรสิตในลำไส้ในเด็กนักเรียนทั่วประเทศไทยจำนวน 1,909 ราย พบว่ามีอัตราการติดเชื้อสูงถึง 37.3% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาต่างๆ ที่พบการติดเชื้อปรสิตในลำไส้ในเด็กเป็นจำนวนมาก 4.24-47.1% (Saksirisampant *et al.*, 2003; 2004; 2006; Matthy *et al.*, 2011) โดยจากการศึกษานี้ พบว่าปรสิตที่ตรวจพบมากที่สุด คือ *Blastocystis* sp. (33.1%) ซึ่งแตกต่างจากรายงานต่างๆ ที่รายงานพบพยาธิไส้เดือน (16-49%) พยาธิปากขอ (22-38%) พยาธิเส้นด้าย (4-33%) พยาธิใบไม้ในตับ (12-24%) ในขณะที่ *Blastocystis* sp. พยาธิแส้ม้า และ โปรโตซัว พบได้ในความชุกที่น้อยกว่า นอกจากนี้ การศึกษานี้ยังพบว่าอัตราความชุกของการติดเชื้อปรสิตในลำไส้ชนิดต่างๆ ยังแตกต่างกันไปในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศ ซึ่งอาจเกิดจากลักษณะทางภูมิภาค เชื้อชาติ วัฒนธรรม ตลอดจนสุขอนามัยของประชากรในแต่ละภูมิภาค

การสำรวจโรคปรสิตลำไส้ในเด็กนักเรียนในจังหวัดกาญจนบุรีซึ่งเป็นจังหวัดที่ตรวจพบปรสิตในลำไส้สูงที่สุดถึง 83.1% พบ โปรโตซัว *Blastocystis* sp. (82.4%) และ *G. lamblia* (16.8%) ซึ่งเป็นปรสิตที่มีการติดต่อเหมือนกันคือติดต่อจากการดื่มน้ำที่ปนเปื้อนระยะติดต่ออยู่ ทั้งนี้ เนื่องจากเด็กนักเรียนในจังหวัดกาญจนบุรีส่วนมากเป็นชาวไทย-กะเหรี่ยง และชาวพม่า ซึ่งมีความรู้ทางสุขอนามัยน้อย นอกจากนี้จากการสำรวจพื้นที่ยังพบว่า น้ำดื่มที่โรงเรียนและครัวเรือนใช้เป็นน้ำประปาภูเขา ซึ่งเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญของปรสิตระยะติดต่อทั้งสองชนิด

การสำรวจโรคปรสิตลำไส้ในเด็กนักเรียนในภาคเหนือ พบว่า มีอัตราการติดเชื้อปรสิตในลำไส้สูงถึง 54.6% ซึ่งไม่แตกต่างจากรายงานก่อนหน้านี้ (48.9-53.7%) (Garavelli *et al.*, 1988, Piangjai *et al.*, 2003) โดยนอกจากพบอัตราการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. (43.8%) สูงแล้ว ยังพบอัตราการติดเชื้อพยาธิไส้เดือนอีกด้วย (26.3%) ทั้งนี้เด็กนักเรียนในจังหวัดน่านเป็นเด็กชาวไทย-กะเหรี่ยง ใช้น้ำประปาภูเขาเช่นเดียวกับเด็กในจังหวัดกาญจนบุรี นอกจากนี้จากการสำรวจพื้นที่อาศัยของเด็กนักเรียนพบว่าที่อยู่อาศัยไม่มีห้องสุขา จึงอาจเป็นแหล่งแพร่กระจายของพยาธิไส้เดือน อย่างไรก็ตาม จากการสังเกตพบว่าเด็กนักเรียนส่วนมากไม่มีรองเท้าใส่ แต่กลับพบการติดเชื้อพยาธิปากขอน้อยเพียง 0.8% อาจเนื่องมาจากการสำรวจดำเนินในระหว่างหน้าหนาว สภาพดินแห้งไม่เหมาะกับการเจริญเติบโตของพยาธิปากขอซึ่งอยู่อาศัยตามพื้นดิน

สำหรับการสำรวจโรคปรสิตในเด็กนักเรียนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้ทำการสำรวจ 2 จังหวัด คือ จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดขอนแก่น ซึ่งพบว่ามีอัตราความชุกที่แตกต่างกัน โดยพบการติดเชื้อปรสิตในลำไส้ในเด็กนักเรียนจังหวัดขอนแก่น (43.6%) มากกว่าจังหวัดนครราชสีมา (0.5%) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสุขอนามัยสิ่งแวดล้อมและสถานะของครอบครัวที่แตกต่างกันของโรงเรียนทั้งสอง โดยจากแบบสอบถามพบว่านักเรียนในจังหวัดนครราชสีมาอยู่ในครอบครัวข้าราชการทหารและ

ครู อีกทั้งโรงอาหารของโรงเรียนมีสุขอนามัยที่ดี แตกต่างจากนักเรียนในจังหวัดขอนแก่นซึ่งส่วนมากครอบครัวยุคใหม่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม โรงเรียนอยู่ในถิ่นทุรกันดาร และโรงอาหารมีสุขอนามัยที่ไม่ดี จากผลการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าการให้ความรู้และการศึกษาแก่ประชาชนให้เข้าใจถึงอันตรายจากโรคปรสิต ตลอดจนให้ความรู้ด้านสุขอนามัยและสิ่งแวดล้อมยังคงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการป้องกันโรคปรสิตได้

จากการเปรียบเทียบความไวในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ในตัวอย่างอุจจาระทั้ง 330 รายพบว่าวิธี simple smear ให้ผลบวกเพียง 2.73% ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี formalin ethyl-acetate concentration สามารถเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัยได้มากกว่า 2 เท่า โดยให้ผลบวกถึง 5.76% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาต่างๆ ซึ่งพบว่าการศึกษาด้วยวิธี เข้มข้นให้ความไวในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ได้มากกว่า simple smear ถึง 3 เท่า (Nuchprayoon *et al.*, 2009) ทั้งนี้เนื่องจากวิธี simple smear เป็นการป้ายอุจจาระปริมาณน้อยลงบนสไลด์ ซึ่งหากมีจำนวนเชื้อน้อยอาจทำให้ป้ายไม่โดนเชื้อ ส่วนวิธี formalin ethyl-acetate concentration เป็นเทคนิคที่ใช้ปริมาณอุจจาระมากขึ้น เพื่อเพิ่มความไวในการวินิจฉัย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี simple smear แต่ก็ยังมีข้อจำกัดสำหรับการวินิจฉัยเชื้อโปรโตซัว เนื่องจากเป็นวิธีที่จะต้องปั่นให้เชื้อตกตะกอนดังนั้นเชื้อโปรโตซัวบางระยะที่มีผนังเซลล์บางก็จะแตกได้ง่าย สำหรับวิธี PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง ให้ผลบวกถึง 20.61% ซึ่งให้ความไวในการวินิจฉัยสูงกว่าวิธี simple smear ถึง 10 เท่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Roberts (2011) ที่พบว่าวิธี PCR ให้ความไวในการวินิจฉัยได้ดีขึ้น 2 เท่า แต่อย่างไรก็ตามบางการศึกษาพบว่าวิธี PCR จากตัวอย่างอุจจาระมีความไวในการพบเชื้อเท่ากับวิธี Direct microscopy โดย Santos (2013) กล่าวว่า primer มีที่ให้อาจอยู่ในช่วงที่มีความหลากหลายของแต่ละ subtype นอกจากนี้จากการศึกษานี้พบว่าผู้ติดเชื้อถึง 85% ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี simple smear และวิธี formalin ethyl-acetate concentration แสดงให้เห็นว่าวิธี simple smear และวิธี formalin ethyl-acetate concentration ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป อาจไม่เพียงพอกับการศึกษาเพื่อประเมินสถานการณ์ที่แท้จริงของการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ได้

ถึงแม้ว่าวิธี PCR มีความไวกว่าทั้งสองวิธีที่กล่าวมาแต่ยังพบว่ายังมีบางตัวอย่างที่ตรวจพบในวิธี simple smear และวิธี formalin ethyl-acetate concentration แต่ไม่สามารถพบ *Blastocystis* sp. ในวิธี PCR ได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากรูปร่างบางระยะของเชื้อมีผลต่อการทำ PCR โดยการศึกษาของ Kuk (2012) พบว่า *Giardia* ระยะ trophozoites ให้ผล PCR ลบ แต่กลับพบว่าให้ผลบวกในตัวอย่างที่พบระยะ cyst หรืออีกสาเหตุอาจเกิดจากในอุจจาระมี inhibitor ที่เป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ (Abbaszadegan *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการวินิจฉัยด้วยวิธีทางปรสิตวิทยาอาจมีความไวไม่เพียงพอสำหรับการวินิจฉัยโรค ซึ่งจากการ

สำรวจความชุกที่แท้จริงของโรคปรสิตด้วยวิธีการวินิจฉัยที่มีความไวสูงพบว่า *Blastocystis* sp. เป็นโปรโตซัวมีอัตราการติดเชื้อสูงมากในทุกๆ ภูมิภาคของประเทศ อาจเนื่องมาจากการละเลยในการรักษาโรคที่ถูกต้อง ทำให้เชื้อมีการดื้อยาและแพร่กระจายไปอย่าง แม้ว่าจะมีรายงานการไม่ตอบสนองต่อยา metronidazole ในผู้ติดเชื้อ *Blastocystis* sp. แต่ยังไม่มีการศึกษาใดที่สามารถอธิบายถึงกลไกการเกิดการดื้อยาในเชื้อ *Blastocystis* sp.

เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานในการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (drug susceptibility test) ของเชื้อ โปรโตซัว ผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยา metronidazole ของ *Blastocystis* sp. เพื่อหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และพัฒนาสายพันธุ์ดื้อยาของ *Blastocystis* sp. ในห้องปฏิบัติการ โดยเปรียบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ Jones's medium (JM), Locke egg serum medium (LES), LB Broth, IMDM, และ RPMI โดยพบว่าเชื้อเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุดใน LES medium แต่ทำให้เชื้อเกาะกลุ่มกันจนไม่สามารถนับจำนวนได้จึงไม่เหมาะสมกับการทดสอบความไวต่อยา ส่วน RPMI เป็นอาหารเลี้ยงที่ เหมาะสมกับการทดสอบความไวของยามากที่สุด อย่างไรก็ตาม จากการทดลองเลี้ยงและเหนี่ยวนำให้เชื้อ *Blastocystis* sp. เกิดการดื้อยาพบว่ามีความลำบากในการทำการทดลองเนื่องจากเชื้อค่อนข้างมีความหลากหลายในรูปร่างและในแต่ละระยะของเชื้อมีผลต่อการทดลองแตกต่างกัน ในแต่ละความเข้มข้นของยา metronidazole ทำให้ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์ดื้อยาของเชื้อได้ในห้องปฏิบัติการ

จากการคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อของยา วิเคราะห์และศึกษาอัตราการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *Blastocystis* sp. ในประเทศ ได้มุ่งสนใจไปที่ยีน ferredoxin (Fd) เนื่องจากเชื่อว่ามี ความเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยา และได้ทำการออกแบบ primer จากยีน โนมของ *Blastocystis* sp. Singapore isolate B (subtype 7) อย่างไรก็ตาม เมื่อได้ทำการเพิ่มจำนวนยีน ferredoxin และเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 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 โดยผลจากการโครงการวิจัยนี้สามารถเตรียมผลิตผลงานตีพิมพ์ได้ทั้งสิ้นจำนวน 2 เรื่อง ได้แก่ 1) High prevalence of intestinal parasitic infections among school-age children in Thailand: a comparative study และ 2) Comparison the sensitivity for detection of *Blastocystis hominis* by Simple smear method Formalin-Ethyl Acetate Concentration Technique and Polymerase chain reaction methods

บรรณานุกรม

1. Babu S, Ganley LM, Klei TR, Shultz LD, Rajan TV. (2000) Role of gamma interferon and interleukin-4 in host defense against the human filarial parasite *Brugia malayi*. *Infection and Immunity*. 68: 3034-3035.
2. Behbehani K. (1998) Candidate parasitic diseases. *Bulletin of the World Health Organization*. 76 Suppl 2: 64-67.
3. Bhumiratana A, Koyadun S, Suvannadabba S, Karnjanopas K, Rojanapremsuk J, Buddhirakkul P, Tantiwattanasup W. (1999) Field trial of the ICT filariasis for diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infections in an endemic population of Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 30: 562-568.
4. Bhunia B, Bhandary YP, Reddy MV, Harinath BC. (2003) Analysis of IgG subclasses and IgE antibodies across the clinical spectrum of bancroftian filariasis in an endemic area. *Indian journal of pathology and microbiology*. 46: 113-117.
5. Das PK. (2002) Prospects of elimination of lymphatic filariasis in India. *ICMR Bulletin*. 32.
6. Day KP. (1991) The endemic normal in lymphatic filariasis: a static concept. *Parasitology Today*. 7: 341-343.
7. Dimock KA, Eberhard ML, Lammie PJ. (1996) Th1-like antifilarial immune responses predominate in antigen-negative persons. *Infection and Immunity*. 64: 2962-2967.
8. Dreyer G, Pires ML, de Andrade LD, Lopes E, Medeiros Z, Tenorio J, Coutinho A, Noroes J, Figueredo-Silva J. (1994) Tolerance of diethylcarbamazine by microfilaraemic and amicrofilaraemic individuals in an endemic area of Bancroftian filariasis, Recife, Brazil. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*. 88: 232-236.
9. Freedman DO. (1998) Immune dynamics in the pathogenesis of human lymphatic filariasis. *Parasitology Today*. 14: 229-234.
10. Freedman DO, Nutman TB, Ottesen EA. (1989) Protective immunity in bancroftian filariasis. Selective recognition of a 43-kD larval stage antigen by infection-free individuals in an endemic area. *The Journal of clinical investigation*. 83: 14-22.

11. Haarbrink M, Abadi GK, Buurman WA, Dentener MA, Terhell AJ, Yazdanbakhsh M. (2000) Strong association of interleukin-6 and lipopolysaccharide-binding protein with severity of adverse reactions after diethylcarbamazine treatment of microfilaremic patients. *The Journal of Infectious Diseases*. 182: 564-569.
12. Haarbrink M, Terhell AJ, Abadi GK, Mitsui Y, Yazdanbakhsh M. (1999) Adverse reactions following diethylcarbamazine (DEC) intake in 'endemic normals', microfilaraemics and elephantiasis patients. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*. 93: 91-96.
13. Haarbrink M, Terhell AJ, Abadi GK, Mitsui Y, Yazdanbakhsh M. (1999) Inflammatory cytokines following diethylcarbamazine (DEC) treatment of different clinical groups in lymphatic filariasis. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*. 93: 665-672.
14. Halma MAT, Wheelhouse NM, Barder MD, Powell JJ, Fearon KCH, Ross JA. (2005) Interferon- γ polymorphisms correlate with duration of survival in pancreatic cancer. *Human Immunology*. 65: 1405-1408.
15. Hise AG, Daehnel K, Gillette-Ferguson I, Cho E, McGarry HF, Taylor MJ, Golenbock DT, Fitzgerald KA, Kazura JW, Pearlman E. (2007) Innate immune responses to endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in *Brugia malayi* and *Onchocerca volvulus* are dependent on TLR2, TLR6, MyD88, and Mal, but not TLR4, TRIF, or TRAM. *Journal of Immunology*. 178:1068-1076.
16. Hoerauf A, Brattig N. (2002) Resistance and susceptibility in human onchocerciasis--beyond Th1 vs. Th2. *Trends in Parasitology*. 18: 25-31.
17. Jenson JS, O'Connor R, Osborne J, Devaney E. (2002) Infection with *Brugia* microfilariae induces apoptosis of CD4(+) T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. *European journal of immunology*. 32: 858-867.
18. Jitpakdi A, Choochote W, Panart P, Insun P, Panart K, Pitasawat B, Prajakwong S. (1999) Variation in microfilariae and infective stages of two types of *Wuchereria bancrofti* from the Thai-Myanmar border. *Journal of Helminthology*. 73: 317-321.
19. Karnjanopas K. (1997) The susceptibility of some strains *Culex quinquefasciatus* in Thailand to nocturnal periodic *Wuchereria bancrofti*. *Journal of Public Health*. 27: 169-177.

