

การจำแนกพยาธิไส้เ็น้าของคนและสุนัขโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส



นายบัณฑิต อารีกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

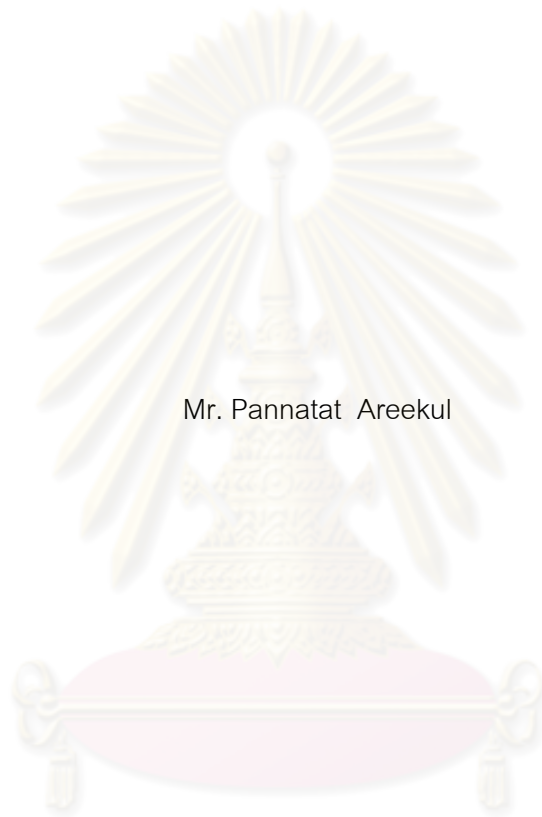
สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED DIFFERENTIATION OF
HUMAN AND DOG WHIPWORMS



Mr. Pannatat Areekul

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Parasitology

Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การจำแนกพยาธิไส้เ็นของคนและสุนัขโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส
โดย	นายบัณฑิต อารีกุล
สาขาวิชา	ปรสิตวิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทราดุลย์) คณบดีคณะแพทยศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(รองศาสตราจารย์ ณัฐรต จันทชุม) ประธานกรรมการ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงศักดิ์ ลิ้มปิกิตติกุล) กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

ปีณทัต อารีกุล : การจำแนกพยาธิไส้เมี้าของคนและสุนัขโดยปฏิกิริยาลูกโซ่
โพลีเมอร์เรส. (POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED DIFFERENTIATION
OF HUMAN AND DOG WHIPWORMS.) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ดร.จตุรงค์
พุทธพรทิพย์, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์,
อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : นายแพทย์ ประเสริฐ สิริธิเจริญชัย, 104 หน้า.

โรคพยาธิไส้เมี้าเป็น โรคติดเชื้อปรสิตที่สำคัญของคนซึ่งมีสาเหตุมาจากหนอนพยาธิ
Trichuris trichiura พบรายงานการติดเชื้อประมาณ 1 ใน 10 ของประชากรโลก มีความชุกของโรค
สูงในเขตภูมิอากาศอบอุ่นและร้อนชื้น นอกจากนี้ *T. vulpis* ซึ่งเป็นพยาธิไส้เมี้าชนิดที่จำเพาะต่อ
สุนัข ได้มีรายงานพบการติดเชื้อในคนเช่นกัน ทั้งนี้เป็นผลจากการวินิจฉัยโดยความแตกต่างทาง
รูปร่างลักษณะของไข่พยาธิทั้งสองชนิดที่พบในอุจจาระผู้ป่วย อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีไข่พยาธิไส้เมี้า
ทั้งสองชนิดที่มีความใกล้เคียงหรือเหลื่อมล้ำกันในด้านขนาดและรูปร่าง จนอาจนำไปสู่การวินิจฉัยที่
ผิดพลาดได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของพยาธิไส้เมี้าทั้งสองชนิดโดย
การหาและเปรียบเทียบรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนสำหรับไรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็ก
เพื่อพัฒนาวิธีการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสสำหรับวินิจฉัยพยาธิไส้เมี้าทั้งสองชนิดจากไข่พยาธิที่
พบในอุจจาระผู้ป่วยและนำวิธีการที่พัฒนาได้ไปศึกษาในกลุ่มประชากรในเขตชุมชนบ้านท่าสอง
ยาง อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก ตั้งอยู่ทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทำการสุ่มเก็บ
อุจจาระนักเรียน 80 คน เป็นชาย 36 คน หญิง 44 คน อุจจาระสุนัขในชุมชน 59 ตัว และอุจจาระจาก
สุนัขจรจัดในเขตกรุงเทพฯ 20 ตัว ผลการศึกษาพบว่าความไวของการทดสอบประสิทธิภาพ
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเปรียบเทียบกับ การดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้ผลบวก 44% เมื่อสกัดดี
เอ็นเอโดยกระแทกไข่พยาธิด้วยเม็ดแก้ว ในขณะที่การบดไข่พยาธิให้แตกโดยตรงด้วยปลายปิเปตต์
ให้ผลบวก 95.9% โดยสามารถให้ผลบวกจากไข่พยาธิแม่เพียงหนึ่งใบ และพบการติดเชื้อร่วมกัน
ของ *T. trichiura* และ *T. vulpis* จำนวน 6 ตัวอย่างจาก 56 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 10.7 แสดง
ให้เห็นถึงการติดเชื้อ *T. vulpis* ในคนซึ่งมีได้ไม่บ่อยในเขตชุมชนนี้ และที่สำคัญคือสามารถตรวจ
พบไข่ *T. trichiura* จากอุจจาระสุนัขในเขตพื้นที่เดียวกัน ซึ่งแสดงถึงความเป็นไปได้ในการเป็น
โฮสต์กักตุนของสุนัขและสามารถส่งผ่านโรคพยาธิไส้เมี้ามาสู่คนได้ ดังนั้นการติดโรคพยาธิไส้เมี้า
T. trichiura ของประชากรในชุมชนนี้จึงสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งจากคนโดยตรงและสุนัข

ภาควิชา...ปรสิตวิทยา.....
สาขาวิชา...ปรสิตวิทยาทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา...2552.....

ลายมือชื่อนิสิต.....ปีณทัต อารีกุล.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5074765030 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORDS : Ribosomal RNA / nested PCR / Trichuriasis

PANNATAT AREEKUL : POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED
DIFFERENTIATION OF HUMAN AND DOG WHIPWORMS.

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHATURONG PUTAPORNTIP, PH.D,

THESIS CO-ADVISOR : PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D, PH.D,

THESIS CO-ADVISOR : ASSIS. PROF. PRASERT SITTHICHAROENCHAI,
PH.D., 104 pp.

Trichuriasis is an important soil-transmitted helminth infection caused by *Trichuris trichiura* accounting for about one-tenth of the world population. Incidentally, *T. vulpis* or dog whipworm has been reported to infect humans based on the egg size. However, an overlapping egg dimension occurs between *T. trichiura* and *T. vulpis* leading to the potential for misdiagnosis. Herein, we determined and compared the small subunit ribosomal RNA sequences of both species of whipworms for developing species-specific PCR diagnosis. After validation of the method, we conducted a cross-sectional survey at Ta Song Yang District in Tak Province, northwestern Thailand in 2008. Stool samples were randomly recruited from 80 schoolchildren (36 males, 44 females) and 59 semi-domesticated dogs in this community and 20 strayed dogs in Bangkok. Results have shown that the sensitivity, comparing with microscopic examination of stool samples using formalin-ether sedimentation method, was 44% when DNA was extracted by the glass-bead beating method. However, the sensitivity reached 95.9% when DNA was extracted from individual eggs disrupted by directly pressing on them with pipette tips and single eggs could be detected by this method. Co-infections of *T. trichiura* and *T. vulpis* were found in 6 of 56 *Trichuris*-positive cases (10.7%), suggesting that human infection with *T. vulpis* was not uncommon in this region. Importantly, *T. trichiura* eggs were detected in dog stool samples from the same community, suggesting the potential reservoir role of dogs in the transmission of human whipworm. Therefore, human acquisition of *T. trichiura* infection in this community could involve both anthroponotic and zoonotic transmission cycles.

Department : Parasitology

Field of Study : Medical Parasitology.....

Academic Year : 2009.....

Student's Signature Pannatit Areekul.

Advisor's Signature Chaturong Putaporn

Co-Advisor's Signature Somchai Jongwutiwes

Co-Advisor's Signature P. Prasert Sitthicharoenchai

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ ประสิทธิ์ประสาทความรู้และคำแนะนำในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ระหว่างการศึกษาวิจัย เป็นผู้ให้ความเมตตากรุณาต่อข้าพเจ้าอย่างดียิ่ง ตลอดจนแก้ไขข้อผิดพลาดของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์อย่างดีที่สุด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมชาย งามวิมลเศียร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย ที่ได้กรุณาให้การสนับสนุน ให้ความรู้ ความคิดเห็นต่าง ๆ ในการศึกษาวิจัย ตลอดจนช่วยแก้ไขข้อผิดพลาดของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้อย่างดียิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงอีกครั้งไว้ ณ ที่นี้ สำหรับคำสอนต่าง ๆ อันมีคุณค่าที่ข้าพเจ้าพึงได้รับตลอดการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ธีรยุทธ จันทร์ชุม ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงศักดิ์ ลิ้มปิติตกุล ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ อาจารย์สุนีย์ สิริธรรมใจ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร คุณมาลี เจริญกร คุณอุรัสยา พัฒนวงศ์ คุณทวีศักดิ์ แซ่เตีย คุณธงชัย หงษ์ศรีเมือง ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่าง ๆ ตลอดจนความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านสำหรับการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ น้อง และเพื่อน ๆ ทุกคนสำหรับคำปรึกษา กำลังใจ ตลอดจนการสนับสนุนข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
อนุกรมวิธานของพยาธิตัวตืด (Trichuris sp.).....	5
ลักษณะทั่วไปของพยาธิตัวตืด.....	7
กายสัณฐานของ <i>Trichuris trichiura</i>	9
วงชีวิตของ <i>Trichuris trichiura</i>	14
การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์และกลไกการแพร่กระจายของ <i>Trichuris trichiura</i> ...	16
อาการแสดงทางคลินิกและพยาธิสภาพ.....	21
การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ.....	24
การควบคุมและป้องกันโรคพยาธิตัวตืด.....	25
การรักษาโรคพยาธิตัวตืด.....	25
<i>Trichuris vulpis</i> กับบทบาทในการเกิด zoonosis.....	25
การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของพยาธิตัวตืด.....	27
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
รูปแบบงานวิจัย.....	30
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	30
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	30
ขนาดของกลุ่มประชากร.....	30
เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	31

	หน้า
การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง.....	35
การวางแผนการเก็บรวบรวมตัวอย่างอุจจาระ.....	35
การรวบรวมไข่พยาธิโดย concentration technique.....	36
การตรวจหาเชื้อปรสิตโดย simple smear technique.....	37
การวัดขนาดไข่พยาธิ.....	37
การนับจำนวนไข่พยาธิโดย simple smear technique.....	37
การสกัดดีเอ็นเอจาก <i>Trichuris trichiura</i> ตัวเต็มวัย.....	38
การสกัดดีเอ็นเอจากไข่พยาธิที่บดด้วย pipette tip.....	39
การสกัดดีเอ็นเอจากไข่พยาธิที่กระแทกด้วยเม็ดแก้ว.....	41
การออกแบบ oligonucleotides.....	41
การทำโคลน (subcloning).....	44
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอร์เรส.....	49
การตรวจผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธี gel electrophoresis.....	51
การวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA.....	51
4. ผลการทดลอง.....	56
ผลการตรวจหาเชื้อปรสิตในอุจจาระภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	56
ผลจาก PCR และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S-ITS1-5.8S gene.....	59
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S-ITS1-5.8S gene.....	60
ผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของ <i>T. trichiura</i> และ <i>T. vulpis</i>	73
ผลการวินิจฉัย <i>T. trichiura</i> และ <i>T. vulpis</i> โดยวิธี PCR.....	74
การทดสอบความไวและความจำเพาะของไพรเมอร์.....	77
ความสัมพันธ์ทางสัณฐานวิทยาของไข่พยาธิต่อสายพันธุ์.....	80
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	85
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	88
รายการอ้างอิง.....	92
ภาคผนวก.....	101
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	104

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ตัวอย่างพยาธิไส้เ้มาชนิดต่าง ๆ และโฮสต์จำเพาะของพยาธิ.....	6
2.	แสดงความชุกของปรสิตในทางเดินอาหารที่ตรวจพบในอุจจาระสุนัขประเทศไทย อินเดีย.....	18
3.	PCR condition และ PCR Cycle Profile ของ semi-nested PCR ด้วย ไพรเมอร์ TT18SF0-TT58SR0.....	52
4.	PCR condition และ PCR Cycle Profile ของ semi-nested PCR ด้วย ไพรเมอร์ TT18SF0-TT58SR1.....	53
5.	PCR condition และ PCR Cycle Profile ของ nested PCR ด้วยไพรเมอร์ HT18SF0-HT18SR0.....	54
6.	PCR condition และ PCR Cycle Profile ของ nested PCR ด้วยไพรเมอร์ HTT18SF0-HT18SR และ HTV18SF0- HT18SR.....	55
7.	อัตราการตรวจพบเชื้อปรสิตในทางเดินอาหารชนิดต่าง ๆ ของเด็กนักเรียนที่ ใช้ในการวิจัย.....	57
8.	อัตราการตรวจพบเชื้อปรสิตในทางเดินอาหารชนิดต่าง ๆ ของสุนัขที่ใช้ใน การวิจัย.....	58
9.	ขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณต่าง ๆ บน ribosomal RNA ของ <i>T. trichiura</i> และ <i>T. vulpis</i>	62
10.	การแทนที่ของเบสหนึ่งตำแหน่งบริเวณ 18S rRNA gene ของ <i>T. trichiura</i> โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง.....	63
11.	ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวซ้ำกันของนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของ <i>T. trichiura</i>	70
12.	ความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณ ITS1 ระหว่าง <i>T. vulpis</i> จากงานวิจัย กับลำดับเบสอ้างอิง.....	70
13.	ประสิทธิภาพของกระบวนการ PCR ที่ใช้ตรวจสอบ DNA ของ <i>T. trichiura</i> และ <i>T. vulpis</i>	78
14.	อัตราการติดโรคปรสิตหนอนพยาธิ 4 ชนิดในสุนัขจรจัดในเขตกรุงเทพฯ.....	86

