

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไป

หนอนพยาธิตัวจิ๋ว อยู่ใน Genus *Gnathostoma* เป็นพยาธิตัวกลมจัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า spirurid nematode (Daengsvang, 1980) ในปัจจุบันพบว่า มีอย่างน้อย 13 species ได้แก่ *Gnathostoma spinigerum*, *G. hispidum*, *G. turgidum*, *G. americanum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum*, *G. procyonis*, *G. miyazaki*, *G. vietnamicum*, *G. malayiae*, *G. didelphis*, *G. brasiliensis* และ *G. binucleatum* (Daengsvang, 1980; Almeyda-Artigas, 1991) และมีรายงานเพียง 5 species ที่ทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum* และ *G. binucleatum* (Daengsvang, 1980; Miyazaki, 1991; Almeyda-Artigas, 1991) สำหรับในประเทศไทยพบหนอนพยาธิตัวจิ๋วที่เป็นสาเหตุของโรคพยาธิตัวจิ๋ว มี 5 species คือ *G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. malaysiae* และ *G. vietnamicum* (Dissamarn *et al.*, 1966; Daengsvang, 1980; Kamiya *et al.*, 1987) แต่ที่เป็นสาเหตุของโรคพยาธิตัวจิ๋วในคน มีรายงานเพียงชนิดเดียวคือ *G. spinigerum* (Daengsvang, 1980; Radomyos and Daengsvang, 1987; Setasuban, 1990a)

G. spinigerum จัดอยู่ใน Phylum Nematelminthes; Class Nematoda (Rudolphi, 1808) Order Eunematoda (Ward, 1916); Superfamily Spiruroidea (Reiliet and Henry, 1915); Family Gnathostomidae (Raillet, 1895); Subfamily Gnathostominae (Baylis and Lane, 1920); Genus *Gnathostoma* (Owen, 1836)

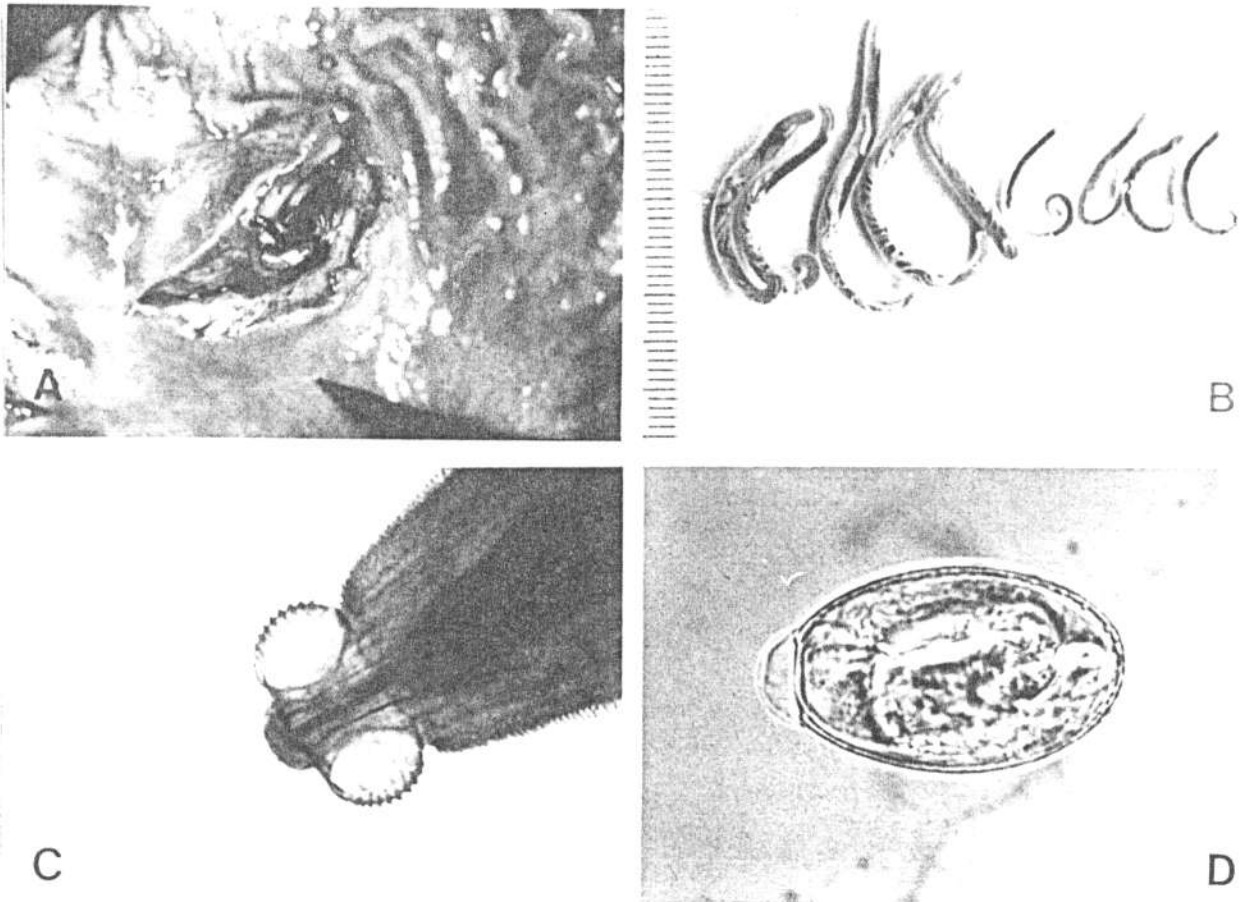
พยาธิตัวจิ๋ว *G. spinigerum* พบครั้งแรกโดย Richard Owen นักชีววิทยา ชาวอังกฤษ เมื่อปี พ.ศ. 2379 โดยพบพยาธิตัวแก่ ในกระเพาะอาหารของเสือที่ตาย ในสวนสัตว์ที่กรุงลอนดอน สำหรับประเทศไทย พบครั้งแรกในคนในปี พ.ศ. 2432 โดย Levinsen ได้พบพยาธิเพศเมียที่ยังโตไม่เต็มที่ (immature female) จากเต้านมของหญิงไทย ที่อาศัยอยู่ในกรุงเทพฯ (Daengsvang, 1980) ต่อมาในช่วงปี พ.ศ. 2476 - 2480 ศาสตราจารย์นายแพทย์

หลวงเฉลิม พรหมมาส และศาสตราจารย์นายแพทย์สวัสดิ์ แดงสว่าง ได้ค้นพบวงจรชีวิตของพยาธิตัวจิ๊ด และหลังจากนั้นก็มียางานผู้ป่วยพยาธิตัวจิ๊ดอยู่ตลอดมา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีโรคพยาธิตัวจิ๊ดมากที่สุดทั้งในคนและสัตว์ (Daengsvang, 1986) จากการสำรวจในปี พ.ศ. 2504 - 2506 ในโรงพยาบาลประจำจังหวัด 62 แห่ง และโรงพยาบาลในกรุงเทพฯ พบว่า มีผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายการติดเชื้อหนองพยาธิตัวจิ๊ด เฉลี่ยปีละประมาณ 900 ราย (Daengsvang *et al.*, 1966) และในปี พ.ศ. 2432 - 2516 มียางานผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๊ดที่ได้ตัวพยาธิออกมา จำนวน 63 ราย (Daengsvang, 1980) และมีผู้ป่วยอย่างน้อย 10 รายที่ตายเนื่องจากการติดเชื้อหนองพยาธิตัวจิ๊ดในระบบประสาทส่วนกลาง (Boongrid *et al.*, 1977; Chitanond and Rosen, 1967; Ratanasiri *et al.*, 1981) นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยที่มีลักษณะคล้ายกัน 45 ราย ที่ไม่ได้ตัวพยาธิ แต่มีการติดเชื้อในสมอง ชนิด myelo-encephalitis (Punyagupta *et al.*, 1968) และเชื่อว่ามีผู้ป่วยกว่า 10,000 รายที่มีอาการคล้ายกับการติดเชื้อพยาธิตัวจิ๊ด แต่ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยยืนยันได้