20. Kwan-Lim GE, Forsyth KP, Maizels RM. (1990) Filarial-specific IgG4 response correlates with active *Wuchereria bancrofti* infection. *Journal of Immunology*. 145: 4298-42305.
21. Lawrence RA. (2001) Immunity to filarial nematodes. *Veterinary parasitology*. 100: 33-44.
22. Maizels RM, Lawrence RA. (1991) Immunological tolerance: the key feature in human filariasis? *Parasitology Today*. 7: 271-276.
23. Molyneux DH, Bradley M, Hoerauf A, Kyelem D, Taylor MJ. (2003) Mass drug treatment for lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Trends in parasitology*. 19: 516-22.
24. Nuchprayoon S, Porksakorn C, Junpee A, Sanprasert V. (2003) Comparative Assessment of the Og4C3 ELISA to ICT Filariasis Test: A study in Myanmar migrants of Thailand. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21: 253-257.
25. Nuchprayoon S, Sangprakarn S, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S, Poovorawan Y. (2003) Differentiation of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* by PCR-RFLP of ITS-1 and ITS-2. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 34 (Suppl 2): 67-73.
26. Nuchprayoon S, Sanprasert V, Porksakorn C, Nuchprayoon I. (2003) Bancroftian filariasis in an endemic area of Thailand-Myanmar border. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21: 179-188.
27. Nuchprayoon S, Yentakam S, Sangprakarn S, Junpee A. (2001) Endemic bancroftian filariasis in Thailand: detection by Og4C3 antigen capture ELISA and the polymerase chain reaction. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 84:1300-1307.
28. Ottesen EA, Duke BOL, Karam M, Behbehani K. (1997) Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic flariasis. *Bulletin of the World Health Organization*. 75: 491-503.
29. Porksakorn C, Nuchprayoon S, Park K, Scott AL. (2007) Proinflammatory cytokine gene expression by murine macrophages in response to *Brugia malayi* *Wolbachia* surface protein. *Mediators of Inflammation*. 2007: 84318.
30. Porto I, Leone AM, Crea F, Andreotti F. (2005) Inflammation, genetics, and ischemic heart disease: focus on the major histocompatibility complex (MHC) genes. *Cytokine* 29: 187-196.

31. Ravichandran M, Mahanty S, Kumaraswami V, Nutman TB, Jayaraman K. (1997) Elevated IL-10 mRNA expression and downregulation of Th1-type cytokines in microfilaraemic individuals with *Wuchereria bancrofti* infection. *Parasite Immunology*. 19: 69-77.
32. Sartono E, Kruize YC, Partono F, Kurniawan A, Maizels RM, Yazdanbakhsh M. (1995) Specific T cell unresponsiveness in human filariasis: diversity in underlying mechanisms. *Parasite Immunology*. 17: 587-594.
33. Shih W, Chetty R, Tsao MS. (2005) Expression profiling by microarrays in colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*. 13: 517-524.
34. Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Di Sacco B, Damiani G, Genchi C. (1995) Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Molecular and biochemical parasitology*. 74:2 223-7.
35. Specht S, Volkmann L, Wynn T, Hoerauf A. (2004) Interleukin-10 (IL-10) counterregulates IL-4-dependent effector mechanisms in murine filariasis. *Infection and Immunity*. 72: 6287-6293.
36. Sumethvanich C, Choochote W, Panart K, Jitpakdi A, Panart P. (1996) Comparative morphometry of nocturnally periodic and subperiodic *Wuchereria bancrofti* microfilaria. *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology*. 19: 55-60.
37. Taylor MJ, Cross HF, Bilo K. (2000) Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. *The Journal of experimental medicine*. 191:1429-1436.
38. Tritteraprapab S. (1997) Update in lymphatic filariasis: a re-emerging disease of Thailand. *Chulalongkorn Medical Journal*. 41: 611-622.
39. Tritteraprapab S, Karnjanopas K, Porksakorn C, Sai-Ngam A, Yentakam S, Loymak S. (2001) Lymphatic filariasis caused by *Brugia malayi* in an endemic area of Narathiwat Province, southern of Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 84 Suppl 1:S182-8.
40. Tritteraprapab S, Kanjanopas K, Suwannadabba S, Sangprakarn S, Poovorawan Y and Scott AL. (2000) Transmission of the nocturnal periodic strain of *Wuchereria bancrofti* by *Culex*

quinguefasciatus: Establishing the potential for urban filariasis in Thailand. *Epidemiology and Infection*. 125(1): 207-212.