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ภาพวาดตัวเต็มวัยของพยาธิตัวตืด <i>Trichuris trichiura</i> เพศผู้.....	11
2. แสดงตัวเต็มวัยของพยาธิตัวตืด <i>T. trichiura</i> เพศเมียและเพศผู้.....	11
3. แสดงส่วนปลายหางของพยาธิตัวตืด <i>T. trichiura</i> ตัวเต็มวัย.....	12
4. ภาพถ่ายเปรียบเทียบไข่พยาธิตัวตืด <i>T. vulpis</i> และ <i>T. trichiura</i>	13
5. วงชีวิต (life cycle) ของพยาธิตัวตืด <i>T. trichiura</i>	15
6. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า LST และความชุกของ ผู้ป่วยจาก <i>A. lumbricoides</i> , <i>T. trichiura</i> และ Hookworm.....	20
7. ภาพถ่ายจาก SEM แสดงตัวอ่อนของพยาธิตัวตืดในลำไส้หนู.....	22
8. ภาพถ่ายพยาธิตัวตืดในลำไส้หนู.....	23
9. การไหลออกนอกร่างกายของไส้ตรง (rectal prolapse).....	23
10. แสดง DNA ผลิตผลจาก semi-nested PCR (รอบที่สอง) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis.....	60
11. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA gene ของพยาธิตัวตืด.....	64
12. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS1 และ 5.8S rRNA gene ของพยาธิตัวตืด.....	71
13. แสดง phylogenetic tree ของ <i>T. trichiura</i> และ <i>T. vulpis</i>	73
14. แสดงแถบ DNA ผลิตผลจาก nested PCR รอบที่สองจากตัวอย่างอุจจาระ นักเรียนและสุนัข.....	75
15. แสดงแถบ DNA ผลิตผลจาก nested PCR รอบที่สองจากตัวอย่างอุจจาระ นักเรียน.....	76
16. แสดงแถบดีเอ็นเอผลิตผลจากวิธี PCR โดยใช้ไข่พยาธิตัวตืดจำนวนต่างกัน.....	79
17. แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนไข่พยาธิตัวตืดจากอุจจาระนักเรียนที่ความยาวต่าง ๆ.....	80
18. แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนไข่พยาธิตัวตืดกลุ่มที่ให้ผลบวกต่อ <i>T. trichiura</i> และกลุ่ม ที่ให้ผลบวก mixed infection จากอุจจาระนักเรียนที่ความยาวต่าง ๆ.....	81
19. แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนไข่พยาธิตัวตืดจากอุจจาระนักเรียนเป็นรายตัวอย่างที่ ให้ผลบวกต่อ <i>T. trichiura</i> ที่ความยาวต่าง ๆ.....	82
20. แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนไข่พยาธิตัวตืดจากอุจจาระสุนัขที่ขนาดความยาวต่าง ๆ.....	83
21. ภาพถ่ายไข่พยาธิตัวตืด <i>T. trichiura</i> และ <i>T. vulpis</i> จากการศึกษา.....	84

บทที่ 1

บทนำ

พยาธิไส้เ็นหรือ whipworm (*Trichuris* sp.) จัดเป็นปรสิตจำพวกหนอนพยาธิตัวกลมในลำไส้ที่ไม่มีฟาสมิด (Aphasmids) โดยคำว่า “*Trichuris*” ตามความหมายแล้วแปลว่า “มีหางคล้ายเส้นด้าย” ทั้งนี้เกิดจากความเข้าใจผิดว่าส่วนที่เรียวยาวเล็กของพยาธิไส้เ็นเป็นส่วนหางซึ่งแท้จริงแล้วเป็นส่วนหัว ต่อมาในปี ค.ศ. 1998 Schrank ได้ตั้งชื่อพยาธิขึ้นใหม่ว่า “*Trichocephalus*” ซึ่งหมายถึงส่วนหัวที่มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย แต่ชื่อใหม่นี้ไม่เป็นที่ยอมรับโดยมีใช้กันเฉพาะในแถบลาตินอเมริกาเท่านั้น ปัจจุบันจึงรู้จักกันทั่วไปในชื่อเดิมคือ *Trichuris* sp. ลำตัวของพยาธิแบ่งออกเป็นสองส่วนอย่างชัดเจนคือส่วนหน้า (anterior) ซึ่งมีลักษณะเรียวยาวเล็ก และส่วนท้าย (posterior) ที่มีลักษณะพองโต มีหลอดอาหารเป็นแบบ stichosome เช่นเดียวกับหนอนพยาธิ *Capillaria* sp. และ *Trichinella spiralis* ซึ่งจัดอยู่ใน Superfamily Trichinelloidea

พยาธิไส้เ็นเป็นปรสิตที่พบได้ทั่วไปในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด ปัจจุบันพบว่าพยาธิไส้เ็นมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ (species) ซึ่งโดยเบื้องต้นแล้วมักใช้ลักษณะทางกายวิภาคของพยาธิร่วมกับชนิดของโฮสต์ที่พบในการจำแนก สำหรับ *Trichuris trichiura* (L., 1771) เป็นพยาธิไส้เ็นชนิดที่จำเพาะต่อสัตว์ในตระกูลไพรเมท (primates) รวมถึงมนุษย์ด้วย และในเวลาต่อมาได้มีผู้รายงานพบพยาธิไส้เ็นชนิดอื่น ๆ อีกหลายชนิดที่มีโฮสต์จำเพาะเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สุนัข สุนัขจิ้งจอก โค แกะ แพะ อูฐ กระต่าย และหนู เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้สนใจทำการศึกษเกี่ยวกับคุณลักษณะต่าง ๆ ของพยาธิไส้เ็นในหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน สันฐานวิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยาระหว่างโฮสต์กับพยาธิ รวมถึงชีวโมเลกุลของพยาธิ เป็นต้น สำหรับการศึกษในช่วงแรกมักเป็นการศึกษาสันฐานวิทยาของพยาธิดังเช่นการศึกษาของ Chandler (1930) ได้รายงานลักษณะของพยาธิตัวเต็มวัยและไข่ของพยาธิไส้เ็น 5 ชนิด คือ *T. vulpis*, *T. ovis*, *T. trichiura*, *T. minuta* และ *T. leporis* พร้อมทั้งศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาโดยละเอียดของ *T. tenuis* ซึ่งเป็นชนิดที่ค้นพบใหม่จากอุจจาระที่ตายใน Houston Zoological Garden เป็นต้น การศึกษาเหล่านี้มีจุดประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของพยาธิไส้เ็นโดยการเปรียบเทียบและศึกษาอนุกรมวิธานจากลักษณะภายนอกของพยาธิตัวเต็มวัยที่พบในโฮสต์ชนิดต่าง ๆ เป็นหลัก

วงชีวิตของ *T. trichiura* มีการศึกษาครั้งแรกโดย Grassi ในปี ค.ศ. 1887 จากนั้นมีการศึกษาต่อมาโดย Fulleborn ในปี ค.ศ. 1923 และ Hasegawa ในปี ค.ศ. 1924 พยาธิไส้มี้ม่วงจรชีวิตที่สมบูรณ์โดยอาศัยโฮสต์เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ไม่มีโฮสต์ตัวกลาง การติดต่อสู่มนุษย์เป็นแบบ soil-transmitted จากการรับประทานไข่พยาธิระยะติดต่อซึ่งผ่านการเจริญอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมภายนอกโฮสต์เป็นระยะเวลาหนึ่ง สำหรับผู้ที่ติดโรคพยาธิไส้มี้ม่วงมักไม่มีอาการแสดงทางคลินิกหรืออาจเกิดอาการเพียงเล็กน้อยไม่รุนแรง อย่างไรก็ตามในผู้ที่ติดเชื้อระดับปานกลาง (moderate infection) หรือติดเชื้อเป็นจำนวนมาก (heavy infection) สามารถทำให้ผู้ป่วยเกิดพยาธิสภาพภายในลำไส้ มีอาการแสดงที่รุนแรงและชัดเจน เช่น ท้องร่วงเรื้อรัง เสียเลือดมาก โลหิตจาง ขาดสารอาหาร ในกรณีที่มีพยาธิจำนวนมากอาจเกิดภาวะลำไส้อุดตันหรือลำไส้ทะลุจนเสียชีวิตได้ (ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุล, ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ และประยงค์ ระดมยศ, 2549)

จากข้อมูลในปี ค.ศ. 2001 พบว่าประชากรเกือบหนึ่งพันล้านคนทั่วโลกติดโรคพยาธิไส้มี้ม่วง (trichuriasis) (Beaver, Jung และ Cupp, 1984) โดยพบมากเป็นอันดับสองรองจากโรคพยาธิไส้เดือน (ascariasis) (Katz, Despommier และ Gwadz, 1989) และมีอัตราการแสดงอาการของโรคสูงถึงกว่า 200 ล้านคน โรคพยาธิไส้มี้ม่วงจัดเป็นโรคที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของประชากร และโดยอ้อมต่อประสิทธิภาพในการทำงานของผู้ติดเชื้ออันจะมีผลต่อการพัฒนาสังคมและเศรษฐกิจของประเทศ โดยเฉพาะประเทศเขตร้อนแถบเส้นศูนย์สูตรและเขตอบอุ่นที่มีการจัดการด้านสาธารณสุขต่ำกว่ามาตรฐาน หรือในประชากรที่มีระดับการครองชีพต่ำและขาดการโภชนาการที่ดีซึ่งรวมถึงประชากรในประเทศไทยด้วย พยาธิไส้มี้ม่วงเป็นพยาธิที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย อัตราการติดโรคพยาธิไส้มี้ม่วงโดยเฉลี่ยทั่วประเทศคิดเป็นร้อยละ 6.46 พบมากที่สุดทางภาคใต้โดยมีอัตราการติดโรคร้อยละ 32.5 สำหรับภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีอัตราการติดโรคร้อยละ 4.46, 0.12 และ 0.01 ตามลำดับ (สรรเพชญ์ เบญจวงศ์กุลชัย)

หลังจากปี ค.ศ. 1956 นักวิจัยบางส่วนได้สังเกตเห็นถึงความสำคัญในการศึกษาเกี่ยวกับพยาธิไส้มี้ม่วงชนิดที่เป็นปรสิตของสุนัขหรือ *T. vulpis* มากขึ้นเนื่องจากมีการตรวจพบไข่พยาธิในอุจจาระผู้ป่วย trichuriasis ซึ่งไข่ที่พบมีขนาดใหญ่กว่าไข่พยาธิ *T. trichiura* ที่พบโดยปกติ แต่กลับมีความใกล้เคียงกับขนาดไข่ของ *T. vulpis* จึงมีความเข้าใจว่ามนุษย์สามารถติดโรคจาก *T. vulpis* ได้ ในปัจจุบันสภาวะการณของผู้ป่วย trichuriasis ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเกิดจาก *T. vulpis* ทั่วโลกมีรายงานอยู่มากกว่า 30 ราย ซึ่งล้วนแล้วแต่ให้คำวินิจฉัยจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่พยาธิที่พบในอุจจาระเท่านั้น นอกจากนี้ *T. suis* ซึ่งเป็นปรสิตของสุกรก็เคยมีรายงานว่าสามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้เช่นกัน (Minvielle, Pezzani และ Basualdo, 1993)

กรุงเทพมหานครจัดเป็นเมืองที่มีการเจริญเติบโตในด้านเศรษฐกิจ สังคม และคุณภาพชีวิตของประชากรอย่างรวดเร็ว แต่ในขณะที่เดียวกันหลายสถานที่ในกรุงเทพฯยังคงเป็นแหล่งชุมชนที่มีผู้คนอาศัยอยู่อย่างแออัดและมีคุณภาพชีวิตต่ำกว่ามาตรฐาน เช่น แหล่งสลัมหรือชุมชนที่มีระบบจัดการน้ำทิ้งและการระบายน้ำไม่ถูกหลักสุขาภิบาล เป็นต้น ซึ่งไม่ว่าจะเป็นแหล่งชุมชนที่ได้กล่าวมา วัด สวนสาธารณะ หรือโรงเรียน ล้วนแต่เป็นสถานที่ที่เหมาะสมและแพร่กระจายของโรคพยาธิไส้มา้ทั้งในมนุษย์และสุนัข โดยเฉพาะในสุนัขจรจัดซึ่งพบได้กระจัดกระจายทั่วไปในกรุงเทพฯ สุนัขเหล่านี้ไม่ได้รับการควบคุมและป้องกันโรคจากทางรัฐบาลทำให้การแพร่กระจายโรคพยาธิไส้มา้ในสุนัขจรจัดมีมากตามไปด้วยและสุนัขจรจัดเหล่านี้ยังคงมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสุนัขที่เลี้ยงแบบปล่อย เป็นเหตุให้สุนัขเลี้ยงสามารถติดโรคพยาธิไส้มา้ได้โดยตรง และอาจทำหน้าที่เป็นตัวแพร่กระจายเชื้อสู่มนุษย์ที่ใกล้ชิดตัวสุนัขหรืออาศัยอยู่ในแหล่งเดียวกันอีกด้วย

ระบาดวิทยาของปรสิตหนอนพยาธิที่พบในสุนัขจรจัดเขตกรุงเทพฯได้รับการศึกษาครั้งแรกโดย Manning และคณะ (1969) ต่อมา Hinz (1980) ได้รายงานอัตราการติดโรคพยาธิในลำไส้ของสุนัขจรจัดในเขตกรุงเทพฯ พบว่าพยาธิไส้มา้มีอัตราการระบาดมากเป็นอันดับสอง (54.2%) และมีรายงานว่าพบน้อยลงเป็น 33% โดยอาคมและสุพจน์ (2544) ถึงแม้ว่าผู้ป่วยที่ติดโรคจาก *T. vulpis* จากทั่วโลกยังมีรายงานไม่บ่อยนัก แต่เนื่องจากพยาธิชนิดนี้มีโฮสต์จำเพาะ (definitive host) เป็นสุนัขซึ่งมีความใกล้ชิดกับมนุษย์ การติดโรคพยาธิไส้มา้จาก *T. vulpis* (zoonotic trichuriasis) จึงเป็นเรื่องที่ควรให้ความสำคัญ เพราะนอกจากจะมีผลทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการทางคลินิกได้เช่นเดียวกับผู้ป่วยจาก *T. trichiura* แล้ว ยังพบว่าพยาธิสามารถทำให้ผู้ป่วยบางรายเกิดอาการ visceral larva migrans ได้ (Sukano และคณะ, 1980; Masuda และคณะ, 1987; Dvorak, Spickler และ Roth, n.d.) ดังนั้นการศึกษาในรายละเอียดของพยาธิ *T. vulpis* จึงมีความจำเป็น ในแง่ของ zoonosis อีกด้วย

การพบผู้ป่วย trichuriasis จากพยาธิ *T. vulpis* ในระยะหลังยังคงมีอยู่ และส่วนใหญ่มักให้ผลการวินิจฉัยโรคโดยใช้วิธีการทางสัตวฐานวิทยาของไข่พยาธิในการพิสูจน์ ถึงแม้ว่าไข่ของ *T. vulpis* จะมีรูปร่างลักษณะคล้ายถังเบียร์ (barrel shape) มากกว่าไข่ของ *T. trichiura* ก็ตาม แต่การวินิจฉัยโดยสัตวฐานวิทยาของไข่พยาธิทั้งสองชนิดก็อาจก่อให้เกิดความสับสนและความผิดพลาดของผลการวินิจฉัยได้ เนื่องจากไข่พยาธิทั้งสองชนิดนี้มีรูปร่างและขนาดที่ใกล้เคียงกัน (Dunn และคณะ, 2002) หรือหากจะมีการวินิจฉัยไข่ว่วมกับการตรวจดูพยาธิตัวเต็มวัยก็ยังคงพบอุปสรรคจากโอกาสที่จะพบพยาธิตัวเต็มวัยในอุจจาระผู้ป่วยซึ่งมีน้อยมาก ส่วนการนำพยาธิตัวเต็มวัยออกมาศึกษานอกจากจะมีวิธีการที่ยุงยากแล้วยังเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายแก่ผู้ป่วยโดยไม่จำเป็น