2.2 รูปร่างลักษณะและวงจรชีวิตของพยาธิตัวจิ๊ด *G. spinigerum*

วงจรชีวิตจากการทดลองของพยาธิตัวจิ๊ด *G. spinigerum* ในประเทศไทย พบได้สมบูรณ์ โดยศาสตราจารย์นายแพทย์หลวงเฉลิม พรหมมาส และศาสตราจารย์นายแพทย์สวัสดิ์ แดงสว่าง (Prommas and Daengsvang, 1933, 1936, 1937) โดยพยาธิตัวแก่ทั้งเพศผู้และเพศเมียจะอาศัยอยู่ในก้อนทุม (tumor mass) ที่ผนังกระเพาะอาหารของโฮสต์เฉพาะ (definitive host) ได้แก่ สุนัข แมว เสือ สิงห์โต แรคคูน เป็นต้น ตัวแก่ของพยาธิมีขนาดเปลี่ยนแปลงไปตามขนาดของโฮสต์ พยาธิเพศผู้จะมีขนาดเล็ก 1.8 x 26.2 มม. เพศเมียมีขนาดเฉลี่ย 2.3 x 34.7 มม. (Baylis and Lane, 1920; Daengsvang, 1980; Owen, 1836) เพศผู้จะมีขนาดเล็กและสั้นกว่าเพศเมีย ทั้งสองเพศมีลักษณะอ้วนป้อม สีชมพู ผิวใส มองเห็นอวัยวะภายในได้ (Zaman, 1979) ส่วนหัวมีกระเปาะ (cephalic bulb) แยกจากลำตัวอย่างชัดเจน โดยมีรอยคอดตรงคอ (cervical constriction) กระเปาะหัวจะมีหนามเรียงเป็นแถวตามขวางอยู่โดยรอบ จำนวน 8 แถว ที่ปากมีริมฝีปาก 1 คู่ บริเวณคอมี cervical sacs เป็นถุงใส 2 คู่ อยู่แต่ละฟากของหลอดอาหาร มีความยาวเกือบเท่าหลอดอาหาร ซึ่งมีหน้าที่ทำให้หัวโป่งและยุบได้ ช่วยในการไซให้ตัวเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ลำตัวมีรอยข่นตลอดลำตัวจนกระทั่งถึงส่วนหาง ครึ่งบนของลำตัวมีหนามขนาดเล็กเรียงเป็นแนวขวางรอบลำตัว

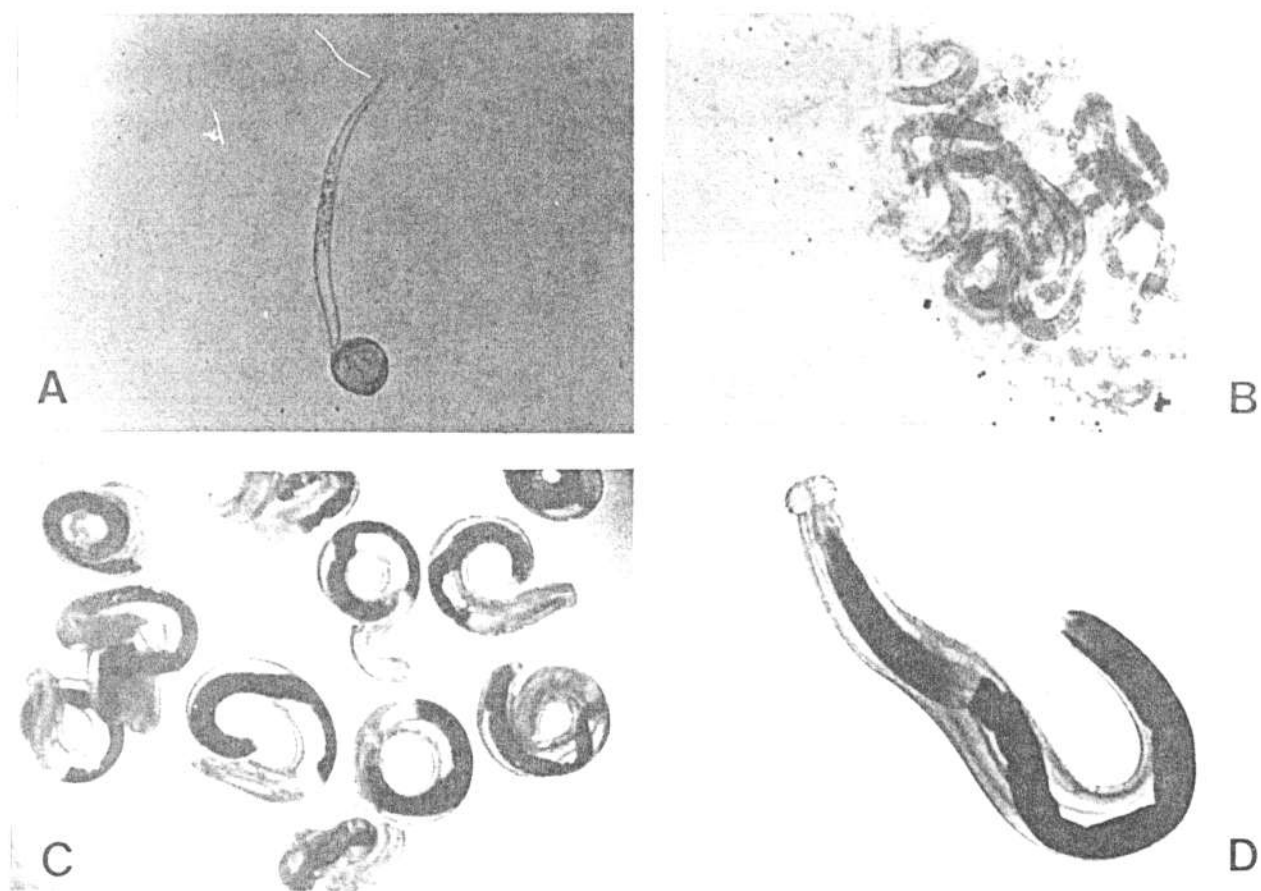


ภาพที่ 1 พยาธิตัวจิ๊ด *G. spinigerum*

- A : ก้อนทูนในกระเพาะอาหารของสุนัข ที่เป็นที่อยู่ของตัวแก่พยาธิตัวจิ๊ด
 B : ตัวแก่เพศผู้ (ตัวเล็ก) และตัวแก่เพศเมีย (ตัวใหญ่)
 C : ตัวแก่พยาธิที่กระเพาะหัวมีหนาม 8 แถว
 D : ไข่พยาธิตัวจิ๊ด

ครึ่งล่างของลำตัว ไม่มีหนาม ปลายหางพยาธิเพศผู้มี pseudobursa แผ่กว้าง และมี papillae 4 คู่ spicule 2 อัน ซึ่งยาวไม่เท่ากัน อาจโผล่ให้เห็นได้ที่ cloaca พยาธิเพศเมียจะหางเรียวยาว มี anus เปิดที่เกือบปลายหาง และมีรูเปิดของ vulva อยู่ตรงกลางลำตัวก่อนไปข้างท้ายเล็กน้อย จาก vulva มี vagina 1 อัน จาก vagina เป็น uterus ซึ่งแยกเป็น 2 ท่อ ภายในมีไข่อยู่เต็ม และต่อจากนั้นเป็นรังไข่ ซึ่งเป็นท่อยาวสีขาวขุ่นคดเคี้ยวไปมา