41. Tritteeraprapab S, Nuchprayoon I, Porksakorn C, Poovorawan Y, Scott AL. (2001) High prevalence of *Wuchereria bancrofti* infection among Myanmar migrants in Thailand. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 95: 535-538.
42. Tritteeraprapab S, Songtrus J. (1999) High prevalence of bancroftian filariasis in Myanmar-migrant workers: a study in Mae Sot district, Tak province, Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 82: 735-9.
43. Tritteeraprapab S, Thumpanyawat B, Sangprakarn S. (1998) *Wuchereria bancrofti*- specific circulating antigen for diagnosis of bancroftian filariasis. *Chulalongkorn Medical Journal*. 42:267-277.
44. Turner PF, Rockett KA, Ottesen EA, Francis H, Awadzi K, Clark IA. (1994) Interleukin-6 and tumor necrosis factor in the pathogenesis of adverse reactions after treatment of lymphatic filariasis and onchocerciasis. *The Journal of Infectious Disease*. 169:1071-1075.
45. Weil GJ, Lammie PJ, Weiss N. (1997) The ICT filariasis test: a rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. *Parasitology Today*. 13: 401-404.
46. Wilson M, Seymour R, Henderson B. (1998) Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infections and Immunity*. 66:2401-2409.
47. WHO (2003) Lymphatic filariasis: progress report on the program in 2002. *Weekly Epidemiological Record*, 2003. 78: 171-179.

ประวัตินักวิจัยและคณะ

ผู้วิจัยหลัก / หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อผู้วิจัยหลัก (ภาษาไทย) ศ.ดร.พญ. สุรางค์ นุชประยูร
(ภาษาอังกฤษ) Surang Nuchprayoon M.D., Ph.D., M.P.H.
2. หมายเลขประจำตัวประชาชน
3100100774745
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
ศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 0-2256-4387 โทรสาร 02-252-5944
E-mail: fmedstt@md.chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม)		จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2530
Master of Public Health	Immunology and infectious Diseases	Johns Hopkins University, USA	2535
Doctor of Philosophy	Molecular Parasitology and Immunology	Johns Hopkins University, USA	2538
อนุมัติบัตร	พยาธิวิทยาคลินิก	แพทยสภา	2546

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

Molecular Parasitology and Immunology

Lymphatic filariasis

7. ประสิทธิภาพที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

- 6.2.1 “Early detection of bancroftian filariasis in children and young individuals using IgG4 assays” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.2 “การวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่เกิดจากเชื้อ *Wuchereria bancrofti* ในระยะแรกเริ่มโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและการตรวจทางน้ำเหลือง” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.3 “Polymerase chain reaction-based detection of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus*” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.4 “บทบาทของโวลบาเกียในการเกิดพยาธิสภาพผลข้างเคียงต่อยารักษาโรคเท้าช้าง (The role of *Wolbachia* in the pathogenesis of chemotherapy-induced adverse reactions in lymphatic filariasis)” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.5 “การศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *Wuchereria bancrofti* ในคนไทยและแรงงานอพยพ (Study and differentiation of *Wuchereria bancrofti* strains in Thais and migrant workers)” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.6 “ความสัมพันธ์ของแอนติบอดี IgG ชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อโปรตีน *Wolbachia* surface protein (WSP) ในผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (Association between specific anti-WSP IgG subclasses and clinical manifestation in lymphatic filariasis patients)” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.7 “ผลของยาDoxycycline ในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาและลดอาการข้างเคียงของยา Diethylcarbamazine (DEC) ในการรักษาผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (Effects of doxycycline on increasing of efficacy and decreasing of adverse drug reactions from treatment of lymphatic filariasis patients with Diethylcarbamazine (DEC))” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.8 “ผลของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *Wolbachia* spp. เพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคเท้าช้าง (Effects of antimicrobial agents against *Wolbachia* spp. for treatment of filariasis)” (ผู้ร่วมวิจัย)

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- **Triteeraprapab S.** 1989 *Blastocystis hominis*: A neglected intestinal protozoan parasite. Chulalongkorn Medical Journal. 33: 343-348.
- **Triteeraprapab S,** Richie TL, Tuan RS, Shepley KJ, Dinman JD, Neubert TA, and Scott AL. 1995 Molecular cloning of a gene expressed during early embryonic development in *Onchocerca volvulus*. Molecular and Biochemical Parasitology. 69: 161-171.
- **Triteeraprapab S,** 1997 “Want to do research.....Who can help” Chulalongkorn Medical Journal. 41: 345-346.
- **Triteeraprapab S.** 1997 update in lymphatic filariasis: a re-emerging disease of Thailand. Chulalongkorn Medical Journal. 41: 611-622.
- **Triteeraprapab S,** Jongwutiwes S, Chanthachume N. 1997 The prevalence rates of human intestinal parasites in Mae-la-moong, Umphang, Tak province, a rural area of Thailand. Chulalongkorn Medical Journal. 41: 649-658.
- **Triteeraprapab S.** 1998 New vaccine introduction: Summary from “The First Asia-Pacific Regional Consultation on Economic and Policy Considerations in New Vaccine Introduction” Chulalongkorn Medical Journal. 42(10): 925-933.
- **Triteeraprapab S,** Nuchprayoon I. 1998 Eosinophilia, anemia, and parasitism in a rural region of Northwest Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 29(3): 584-590.
- **Triteeraprapab S,** Thumpanyawat B, Sangprakarn S. 1998 *Wuchereria bancrofti*-specific circulating antigen for diagnosis of bancroftian filariasis. Chulalongkorn Medical Journal. 42: 267-277.
- **Triteeraprapab S,** and Songtrus J. 1999 High prevalence of bancroftian filariasis in Myanmar migrants : A study in Mae sot, Tak province, Thailand. Journal of Medical Association of Thailand. 82: 734-739.
- **Triteeraprapab S,** Akrabovorn P, Promtorng J, Chuenta K. 1999 High prevalence of hookworm infection in a population of Northeastern Thailand after an opisthorchiasis control program. Chulalongkorn Medical Journal. 43(2): 99-108.