อย่างไรก็ตามหลังจากมีความเจริญก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี องค์ความรู้ต่าง ๆ ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาพยาธิไส้เมาถึงอย่างกว้างขวาง เช่น การศึกษาระบาดวิทยา น้ำเหลืองวิทยา และอณูชีววิทยา เป็นต้น ในปัจจุบันความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีการที่ดีและมีประสิทธิภาพสูงสำหรับใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยเกิดความผิดพลาดน้อย เช่น การศึกษาคุณลักษณะของดีเอ็นเอของพยาธิไส้เมาถึง โดยเฉพาะการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal RNA แต่ข้อมูลดังกล่าวยังมีอยู่อย่างจำกัด ซึ่งข้อมูลลำดับเบสของ ribosomal RNA gene ใน *T. vulpis* มีเฉพาะในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 (accession number AM234616) (Cutillas และคณะ, 2007) ส่วนลำดับเบสของ *T. trichiura* มีรายงานไว้ในส่วนของ 18S rRNA gene เท่านั้น ดังนั้นการโคลน ribosomal RNA gene บนตำแหน่งเป้าหมายเพื่อให้ได้ยีนต้นแบบที่มีลำดับเบสสมบูรณ์จึงมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องในอนาคต ตลอดจนการใช้สำหรับพัฒนาวิธีการปฏิบัติการลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) เพื่อการวินิจฉัย *T. trichiura* และ *T. vulpis* ได้อย่างถูกต้องในงานวิจัยนี้ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการทราบระบาดวิทยาของพยาธิไส้เมาถึงทั้ง 2 ชนิดนี้ในประเทศไทย และเพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันโรคพยาธิไส้เมาถึงอีกทางหนึ่งด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุกรมวิธานของพยาธิไส้เ้ม่า (*Trichuris* sp.)

Phylum Nematoda

Class Enoplea, Adenophorea, Aphasmidea

Subclass Enoplia

Order Enoplida

Superfamily Trichuroidea

Family Trichuridae

Genus *Trichuris*

พยาธิไส้เ้ม่าเป็นปรสิตหนอนพยาธิตัวกลมที่สำคัญชนิดหนึ่งซึ่งอาศัยอยู่ในลำไส้ของโฮสต์ (intestinal nematode) จากการจัดลำดับหมวดหมู่ในอนุกรมวิธานโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวพยาธิ ชนิดของโฮสต์ และการจำแนกทางชีวโมเลกุล ทำให้ปัจจุบันสามารถจำแนกพยาธิไส้เ้ม่าออกเป็นหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าพยาธิไส้เ้ม่าเป็นปรสิตที่มีความจำเพาะต่อโฮสต์ที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น โค กระบือ แพะ แกะ สุนัข หนู ลิง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในด้านความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพยาธิและโฮสต์จำเพาะโดยพยาธิไส้เ้ม่าแต่ละชนิดมีระดับความหลากหลายของโฮสต์จำเพาะที่แตกต่างกัน บางชนิดมีความจำเพาะต่อโฮสต์ในระดับ Genus หรือบางชนิดก็มีความจำเพาะต่อโฮสต์ในระดับ Family เช่น *T. arvicolae* ซึ่งมีรายงานพบในสัตว์ฟันแทะใน Family Arvicolidae ขณะเดียวกันบางชนิดก็สามารถพบได้ในโฮสต์ที่มีความห่างไกลกันทางสายวิวัฒนาการมากขึ้น เช่น *T. skrjabini* ซึ่งพบได้ใน อูฐ โค แพะ และแกะ สำหรับพยาธิไส้เ้ม่าที่เป็นปรสิตของมนุษย์ ปัจจุบันพบเพียงชนิดเดียวคือ *T. trichiura*

ตารางที่ 1 แสดงพยาธิไส้เ้ม้าชนิดต่าง ๆ และโฮสต์จำเพาะของพยาธิแต่ละชนิด

ชนิดของพยาธิ	โฮสต์
<i>T. trichiura</i> (Linnaeus, 1771)	primate
<i>T. muris</i> (Schrank, 1788)	rodent (rat, mice)
<i>T. suis</i> (Schrank, 1788)	swine
<i>T. vulpis</i> (Froelich, 1789)	canids
<i>T. ovis</i> (Abildgaard, 1795)	cattle, sheep
<i>T. leporis</i> (Zeder, 1803)	rabbit, hare
<i>T. discolor</i> (Von Linstow, 1906)	cattle
<i>T. skrjabini</i> (Baskakov, 1924)	camel, cattle, sheep, goat
<i>T. tenuis</i> (Chandler, 1930)	camelid
<i>T. sylvilagi</i> (Tiner, 1950)	rabbit
<i>T. arvicolae</i> (n. sp.)	rodent (Family Arvicolidae)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะทั่วไปของพยาธิไส้เ้ม้า

การศึกษาสัณฐานวิทยาของพยาธิไส้เ้ม้ามีอยู่อย่างกว้างขวางนับตั้งแต่อดีตมาจนถึงปัจจุบัน โดยในอดีตจัดว่ามีความสำคัญมากในแง่ของการจัดลำดับหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธาน เนื่องจากได้มีการค้นพบพยาธิไส้เ้ม้าอยู่ในโฮสต์ชนิดอื่น ๆ อีกมาก การจำแนกชนิดของพยาธิจึงใช้การพิจารณาจากลักษณะทางกายวิธานประกอบกับชนิดของโฮสต์ที่พบเป็นสำคัญ อย่างไรก็ตามเมื่อมีการค้นพบพยาธิไส้เ้ม้าในโฮสต์ชนิดต่าง ๆ มากขึ้น การจำแนกชนิดของพยาธิไส้เ้ม้าก็มีความยุ่งยากและคลุมเครือมากขึ้นตามไปด้วย โดยพบว่าพยาธิบางชนิดมีรูปร่างภายนอกเหมือนกันแต่พบในโฮสต์ต่างชนิดกัน บางชนิดมีความแปรผันในรูปร่างลักษณะสูง หรือหลายชนิดที่มีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกันมาก เป็นต้น ในระยะหลังที่ความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลรวมถึงเทคนิคต่าง ๆ ได้ถูกพัฒนาขึ้น การศึกษาลักษณะพันธุกรรมของพยาธิจึงถูกนำมาใช้ประกอบการศึกษาพยาธิไส้เ้ม้าอย่างกว้างขวาง และสามารถให้ความกระจ่างชัดในเรื่องสายพันธุ์ของพยาธิและโฮสต์จำเพาะได้เป็นอย่างดี

หลายการศึกษาได้บรรยายไว้ถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิไส้เ้ม้าที่ได้จากโฮสต์ชนิดต่าง ๆ ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ดังเช่นรายงานของ Mayer ในปี ค.ศ. 1841 ซึ่งเป็นบุคคลแรกที่ได้บรรยายรูปร่างลักษณะของ genital organs และลักษณะภายนอกของพยาธิ *T. ovis* โดยอธิบายสัณฐานวิทยาต่าง ๆ พร้อมด้วยภาพวาดของ spicule และ sheath (Sarwar, 1959) หลังจากนั้นยังมีการอธิบายถึงอนุกรมวิธานและสัณฐานวิทยาของพยาธิใน genus *Trichuris* โดย Wilson (1846) อีกการศึกษาหนึ่งเกี่ยวกับพยาธิไส้เ้ม้าในสัตว์เคี้ยวเอื้องโดย Sprehn (1927) ได้รายงานไว้ว่า *T. globulosa* เป็นปรสิตที่มีโฮสต์จำเพาะคือแกะและแพะ และอธิบายถึงความแตกต่างระหว่าง *T. ovis* และ *T. globulosa* ในลักษณะของ spicule และ sheath ประกอบกับการศึกษาในเวลาต่อมาโดย Chandler (1930) ที่พบว่าความยาวของ spicule สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกชนิดของพยาธิไส้เ้ม้าได้อย่างน่าเชื่อถือที่สุดเมื่อพิจารณาควบคู่ไปกับลักษณะภายนอกอื่น ๆ และในปี ค.ศ. 1932 มีรายงานที่ได้อธิบายถึงลักษณะและโครงสร้างของ vagina ใน *T. ovis* และ *T. globulosa* ทำให้พบว่าโครงสร้างของ vagina ในพยาธิไส้เ้ม้าทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน (Baylis, 1932) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงโครงสร้างของกล้ามเนื้อบริเวณ ejaculatory duct โดย Oliveros และคณะ (2000)

T. suis ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในกรณีของการเกิด zoonotic เนื่องจากกรณีศึกษาพื้นฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากกับ *T. trichiura* (Creplin, 1825; Schwartz, 1926) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่ได้พิสูจน์ถึงความแตกต่างกันในรูปร่างของพยาธิไส้เฒ่าทั้งสองชนิดว่าสามารถแยกจากกันได้ (Sondak, 1948; Pavlovski และ Sondak, 1951) อย่างเช่นความยาวของ spicule สามารถใช้เป็นตัวจำแนกชนิดของพยาธิไส้เฒ่าได้ แต่อย่างไรก็ตาม spicule ของ *T. suis* กับ *T. trichiura* ก็ยังคงมีความคล้ายคลึงกันมาก ในการจำแนกพยาธิทั้งสองชนิดนอกจากความยาวของ spicule แล้วยังสามารถตรวจสอบได้จาก pericloacal papillae ซึ่งพบเฉพาะใน *T. trichiura* เท่านั้น (Chandler, 1930; Knight, 1971) แต่จากการศึกษาเพิ่มเติมโดย Spakulova และ Lysek (1981) พบว่ารูปร่างลักษณะของ *T. suis* ที่ได้จาก *sus scrofa domestica* (swine) และ *sus scrofa scrofa* (wild boar) ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีความแตกต่างกัน ประกอบกับการพบ pericloacal papillae ใน *T. suis* จาก wild boar เช่นเดียวกับใน *T. trichiura* ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาก่อนหน้า *T. trichiura* จึงอาจติดต่อข้ามโฮสต์ไปสู่ wild boar ได้เช่นเดียวกับผลงานตีพิมพ์ในปี ค.ศ. 1979 (Thienpont, Rochette และ Vanparijs, 1979)

จากรายงานของ Spakulova (1994) ซึ่งได้ศึกษาพื้นฐานวิทยาของพยาธิไส้เฒ่าโดยการวัดความยาวของอวัยวะต่าง ๆ และคำนวณด้วยสูตรทางคณิตศาสตร์ เพื่อการจำแนกพยาธิไส้เฒ่าเพศผู้ 5 สายพันธุ์ออกจากกัน คือ *T. ovis*, *T. skrjabini*, *T. sylvilagi*, *T. suis* และ *T. trichiura* พบว่าการจำแนกพยาธิไส้เฒ่าเพศผู้โดยการวัด spicule length, spicule shaft width และ total body length ของพยาธิเป็นวิธีการที่เหมาะสมและเพียงพอสำหรับการตรวจวินิจฉัย *T. skrjabini*, *T. sylvilagi* และ *T. ovis* ออกจากกัน ส่วน *T. suis* และ *T. trichiura* เป็นพยาธิที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันเป็นอย่างมาก และมักทำให้การวินิจฉัยโดยพิจารณาเพียงลักษณะที่กล่าวมาแล้วผิดพลาดไป จึงต้องมีเกณฑ์ในการพิจารณาเพิ่มขึ้นอีก 4 ลักษณะคือ anterior body length, anterior body width, maximum posterior body width และ middle body width in place of oesophagointestinal junction จึงจะเพียงพอและเชื่อถือได้

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการศึกษาความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของพยาธิไส้เฒ่าตัวเต็มวัยเพื่อเป็นเกณฑ์ในการจำแนกชนิดของพยาธิ ในจำนวนนี้มีหลายชนิดสามารถวินิจฉัยได้อย่างชัดเจน แต่ก็ยังมีข้อยกเว้นสำหรับบางชนิดที่อาจมีความแปรผันในรูปร่างลักษณะสูงเมื่ออยู่ในโฮสต์ต่างชนิดกัน เนื่องจากชนิดของโฮสต์ที่พยาธิอาศัยมีอิทธิพลให้พยาธิมีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกันไป และบางครั้งอาจทำให้มีการระบุเป็นชนิดใหม่ได้ ดังนั้นการใช้เกณฑ์ในการจำแนกชนิดของพยาธิไส้เฒ่าโดยอาศัยการพิจารณาจากสัณฐานวิทยาของตัวพยาธิเพียงอย่างเดียวจึงมีความไม่ชัดเจน (Knight, 1984)