เมื่อพยาธิเพศผู้และเพศเมียผสมพันธุ์กัน พยาธิเพศเมียจะวางไข่ ออกมาทางรูเปิดของกอนทียม เข้าสู่กระเพาะอาหารของโฮสต์เฉพาะ และไข่จะออกมากับอุจจาระของโฮสต์ ไข่พยาธิตัวจิ๋ว มีรูปร่างกลมรี ขนาดเฉลี่ย $68.7 \times 36.7 \mu\text{m}$ (Prommas and Daengsvang, 1933) ภายในมี 1-2 เซลล์ ลักษณะคล้ายไข่พยาธิปากขอ แต่ว่าขั้วหนึ่งมีจุก (mucoid plug) เห็นได้ชัด มีเปลือกค่อนข้างหนา ผิวของเปลือกไข่มีรูพรุนคั่นๆ เมื่อไข่ตกลงสู่ น้ำ ที่อุณหภูมิ 25-31 องศาเซลเซียส เซลล์ภายในไข่จะเจริญเป็น morula stage ภายใน 2 วัน และอีก 2 วัน จะเจริญเป็นตัวอ่อน (larva) ประมาณวันที่ 12 ตัวอ่อนระยะที่ 1 (first-stage larva) จะฟักออกจากไข่ ตัวอ่อนระยะที่ 1 มีขนาดประมาณ $265.2 \times 15.8 \mu\text{m}$ (Prommas and Daengsvang, 1933) รูปร่างเรียวยาว มีเยื่อบางๆ (sheath) หุ้มคล้ายเยื่อหุ้มของ microfilaria ตัวอ่อนจะเคลื่อนไหวตลอดเวลาและรวดเร็วมาก และจะถูกกินโดยไรน้ำ (cyclops) ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวแรก (first intermediate host) จากการทดลอง พบว่ามีไรน้ำประมาณ 4 species ที่สามารถติดเชื้อหนอนพยาธิตัวจิ๋วได้ ได้แก่ *Mesocyclops leuckarti*, *Eucyclops agilis*, *Cyclops varican* และ *Thermocyclops sp.* (Sooksri, 1967) หลังจากถูกไรน้ำกิน ตัวอ่อนระยะที่ 1 จะเข้าไปอยู่ในช่องว่างในกระเพาะอาหาร และจะเปลี่ยนเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (second stage larvae) แล้วไซผนังกระเพาะอาหารเข้าไปอยู่ในช่องว่างในลำตัวของไรน้ำ ตัวอ่อนระยะที่ 2 มีรูปร่างเรียวยาว มีริมฝีปาก 2 อัน ขนาดไม่เท่ากัน และขนาดลำตัวเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่อาศัยอยู่ในไรน้ำ ประมาณ 5 วัน ตัวอ่อนจะลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นต้น (early third stage larvae) ตัวอ่อนจะมีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ระยะเวลาการอาศัยอยู่ในไรน้ำ และปัจจัยของความหนาแน่นของตัวพยาธิในไรน้ำ (density dependent effect) (Maleewong *et al.*, 1988 b) ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นต้น มีลำตัวป้อมขึ้น มีส่วนหัวที่ประกอบด้วย กระเปาะหัวที่มีหนาม 4 แถว มีรอยคอด ระหว่างส่วนหัวและส่วนลำตัว ในช่องลำตัวมี cervical sacs 4 คู่ ต่อจากกระเปาะหัวเข้าไปข้างหลอดอาหาร (esophagus) ลำไส้ประกอบด้วยเซลล์เป็นจุดๆ (granular intestine tract)



ภาพที่ 2 ตัวอ่อนพยาธิตัวจิ๋ว *G. spinigerum*

A : ตัวอ่อนระยะที่ 1 กำลังไข่ออกจากไข่

B : ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นคั่นอยู่ในช่องว่างลำตัวของไรน้ำ

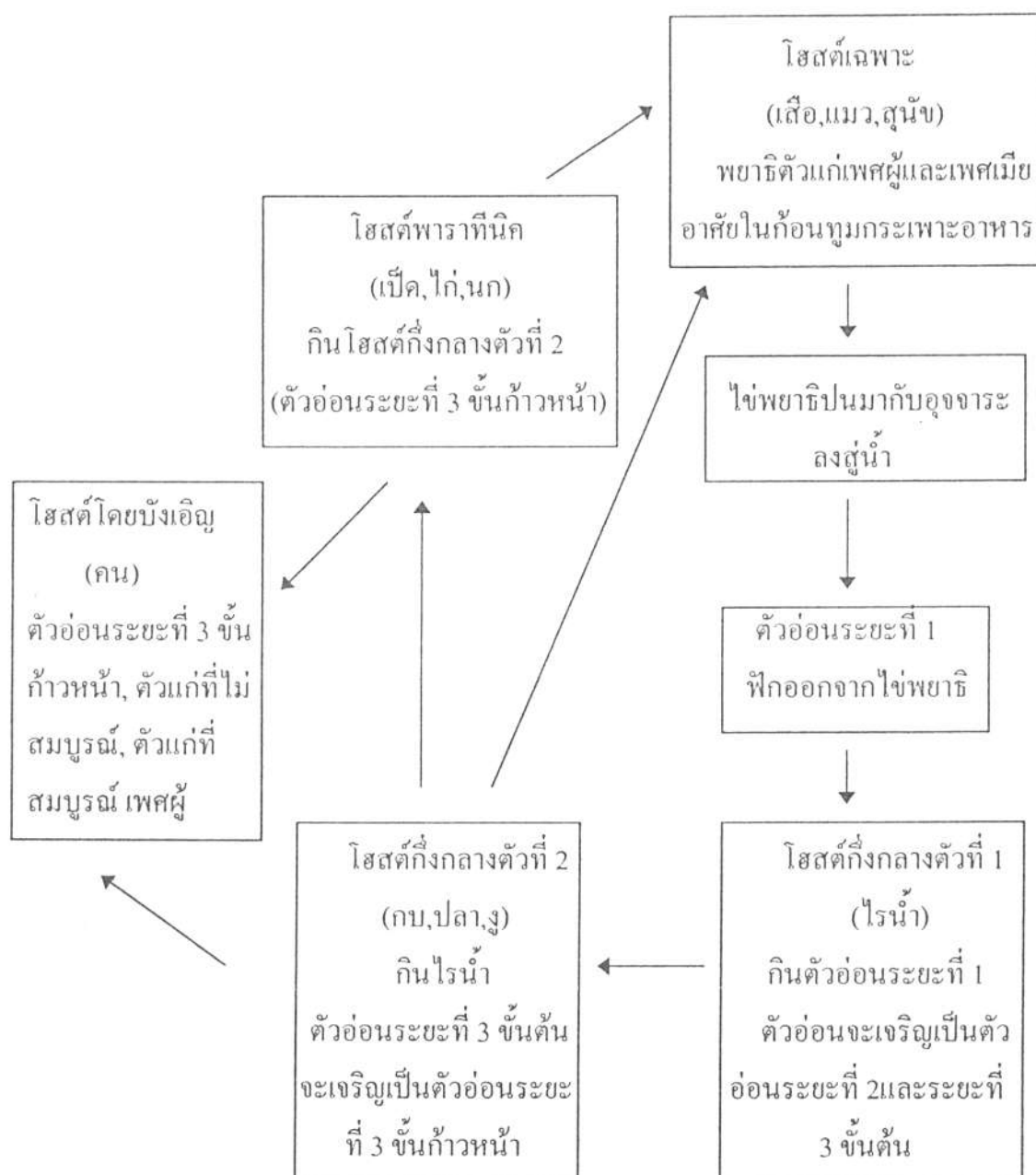
C : ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำวหน้า ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหนูถีบจักร

D : ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำวหน้า ที่มีกระเปาะห้วมีหนาม 4 แถว

เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) พบว่า หนามที่กระเปาะหัวในแต่ละแถวจะมีลักษณะเป็นปลายเคียวคล้ายตะขอ ลำตัวปกคลุมด้วยแถวหนาม ส่วนหัวมี papillae 1 คู่ และตามลำตัวมี papillae อีก 1 คู่ (Malecwong *et al.*, 1988 b)

เมื่อไรน้ำที่มีตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นคั้น (infected cyclops) ถูกกินโดยโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 (second intermediate host) เช่น ปลา กบ งู เป็นต้น ตัวอ่อนของพยาธิจะเจริญเติบโตในเนื้อเยื่อของโฮสต์ ฟังตัวเป็นซิสต์ (cyst) อยู่ในเนื้อเยื่อ กลายเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นก้าวหน้า (advanced third stage larvae) มีขนาดประมาณ $0.29-0.42 \times 2.7-3.95$ มม. โดยรูปร่างแบ่งได้เป็น 3 ส่วนใหญ่ๆ คือ ริมฝีปาก (lips), กระเปาะหัว (head bulb) และ ลำตัว (body) (Daengsvang, 1980) ริมฝีปากมีปุ่ม papillae 2 คู่, มี amphid 1 คู่ กระเปาะหัวมีหนาม 4 แถว เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่า หนาม 2 แถวแรก มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า (rectangular shape) ส่วนแถวที่ 3 และ 4 จะมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยม (triangular shape) (Anantaphuti *et al.*, 1982) ลำตัวมีหนามปกคลุม ขนาดของหนามจะเล็กลงจากส่วนหัวไปทางด้านท้ายของลำตัว ภายในลำตัว จะมี cervical sacs 4 คู่ ต่อจากกระเปาะหัวลงข้างหลอดอาหาร หลอดอาหารแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนต้นประกอบไปด้วยกล้ามเนื้อ (muscular part) และส่วนท้ายประกอบไปด้วย ต่อม (glandular part) ถ้าไส้มีสีเหลือง จะต่อจากหลอดอาหาร ประกอบไปด้วยเซลล์ชนิด columnar epithelium ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่เจริญสมบูรณ์

ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นก้าวหน้า ยังสามารถติดต่อไปสู่โฮสต์พาราทีนิก (paratenic host) ได้แก่ งู เป็ด ไก่ นก และสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม ซึ่งในประเทศไทย พบว่า มีสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังมากกว่า 44 ชนิด ที่สามารถเป็นโฮสต์ของพยาธิชนิดนี้ (Daengsvang, 1980) ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นก้าวหน้าจะอาศัยอยู่ในกล้ามเนื้อ และอวัยวะภายในโฮสต์ โดยไม่มีการเจริญเติบโต หรือ เปลี่ยนแปลงใดๆ ยังคงเป็นระยะติดต่อยู่เช่นเดิม เมื่อโฮสต์เฉพาะ เช่น สุนัข แมว กิน เนื้อดิบของโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 หรือโฮสต์พาราทีนิกที่มีตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นก้าวหน้า ตัวอ่อนจะไขทะลุลำไส้เล็กผ่านช่องท้อง ทะลุกระบังลม ฟังตัวเข้าผนังกระเพาะอาหารเป็นก้อนทุม (tumor mass) และเจริญเป็นพยาธิตัวแก่ต่อไป จำนวนก้อนทุมที่พบส่วนมากมีเพียง 1 ก้อน น้อยมากที่พบ 2 ก้อนหรือมากกว่า แต่ละก้อนทุมจะมีรูเปิดเล็กๆ ที่ผนังกระเพาะอาหารด้านใน (Prommas and daengsvang, 1937) ระยะก่อนเชื้อปรากฏ



ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของหนอนพยาธิตัวจิ๋ว (*Gnathostoma spinigerum*)

(prepatent period) ในแมวประมาณ 2-7 เดือน และในสุนัข ประมาณ 3-8 เดือน (Prommas and Daengsvang, 1937; Daengsvang *et al.*, 1969; Miyazaki, 1960)

มีรายงานการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นต้น จากไรน้ำในจานเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย RPMI 1640 และ 10% fetal calf serum พบว่า ตัวอ่อนระยะที่ 3 จะโตขึ้นอย่างเห็นได้ชัด มีการลอกคราบเป็นเศษเล็กๆปะปนมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายใน 3-5 วัน ภายหลังการเพาะเลี้ยง โดยมีหนามที่กระเปาะหัว 4 แฉก เหมือนเดิม (Malecwong *et al.*, 1997) และประกอบกับมีรายงานการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นภาชนะในจานเพาะเลี้ยง ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ผสมกับ 10% fetal calf serum, 1% dog serum และ 0.25% dog hemolysate ประมาณ 180 วัน ภายหลังการเพาะเชื้อ ตัวอ่อนจะมีการลอกคราบจากหนามที่กระเปาะหัว 4 แฉก เป็นตัวอ่อนที่หนามที่หัว 8 แฉก ซึ่งคล้ายกับตัวแก่ที่ไม่สมบูรณ์ (Malecwong *et al.*, 1995) ทำให้เกิดคำถามว่า ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นภาชนะ อาจเป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 ซึ่งเมื่อลอกคราบอีกครั้งหนึ่ง จึงจะกลายเป็นตัวแก่ที่ไม่สมบูรณ์ และมีหนาม 8 แฉกที่กระเปาะหัว

2.3 ระบาดวิทยาและการติดต่อ

พยาธิตัวจิ๊ดพบครั้งแรกจากก้อนทุมในกระเพาะอาหารของเสือ และต่อมามีรายงานพบในกระเพาะอาหารของแมวบ้าน, แมวป่า, สิงห์โต, เสือคาเว และสุนัข ในประเทศอินเดีย ไทย มาเลเซีย จีน ญี่ปุ่น เป็นต้น ในประเทศไทยพบว่า มีสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังอย่างน้อย 44 species (Daengsvang, 1980) และประมาณ 36 species ในประเทศญี่ปุ่น (Miyazaki, 1966) ที่มีรายงานว่ามีการติดเชื้อของตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นภาชนะของพยาธิตัวจิ๊ด ข้อมูลเหล่านี้เป็นดัชนีที่แสดงถึงการติดเชื้อพยาธิตัวจิ๊ดสามารถแพร่กระจายไปได้ทั่วโลก

โรคพยาธิตัวจิ๊ดในคน (human gnathostomiasis) มีรายงานจากประเทศไทย, มาเลเซีย จีน, ญี่ปุ่น, อินเดีย, อินโดนีเซีย, อิสราเอล, เวียดนาม และฟิลิปปินส์ (Beaver *et al.*, 1984) ผู้ป่วย 2 รายจากประเทศเม็กซิโก (Pelacz and Perez-Reyes, 1970) และมีรายงานผู้ป่วยหญิงจากประเทศบังคลาเทศ (Dow *et al.*, 1988) โรคพยาธิตัวจิ๊ดในคน ไม่เคยมีรายงานว่าพบพยาธิตัวแก่ในก้อนทุมที่กระเพาะอาหาร หรือพบไขในอุจจาระผู้ป่วย ปัจจุบันเชื่อว่าคนเป็นโฮสต์โดยบังเอิญ (accidental host) ผู้ป่วยพยาธิตัวจิ๊ดในประเทศไทย ส่วนมากเป็น

ผู้หญิง และมีอายุอยู่ระหว่าง 20-25 ปี (Daengsvang, 1980) อาจเป็นเพราะผู้หญิงไทยมีอุปนิสัยในการกินอาหารประเภทเนื้อที่ปรุงไม่สุก โดยกรรมวิธีการหมัก การยำ การลาบและก้อย ที่ใช้เนื้อปลาน้ำจืด โดยเฉพาะปลาค้อ (*Ophicephalus striatus*) ซึ่งพบว่ามีกรดไขมันของตัวอ่อนพยาธิตัวจืดค่อนข้างสูง และอาจติดเชื้อจากการไชผ่านผิวหนังโดยตรงในขณะที่ประกอบอาหารประเภทเนื้อ เพราะได้มีการทดลองพบว่าตัวอ่อนของพยาธิสามารถไชผ่านผิวหนังของสัตว์ทดลองได้ (Daengsvang et al., 1971)

การติดต่อ จากการทดลองพบว่า มี 3 วิธี ที่คนสามารถติดเชื้อหนอนพยาธิตัวจืดได้ คือ

1. โดยการกิน (oral transmission) ได้มีการทดลองโดยการเลี้ยงแมงด้วยปลาน้ำจืดที่ติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิตัวจืด (Prommas and Daengsvang, 1937) สามารถตรวจพบไข่พยาธิตัวจืดในอุจจาระแมงใน 198-223 วัน หลังจากให้กินปลา แสดงว่าการกินอาจเป็นวิธีหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อพยาธิตัวจืดในคนได้

2. โดยการไชผ่านผิวหนัง (skin penetration) ศาสตราจารย์นายแพทย์สวัสดิ์ แดงสว่าง และคณะ ได้ทำการทดลองในปี พ.ศ. 2524 พบว่า ตัวอ่อนพยาธิตัวจืด สามารถไชผ่านผิวหนังสัตว์กักตุน (rodent) และแมง ภายในเวลาไม่กี่นาที และสามารถเจริญเติบโตเป็นตัวแก่ ฝังอยู่ในกระเพาะอาหาร ตรวจพบได้ภายใน 2-8 1/4 เดือน หลังการไชของพยาธิ การไชผ่านทางผิวหนังจึงอาจเป็นอีกทางหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อพยาธิตัวจืดในคน

3. โดยผ่านทางรก (prenatal transmission) จากการทดลองพบว่า ลูกหนู 2 ใน 152 ตัวที่เกิดจากแม่หนูถีบจักร ที่ติดเชื้อพยาธิตัวจืดตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ามหน้า ระหว่างการตั้งครรภ์ ลูกหนูมีการติดเชื้อพยาธิตัวจืดโดยการตรวจพบพยาธิตัวอ่อนที่ยังไม่ได้เข้าซิสต์ (cyst) สำหรับในคน มีรายงานเด็กทารก 3 คน ที่คาดว่าติดเชื้อจากแม่สู่ลูก โดยทารกมีอายุเพียง 3 วัน, 7 วัน และ 1 เดือน (Daengsvang, 1985)