- **Triteeraprapab S**, Thumpanyawat B, Nuchprayoon I and Thanamun B. 2000 Eosinophilia with low prevalence of parasitism in a rural area of Maha Sarakham after yearly mass treatment with mebendazole. *Chulalongkorn Medical Journal*. 44(6): 423-432.
- **Triteeraprapab S**, Kanjanopas K, Suwannadabba S, Sangprakarn S, Poovorawan Y and Scott AL. 2000 Transmission of the nocturnal periodic strain of *Wuchereria bancrofti* by *Culex quinquefasciatus*: Establishing the potential for urban filariasis in Thailand. *Epidemiology and Infection*. 125(1): 207-212.
- **Triteeraprapab S**, Nuchprayoon I, C Porksakorn, Poovorawan Y and Scott AL. 2000 High prevalence of *Wuchereria bancrofti* infection among Myanmar migrants of Thailand. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 95(5): 535-538.
- **Triteeraprapab S**, Karnjanopas K, Porksakorn C, Sai-ngam A, Yentakan S and Loymak S. 2001 Lymphatic filariasis caused by *Brugia malayi* in an endemic area of Narathiwat province, Southern of Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. June 84 (suppl 1): S182-S188.
- Nuchprayoon I, Sai-NGam A, Suntrarachun, S, Noiphrom J, Pakmanee N, Chanhom L, **Nuchprayoon S**, Sitprija V. 2001 Molecular Cloning of Phospholipase A2 from a Thai Russell's Viper Venom Gland cDNA Library. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 84 (suppl 1): S99-S105.
- Saksirisampant W, Chawengkiattikul R, Kraivichain K, **Nuchprayoon S**. 2001 Specific IgE Antibody Responses to Somatic and Excretory-Secretory Antigens of Third Stage *G. spinigerum* Larvae in Human Gnathostomiasis. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 84 (suppl 1): S173-S181.
- **Nuchprayoon S**, Yentakam S, Sangprakarn S and Junpee A. 2001 Endemic Bancroftian filariasis in Thailand : detection by Og4C3 antigen capture ELISA and the Polymerase Chain Reaction. *Journal of the Medical Association of Thailand*. September 84 (9): 1300-1307.
- Saksirisampant W, Kulkaew K, **Nuchprayoon S**, Yentakham S and Wiwanitkit V. 2002 A survey of the infective larvae of *Gnathostoma spinigerum* in swamp eels bought in a local market in Bangkok, Thailand. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 96(2): 191-195.

- **Nuchprayoon S**, Siriyasatien P, Kraivichian K, Porksakorn C, Nuchproayoon I. 2002 Prevalence of Parasitic Infections among Thai Patients at the King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand.* June 85(Suppl 1) :S415-S423.
- Saksirisampant W, **Nuchprayoon S**, Wiwanitkit V, Kraivichian K, Suwansaksri J. 2002 Prevalence and intensity of third stage *Gnathostoma spinigerum* larvae in swamp eels sold in three large markets in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* June 33 (Suppl 3): 60-62.
- Saksirisampant W, Wiwanitkit V, Akrabovorn P, **Nuchprayoon S**. 2002 Parasitic infections in Thai workers that pursue overseas employment : The need for a screening program. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health.* Vol 33 (Suppl 3) :110-112.
- Nuchprayoon I, Sanpavat S, **Nuchprayoon S**. (2002) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. *Hum Mutation* 19(2):185.
- Siriyasatien P, Yingyourd P, **Nuchprayoon S**. 2003 Efficacy of Albendazole against early and late stage of *Trichinella spiralis* infection in mice. *Journal of the Medical Association of Thailand.* 86 (Suppl 2) : S257-S262.
- Saksirisampant W, **Nuchprayoon S**, Wiwanitkit V, Yenthakam S, Ampavasiri A. 2003 Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani Province. *Journal of the Medical Association of Thailand.* 86 (Suppl 2) : S263-S270.
- **Nuchprayoon S**, Sanprasert V, Suntravat M, Kraivichian K, Saksirisampant W, Nuchprayoon I. 2003 Study of specific IgG subclass antibodies for diagnosis of *Gnathostoma spinigerum*. *Parasitology Research.* 91:137-143.
- **Nuchprayoon S**, Sangprakarn S, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S, Poovorawan Y. 2003 Differentiation of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* by PCR-RFLP of ITS-1 and ITS-2. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* 34 (Suppl 2) : 67-73.