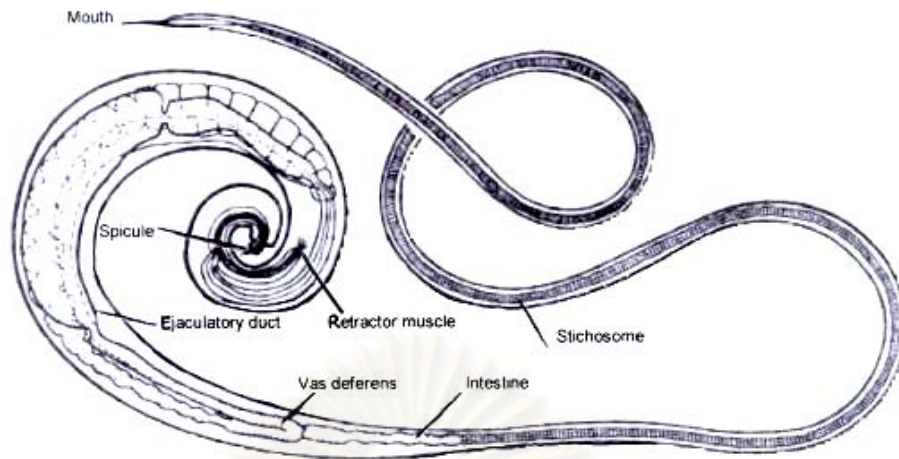
สำหรับการศึกษาสัณฐานวิทยาของไขพยาธิไส้ม้านั้นเริ่มขึ้นในระยะหลังโดย Corrêa, Yamanaka, Corrêa, Silva และ Silva (1980) เป็นคนแรก ซึ่งทำการศึกษาไขพยาธิภายในมดลูกของ *T. trichiura* ตัวเต็มวัยที่ได้จากคนไข้ จากการศึกษาพบว่ามิใช่พยาธิขนาดใหญ่ผิดปกติจากที่เคยพบมาปนอยู่กับไขพยาธิขนาดปกติ ส่วน Ash และ Orihel (1984) ได้รายงานเกี่ยวกับขนาดของไขโดยทั่วไปของ *T. trichiura* ว่ามีความยาว 50–54 ไมโครเมตร และกว้าง 22–23 ไมโครเมตร ต่อมาได้มีการศึกษาของ Yoshikawa และคณะ (1989) ที่ให้การสนับสนุนผลงานของ Corrêa และคณะ (1980) ได้เป็นอย่างดี โดยเริ่มจากการพบความผันแปรในขนาดของไข *T. trichiura* ในอุจจาระของผู้ป่วยซึ่งมีทั้งไขขนาดปกติจนถึงขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังอธิบายถึงสัณฐานวิทยาของพยาธิตัวเต็มวัยเพศเมียที่ได้จากผู้ป่วยรายเดียวกัน พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับตัวเต็มวัยและไขของ *T. vulpis* ที่ได้จากอุจจาระสุนัข พบว่าพยาธิตัวเต็มวัยเพศเมียของ *T. trichiura* สามารถแยกออกจาก *T. vulpis* ได้โดยมดลูกของ *T. trichiura* จะมีลักษณะคดเวียงอย่างเด่นชัด ในขณะที่มดลูกของ *T. vulpis* จะค่อนข้างตรง ส่วนการศึกษาความผันแปรในขนาดของไขพยาธิพบว่าความยาวของไข *T. trichiura* สามารถแยกออกเป็นสองกลุ่มได้อย่างชัดเจน โดยกลุ่มขนาดเล็กมีความยาวน้อยกว่า 64 ไมโครเมตร กลุ่มขนาดใหญ่มีความยาวตั้งแต่ 64 ไมโครเมตรขึ้นไป และยาวที่สุดถึง 82.5 ไมโครเมตร ส่วนไขของ *T. vulpis* มีความยาวตั้งแต่ 72.5–90.0 ไมโครเมตร ซึ่งคาบเกี่ยวกับขนาดไขของ *T. trichiura* กลุ่มขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังมีรายงานเรื่องการพัฒนาของตัวอ่อนในไขพยาธิทั้งสองชนิดที่เลี้ยงไว้ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าไขที่ได้จากมดลูกของพยาธิทั้งสองชนิดหยุดการเจริญที่ระยะ morula ในขณะที่ไขพยาธิจากอุจจาระสามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนได้ แต่ไขของ *T. vulpis* ส่วนใหญ่จะมีขนาดโตขึ้นและมีลักษณะคล้ายถังเบียร์ (barrel shape) นอกจากนี้ยังมีรายงานผู้ป่วย (Case report) ซึ่งตรวจพบไขพยาธิไส้ม้านขนาดใหญ่กว่าไข *T. trichiura* ขนาดปกติคือมีความยาวเฉลี่ย 90 ไมโครเมตร ความกว้างเฉลี่ย 40 ไมโครเมตร เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Yoshikawa และคณะ (1989) ประกอบกับการสืบประวัติพบว่าผู้ป่วยเลี้ยงสุนัข จึงให้การวินิจฉัยว่าไขพยาธิที่พบเป็นไขพยาธิ *T. vulpis* ซึ่งติดต่อสู่ผู้ป่วยโดยบังเอิญ (Dunn และคณะ, 2002; Kenney และ Yermakov, 1980)

กายสัณฐานของ *Trichuris trichiura*

กายสัณฐานของ *T. trichiura* ตัวเต็มวัยเมื่อดูสด ๆ จะเห็นเป็นสีเทาอมชมพู ส่วนหน้าของลำตัว (anterior) มีลักษณะเรียวยาวเล็กคล้ายปลายไส้ที่มีความยาวประมาณ 3 ใน 5 ของความยาวลำตัวทั้งหมด ที่ปากไม่มีริมฝีปากแต่มี stylet ที่มีลักษณะแหลมมีหน้าที่ช่วยในการไชเข้าสู่เยื่อบุผนังลำไส้ของโฮสต์ ต่อจากปากเป็นหลอดอาหารแบบ stichosomal type ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่พบในพยาธิ superfamily Trichuroidea เท่านั้น ส่วนต้นและส่วนปลายของหลอดอาหารประกอบด้วยกล้ามเนื้อเป็นบริเวณสั้น ๆ ส่วนกลางของหลอดอาหารซึ่งมีความยาวจะประกอบไปด้วยเซลล์ stichocyte เรียงต่อกันเป็นแถว ตรงกลางของแต่ละเซลล์มีรูซึ่งเป็นทางผ่านของอาหาร ลักษณะของหลอดอาหารแบบ stichosomal type นี้พบเป็นครั้งแรกจากรายงานของ Eberth ในปี ค.ศ. 1859 ซึ่งพบว่าหลอดอาหารของ *T. trichiura* มีลักษณะที่แตกต่างจากพยาธิตัวกลมชนิดอื่นโดยอยู่ภายในเซลล์ขนาดใหญ่ที่เรียงต่อกันเป็นแถวตลอดความยาวของส่วนหน้าของลำตัว หลอดอาหารแบบ stichosomal type นี้ได้รับการศึกษาเพิ่มเติมและเผยแพร่โดยนักวิจัยอีกหลายท่าน ซึ่งผลงานได้ถูกรวบรวมไว้โดย Chitwood (2009) สำหรับส่วนหางหรือส่วนท้าย (posterior) ของตัวพยาธิจะมีรูปร่างอ้วนหนาคล้ายด้ามไต้ยาวประมาณ 2 ใน 5 ของความยาวลำตัว ลักษณะภายนอกต่างกันตามเพศของพยาธิ ส่วนอวัยวะภายในประกอบด้วยลำไส้ ทวารหนัก และระบบสืบพันธุ์ โดยลำไส้เป็นส่วนที่ต่อมาจากหลอดอาหารมีความยาวไปจนถึงสุดของส่วนหางและเปิดออกที่ทวารหนัก (cloaca)

พยาธิตัวผู้ (ภาพที่ 1, 2 และ 3A) มีความยาวลำตัวประมาณ 30-45 มิลลิเมตร ส่วนหางมีลักษณะม้วนงอ กว้างประมาณ 2 มิลลิเมตร อวัยวะของพยาธิมีลักษณะเป็นกระเปาะอยู่บริเวณใกล้ปลายหางทอดยาวขึ้นมาจนถึงบริเวณรอยต่อระหว่างหลอดอาหารกับลำไส้จากนั้นต่อกับท่อนำอสุจิ (vas deferens) และ ejaculatory duct ที่เป็นกล้ามเนื้อมาเปิดออกที่ cloaca ส่วนปลายหางพบ spicule 1 อันยาวประมาณ 2.5 มิลลิเมตร มีปลอกหุ้มซึ่งสามารถยืดหดได้ บริเวณผิวของปลอกมีปุ่มเล็ก ๆ มากมายเรียกว่า spinous spicular sheath

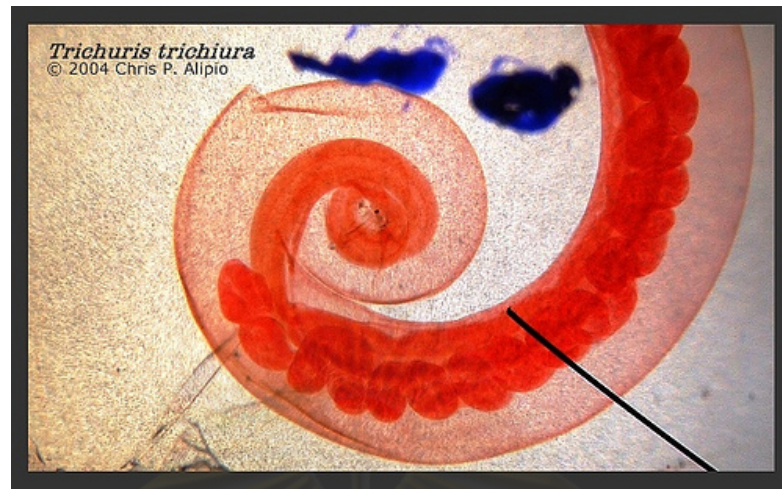
พยาธิตัวเมีย (ภาพที่ 2, 3B) มีความยาวลำตัวประมาณ 35-50 มิลลิเมตร ส่วนหางตรงไม่ม้วนงอเหมือนเพศผู้ ปลายหางมน มีอวัยวะสืบพันธุ์เพียงชุดเดียว โดยมีรังไข่อยู่บริเวณตอนกลางของหางทอดยาวไปจนถึงปลายหาง ต่อกับท่อไข่ (oviduct) มดลูก (uterus) ซึ่งสามารถบรรจุไข่ได้ถึง 60,000 ฟอง และช่องคลอดที่มีความยาวมาเปิดออกใกล้ตอนปลายของหลอดอาหาร (Garcia, 2001)



ภาพที่ 1 ภาพวาดแสดงส่วนประกอบของ *Trichuris trichiura* ตัวเต็มวัยเพศผู้
ที่มา: <http://www.soton.ac.uk/~ceb/Diagnosis/Vol5.htm>



ภาพที่ 2 แสดงตัวเต็มวัยของพยาธิ *T. trichiura* เพศเมีย (ซ้าย) และเพศผู้ (ขวา)
ที่มา: <http://ucdnema.ucdavis.edu/imagemap/nemmap/ent156html/E156trichurisB>



ภาพที่ 3A แสดงปลายหางของ *T. trichiura* เพศผู้ มีลักษณะม้วนงอ มองเห็นอวัยวะ

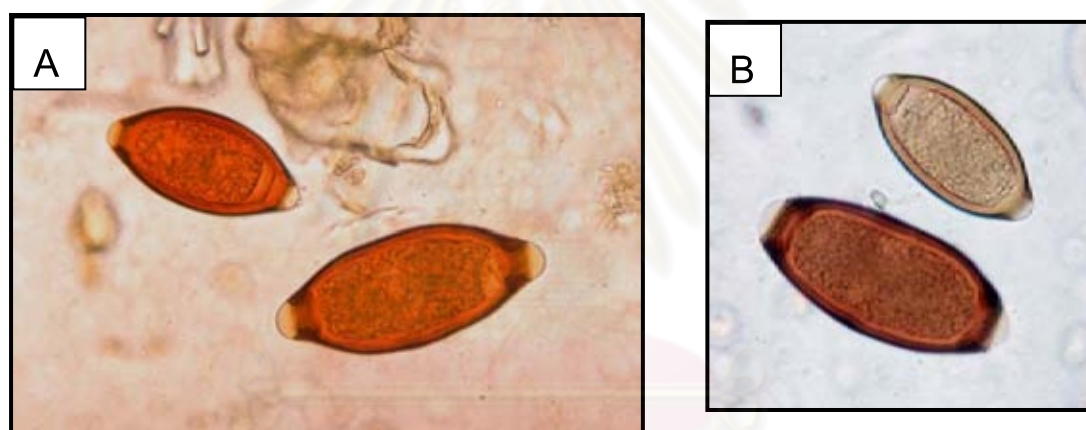
ที่มา: <http://www.flickr.com/photos/lordzagato/3610056593/>



ภาพที่ 3B แสดงปลายหาง *T. trichiura* เพศเมีย ที่มีลักษณะเหยียดตรง

ที่มา: <http://www.flickr.com/photos/lordzagato/3610056195/>

ไข่พยาธิ *T. trichiura* (ภาพที่ 4) โดยทั่วไปมีขนาดกว้าง 21-26 ไมโครเมตร ยาว 50-56 ไมโครเมตร แต่จากการศึกษาถึงความหลากหลายในขนาดของไข่ *T. trichiura* พบว่าไข่จำนวนหนึ่งมีขนาดใหญ่กว่าไข่ขนาดปกติที่พบเห็นได้ทั่วไปปนอยู่ ซึ่งส่วนใหญ่มีความยาวประมาณ 78 ไมโครเมตร และกว้างประมาณ 30 ไมโครเมตร (Dunn และคณะ, 2002) ไข่พยาธิมีลักษณะรูปทรงรีแบบถึงเปียร์ มีขั้ว 2 ขั้วอยู่ตรงข้ามกัน และมีจุกนูนใสปิดขั้วทั้งสอง ผิวเปลือกไข่เรียบ เปลือกหนา 3 ชั้นเห็นเป็นสีน้ำตาลซึ่งเข้าใจว่าเป็นสีของน้ำดีของโฮสต์ ไข่พยาธิที่ปนออกมากับอุจจาระใหม่ ๆ ภายในจะมีลักษณะเป็นเซลล์เดียว ซึ่งต้องอาศัยการเจริญแบ่งเซลล์อยู่ในสิ่งแวดล้อมภายนอกจนกว่าตัวอ่อนภายในจะผ่านการลอกคราบ 2 ครั้งและเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่สามจึงเป็นระยะติดต่อกัน (ชูเกียรติ และคณะ, 2539)



ภาพที่ 4 แสดงไข่พยาธิ *T. trichiura* ที่มีความหลากหลายของขนาดเปรียบเทียบกับไข่พยาธิ *T. vulpis* ด้วยวิธี simple smear technique.