อีกทางหนึ่งที่น่าจะติดต่อสู่คนได้ คือ การดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนตัวอ่อนพยาธิ ที่อาจเกิดจากการล้างเนื้อสัตว์หรือปนเปื้อนด้วยไรน้ำที่มีการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิ (infected cyclops) เพราะได้พบว่า ตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 3 ขึ้นก้ามหน้า สามารถอยู่ในน้ำได้อย่างอิสระได้นาน 2-3 วัน ซึ่งยังคงสามารถติดเชื้อในหนูถีบจักรได้ (Daengsvang, 1975) และพบว่า สามารถทำให้สัตว์พวกลิง (primate) ติดเชื้อพยาธิตัวจืดได้ โดยปนเปื้อนด้วยน้ำที่มีไรน้ำที่ติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิ มีอัตราการติดเชื้อ ร้อยละ 3.1 (Daengsvang, 1971)

มีรายงานหนอนพยาธิตัวจืด *G. spinigerum* ที่ได้จากผู้ป่วย จำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่า

เป็นพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นหัว 5 ตัวอย่าง, ตัวแก่ที่ไม่สมบูรณ์ทั้งสองเพศ (immature male and female) 14 ตัวอย่าง และเป็นตัวแก่ที่สมบูรณ์เพศผู้ (mature male) 4 ตัวอย่าง (Radomyos and Daengsvang, 1987)

2.4 การเกิดพยาธิสภาพและพยาธิวิทยา

หลังจากผู้ป่วยได้รับหนอนพยาธิตัวจิ๋ว ส่วนมากจากการรับประทานเนื้อสัตว์ที่ปรุงไม่สุก หนอนพยาธิจะไชผ่านทางเดินอาหารเข้าสู่อวัยวะภายใน, กล้ามเนื้อ, ผิวหนัง ตัวอ่อนพยาธิจะไชไปเรื่อยๆ อย่างไม่รู้จุดหมาย พยาธิสภาพส่วนมากจะเกิดบริเวณรอบๆ ที่ตัวพยาธิอาศัยอยู่ ซึ่งมีตั้งแต่ปฏิกิริยาภูมิแพ้, เนื้อเยื่ออักเสบ, เลือดออก (hemorrhage), เนื้อตาย (necrosis) และมีการแตกของเซลล์ (cell lysis) รอบบริเวณที่มีตัวพยาธิ ขณะที่หนอนพยาธิตัวจิ๋วไชผ่าน จะปล่อยสารพิษ (gnathostome toxin) หรือเอ็นไซม์ต่างๆ เช่น acetylcholine-like substance, hyaluronidase, proteolytic enzyme และ hemolytic substance (Miyazaki, 1960) พยาธิสภาพ จะเกิดการอักเสบ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาของร่างกายต่อพยาธิ หรือต่อสารที่พยาธิปล่อยออกมา ผลของการเกิดอักเสบอาจทำให้หน้าที่ของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้นเสียไป การอักเสบอาจเกิดจากเนื้อเยื่ออักเสบ และมีเลือดออก เนื่องจากหนอนพยาธิตัวจิ๋วมีขนาดใหญ่ มีหัวหนาม เมื่อคู่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีการอักเสบและบวม มีเม็ดเลือดขาวมาล้อมรอบเต็มไปหมด เซลล์ส่วนมากเป็น eosinophil, lymphocyte, macrophage และ plasma cells มี neutrophil เพียงเล็กน้อย เมื่อตัวหนอนพยาธิหยุดอยู่กับที่ (encyst) จะเกิดการอักเสบแบบ granulomatous มี fibrous connective tissue มาล้อมรอบ รวมทั้ง histiocyte และ giant cell และมีเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอสิโนฟิลมาล้อมรอบมากมาย มีรอยเลือดออกและอาจพบผลึก Charcot-Leyden ได้ ในกระแสเลือดมีการเปลี่ยนแปลงของระดับเม็ดเลือดขาว มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่า 10,000 cells/cu.mm. และมีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอสิโนฟิลสูง อาจมากกว่า 50% (Miyazaki, 1960) ศาสตราจารย์นายแพทย์ สวัสดิ์ แดงสว่าง ได้รายงานในปี พ.ศ. 2523 จากคนที่ เป็นโรคพยาธิตัวจิ๋ว 40 ราย พบว่า ผู้ป่วย 26 รายมีระดับเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil ในเลือดสูง ระหว่าง 10-96% บางรายมีจำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือดสูงขึ้นด้วย (leucocytosis)

การเคลื่อนไหวของการตอบสนองของระดับเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil ในกระแสเลือด เป็น 2 ระดับ (biwave response) จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง ได้แก่ หนูถีบจักรและ

หนู rat (Malecwong, 1985) พบว่า การที่เม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil สูง ในช่วงแรกน่าจะเกิดจากการอักเสบของการไชของพยาธิ และการสูงในช่วงที่ 2 น่าจะมาจากการกระตุ้นของแอนติเจนของพยาธิที่ขับออกมา และอาจจะมีความสัมพันธ์กับเม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte สำหรับการศึกษาค้นคว้าทางภูมิคุ้มกันทางเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยาในหนูถีบจักร (Malecwong, 1985) พบว่าในสัปดาห์แรกของการติดเชื้อ จะมีการอักเสบแบบเฉียบพลันตามรอยที่หนอนพยาธิไชผ่าน ประกอบไปด้วยเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil neutrophil และเซลล์ชนิด mononuclear cell ในสัปดาห์ที่ 2-4 ของการติดเชื้อ จะเริ่มมี fibrous connective tissue มาแทรกซึม ประกอบด้วยเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil macrophage, monocyte มีเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte และ plasma cells บ้าง ในสัปดาห์ที่ 8-12 ของการติดเชื้อ จะมี fibrous connective tissue มาล้อมรอบมากขึ้น มีเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil, macrophage, mononuclear cells และ giant cells เล็กน้อย

2.5 อาการและอาการแสดง

แบ่งอาการทางคลินิกของโรคพยาธิตัวจิ๊ดในคน ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

2.5.1 External หรือ cutaneous gnathostomiasis หรือ gnathostomiasis externa

โดยมีอาการและอาการแสดงที่ผิวหนัง หรือเนื้อเยื่อ และ mucous membrane โดยเฉพาะบริเวณอก, ท้อง, มือ, ขา, เท้า, นิ้ว, ใบหน้า, ปาก, ลิ้น, เปลือกตา, คีรษะ, คอ และอวัยวะสืบพันธุ์ อาการที่ผิวหนังผันแปรไปได้หลายระดับ ซึ่งศาสตราจารย์นายแพทย์สวัสดิ์ แดงสว่าง (1980) ได้สรุปไว้ดังนี้

2.5.1.1 มีอาการบวมเคลื่อนที่ (intermittent migratory swelling) มีขนาดต่างๆ กัน กดบริเวณที่บวมไม่ค่อยนุ่มลงไป

2.5.1.2 มีอาการอักเสบบวมแดง รอบบริเวณที่บวม

2.5.1.3 มีอาการคันระคายเคือง หรือบวมรอบบริเวณที่มีการบวมแดง

2.5.1.4 มีอาการปวดจี๊ด เคลื่อนที่ คัน ระคายเคืองเล็กน้อย

2.5.1.5 มีอาการปกติ

บางครั้งหนอนพยาธิตัวจิ๊ดจะไชขึ้นไปที่บริเวณผิวหนัง อาจจะไชหลุดออกมาจากผิวหนังหรืออาจจะไชไปเรื่อยๆ ทำให้คล้ายโรค creeping eruption ที่เกิดจากหนอนพยาธิปากขอของสุนัขและแมว

2.6 การวินิจฉัย

การวินิจฉัยที่สมบูรณ์ที่สุดของโรคพยาธิตัวจืดในคน คือการได้ตัวพยาธิจากผู้ป่วย จากวิธีการต่างๆ เช่น โดยการผ่าตัด หรือ พยาธิไขหลุดออกมาจากส่วนหนึ่งส่วนใดของร่างกาย แต่การได้ตัวหนอนพยาธิตัวจืดออกมาทำได้ลำบากมาก และน้อยรายที่จะได้พยาธิ อย่างไรก็ตาม อาการทางคลินิกและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ สามารถบอกได้บ้าง ซึ่งการช่วยวินิจฉัย อาจแบ่งได้ดังนี้

2.6.1 อาการทางคลินิกของ external และ visceral gnathostomiasis เป็นตัวช่วยวินิจฉัย ประวัติผู้ป่วยจะมีอาการบวมเคลื่อนที่ เจ็บปวดจี๊ดๆ คันๆ ในบริเวณที่มีการบวม