- **Nuchprayoon S**, Porksakorn C, Junpee A, Sangprakarn S, Poovorawan Y. 2003 Comparative assessment of an Og4C3 ELISA and an ICT filariasis test: A study of Myanmar in Thailand. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21: 253-257.
- **Nuchprayoon S**, Sanprasert V, Porksakorn C, Nuchprayoon I. 2003 Prevalence of Bancroftian Filariasis on the Thai-Myanmar Border. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21:179-188.
- Sritangratanakul S, **Nuchprayoon S**, Nuchprayoon I. 2004 Pneumocystis Pneumonia: An Update. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 87 (Suppl 2) : S309-S417.
- Kraivichian K, **Nuchprayoon S**, Sitichalernchai P, Chaicumpa W, Yentakam S. 2004 Treatment of cutaneous Gnathostomiasis with ivermectin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 71(5) : 623-628.
- Saksirisampant W, Prownebon J, Kammarnee P, Thaisom S, Yentakam S, **Nuchprayoon S**. 2004 Prevalence of Paratitism among Students of the Karen Hill-Tribe in Mae Chame District, Chaing Mai Province, Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 87 (Suppl 2) : S278-S283.
- Jaijakul S, **Nuchprayoon S**. 2005 Treatment of lymphatic filariasis: An update. *Chulalongkorn Medical Journal*. July 49: 401-421.
- Sanprasert V, jaratsing P, Nuchprayoon I, **Nuchprayoon S**. 2005 Computer-Assisted Instruction in Parasitology: A Cross-Over Design. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 88 (Suppl 4) : S214-S219.
- Jaijakul S, Saksirisampant W, Prownebon J, Junpee A, Yenthakam S, Mungthin M, Leelayoova S, **Nuchprayoon S**. 2005 *Pneumocystis jiroveci* in HIV/AIDS Patients: Detection by FTA Filter Paper together with PCR in Noninvasive Induced Sputum Specimens. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 88 (Suppl 4) : S294-S299.
- Siriyasatein P, Tangthongchaiwiriya K, Kraivichian K, **Nuchprayoon S**, Tawatsin A, Tahvara U. 2005 Decrease of Mosquito Salivary Gland Proteins after a Blood Meal: An Implication for Pathogenesis of Mosquito Bite Allergy. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 88 (Suppl 4) : S255-S259.
- Charuruks N, Milintagas A, Watanaaboonyoungcharoen P, Kalayanachati A, **Nuchprayoon S**. 2005 Annual Laboratory Checkup: Early Signs of Health Promblems in

Young and Middle-Age Adults. Bnormal Results of Annual Laboratory Checkup in Young Adults. 36 (3) : 769-774.

- **Nuchprayoon S**, Junpee A, Poovorawan Y, Scott AL. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers PCR and RFLP analysis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 73(5): 895-900.
- **Nuchprayoon S**, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S, Suvannadabba S, Poovorawan Y. 2006 Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS1. Veterinary Parasitology. 140: 366-372.
- Saksirisampant W, Prownebon J, Kulkumthorn M, Yenthakam S, Janpla S, **Nuchprayoon S**. 2006 Prevalence of intestinal parasitic infections among school children in the central region of Thailand. J Med Assoc Thai. 2006 Nov;89(11):1928-33.
- Porksakorn C, **Nuchprayoon S**, Park K, Scott AL. 2007 Proinflammatory cytokine gene expression by murine macrophages in response to *Brugia malayi* *Wolbachia* surface protein. Mediators of Inflammation. 2007:84318.
- **Nuchprayoon S**, Junpee A, Poovorawan Y. 2007 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for differentiation between Thai and Myanmar strains of *Wuchereria bancrofti*. Filaria Journal. 6(1):6.
- **Nuchprayoon S**, Saksirisampant W, Jaijakul S, Nuchprayoon I. 2007. Flinders technology associates (FTA) filter paper-based DNA extraction with polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Pneumocystis jirovecii* from respiratory specimens of immunocompromised patients. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 21(6): 382-386.
- Tiawsirisup S, Sripatranusorn S, Oraveerakul K, **Nuchprayoon S**. 2008. Distribution of mosquito (Diptera: Culicidae) species and *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infections during the bird immigration season in Pathumthani province, central Thailand. Parasitology Research. 102(4): 731-735.
- **Nuchprayoon S**, Sanprasert V, Kaewzaithim S, Saksirisampant W. 2008. Screening for intestinal parasitic infections among Myanmar migrant workers in Thai food industry: A high-risk transmission. Journal of Immigrant and Minority Health. 11(2):115-121.
- **Nuchprayoon S**. DNA-based diagnosis of lymphatic filariasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2009; 40(5):904-13.