A. ไข่พยาธิ *T. trichiura* ขนาดปกติ (บน) และ *T. vulpis* (ล่าง)
ที่มา:

1 http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eggs_of_Trichuris_trichiura_and_Trichuris_vulpis_06G0018_jpg_lores.jpg

B. ไข่พยาธิ *T. trichiura* ขนาดปกติ (บน) และขนาดใหญ่ (ล่าง)

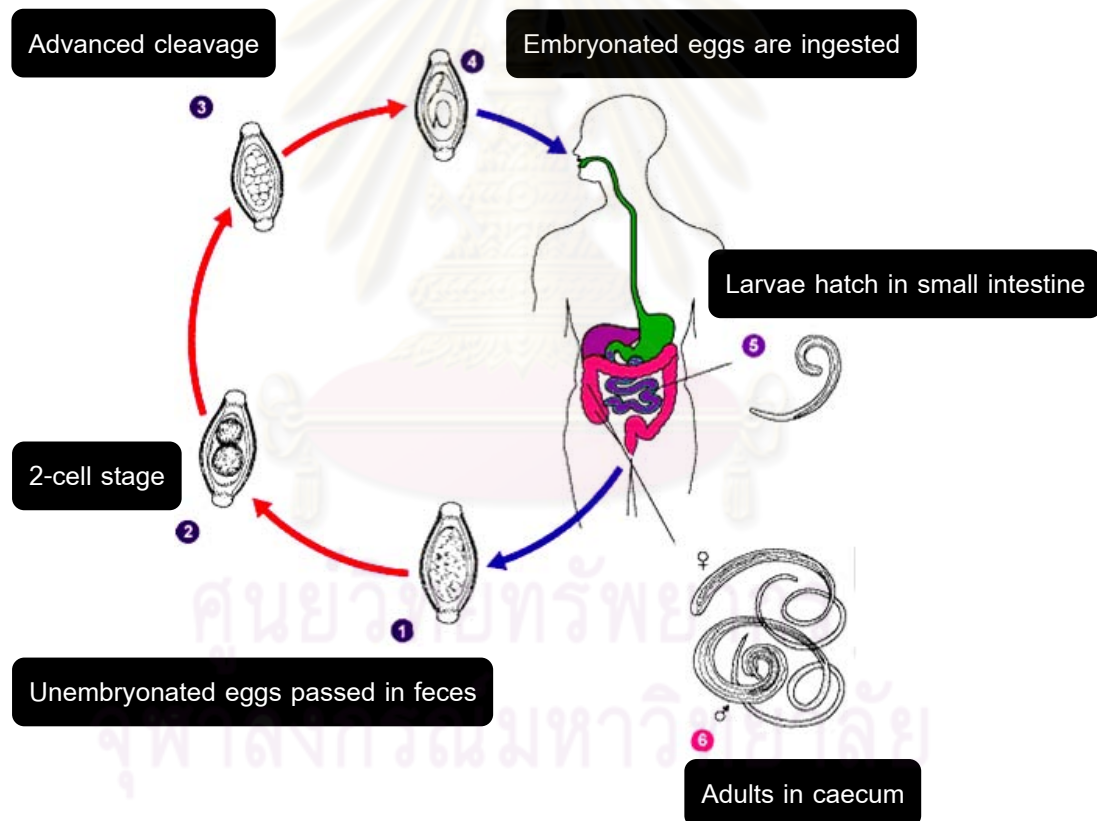
ที่มา: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/S-Z/Trichuriasis/body_Trichuriasis_il1.htm

วงชีวิตของ *Trichuris trichiura*

Trichuris trichiura เป็นพยาธิที่มีวงชีวิตสมบูรณ์โดยอาศัยโฮสต์เพียงชนิดเดียว มีการติดต่อสู่มนุษย์แบบ soil-transmitted โดยการรับประทานไข่ระยะติดต่อ จากนั้นตัวอ่อนจะฟักออกจากไข่ผ่านทาง mucoid plug ที่บริเวณลำไส้เล็กซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นบริเวณ duodenum การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า สภาพความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะอาหารและลำไส้จัดเป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นให้ตัวอ่อนมีการฟักออกจากไข่ภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเข้าสู่ร่างกาย (Panesar และ Croll, 1980) และจะพัฒนาอยู่ในลำไส้เล็กโดยการไชเข้าไปเจริญเติบโตอยู่ในผนังลำไส้ซึ่งมักพบที่บริเวณ crypts of Lieberkuhn (Gutierrez, 1990) ประมาณ 8-10 วันให้หลังพยาธิจะไชออกมาอยู่ในช่องของลำไส้เล็กตามเดิมและเดินทางไปเจริญเป็นพยาธิตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในบริเวณลำไส้ใหญ่ ระหว่างนี้พยาธิจะลอกคราบ 2 ครั้ง ตำแหน่งที่พบพยาธิ (normal habitat) อาจพบได้ตั้งแต่ลำไส้ใหญ่ตอนปลาย (colon) หรืออาจพบได้บ้างบริเวณลำไส้ใหญ่ตอนต้น (caecum) ลำไส้เล็กตอนปลาย (ileum) และไส้ติ่ง (appendix) (สรรเพชญ เบญจวงศ์กุลชัย) โดยพยาธิจะไชเข้าไปฝังตัวอยู่ในผนังลำไส้ และมีส่วน epithelium คลุมพยาธิทั้งตัวเกิดลักษณะคล้ายอุโมงค์ (tunnel) ที่มีพยาธิอาศัยอยู่ และขนาดของอุโมงค์นี้จะใหญ่ขึ้นตามขนาดของพยาธิที่โตขึ้นตามลำดับ (Panesar และ Croll, 1980) เมื่อพยาธิเจริญเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยส่วนหัวของพยาธิจะยังคงฝังอยู่ในผนังลำไส้ แต่ส่วนท้ายของพยาธิจะยื่นออกมาอยู่ในช่องของลำไส้เพื่อประโยชน์ในการผสมพันธุ์และวางไข่ (Zaman, 1984) พยาธิไส้เ็นสามารถเจริญเติบโตได้โดยอาศัยสารอาหารจากโฮสต์ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเลือด และ enterocyte พยาธิที่อาศัยอยู่ในร่างกายมนุษย์สามารถมีอายุขัยได้นาน 2-8 ปี หรือ 3 ปีโดยเฉลี่ย (Garcia, 2001; Gutierrez, 1990)

ตลอดช่วงการเจริญเติบโตของ *T. trichiura* ตั้งแต่ฟักออกจากไข่จนเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย จะไม่มีระยะที่ต้องเดินทางผ่านปอดเพื่อการเจริญเติบโต (lung migration) เหมือนกับที่พบในพยาธิไส้เดือนหรือ round worm (*Ascaris lumbricoides*) และพยาธิปากขอหรือ hookworm ซึ่งระยะเวลาตั้งแต่โฮสต์ได้รับไข่พยาธิไส้เ็นเข้าไปจนถึงระยะที่พยาธิตัวเต็มวัยสามารถออกไข่ป่นมาในอุจจาระของโฮสต์ (prepatent period) ใช้เวลาประมาณ 60-90 วัน (Garcia, 2001) โดยพยาธิตัวเมียหนึ่งตัวสามารถออกไข่ได้เฉลี่ย 3,000-20,000 ฟองต่อวัน (Bundy และ Cooper, 1990) เมื่อพยาธิเพศเมียออกไข่ป่นออกมากับอุจจาระแล้ว ไข่พยาธิต้องใช้ระยะเวลาอยู่ในพื้นดินที่มีสภาวะแวดล้อมเอื้อต่อการเจริญของตัวอ่อนคือต้องเป็นพื้นดินที่รุ่ม มีความชื้นสูง อุณหภูมิระหว่าง 22-35 องศาเซลเซียส โดยตัวอ่อนจะเกิดการลอกคราบ 2 ครั้งไปเป็นตัวอ่อนระยะที่สามอยู่ในไข่ ซึ่งเป็น

ระยะติดต่อที่สามารถฟักเป็นตัวอ่อนภายในโฮสต์ได้ การเจริญของไข่พยาธินับตั้งแต่ออกมาถึง อุจจาระสู่สิ่งแวดล้อมจนกระทั่งเจริญเป็นระยะติดต่อใช้เวลาประมาณ 11-30 วัน ซึ่งจากการ ทดลองพบว่าใช้เวลาประมาณ 28 และ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Beer, 1976) ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมไข่พยาธิสามารถมีชีวิตอยู่และยังคงความสามารถ ในการติดต่อเข้าสู่มนุษย์ได้นานกว่า 18 เดือน ไข่พยาธิไส้เ้าสามารถทนต่อช่วงกว้างของอุณหภูมิ สิ่งแวดล้อมได้น้อยกว่าไข่ของ *A. lumbricoides* แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นไข่ระยะ ติดต่อสูงกว่า ตัวอ่อนของพยาธิจะตายเมื่อถูกแสงแดดนานกว่า 12 ชั่วโมงหรืออยู่ที่อุณหภูมิ -80 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Rukmono, 1980; Bundy และ Cooper, 1989; Brooker, Clements และ Bundy, 2006)



ภาพที่ 5 แสดงวงชีวิต (life cycle) ของพยาธิไส้เ้า *Trichuris trichiura*

ที่มา: ดัดแปลงจาก [3http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Trichuriasis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Trichuriasis.htm)

การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์และกลไกการแพร่กระจายของ *Trichuris trichiura*

Trichuris trichiura เป็นปรสิตหนอนพยาธิในลำไส้ของมนุษย์ ที่มีกลไกการแพร่กระจายเชื้อโดยการกินไข่พยาธิระยะติดต่อซึ่งปนเปื้อนอยู่ในพื้นดิน จากการสำรวจพบว่ามียั่วยุโรคสูงในเด็กซึ่งเป็นวัยที่มีพฤติกรรมต่าง ๆ ที่เอื้อต่อการได้รับไข่พยาธิไส้มาเข้าสู่ร่างกายได้โดยตรง เช่น การเอานิ้วมือเข้าปาก การกินเศษขนมที่ตกลงพื้นดิน หรือการหยิบจับอาหารโดยไม่ล้างมือ เป็นต้น ประกอบกับปัจจัยอื่น ๆ ที่ช่วยเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ เช่น การอาศัยอยู่ในแหล่งที่มีความชุกของโรคสูง การจัดการด้านสุขาภิบาลที่ไม่ได้มาตรฐาน หรือสังคมที่ประชากรมีระดับการศึกษาต่ำ เป็นต้น จากการสำรวจตัวอย่างดินบริเวณสนามเด็กเล่นของโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในประเทศอังกฤษ พบไข่พยาธิ *T. trichiura* ประมาณ 1 ฟองต่อน้ำหนักดิน 1 กรัม (Green และคณะ, 1973) นอกจากนี้ประเทศไทยเคยมีการศึกษาตัวอย่างดินในจังหวัดนครศรีธรรมราชโดย Maipanich และคณะ (1995) ซึ่งตรวจพบไข่พยาธิไส้มา 2.6% ของตัวอย่างดินที่สำรวจทั้งหมด สำหรับแหล่งน้ำต่าง ๆ รวมถึงน้ำในท่อระบายน้ำเคยพบว่ามีไข่พยาธิไส้มาปะปนอยู่เช่นกัน แต่ไข่พยาธิค่อนข้างหนักจึงมักจมลงสู่ก้นแหล่งน้ำอย่างรวดเร็ว แหล่งน้ำเหล่านี้จึงไม่ใช่ปัจจัยสำคัญในการติดต่อของพยาธิไส้มา (Feachem และคณะ, 1983)

ด้วยกลไกการติดเชื้อแบบ soil-transmitted นี้เอง แหล่งสะสมไข่พยาธิไส้มาในธรรมชาติที่เอื้อต่อการแพร่ระบาดสู่มนุษย์มากที่สุดก็คือพื้นดิน ปัจจุบันเราทราบว่าการแพร่กระจายของไข่พยาธิไส้มาไปยังบริเวณต่าง ๆ นั้นอาจเกิดขึ้นได้โดยบังเอิญจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นซึ่งเป็นพาหะนำโรค (transport host) เช่น ผลงานของ Kinfu, และ Erko (2008) ที่ได้ศึกษาบทบาทของแมลงสาบและความสามารถในการเป็นตัวกระจายโรคติดเชื้อปรสิตในลำไส้ที่สำคัญในเมือง Addis และ Ziway ประเทศเอธิโอเปียโดยแมลงสาบที่นำมาศึกษาเป็นสายพันธุ์ *Blattella germanica*, *Periplaneta brunnea*, *Pycnoscelus surinamensis* และ *Supella longipalpa* ซึ่งทุกสายพันธุ์ที่ศึกษาล้วนพบได้ในประเทศไทย จากการนำน้ำที่ชะล้างแมลงสาบมาสองด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อปรสิตในลำไส้ทั้งซิสต์ของโปรโตซัวและไข่ของหนอนพยาธิหลายชนิดรวมถึง *T. trichiura* ด้วย นอกจากแมลงสาบแล้ว แมลงวันก็มีบทบาทในการแพร่กระจายไข่พยาธิไส้มาไปยังสถานที่ต่าง ๆ หรือในอาหารและน้ำดื่มด้วยเช่นกัน ซึ่งเคยมีการสำรวจในเมืองดักกา ประเทศบังคลาเทศพบไข่พยาธิไส้มาอยู่ตามตัวของแมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) มากถึง 47% ของจำนวนแมลงวันที่นำมาศึกษา (Khan และ Huq, 1978)

นอกจากกลไกในการแพร่กระจายของโรคติดเชื้อปรสิตในลำไส้ต่าง ๆ โดยตัวพาแล้ว การแพร่กระจายของเชื้อผ่านทางสุนัขก็เป็นอีกหนึ่งตัวการสำคัญที่นับว่าเป็นอุปสรรคต่อการป้องกันและควบคุมโรคอย่างได้ผล ซึ่งระยะเวลาที่ผ่านมาหลายการศึกษาได้ตรวจพบเชื้อปรสิตของมนุษย์ที่มีสุนัขเป็นโฮสต์โดยบังเอิญ และสามารถแพร่กระจายเชื้อได้ ตัวอย่างเช่น การตรวจพบ oocyst ของ *Toxoplasma gondii* ปะปนออกมากับอุจจาระสุนัข โดยยังคงความสามารถในการติดต่อสู่มนุษย์ (Lindsay, Dubey, Butler, and Blagburn, 1997) การตรวจพบไข่ของพยาธิ *Hymenolepis* sp. ในอุจจาระสุนัข (Meloni, Thompson, Hopkins, Reynoldson, and Gracey, 1993) และรายงานการตรวจพบไข่ของ *A. lumbricoides* ในอุจจาระสุนัขที่ประเทศออสเตรเลียและอินเดีย (Joshi and Sabne, 1977)

Raub และคณะ (2002) ได้รายงานผลสำรวจการกระจายตัวของเชื้อปรสิตในทางเดินอาหารของสุนัขในประเทศอินเดียซึ่งมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อสู่มนุษย์ พบว่าจากสุนัขที่ทำการสำรวจทั้งหมด 101 ตัวอย่าง เมื่อตรวจอุจจาระโดย sedimentation technique ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แล้วให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อปรสิตในลำไส้ที่มีความสามารถในการเกิด Zoonosis มากถึง 13 ชนิด (99% ของจำนวนสุนัขทั้งหมด) ดังตารางที่ 2 ในจำนวนนี้พบว่าอัตราการติดเชื้อจาก hookworm มีมากที่สุดถึง 94% นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบไข่พยาธิ *A. lumbricoides* (31%), *T. trichiura* (25%) และซิสต์ของ *Isospora belli* ซึ่งมีมนุษย์เป็นโฮสต์จำเพาะอีกด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงความชุกของปรสิตในทางเดินอาหารที่ตรวจพบในอุจจาระสุนัขในประเทศอินเดีย

Parasite	Total prevalence (n=101) (%)
Hookworm spp.	94
<i>Spirocerca lupi</i>	40
<i>Ascaris</i> spp.	31
<i>Trichuris</i> spp.	25
<i>Spirometra</i> spp.	28
<i>Opisthorchis</i> spp.	17
<i>Taenia</i> spp.	14
<i>Toxocara canis</i>	11
<i>Coccidia</i> spp.	9
<i>Isoospora belli</i>	2
<i>Hymenolepis diminuta</i>	8
<i>Dipylidium caninum</i>	6
<i>Sarcocystis</i> spp.	3
<i>Giardia duodenalis</i>	3
<i>Gnathostoma spinigerum</i>	2
<i>Strongyloides</i> spp.	2
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1
<i>Paragonimus</i> spp.	1
<i>Entamoeba</i> spp.	1