2.6.2 ประวัติการรับประทานอาหารสุกๆดิบๆ โดยเฉพาะปลาน้ำจืด, แหนม, ส้มฟัก, ลาบ กบ, ไก่, เป็ด, งู เป็นต้น หรือคัมน้ำจากบ่อหรือบึงจากบริเวณที่มีการระบาดของโรคพยาธิตัวจืด นอกจากนี้ อาจต้องซักประวัติการที่มีผิวหนังสัมผัสใกล้ชิดกับชิ้นเนื้อที่มีหนอนพยาธิระยะ ติดต่อหรือไม่

2.6.3 ระดับจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil ในกระแสเลือด ซึ่งมีความผันแปรในช่วงร้อยละ 10-96

2.6.4 ในกรณีพยาธิตัวจืดเข้าสมองหรือประสาทส่วนกลาง การตรวจโดย CT scan ช่วยวินิจฉัยโรคได้ โดยเห็นเลือดออกในสมอง หรือสมองบวม น้ำ การตรวจน้ำไขสันหลังมักพบเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil ร้อยละ 5-90 การตรวจพบแอนติบอดี ในน้ำไขสันหลังช่วยสนับสนุนการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างแน่นอน

2.6.5 ถ้าตัดชิ้นเนื้อแล้วนำไปย้อมสี ถ้าพบตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นหน้า สามารถบอก species ได้จากการดูลักษณะของเซลล์ลำไส้ (Akahane *et al.*, 1986)

2.6.6 การวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยา เป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดี หรือแอนติเจนที่จำเพาะ เพื่อใช้สนับสนุนการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจืด โดยมีวิธีการต่างๆ ดังนี้

2.6.6.1 การทดสอบทางผิวหนัง (skin test)

ส่วนใหญ่เป็นการทดสอบ active cutaneous anaphylaxis หรือทดสอบ hypersensitivity type I เพื่อตรวจหา IgE antibody โดยการฉีดสารสกัดจากหนอนพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 3 หรือตัวแก่ (crude somatic extract) โดยฉีดใต้ผิวหนัง (intracutaneous) ในขนาด 0.05 มล. อ่านผลหลังฉีด 15-30 นาที เปรียบเทียบกับ control ที่ฉีดน้ำเกลือปกติ (normal saline) 0.05 มล. โดยผลบวกจะต้องให้ปฏิกิริยาบวมแดง ที่มีรอยแดงขึ้นแดงแขนง

รอบผื่นแดง (red arcola with pseudopodia) การทดสอบทางผิวหนัง จะให้ความไวสูง แต่มีปัญหาด้านความจำเพาะเพราะจากการทดสอบในประเทศญี่ปุ่น พบว่าให้ผลบวก 23 ราย จาก 105 ราย (21.4%) ในคนปกติ ที่ไม่ได้อยู่ในแหล่งระบาด (Morishita *et al.*, 1969) และให้ผลบวกกับผู้ป่วยโรคพยาธิปากขอ, โรคพยาธิเส้นด้ายและโรคพยาธิไส้เดือน (Tada *et al.*, 1966) สำหรับการทดสอบในหนูถีบจักรที่ได้รับพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 3 พบว่า หนูเริ่มให้ผลบวก โดยวิธี active cutaneous anaphylaxis ต่อแอนติเจนชนิด crude somatic ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นหน้า หลังจากได้รับตัวอ่อนพยาธิ 1 เดือน (Morakote *et al.*, 1987 a)

2.6.6.2 การทดสอบโดยวิธี precipitin test

เป็นการทดสอบหาแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรัมของผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืด โดยใช้แอนติเจนชนิดที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด *G. spinigerum* พบว่าให้ผลบวกกับผู้ป่วยที่เป็นโรคพยาธิตัวจืดชนิดที่ได้หนอนพยาธิออกมา (proven gnathostomiasis sera) เพียง 3 ใน 8 ราย (38%) (Malcewong *et al.*, 1988) เห็นได้ว่าวิธีนี้มีความไวค่อนข้างต่ำ ไม่ค่อยแพร่หลาย (Kita, 1957; Furuno, 1959) และในการทดสอบในหนูถีบจักร พบว่า จะให้ค่าผลบวกสูงในสัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 7 ของการติดเชื้อหนอนพยาธิตัวจืด (Anantaphruti *et al.*, 1986)

2.6.6.3 การทดสอบโดยวิธี indirect haemagglutination test (IHA)

ได้มีการทดสอบหาระดับแอนติบอดีในกระด่ำที่เป็นโรคพยาธิตัวจืด โดยวิธี IHA ซึ่งได้ใช้แอนติเจนเป็น acid - soluble protien extracts พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามแก้ว (cross-reaction) กับกระด่ำที่มีแอนติบอดีต่อพยาธิไส้เดือน (*Ascaris*) หรือพยาธิ *Toxocara* (Punyagupta and Pacheco, 1961) และยังพบว่า ให้ผลบวกในกระด่ำที่ติดเชื้อพยาธิตัวจืด ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการติดเชื้อ (Morakote *et al.*, 1987 b) ได้มีการทดสอบหาแอนติบอดีต่อพยาธิตัวจืด *G. spinigerum* ในคน โดยวิธี IHA และใช้แอนติเจนชนิดสกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 (crude somatic extract) พบว่ามีความไว 62% โดยให้ผลบวกกับซีรัมของผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืดที่ได้ตัวหนอนพยาธิออกมา 5 ราย จาก ทั้งหมด 8 ราย (Malcewong *et al.*, 1988)

2.6.6.4 การทดสอบโดยวิธี indirect fluorescent antibody test (IFAT)

ได้มีผู้ทดลองใช้วิธี IFAT ในการทดสอบหาแอนติบอดี ต่อหนอนพยาธิตัวจืด *G. spinigerum* ในซีรัมและน้ำไขสันหลัง (Morakote *et al.*, 1989; Morakote *et al.*, 1990) โดยใช้ชิ้นตัดขวางของ *G. spinigerum* ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นหน้า เป็นแอนติเจน พบว่า

มีการเรืองแสง (fluorescent) ของแอนติบอดี ปรากฏที่หลอดอาหาร, ผิว (cuticle) และ granule ของลำไส้ ซึ่งอาจจะบ่งชี้ได้ว่าลำไส้และหลอดอาหาร จะเป็นส่วนที่จับแอนติเจนชนิด คัดหลั่ง (excretory - secretory antigen)

2.6.6.5 การทดสอบโดยวิธี radioimmunoassay (RIA)

ในการศึกษาระดับแอนติบอดีในแมวที่ติดเชื้อ *G. spinigerum* โดยวิธี RIA พบว่า ระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนของพยาธิตัวจิ๋วสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังมี ปฏิกริยาตอบสนองเกี่ยวกับแมวที่ติดเชื้อ *Toxocara* และ *Opisthorchis* (Kasemsuth *et al.*, 1981)

2.6.6.6 การทดสอบโดยวิธี enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA)

การทดสอบหาแอนติบอดีต่อหนอนพยาธิตัวจิ๋ว โดยวิธี ELISA มีการนำมาใช้ ในปี พ.ศ. 2523 (Suntharasamai *et al.*, 1980; Suntharasmai *et al.*, 1985) โดยใช้ crude somatic extract ของพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้าวหน้า ของพยาธิตัวจิ๋ว *G. spinigerum* เป็น แอนติเจน ตรวจหา IgG antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๋ว พบว่ามีความไว 100% ในกลุ่ม ผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๋วที่ได้หนอนพยาธิออกมา (4ราย) และมีความไว 59% หากนำผู้ป่วยที่มี อาการทางคลินิกมาร่วมด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีปฏิกริยาตอบสนองเกี่ยวกับซีรัมของผู้ป่วย โรคพยาธิหอยโข่ง (cerebral angiostrongyliasis), โรคพยาธิปากขอ, โรคพยาธิเส้นด้าย (strongyloidiasis), โรคพยาธิใบไม้ตับ และ โรคพยาธิใบไม้ปอด โดยมีความจำเพาะเพียง 84% ต่อมาในปี พ.ศ. 2529 ได้มีกลุ่มนักวิจัยได้ใช้แอนติเจนชนิด crude somatic extract จาก ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของหนอนพยาธิตัวจิ๋ว จากตับปลาไหล มาตรวจวัด IgG antibody ที่จำเพาะ ใน ซีรัมผู้ป่วย intermitten cutaneous migratory swelling 46 ราย พบว่าได้ผลบวก 100% แต่ ยังมีปฏิกริยาตอบสนองเกี่ยวกับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง และ โรคพยาธิตัวกลมในลำไส้บางชนิด (Dhramrong-At *et al.*, 1986) และในปี พ.ศ. 2531 ได้มีการเปรียบเทียบแอนติเจนชนิดสาร สกัดจากหนอนพยาธิตัวอ่อน ระยะที่ 3 ขึ้นก้าวหน้า (crude somatic extract) กับสารขับถ่าย (excretory-secretory) มาตรวจวัดระดับ IgG antibody โดยวิธี ELISA พบว่า ให้ผลไม่ แตกต่างกัน มีความไว 87% เมื่อใช้แอนติเจนทั้งสองชนิด และมีความจำเพาะ 96.9% สำหรับแอนติเจนชนิดสารสกัดจากหนอนพยาธิ และ 97.4% สำหรับแอนติเจนชนิดสารขับ ถ่ายคัดหลั่ง (Malcewong *et al.*, 1988) ต่อมา ดร.จันทน์ นพรัตน์และคณะ (Nopparatana *et al.*, 1991) ได้แยกส่วนของแอนติเจนที่สกัดจากหนอนพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 3