- Junpee A, Tencomnao T, Sanprasert V, **Nuchprayoon S**. Association between Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms and asymptomatic bancroftian filariasis. *Parasitol Res.* 2010; 107(4):807-16.
- Sanprasert V, Sujariyakul A, **Nuchprayoon S**. A single dose of doxycycline in combination with diethylcarbamazine for treatment of bancroftian filariasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2010; 41(4):800-12.
- Tiawsirisup S, **Nuchprayoon S**. Mosquito distribution and Japanese encephalitis virus infection in the immigration bird (Asian open-billed stork) nested area in Pathum Thani province, central Thailand. *Parasitol Res.* 2010; 106(4):907-10.
- Saksirisampant W, **Nuchprayoon S**, Pradniwat P, Lamchuan D. 2010. Boeck and Drbohlav Locke egg serum medium for detection of *Blastocystis hominis*. *Chulalongkorn Medical Journal.* 54(6): 527-36.
- Sanprasert V, Sungpradit S, **Nuchprayoon S**. 2010. *Wolbachia* isolation by fractioned centrifugation from *Dirofilaria immitis* for protein analysis. *Chulalongkorn Medical Journal.* 54(6): 537-548.
- Sungpradit S, **Nuchprayoon S**, Chatsuwan T. 2010. Cost-effectiveness analysis of alkaline lysis, MagNA Pure, and Phenol-chloroform DNA extraction methods followed by measurement of single gene copy number using quantitative real-time PCR for *Dirofilaria immitis* microfilaria. *Chulalongkorn Medical Journal.* 54(6): 549-61.
- **Nuchprayoon S**, Sanprasert V, Jaratsing P, Jaijakul S. 2010. A case report of severe adverse reactions following diethylcarbamazine treatment of lymphatic filariasis. *Chulalongkorn Medical Journal.* 54(6): 593-604.
- Sungpradit S, **Nuchprayoon S**. 2010. *Wolbachia* of arthropods and filarial nematodes: biology and applications. *Chulalongkorn Medical Journal.* 54(6): 605-21.
- Pinyachat A, Rojnuckarin P, Muanpasitporn C, Singhamatr P, Nuchprayoon S. 2011. Albocollagenase, a novel recombinant P-III snake venom metalloproteinase from green pit viper (*Cryptelytrops albolabris*), digests collagen and inhibits platelet aggregation. *Toxicon.* 57(5): 772-80.

• ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 1

1. **ชื่อผู้วิจัย** (ภาษาไทย) อ.ดร.วิวรพรรณ สรรประเสริฐ
(ภาษาอังกฤษ) Vivornpun Sanprasert, Ph.D.
2. **หมายเลขประจำตัวประชาชน**
3100601868092
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน**
อาจารย์
4. **หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**
หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3567 โทรสาร -
E-mail: vivornpun@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)	เทคนิคการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2544
วิทยาศาสตรดุษฎี บัณฑิต	สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2552

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ**

-

7. **ประสบการณ์วิจัย**

7.1 **ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย**

-

7.2 **หัวหน้าโครงการวิจัย**

-

7.3 **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว**

- Nuchprayoon S, **Sanprasert V**, Suntravat M, Kraivichian K, Saksirisampant W, Nuchprayoon I. 2003 Study of specific IgG subclass antibodies for diagnosis of *Gnathostoma spinigerum*. Parasitology Research. 91: 137–143.

- Nuchprayoon S, Porksakorn C, Junpee A, **Sanprasert V**, Poovorawan Y. 2003 Comparative assessment of an Og4C3 ELISA and an ICT filariasis test: A study of Myanmar in Thailand. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21: 253-257.
- Nuchprayoon S, **Sanprasert V**, Porksakorn C, Nuchprayoon I. 2003 Prevalence of bancroftian filariasis on the Thai-Myanmar border. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21(3):179-88.
- **Sanprasert V**, Jaratsing P, Nuchprayoon I, Nuchprayoon S. 2005 Computer-assisted instruction in parasitology: A cross-over design. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 88 (Suppl 4): S214-S219.
- **Nuchprayoon S**, Sanprasert V, Kaewzaithim S, Saksirisampant W. 2008. Screening for intestinal parasitic infections among Myanmar migrant workers in Thai food industry: A high-risk transmission. *Journal of Immigrant and Minority Health*. 11(2):115-121.
- **Sanprasert V**, Sungpradit S, Nuchprayoon S. 2010. *Wolbachia* isolation by fractionated centrifugation from *Dirofilaria immitis* for protein analysis. *Chulalongkorn Medical Journal* 2010; 54(6): 537-548.
- Nuchprayoon S, **Sanprasert V**, Jaratsing P, Jaijakul S. 2010. A case report of severe adverse reactions following diethylcarbamazine treatment of lymphatic filariasis. *Chulalongkorn Medical Journal* 2010; 54(6): 593-604.
- Tiawsirisup S, Thanapaisarnkit T, Varatorn E, Apichonpongsa T, Bumpenkiattikun N, Rattanapuchpong S, Chungpiwat S, **Sanprasert V**, Nuchprayoon S. Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection and immunoglobulin G antibodies against *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in stray dogs in Bangkok, Thailand. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 2010; 40(2): 165-170.
- **Sanprasert V**, Sujariyakul A, Nuchprayoon S. A single dose of doxycycline in combination with diethylcarbamazine for treatment of bancroftian filariasis. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2010; 41(4):800-812.
- Junpee A, Tencomnao T, **Sanprasert V**, Nuchprayoon S. Association between Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms and asymptomatic bancroftian filariasis. *Parasitology Research* 2010; 107(4): 807-816.

- Semnani RT, Mahapatra L, Moore V, **Sanprasert V**, Nutman TB. Functional and phenotypic characteristics of alternative activation induced in human monocytes by IL-4 or the parasitic nematode *Brugia malayi*. *Infection and Immunity* 2011; 79(10): 3957-3965.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- “Genetic variation of *Blastocystis* sp. in Thais and the association with clinical symptoms” เป็นผู้วิจัยหลัก
- “Nanodetection of lymphatic filariasis” เป็นผู้วิจัยหลัก