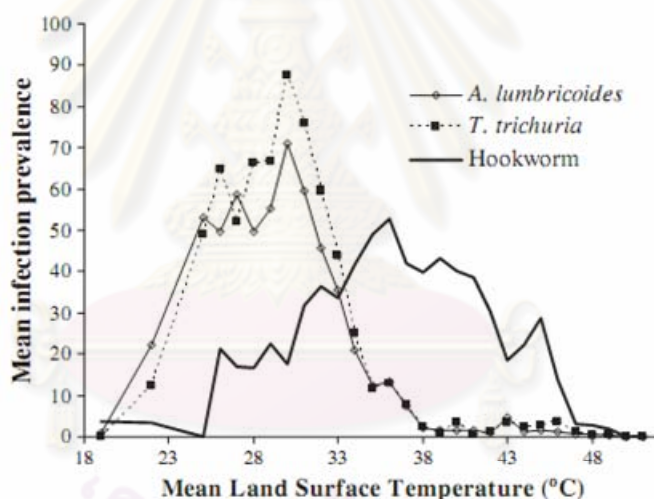
ที่มา: ดัดแปลงจาก Traub และคณะ (2002)

จากหลายข้อมูลสำรวจในเรื่องการกระจายตัวและความชุกของ *T. trichiura* พบว่าเชื้อมีการกระจายตัวได้ทั่วโลก แต่จะมีความชุกสูงในเขตอากาศอบอุ่นและร้อนชื้นแถบศูนย์สูตร (Feigen และ M.D., 1987) จากรายงานในปี ค.ศ. 2001 พบว่าทั่วโลกมีผู้ป่วยด้วยโรคพยาธิไส้เ้มามากถึงหนึ่งพันล้านคน (Pedersen และ Merrel, 2001) และในเวลาต่อมาพบว่าผู้ป่วยโรคพยาธิไส้เ้ม่าทั่วโลกมีจำนวนลดน้อยลง ดังเช่นข้อมูลจากองค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO, 2005) ซึ่งระบุว่าจำนวนผู้ป่วย trichuriasis จากทั่วโลกลดลงเหลือประมาณ 604-795 ล้านคน ในทำนองเดียวกันจากรายงานของ Silva และคณะ ในปี ค.ศ. 2003 ระบุว่าหลายพื้นที่ของโลกมีอัตราการติดโรคพยาธิไส้เ้ม่าของประชากรลดลง ตัวอย่างเช่นในทวีปอเมริกาซึ่งมีอัตราการลดลงอย่างรวดเร็วของจำนวนผู้ป่วยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 เป็นต้นมาซึ่งเกิดจากมาตรการการป้องกัน รักษา และควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ประกอบกับสภาพทางเศรษฐกิจและสังคมที่เจริญขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นผลให้ประชากรในท้องที่มีสุขอนามัยที่ดี (Ehenberg และคณะ, 2003; Pan-American Health Organization (PAHO), 2000) โดยเฉพาะในประเทศบราซิลและเม็กซิโกซึ่งจัดเป็นประเทศที่มีผู้คนอาศัยอยู่อย่างหนาแน่นที่สุด แต่กลับพบว่าอัตราการติดโรคพยาธิไส้เ้ม่าลดลง (Tay และคณะ, 1976, 1995; PAHO, 2000)

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าพื้นที่ที่ทำการสำรวจจะมีอัตราการติดโรคพยาธิไส้เ้ม่าต่ำ แต่โอกาสในการติดโรคแบบ soil-transmitted ย่อมเกิดขึ้นได้เสมอ ดังเช่นรายงานการติดโรคพยาธิไส้เ้ม่าของผู้ป่วยหญิงรายหนึ่งซึ่งไม่เคยอาศัยอยู่ในเขตปรากฏโรค จากการสืบประวัติพบว่าเคยเข้าแคมป์และประกอบอาหารด้วยมือที่เปื้อนดิน จึงสรุปว่าในเขตที่ไม่ปรากฏโรคอาจมีไข่พยาธิไส้เ้ม่าปะปนอยู่ในพื้นดินและสามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้เช่นกัน (Feigen และ M. D., 1987)

สำหรับการกระจายตัวของโรคในทวีปเอเชียนั้นจากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (WHO, 1996) รายงานว่ามีหลายประเทศในทวีปเอเชียโดยเฉพาะประเทศ ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และไต้หวัน ซึ่งประสบผลสำเร็จในการใช้มาตรการควบคุมโรคหนอนพยาธิที่มีการติดต่อแบบ soil-transmitted (STH) มาไม่ต่ำกว่า 40 ปีแล้ว แต่มาตรการที่ใช้ในการควบคุมโรคยังไม่ประสบผลสำเร็จในอีกหลายประเทศ เช่น อินเดีย เนปาล อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย และจีน โดยเฉพาะทางตอนใต้ของประเทศจีนรวมถึงกลุ่มประเทศทางตอนบนของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อย่างไรก็ตามมาตรการควบคุมโรคเหล่านี้ยังต้องมีการปรับเปลี่ยนหรือประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับสภาพโดยรวมของแต่ละประเทศโดยเฉพาะกลุ่มประเทศแถบเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ต่อไป (Brooker, Clements และ Bundy, 2006)

เนื่องจากบริเวณตอนเหนือของประเทศจีน ตอนเหนือของประเทศอินเดีย และประเทศปากีสถานเป็นบริเวณที่มีความชุกของโรคพยาธิไส้มีต่ำที่สุดในทวีปเอเชีย จากรูปแบบของการกระจายตัวนี้สะท้อนให้เห็นถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการระบาดของโรคพยาธิไส้มีได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะปัจจัยทางด้านอุณหภูมิ จากข้อมูลการสำรวจ Land Surface Temperature (LST) ผ่านดาวเทียมในภูมิภาคเอเชียพบว่ามีความสัมพันธ์ต่อความชุกของการระบาดของพยาธิไส้มี โดยในประเทศจีนตอนเหนือมีค่าอุณหภูมิเฉลี่ยต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ส่วนตอนเหนือของอินเดียและปากีสถานมีค่าอุณหภูมิเฉลี่ยสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 6) (Brooker, Clements และ Bundy, 2006) สำหรับช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของตัวอ่อนภายในไข่สู่ระยะติดต่อก็คือ 22-35 องศาเซลเซียส (ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุล, ศรัชัย หล่ออารีย์สุวรรณ และประยงค์ ระดมยศ, 2549)



ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า LST ซึ่งแปรผลผ่านทางดาวเทียมและความชุกของผู้ป่วยจาก *A. lumbricoides*, *T. trichiura* และ Hookworm. โดยยึดค่าเฉลี่ยของอัตราความชุกที่สำรวจได้ในบริเวณที่ค่า LST เท่ากัน

ที่มา: Brooker, Clements และ Bundy (2006)

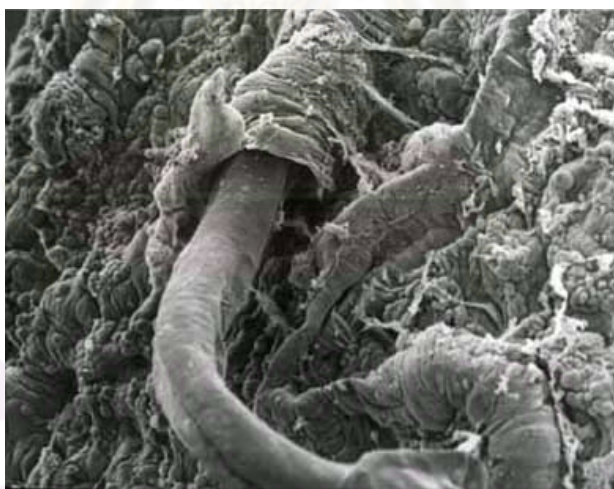
อาการแสดงทางคลินิกและพยาธิสภาพ

อาการแสดงทางคลินิก (clinical symptom) ของโรคพยาธิไส้เฒ่าส่วนใหญ่พบว่าไม่ทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการของโรค หรืออาจเกิดอาการเพียงเล็กน้อยไม่รุนแรงจนถึงขั้นรุนแรงมากได้ (Bundy และ Cooper, 1989; Ramdath และคณะ, 1995; Williams-Blangero และคณะ, 2002) ทั้งนี้ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น จำนวนพยาธิในร่างกายนผู้ป่วย ระยะเวลาที่เป็นโรค อายุ และภาวะโภชนาการของผู้ป่วยเอง (Feigen และ MD, 1987) ซึ่งกรณีที่มีการติดเชื้อน้อยกว่า 10 ตัวมักไม่ทำให้เกิดอาการแสดงอย่างเด่นชัด ตรวจอุจจาระแล้วอาจไม่พบไข่พยาธิ ส่วนการติดเชื้อระดับปานกลาง (moderate infection) อาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการได้ตั้งแต่ปวดท้อง ท้องผูกเรื้อรัง แน่นท้อง คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้เป็นครั้งคราว ในกรณีที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อเป็นจำนวนมาก (heavy infection) โดยมีตัวแก่โดยเฉลี่ย 400 ตัวขึ้นไป จะทำให้มีอาการท้องร่วง (Nanivadekar และคณะ, 1984) และอาจเป็นเรื้อรังนาน 1-3 เดือน มีอาการปวดท้องอย่างรุนแรง ซึ่งอาการท้องร่วงนี้อาจรุนแรงจนทำให้ถ่ายเป็นมูกเลือดได้ (bloody diarrhea) นอกจากนี้ยังทำให้ผู้ป่วยตัวซีด คลื่นไส้ อาเจียน อ่อนเพลีย ถ้าเป็นกับเด็กจะมีอาการซีด ท้องร่วงเรื้อรัง ขาดสารอาหาร (malnutrition) น้ำหนักตัวลด มี clubbing และส่วนมากมี rectal prolapse ดังภาพที่ 9 (Norhayati และคณะ, 2003; Meyer และ Olsen, 1971; Feigen และ MD, 1987) ถ้าผู้ป่วยมีตัวเต็มวัยในลำไส้มากเกินไปจะทำให้เกิดอาการลำไส้อุดตันหรือช่องท้องอักเสบในกรณีที่พยาธิไซทะเล็ดผนังลำไส้ (Fishman และ Perrone, 1984) ในรายที่เป็นนานและมีตัวแก่จำนวนมากอาจทำให้เกิดโรคโลหิตจางชนิด iron-deficiency anemia หรือผู้ป่วยบางรายอาจเสียชีวิตได้ (ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุล, ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ และประยงค์ ระดมยศ, 2549)

พยาธิสภาพของโรคพยาธิไส้เฒ่าเกิดขึ้นโดยตรงจากการที่พยาธิตัวเต็มวัยไซส่วนหัวเข้าไปในผนังลำไส้ เกิดลักษณะคล้ายอุโมงค์คลุมตัวพยาธิซึ่งจะใหญ่ขึ้นตามขนาดของพยาธิที่โตขึ้น (Panesar และ Croll, 1980) ดังภาพที่ 7 เกิดการฉีกขาดของเนื้อเยื่อพร้อมทั้งถูกย่อยจากเอนไซม์ที่ตัวพยาธิหลั่งออกมา (Katz, Despommier และ Gwadz, 1989; Garcia, 2001) ลำไส้มีสีคล้ำจากเลือดคั่งและมีการบวมที่เยื่อเมือก บางครั้งอาจพบแผลที่ผนังลำไส้ พยาธิสภาพที่ตรวจพบจากกล้องจุลทรรศน์พบว่า crypts ของเยื่อเมือกผนังลำไส้ขยายออก มีการขับเมือกออกมามากกว่าปกติและมี fibrin พร้อมกับเซลล์อักเสบชนิด neutrophils บางครั้งพบเลือดออกในชั้น submucosa หรือตุ่มหนองในเนื้อเยื่อชั้น mucosa การอักเสบมักจะลามไปเกินกว่าชั้น muscularis mucosa อาจพบตัวแก่ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ฝังอยู่ในเยื่อเมือกผนังลำไส้ ในรายที่เกิดอาการรุนแรงและเสียชีวิตพบจำนวนพยาธิไส้เฒ่าในลำไส้โดยเฉลี่ยประมาณ 400 ตัวต่อคน ตัวแก่ของพยาธิชนิดนี้อาจพบได้ในรูของไส้ติ่ง

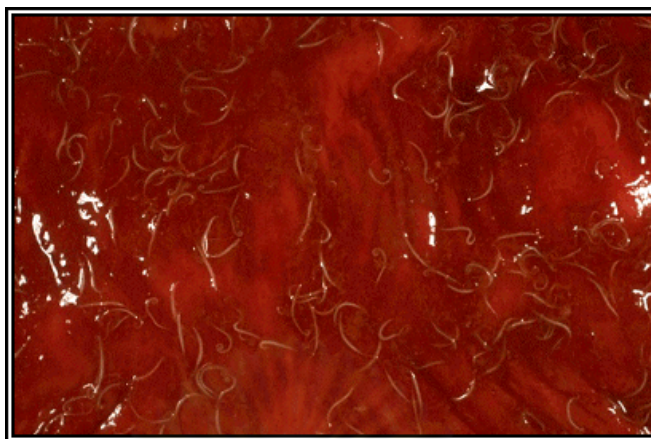
ทำให้เกิดไส้ติ่งอักเสบ (appendicitis) ได้ ทั้งนี้กลไกที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียขั้นรุนแรงและเรื้อรัง ในผู้ติดเชื้อยังไม่ทราบแน่ชัดแต่สันนิษฐานได้ว่าเกิดจากการฉีกขาดของผนังลำไส้และการแพ้สารพิษที่ขับออกจากตัวพยาธิ ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง (hypochromic anemia) ในผู้ติดเชื้อพยาธิไส้เฒ่าด้วย (Feigen และ MD, 1987) ซึ่งพยาธิไส้เฒ่าตัวหนึ่งสามารถทำให้ผู้ป่วยสูญเสียเลือดได้วันละประมาณ 0.005 มิลลิลิตร นอกจากนี้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิไส้เฒ่ายังมีโอกาสที่จะติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น พยาธิไส้เดือน และเชื้ออะมีบา เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าการที่พยาธิฝังส่วนหัวลงในผนังลำไส้หากมีการติดเชื้อร่วมกับโปรโตซัวหรือแบคทีเรียจะทำให้เกิดพยาธิสภาพอย่างถาวร (ซูเกียรติ, ศรชัย และประยงค์, 2549; สรรพชญ เบญจวงศ์กุลชัย)

สำหรับการติดเชื้อ *T. vulpis* ซึ่งส่วนใหญ่เกิดในเด็กนั้น อาการที่พบจะคล้ายกับการติดเชื้อ *T. trichiura* โดยอาจเริ่มจากไม่ปรากฏอาการไปจนถึงท้องร่วงหรือบิด นอกจากนี้ยังมีบางรายงานพบว่า *T. vulpis* สามารถทำให้เกิดอาการ visceral larva migrant ในผู้ป่วย (Sukano, และคณะ, 1980; Masuda, และคณะ, 1987; Dvorak, Spickler และ Roth, (n.d.))