ชั้นกาวหน้า จากตับปลาไหล พบว่าชั้นโพลีเปปไทด์ที่มีน้ำหนักประมาณ 24 kD ที่ pH 8.5 มีความจำเพาะ และได้ทำการแยกให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการผ่าน column chromatography ชนิด gel filtration, chromatofocusing และ anion exchange จากนั้นนำขึ้นส่วนของแอนติเจนที่ได้มาเป็นแอนติเจนในการหา IgG antibody โดยวิธี ELISA ในซีรัมผู้ป่วยพยาธิตัวจืดชนิดได้หนอนพยาธิออกมา จำนวน 5 ราย, ผู้ป่วยที่มีอาการสงสัยว่าเป็นโรคพยาธิตัวจืด 15 ราย, ผู้ป่วยที่เป็นโรคพยาธิชนิดอื่น 136 ราย และคนปกติ 25 ราย พบว่ามีความไว, ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ 100% ต่อมาในปี พ.ศ. 2536 กลุ่มนักวิจัยอีกกลุ่มหนึ่ง (Tupitipopipat *et al.*, 1993) ทำการแยกแอนติเจน ให้บริสุทธิ์บางส่วน จากแอนติเจนชนิด crude somatic extract จากตัวอ่อนระยะที่ 3 ชั้นกาวหน้าของหนอนพยาธิตัวจืดที่ได้จากตับปลาไหล โดยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) แล้วตัดเอาชิ้น gel ที่มีโปรตีนแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 29 kD มาผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าอีกครั้ง (electroelution) เพื่อแยกแอนติเจนออกจาก gel นำแอนติเจนที่ได้มาตรวจหา IgG antibody ที่จำเพาะในผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืด พบว่ามีความไว, ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 100%

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น วิธี ELISA ในการตรวจวัด IgG antibody ที่จำเพาะสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจืดได้ดีมาก โดยเฉพาะการใช้แอนติเจนที่มีความจำเพาะและมีความบริสุทธิ์ แต่การที่จะทำให้บริสุทธิ์แม้เพียงบางส่วน แอนติเจนที่ได้จะมีปริมาณน้อยมาก เช่น การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีทาง physiochemical เป็นวิธีที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน แต่ได้แอนติเจนเพียง 0.23% ของ crude somatic extract (Noparatana *et al.*, 1991) และมีการใช้ partially purified *G. spinigerum* - specific IgG1 ในการทำ monoclonal antibody affinity chromatography เพื่อทำให้แอนติเจนบริสุทธิ์บางส่วน ได้แอนติเจนเพียง 50 นก./มล. (Rojekittkhun *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธี ELISA ในการทดสอบหาระดับ IgE antibody ที่จำเพาะต่อหนอนพยาธิตัวจืด (Soesaty *et al.*, 1987) พบว่า ระดับ IgE antibody ที่จำเพาะและ IgE antibody ทั้งหมด ในซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืดมีระดับสูง และสำหรับการตรวจหาแอนติเจนของโรคพยาธิตัวจืด โดยวิธี two-site sandwich ELISA ให้ผลดีในสัตว์ทดลองเท่านั้น (Maleewong *et al.*, 1992 b) โดยสามารถตรวจวัดได้ภายในสัปดาห์ที่ 1-4 ภายหลังการติดเชื้อหนอนพยาธิตัวจืด

2.7 การจำแนกชนิดแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวจืด

2.7.1 การจำแนกชนิดแอนติเจนของพยาธิตัวจืดโดยวิธี one dimensional gel electrophoresis

จากการศึกษาโดยจำแนกชนิดของแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นน้ำ โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมสี silver stain พบว่า somatic extract ของพยาธิตัวจืดมีองค์ประกอบค่อนข้างซับซ้อนประกอบด้วยแถบโปรตีนหรือ polypeptides มากกว่า 40 ชนิด และเมื่อนำมาทดสอบโดยวิธี western blot analysis โดยทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืดที่ได้ตัวพยาธิออกมา พบว่า มี polypeptides ประมาณ 20 ชนิด ที่เป็น immunogen ในคน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 13 ถึง 150 kD (Nopparatana *et al.*, 1988) และเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบโดยทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืด, ผู้ป่วยโรคพยาธิชนิดอื่นๆ และคนปกติ โดยวิธี immunoblotting พบว่า polypeptides ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24 kD มีความไวและมีความจำเพาะสูง โดยทำปฏิกิริยาเฉพาะกับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืด แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิชนิดอื่นๆ และคนปกติ (Tapchaisri *et al.*, 1991) หลังจากนั้นได้มีคณะนักวิจัยทำการแยกให้ได้เฉพาะแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kD โดยการผ่าน crude somatic extract ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นน้ำของพยาธิตัวจืด ลงใน Sephadex G-200, Chromatofocusing และ Anion exchange column chromatography แล้วนำส่วนที่แยกได้ที่มี polypeptides ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kD อยู่ปริมาณมาก มาทำการแยกชนิดโดยวิธี isoelectric focusing แล้วย้อมสี silver stain พบว่า polypeptides ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kD มีค่า pI ประมาณ 8.5 (Nopparatana *et al.*, 1991)

2.7.2 การจำแนกชนิดแอนติเจนของพยาธิตัวจืดโดยวิธี two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)

จากการสืบค้นสารนิเทศจากฐานข้อมูล MEDLINE ไม่พบว่ามีรายงานการจำแนกชนิดแอนติเจนของพยาธิตัวจืดโดยวิธี 2D-PAGE ซึ่งวิธีนี้มีความละเอียดมาก ในการจำแนกชนิดของโปรตีน จากตัวอย่างเดียวได้มากกว่า 1,000 ชนิด (O' Farrell, 1975) จึงมักใช้ในการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ สำหรับทางด้านปรสิตวิทยา ได้มีการใช้วิธี 2D-PAGE ในการจำแนกชนิดโปรตีนและ immunogens ที่ถูกปล่อยมาจากตัวพยาธิ เช่น การจำแนกโปรตีนที่ถูกปล่อยมาจากพยาธิตัวแก่ของพยาธิตัวแก่ของ *Schistosoma mansoni* ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง (Lewis, L.A. and Strand, M. 1991) หรือการศึกษาความแปรเปลี่ยนของโปรตีน

(protein variation) ของเชื้อมาลาเรีย ชนิด *Plasmodium falciparum* (Tail, 1981) และได้มีการใช้วิธี 2D-PAGE ในการศึกษาเพื่อแยกความแตกต่างของพยาธิในระยะที่ต่างกัน หรือในสถานะแวดล้อมต่างกัน โดยเปรียบเทียบรูปแบบของจุดหรือแถบโปรตีน (protein spot patterns) เช่น ในการศึกษาความแตกต่างของตัวอ่อนพยาธิ *Strongyloides venezuelensis* ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 25 °C และ 37 °C (Tsuiji, N. and Fujisaki, K. 1994) เนื่องจากวิธี 2D-PAGE เป็นวิธีการที่ยุ่งยาก หลายขั้นตอน และการแปลผลค่อนข้างยาก จึงมีรายงานในการศึกษาวิจัยน้อย