ภาพที่ 7 ภาพถ่ายจาก scanning electron microscope แสดงตัวอ่อนของพยาธิไส้เฒ่า ซึ่งไชเนื้อเยื่อชั้น epithelial ในลำไส้หนูเกิดเป็นอุโมงค์หุ้มตัวพยาธิ

ที่มา: Biomedical Graduate Studies. Penn University, Silvania. ภาพ: David Artis



ภาพที่ 8 พยาธิแฉ้มีตัวเต็มวัยจำนวนมากที่ไซส่วนหัวเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้น epithelial บริเวณลำไส้

ที่มา: www.stanford.edu/.../trichsymptoms.html



ภาพที่ 9 การโผล่ออกนอกร่างกายของไส้ตรง (rectal prolapse) เนื่องจากการไซส่วนหัวของพยาธิเข้าทำลายเนื้อเยื่อ elastic epithelium ทำให้กล้ามเนื้อบริเวณหูรูดไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ

ที่มา: 5www.stanford.edu/.../trichsymptoms.html

การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ

วิธีการที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโดยทั่วไปอาศัยการตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของผู้ป่วย โดยอาจตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้โดยตรง (direct smear) ในกรณีที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อมาก สำหรับกรณีที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อน้อยขั้นตอนทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญที่จะช่วยให้การตรวจหาปรสิตในลำไส้รวมถึงไข่พยาธิไส้เ็นในอุจจาระผู้ป่วยมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้นนั้นคือการใช้วิธีตรวจแบบเข้มข้น (concentration technique) คือการรวบรวมปรสิตในอุจจาระให้มีความเข้มข้น และแยกจากส่วนของอุจจาระที่ไม่ต้องการให้ได้มากที่สุด ในขณะที่เดียวกันต้องสูญเสียเชื้อปรสิตในอุจจาระจากขั้นตอนการปฏิบัติให้น้อยที่สุดก่อนนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งวิธีการเหล่านี้ ได้มีผู้ทำการศึกษาค้นคว้าไว้มากมายโดยมีทั้งผู้ที่ยึดค้นวิธีการใหม่ ๆ หรือนำวิธีการเดิมที่ใช้ได้ผล อยู่แล้วมาปรับปรุงเพื่อให้ได้ผลที่ดียิ่งขึ้นและเหมาะสมกับแต่ละงานวิจัยที่มีข้อจำกัดที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่นผลงานของ Wassal และ Denham (1969) ซึ่งอธิบายถึงขั้นตอนในการรวบรวมไข่ของหนอนพยาธิตัวกลมจากอุจจาระ ผลงานของ Data (1979) ซึ่งคิดค้นเทคนิคการรวบรวมไข่พยาธิ *Toxocara* sp. จากดิน ผลงานของ Foreyt (1986) ศึกษาวิธีการรวบรวมไข่หนอนพยาธิตัวกลมและตัวอ่อนพยาธิในกวาง และการศึกษาของ Ybanez (2000) ซึ่งปรับปรุงวิธีการรวบรวมไข่พยาธิ *Toxocara canis* จากดินที่เคยมีรายงานไว้แล้ว (Martinez และคณะ, 2003) เป็นต้น

สำหรับผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อพยาธิไส้เ็นจำนวนมากและเร็วจึงสามารถวินิจฉัยได้จากการตรวจหาไข่พยาธิร่วมกับอาการแสดงทางคลินิกตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งอาการจะคล้ายผู้ป่วยโรคพยาธิปากขอแต่จะแตกต่างกันที่พยาธิไส้เ็นมีอาการท้องเสียเรื้อรัง มีเลือดปนในอุจจาระ และสามารถพบ Charcot Leyden crystals เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีการส่องกล้องในลำไส้ใหญ่ (colonoscopy) หรือลำไส้ใหญ่ส่วนโค้ง (sigmoidoscope) เพื่อตรวจหาพยาธิตัวเต็มวัยได้ (นิมิตร มรกต และเกตุรัตน์ สุขวัฒน์, 2546)

แม้ว่าการตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระจะเป็นวิธีการพื้นฐานที่ใช้กันในห้องปฏิบัติการ สำหรับวินิจฉัยโรคพยาธิไส้เ็นซึ่งโดยปกติแล้วผู้ทำการตรวจมักไม่มีการใช้ ocular micrometer ช่วยในการตรวจเนื่องจากไข่พยาธิไส้เ็นมีลักษณะเฉพาะตัวที่จดจำง่ายและแตกต่างจากพยาธิชนิดอื่นอย่างชัดเจน (Dunn และคณะ, 2002) แต่จากความใกล้เคียงกันในขนาดของไข่พยาธิ *T. trichiura* ขนาดใหญ่และไข่ของ *T. vulpis* จึงอาจทำให้การวินิจฉัยชนิดของพยาธิไส้เ็นทั้งสองในผู้ป่วยผิดพลาดไปได้ การใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งซึ่งสามารถนำมาใช้วินิจฉัยชนิดของพยาธิไส้เ็นจากไข่พยาธิในอุจจาระผู้ป่วยได้อย่างถูกต้อง

การควบคุมและป้องกันโรคพยาธิไส้หม

เนื่องจากพื้นดินเป็นแหล่งที่สามารถพบไข่พยาธิไส้หมาระยะติดต่อกได้ การป้องกันโรคอย่างง่ายที่สุดคือการรักษาสุขอนามัยส่วนตัว เช่น ล้างมือทุกครั้งก่อนประกอบอาหารหรือหลังเล่นกับสุนัข ไม่หยิบจับอาหารที่ตกลงสู่พื้นขึ้นมารับประทาน เป็นต้น นอกจากนี้ควรระมัดระวังการรับประทานผักสดโดยล้างผักให้สะอาดเสียก่อน อาจแช่ผักในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียสนาน 5-10 วินาที หรือแช่ผักในน้ำที่ผสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 200 ppm 2-3 นาทีเพื่อฆ่าตัวอ่อนพยาธิ ควรรับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ ๆ และเก็บอาหารให้มิดชิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของไข่พยาธิจากแมลงที่เป็นตัวพา เช่น แมลงสาบ แมลงวัน เป็นต้น สำหรับผู้เลี้ยงสุนัขควรถ่ายพยาธิให้สุนัขตามกำหนด ไม่ปล่อยสุนัขให้มีการคลุกคลีกับสุนัขจรจัด หลีกเลี่ยงการให้อาหารสุนัขบนพื้นดิน

การรักษา

สามารถรักษาได้ด้วยยา Mebendazole 600 มิลลิกรัม โดยแบ่งกินครั้งละ 100 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 3 วัน สามารถรักษาให้หายได้มากกว่าร้อยละ 70 หรือกิน Albendazole ขนาด 400 มิลลิกรัมเพียงครั้งเดียว โดยให้ผลการรักษาหายเพียงร้อยละ 30 (นิมิตร มรกต และ เกตุรัตน์ สุขวัฒน์, 2546)

Trichuris vulpis กับบทบาทในการเกิด zoonosis

T. vulpis เป็นพยาธิไส้หมที่มีโฮสต์จำเพาะเป็นสุนัข มีกลไกในการแพร่กระจายของเชื้อแบบ soil-transmitted เช่นเดียวกับ *T. trichiura* และด้วยเหตุที่สุนัขเป็นสัตว์ที่มีความใกล้ชิดกับมนุษย์เป็นอย่างมากไม่ว่าจะในสังคมเมืองหรือชนบทก็ตาม การศึกษาระบาดวิทยาของปรสิตในลำไส้ของสุนัขจึงมีความสำคัญต่อการป้องกันและควบคุมโรคที่อาจติดต่อสู่มนุษย์ เนื่องจากปรสิตของในลำไส้สุนัขหลายชนิดมีความสามารถในการติดต่อแบบ zoonosis เช่น *Giardia duodenalis*, *Isospora belli* และ *Ascaris lumbricoides* เป็นต้น นอกจากนี้แล้วปรสิต ในสุนัขบางชนิดยังมีรายงานว่าสามารถติดต่อสู่มนุษย์โดยบังเอิญได้เช่นกัน เช่นผลงานของ Hall และ Sonnenberg (1956) ที่ได้รายงานพบผู้ป่วยด้วยโรคพยาธิไส้หมจาก *T. vulpis* เนื่องจากไข่พยาธิที่ตรวจพบมีขนาดใหญ่เกินกว่าขนาดโดยทั่วไปของไข่ *T. trichiura* หรือ *Capillaria hepatica* แต่กลับสัมพันธ์กับขนาดของไข่ *T. vulpis* เช่นเดียวกับในปี ค.ศ. 1964 ซึ่งมีรายงานการตรวจพบไข่พยาธิไส้หม

ขนาดใหญ่เป็นจำนวนมากปนอยู่กับไข่ขนาดปกติในอุจจาระของผู้ป่วย และให้การวินิจฉัยว่าเป็น การติดเชื้อจาก *T. vulpis* (Harper, Garfield และ Ehrenford, 1964)

การตรวจพบไข่พยาธิ *T. vulpis* ในอุจจาระผู้ป่วยแม้จะเกิดขึ้นไม่บ่อยครั้งนักแต่ก็ยังคงมี รายงานมาจนถึงปัจจุบัน ดังเช่นผู้ป่วยรายหนึ่งใน Mexico ซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อแบบ mixed infection โดย *T. vulpis* ร่วมกับ *T. trichiura* (Vazquez และคณะ, 1997) อีกตัวอย่างหนึ่งเป็น รายงานผู้ป่วยในปี ค.ศ. 2002 พบผู้ป่วยเพศหญิงมีอาการคลื่นไส้ อาเจียนและเบื่ออาหาร มีการ ตอบสนองต่อคำถามค่อนข้างช้า หลังจากการตรวจร่างกายเบื้องต้นพบว่าไม่มีความผิดปกติ แต่ จากผลการตรวจอุจจาระพบเพียงไข่พยาธิ *Trichuris* sp. จำนวนเฉลี่ย 2 eggs/field ซึ่งเมื่อตรวจดู สัณฐานวิทยาของไข่และวัดขนาดแล้วพบว่าไข่พยาธิมีขนาดโดยเฉลี่ยยาว 90 ไมโครเมตร กว้าง 40 ไมโครเมตร ซึ่งจัดอยู่ในเกณฑ์ของไข่ *T. vulpis* ที่ได้มีการศึกษามาก่อนแล้ว ประกอบกับการตรวจ สอบประวัติผู้ป่วยพบว่าผู้ป่วยเลี้ยงสุนัขแบบปล่อยนอกบ้านจำนวน 3 ตัว จึงสรุปว่าผู้ป่วยมีการติด โรคพยาธิไส้เมาจาก *T. vulpis* (Dunn และคณะ, 2002)

จากตัวอย่างที่กล่าวมาการศึกษาในด้านระบาดวิทยาของพยาธิ *T. vulpis* จึงนับได้ว่ามี ความสำคัญต่อการป้องกันและควบคุมโรคพยาธิไส้เมาในมนุษย์ด้วยเช่นกัน ซึ่งการศึกษาในหลาย ประเทศพบว่าไข่พยาธิ *T. vulpis* สามารถตรวจพบได้จากตัวอย่างดินบริเวณสนามเด็กเล่นและในที่ สาธารณะอื่น ๆ หรือแหล่งชุมชนที่มีอุจจาระสุนัขปนเปื้อนอยู่ (Minvielle, Pezzani และ Basualdo Farjat, 1993; Umeche, 1989) โดยสัมพันธ์กับรายงานการตรวจพบไข่พยาธิ *T. vulpis* ในมนุษย์ ซึ่งส่วนใหญ่จะพบการติดเชื้อในเด็กและผู้ที่ใช้ชีวิตอยู่ในแหล่งสลัม (Hall, 1956; Kagei, Hayashi และ Kato, 1986; Mirdha, 1998) จากรายงานการตรวจหาเชื้อปรสิตในอุจจาระสุนัขในประเทศ จาไมกา พบไข่ *T. vulpis* ได้มากกว่า 10% ของตัวอย่างที่ทำการตรวจ ไม่ว่าจะเก็บอุจจาระจากสุนัข จรจัดหรือสุนัขเลี้ยงก็ตาม (Robinson, Thompson และ Lindo, 1989)

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของพยาธิไส้ผ้า

ในปัจจุบันความรู้ทางด้านชีวโมเลกุล (molecular biology technique) นับว่ามีประโยชน์อย่างยิ่งต่อวงการวิทยาศาสตร์และการแพทย์โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้วิธีการต่าง ๆ เพื่อศึกษาคุณลักษณะรูปแบบของ ribosomal RNA (rRNA) gene ซึ่งได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่าเป็นยีนที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการใช้จัดลำดับหมวดหมู่ในอนุกรมวิธานเนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการจัดเรียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด บน rRNA ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่แสดงถึงอัตราของวิวัฒนาการตั้งแต่บริเวณที่มีความหลากหลายต่ำ (small subunit gene) ไปจนถึงความหลากหลายสูง (intergenic spacer regions: ITS) (Oliveros, Cutillas, Rojas และ Arias, 2000) เนื่องจากพยาธิไส้ผ้าบางชนิดสามารถติดต่อสู่โฮสต์ได้มากกว่าหนึ่งชนิด การตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันไปของพยาธิอาจเกิดขึ้นได้ และส่งผลให้โครงสร้างทางสรีรวิทยาของพยาธิเปลี่ยนแปลงไป ในขณะที่พยาธิอาจไม่มีความแตกต่างกันทางสายวิวัฒนาการในระดับยีนก็เป็นได้ (Knight, 1984) จากข้อสันนิษฐานเหล่านี้ Cutillas และคณะ (1995) ได้ทดลองศึกษา isoenzyme ใน *T. ovis* และ *T. globulosa* ซึ่งตรวจพบจากแกะ (*Ovis aries*) และแพะ (*Capra hircus*) ตามลำดับ โดยพยาธิทั้งสองชนิดได้รับการตรวจทางสัณฐานวิทยาแล้วว่ามีความแตกต่างกัน แต่ผลการศึกษา isoenzyme พบว่าพยาธิทั้งสองชนิดควรจัดอยู่ในชนิดเดียวกัน

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene สามารถใช้ในการจำแนกชนิดของพยาธิไส้ผ้าได้อย่างมีประสิทธิภาพถึงแม้ว่าพยาธิจะมีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการมากหรืออาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากก็ตาม (Chilton, Gasser และ Beveridge, 1995; Zarlenga และคณะ, 1991, 1994) จากการศึกษาเพื่อยืนยันผลการทดลองของ Cutillas ในปี ค.ศ. 1995 และหาข้อสรุปโดย Oliveros และคณะ (2000) ซึ่งใช้วิธี PCR ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของ *T. ovis*, *T. globulosa*, *T. suis* และ *T. leporis* พบว่าความยาวของสายนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของ *T. ovis* และ *T. globulosa* มีขนาดเท่ากันคือ 407 bp และมีค่า GC content เท่ากันคือ 62% ในขณะที่ *T. leporis* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 418 bp มีค่า GC content เท่ากับ 62.4% และ *T. suis* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 534 bp ค่า GC content เท่ากับ 64.8% จากการศึกษานี้ได้ให้ข้อสรุปว่าลักษณะความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ระหว่าง *T. ovis* และ *T. globulosa* นั้นเป็นตัวบ่งบอกถึงความเหมือนกันทางพันธุกรรม แม้ว่าพยาธิทั้งสองจะมีกายสัณฐานที่แตกต่างกันและอาศัยอยู่ในโฮสต์ต่างชนิดกันก็ตาม