2.8 แอนติเจนที่สกัดจากหนอนพยาธิตัวจิ๋ว

แอนติเจนจากหนอนพยาธิตัวกลมที่ใช้ในการวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยา มี 3 ชนิดคือ แอนติเจนที่สกัดจากหนอนพยาธิทั้งตัว (somatic extract) , สารขับถ่ายของพยาธิ (excretory and secretory) และ แอนติเจนจากผิวของพยาธิ (surface antigen) แต่ที่นิยมใช้คือ แอนติเจนที่สกัดจากหนอนพยาธิทั้งตัว เพราะแอนติเจนชนิดนี้ จะประกอบด้วยแอนติเจนทั้ง 3 ชนิด สำหรับในการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๋ว มีที่นิยมใช้กันเพียง 2 ชนิด ได้แก่ แอนติเจนที่สกัดจากหนอนพยาธิทั้งตัวและสารขับถ่ายของพยาธิ ซึ่งแอนติเจนทั้ง 2 ชนิดเมื่อนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๋วในคน โดยวิธี ELISA ให้ผลการตรวจไม่แตกต่างกัน (Maleewong *et al.*, 1988) ต่างกับการศึกษาของ Tuntipopipat *et al.*, 1993 ที่รายงานว่า แอนติเจนที่เตรียมจากสารขับถ่ายของพยาธิ ให้ผลการตรวจโดยวิธี ELISA ดีกว่าแอนติเจนที่สกัดจากหนอนพยาธิทั้งตัว แต่เมื่อแยกส่วนของแอนติเจนที่สกัดจากหนอนพยาธิทั้งตัวที่มีน้ำหนักโมเลกุล ต่ำกว่า 27 kD และแยกส่วนแอนติเจนที่เตรียมจากสารขับถ่ายของพยาธิที่มีน้ำหนักโมเลกุล 29 kD ลงมา พบว่า แอนติเจนที่สกัดจากพยาธิทั้งตัวให้ผลการตรวจดีกว่ามาก โดยให้ความไว, ความจำเพาะ และค่าทำนายผลบวกและผลลบ 100%

สำหรับการเตรียมแอนติเจนจากพยาธิในระยะต่างๆ (stage) นิยมใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นแก้วหน้าของพยาธิตัวจิ๋วซึ่งป็นระยะติดคอในคน ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบกับ แอนติเจนที่เตรียมจากระยะอื่น เช่น Foruno (1959) รายงานว่า ในการใช้แอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นแก้วหน้า เพื่อตรวจแอนติบอดีโดยวิธี precipitin test ให้ความไว (sensitivity) สูงกว่าแอนติเจนที่เตรียมจากตัวแก่ของพยาธิ และมีรายงานคล้ายกันโดย Punyagupta and Pacheco (1961) ซึ่งใช้วิธี hemagglutination test พบว่าแอนติเจนที่เตรียมจาก

ตัวแก่พยาธิใช้ไม่ได้เลยในการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา สำหรับในการตรวจโดยวิธี IFAT โดยใช้พยาธิตัวแก่เพศผู้และเพศเมีย เป็น cryosection antigen พบว่า ไม่เกิดสีเขียวเรืองแสงที่จำเพาะ (specific fluorescence) เมื่อทำปฏิกิริยากับซีรัมของกระต่ายที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๊ด (Anantaphuti *et al.*, 1991) และสำหรับในการตรวจโดยวิธี ELISA โดยใช้แอนติเจนที่เตรียมจาก *G. doloresi* และ *G. spinigerum* พบว่าแอนติเจนที่เตรียมจากตัวแก่ของ *G. doloresi* ให้ผลความจำเพาะน้อยกว่าแอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำหน้าของ *G. spinigerum* แต่ให้ความไวเท่ากัน และแอนติเจนที่เตรียมจากตัวแก่พยาธิ *G. doloresi* ให้ปฏิกิริยาคาบเกี่ยวกับซีรัมผู้ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่นมากมาย แต่ไม่มีปฏิกิริยาคาบเกี่ยวกับแอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ *G. spinigerum* (Anantaphruti, 1989) และจากการศึกษาเปรียบเทียบแอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนและตัวแก่ของพยาธิตัวจิ๊ด *G. spinigerum* โดยวิธี ELISA พบว่า แอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนพยาธิให้ผลการตรวจดีกว่ามาก (Morakote *et al.*, 1991) จากผลการศึกษาดังกล่าว การใช้แอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด จึงมีความเหมาะสมที่สุดในการศึกษาทางภูมิคุ้มกันวิทยาของพยาธิตัวจิ๊ด

สำหรับแหล่งที่มาของตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด ส่วนมากจะมาจากตับปลาไหลที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๊ดโดยธรรมชาติ และจากหนูถีบจักรที่ติดเชื้อโดยการทดลอง (Dhamkrong-at *et al.*, 1986; Suntharasamai *et al.*, 1985) แอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำหน้า ทั้งสองชนิดนี้ เมื่อนำมาจำแนกชนิดโดยวิธี SDS-PAGE และ western blot analysis พบว่า มีส่วนของแอนติเจนที่จำเพาะที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kD เหมือนกัน (Nopparatana *et al.*, 1991)

จากการศึกษาแยกส่วนและทำให้บริสุทธิ์ของแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด โดย Nopparatana *et al.* (1991) พบว่า ปฏิกิริยาคาบเกี่ยวส่วนใหญ่จะเกิดกับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 kD ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Tuntipopipat *et al.* (1993) ที่แยกส่วนของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 27 kD นำไปทดสอบโดยวิธี ELISA ให้ผลความไวและความจำเพาะ 100% และพบว่าส่วนของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kD เป็นแอนติเจนที่จำเพาะ สำหรับใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๊ดในคน ซึ่งแอนติเจนที่ 24 kD นี้เป็น glycoprotein และมีค่า pI เท่ากับ 8.5

โปรตีนที่สกัดจากส่วนของหลอดอาหาร(oesophagus) และลำไส้เล็ก(intestine) ของ

ตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 3 ขึ้นก้นหัวของพยาธิตัวจืด เป็นส่วนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน(immunogenic) ได้มากกว่าส่วนอื่นๆของพยาธิ (Nopparatana *et al.*, 1992; Morakote *et al.*, 1989) และพบว่ามีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kD ในส่วนของหลอดอาหารและลำไส้เล็กของตัวอ่อนพยาธิด้วย ดังนั้นการใช้แอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนพยาธิทั้งตัว อาจได้ส่วนที่เป็นแอนติเจนที่จำเพาะที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าการใช้แอนติเจนที่สกัดจากเฉพาะส่วนของหลอดอาหารและลำไส้เล็ก และ จากการศึกษากการทำให้บริสุทธิ์ของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kD พบว่าจะได้ผลสุดท้ายเพียง 0.23 % ของแอนติเจนเริ่มต้น (Nopparatana *et al.*, 1991)

2.9 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านแอนติบอดี ต่อแอนติเจนของพยาธิตัวจืด (humoral immune response)

การตอบสนองทางด้านแอนติบอดีต่อตัวอ่อนพยาธิทั้งระยะที่ 3 ขึ้นคั่นและขึ้นก้นหัว ได้มีการศึกษาในหนูถีบจักร โดยวิธี Ouchterlony gel diffusion (Anantaphruti *et al.*, 1986) พบว่าสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ในสัปดาห์ที่ 3 หลังติดเชื้อหนูถีบจักรด้วยตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นคั่น และยังคงตรวจพบได้จนถึงสัปดาห์ที่ 10 แอนติบอดีจะมีความแรงสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 7 สำหรับหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นหัว จะตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมได้เร็วกว่า ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 6 และยังพบว่า จำนวนของตัวอ่อนพยาธิที่อยู่ในกล้ามเนื้อหนูมีความสัมพันธ์กับความแรงของแอนติบอดี (peak of positive sera) และการตรวจพบแอนติบอดีเริ่มต้น (initial antibody) ยังขึ้นกับระยะของพยาธิด้วย สำหรับการศึกษาในหนูถีบจักรโดยวิธี ELISA (Malccwong *et al.*, 1992 b) พบว่า จะตรวจพบแอนติบอดี (IgG) ในสัปดาห์ที่ 2 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงสัปดาห์ที่ 4 และยังคงตรวจพบได้จนถึงอย่างน้อยสัปดาห์ที่ 8 สำหรับในคนยังไม่มีการศึกษาถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อพยาธิตัวจืด โดยติดตามตลอดระยะเวลาการติดเชื้อ