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของ ribosomal RNA gene โดย Cutillus, de Rojas, และ Ariza (2007) จากตัวอย่าง *T. suis* ที่ได้จาก swine และ wild boar พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความยาวเท่ากันคือ 1,396 bp โดยบริเวณ ITS1, 5.8S และ ITS2 มีความยาว 661, 154 และ 534 bp ตามลำดับ นอกจากนี้ลำดับเบสยังมีความคล้ายคลึงกันอย่างสูงในบริเวณ ITS1 (99.7%) และ ITS2 (99.8%) เมื่อประกอบกับรายงานของ Oliveros และคณะ (1998) กล่าวได้ว่าพยาธิไส้เมาจากโฮสต์ทั้งสองเป็นชนิดเดียวกัน ในขณะที่การศึกษาพันธุกรรมบริเวณเดียวกันใน *T. vulpis* ที่ได้จากสุนัขพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 มีความยาว 410 bp และบริเวณ ITS2 มีความยาว 433 bp ส่วนบริเวณ 5.8S มีความยาว 154 bp ซึ่งเท่ากับกับใน *T. suis* จากโฮสต์ทั้งสองชนิด เมื่อพิจารณาร่วมกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ศึกษาบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ใน *T. ovis*, *T. leporis*, *T. muris*, *T. arvicolae* และ *T. skrjabini* พบว่าบริเวณ ITS1 ของพยาธิไส้เามีลักษณะเป็น homology zone มากกว่าบริเวณอื่น (Cutillus และคณะ, 2002, 2004)

ถึงแม้ว่าวิธีการทางชีวโมเลกุลจะมีประสิทธิภาพในแง่ของความไวและความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตที่ยังสด แต่ประโยชน์อีกประการหนึ่งก็คือสามารถนำเทคนิคเหล่านี้มาใช้ในการศึกษาสารพันธุกรรมของเชื้อปรสิตจากซากโบราณ (fossil) ต่าง ๆ ได้ ซึ่งซากโบราณเหล่านี้ได้เสียสภาพและไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้โดยวิธีการทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว เช่น การสกัดดีเอ็นเอจากซากโบราณ การวินิจฉัยสารพันธุกรรมของซากปรสิตในกระดูก ในเนื้อเยื่อไขมัน หรือในอุจจาระแห้ง เป็นต้น (Bastos และคณะ, 1996; Ferreira และคณะ, 2000; Chacon และคณะ, 1994; Loreille และคณะ, 2001) แต่เนื่องจากการสกัดดีเอ็นเอจากไข่พยาธิและโปรโตซัวชนิดต่าง ๆ ในอุจจาระ (Schneider, Heise และ Epe, 1999; Silva และคณะ, 1999) ดีเอ็นเอที่ได้อาจเจือปนด้วยสารซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้ง (inhibitor) ต่อการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ในกระบวนการ PCR ได้ เทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกหนึ่งซึ่งมีประโยชน์ในการแก้ปัญหาดังกล่าว

ตัวอย่างของการศึกษาในลักษณะนี้ เช่น ผลงานของ Martinez และคณะ (2003) ซึ่งศึกษาการปรับใช้วิธีการ floatation ของ Gordon และ Whitlock ศึกษาการประยุกต์ใช้เทคนิคในการสกัดดีเอ็นเอของ Sambrook, Fritsch และ Maniatis (1989) รวมถึงศึกษาการใช้เทคนิค RAPD-PCR ในการวินิจฉัย *T. trichiura* จากไข่พยาธิในอุจจาระ ผลการทดลองพบว่าวิธีการ floatation ที่ประยุกต์ใช้ให้ผลดีกว่าวิธีการของ Foreyt (1986) และ Ybanez และคณะ (2000) จากการตรวจสอบประสิทธิภาพของการสกัดดีเอ็นเอด้วย RAPD-PCR โดยดูผลจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนอะกาโรสเจล พบแถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณความเข้มข้นสัมพันธ์กับจำนวนไข่พยาธิที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ

ในปัจจุบันเราสามารถนำประโยชน์จากเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อวงการวิทยาศาสตร์และการแพทย์มากมายเช่น เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อปรสิตในอุจจาระ การใช้เทคนิค PCR ช่วยในการตรวจหาปรสิตในเนื้อเยื่อโดยตรวจหาซิสต์ของ *Trichinella spiralis* ในเนื้อเยื่อของมนุษย์และมีการจำแนกเป็น isolate ต่าง ๆ หรือตรวจหาปรสิตจากสารคัดหลั่ง (Robert และคณะ, 1996; Uparanukraw และ Morakote, 1997; Nagano และคณะ, 1999) เป็นต้น แต่ในบางกรณีที่ไม่ทราบ target sequence ของพยาธิ อาจใช้วิธีการ RAPD-PCR (William และคณะ, 1990) ซึ่งไม่ต้องมีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอสามารถใช้วินิจฉัยได้แม้จะมีปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นน้อย เช่น ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไข่พยาธิในอุจจาระผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อต่ำ นอกจากนี้ยังมีเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) ซึ่งเคยศึกษาโดย Oliveros และคณะ (2000) ในการจำแนกพยาธิไส้เ็น 4 ชนิด คือ *T. ovis*, *T. leporis*, *T. suis* และ *T. globulosa* เป็นต้น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบงานวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (descriptive study)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาขนาดไข่ของ *T. trichiura* เปรียบเทียบกับ *T. vulpis* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)
2. เพื่อโคลนและศึกษาลำดับเบสของ ribosomal RNA gene ใน *T. trichiura* และ *T. vulpis* แล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้
3. พัฒนาการวินิจฉัยพยาธิไส้หม่า *T. trichiura* และ *T. vulpis* โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เชนหรือ polymerase chain reaction (PCR) จากลำดับเบสที่ได้

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือ ประชากรจากแหล่งชุมชนที่ยินยอมเข้าร่วมในการศึกษาและสุ่มตรวจวัดที่พบจากสถานที่ต่างๆ

ประชากรตัวอย่าง (population sample) คือ ตัวอย่างอุจจาระ (stool) ที่เก็บจากผู้เข้าร่วมในการศึกษาทั้งจากแหล่งชุมชนและสุนัข

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เชน เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลองโดยอาศัยเอนไซม์จำเพาะเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ขนาดของกลุ่มประชากร

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการพัฒนาเทคนิคสำหรับตรวจวินิจฉัยพยาธิ *T. trichiura* และ *T. vulpis* ออกจากกันโดยวิธี PCR เป็นครั้งแรก ดังนั้นคาดว่าจะใช้ตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยและสุนัขอย่างไม่ต่ำกว่า 20 ตัวอย่าง

เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) OLYMPUS รุ่น BX51

เครื่องปั่นความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิและเวลา

(high speed refrigerated microcentrifuge)

เครื่องปั่นความเร็วสูงขนาดเล็ก

เครื่องซั่งน้ำหนักละเอียดอ่านค่าได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (PCR Thermal Cycler)

เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอโดยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis chamber)

เครื่องยิงกระแสไฟฟ้า (*E.coli* pulser)

เครื่องบ่มสารในหลอดทดลอง

เครื่องบ่มและเขย่าเชื้อในหลอดทดลอง (Shaking Incubator)

เครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับบ่มเชื้อ

เครื่องไมโครเวฟ

โคมไฟพร้อมหลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต

ชุดวิเคราะห์แถบชีวโมเลกุล

ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส

ตู้ปลอดเชื้อ Astec Microflow รุ่น ABS1200

นาฬิกาจับเวลา

ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติ (automatic adjustable micropipette)

ขนาด 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร

หน้ากากกันแสงอัลตราไวโอเล็ต

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง

2. วัสดุอุปกรณ์

กระจกสไลด์ ขนาด 2.5 x 75 เซนติเมตร

กระจกปิดสไลด์ (cover slip)

กระดาษขี้สาร

กระบอกล้างน้ำ

กระบอกล้าง ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร

กระดาษติดฉลาก

กระปุกสำหรับเก็บจุลจากร

ขวดแก้วสำหรับใส่สารเคมี

จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก

ช้อนตักสาร

ถุงมือยาง

ถาดสำหรับเตรียมเจล

ที่วางหลอดทดลอง สำหรับหลอดขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร

แท่งพลาสติกสำหรับบด

แท่งแก้วสำหรับคน

ปิเกตอร์ ขนาด 10, 50, 100, 200, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

ใบมีดตัดอะกาโรสเจล

ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 10, 100 และ 1000 ไมโครลิตร

ผ้าก๊อซ

แผ่นพลาสติกอย่างบาง

พาราฟิล์ม

พลาสติก ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

เม็ดแก้ว (GLASS BEADS) ขนาด 425-600 ไมครอน

ไม้จิ้มฟัน

ไม้สำหรับตักจุลจากร

หลอดทดลองสำหรับปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge tube) ขนาด 0.1, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร

หลอดทดลองสำหรับเลี้ยงเชื้อและดวงสารขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

หลอดหยดสาร (dropper)

3. สารเคมี

3.1. สารเคมีทั่วไป

absolute ethanol
agar powder
agarose (molecular biology grade)
ampicillin
boric acid
cleaning solution
EDTA, disodium salt
diethyl ether
double distilled water
ethidium bromide
40% formaldehyde
glycerol
30% hydrogen peroxide
LB powder
sodium chloride
tris base

3.2 สารเคมีที่เป็น Reagent Kit

QIAamp[®] DNA Mini Kit
QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit
QIAquick[®] Gel Extraction Kit
Recombinant *Taq* DNA polymerase
LA Taq
pGEM[®] -T Easy Vector Systems
ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

3.3 Oligonucleotides

TT18SF0	5'ACGGTGAAGCCGCGAATGGCTC ^{3'}
TT58SR0	5'GTTTGATCGACGCTGCAATGTG ^{3'}
TT58SR1	5'GCAATGTGCGTTCAAAGTATTC ^{3'}
TT18SF1	5'TGAATCGGAATAACTATGCTG ^{3'}
TT18SF2	5'CGACTTGAAAGTTTACTTTGAG ^{3'}
TT18SF3	5'GACTCTGGCCTACTAACTAG ^{3'}
HT18SF0	5'TCTTGATTCAGTGGGTAGTGG ^{3'}
HT18SR0	5'CTTACTGGGAATTCCTCGTTC ^{3'}
HTT18SF	5'AGCGCTCCGCGGAGCACCT ^{3'}
HTV18SF	5'CGCCCCTTGGAGCAGCA ^{3'}
HTSF	5'TCGCGACGCCGTGCCTA ^{3'}
HT18SR	5'CTGTCCCAGTCACGAGAAC ^{3'}

3.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

λ Hind III marker

100 bp DNA Ladder

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างอุจจาระจากเด็กนักเรียนในชนบท ซึ่งกำหนดให้เป็นกลุ่มของการติดเชื้อโรค trichuriasis โดยโฮสต์ที่เป็นมนุษย์ และกลุ่มตัวอย่างอุจจาระจากสุนัขจรจัดในเขตเมืองและชนบท ซึ่งกำหนดให้เป็นกลุ่มของการติดเชื้อโรค trichuriasis โดยโฮสต์ที่เป็นสุนัข

การวางแผนการเก็บรวบรวมตัวอย่างอุจจาระ

1. ตัวอย่างอุจจาระที่ได้จากเด็กนักเรียนในชนบท

การศึกษานี้กำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่างอุจจาระนักเรียนจากโรงเรียนชุมชนบ้านท่าสองยาง เลขที่ 16 หมู่ 9 ตำบลท่าสองยาง อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก โดยทำการสุ่มตัวอย่างนักเรียนทั้งสิ้น 80 คน โดยไม่มีข้อจำกัดเรื่องเพศและอายุ

ขั้นตอนการเก็บอุจจาระนักเรียนเริ่มจากเก็บอุจจาระสดลงในกระปุกสำหรับเก็บอุจจาระพร้อมทั้งบันทึกประวัติ ซึ่งประกอบด้วย ชื่อ-สกุล เพศ อายุ และชั้นเรียน จากนั้นแบ่งอุจจาระสดส่วนหนึ่งผสมกับ 10% formaldehyde ด้วยอัตราส่วนประมาณ 1:1 โดยปริมาตรแล้วคนให้เข้ากันเพื่อรักษาสภาพของเชื้อปรสิตในอุจจาระ นำอุจจาระที่ผสมเข้ากันดีแล้วใส่กระปุก ปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยอุจจาระส่วนนี้จะใช้สำหรับวิธีการทาง morphology ต่าง ๆ ตั้งแต่การตรวจหาเชื้อปรสิตขั้นต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ วัดขนาดไข่พยาธิไส้เ็นที่ตรวจพบและบันทึกภาพสำหรับอุจจาระอีกส่วนหนึ่งที่เหลือจะเก็บโดยคงสภาพอุจจาระสดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาระหว่างนำสู่ห้องปฏิบัติการ เมื่อถึงห้องปฏิบัติการแล้วจะนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในกระบวนการทางอณูชีววิทยาต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ตัวอย่างอุจจาระที่ได้จากสุนัข

การศึกษานี้แบ่งการเก็บตัวอย่างอุจจาระสุนัขออกเป็น 2 กลุ่มคือ

2.1 อุจจาระสุนัขในกรุงเทพมหานคร โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่างจาก 2 เขตพื้นที่ ได้แก่ เขตราชเทวี ประกอบด้วยบริเวณวัดมัถักะสันและชุมชนมัถักะสัน กับเขตปทุมวัน ตลอดความยาว ถ. อังรีนันทน์ และบริเวณวัดปทุมวนาราม

2.2 อุจจาระสุนัขในชุมชนบ้านท่าสองยาง ต. ท่าสองยาง อ. ท่าสองยาง จ. ตาก โดยสุ่มเก็บอุจจาระทั้งสิ้น 59 ตัวอย่าง

ขั้นตอนการเก็บอุจจาระสุนัขจะใช้ไม้สะอาดสำหรับตักอุจจาระตักเอาเฉพาะส่วนที่ไม่สัมผัสพื้นดินซึ่งอาจมีการปนเปื้อนโดยไขพยาธิหรือปรสิตอื่น ๆ ในดินสุ่อุจจาระ นำตัวอย่างอุจจาระใส่ลงในกระปุกสำหรับเก็บอุจจาระ ส่วนวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างในทุกขั้นตอนจะใช้วิธีการเดียวกับในหัวข้อที่ 1

การรวบรวมไขพยาธิโดย concentration technique

1. นำอุจจาระนักเรียนและอุจจาระสุนัขซึ่งผสมกับ 10% formaldehyde ไว้แล้ว คนให้เข้ากันแล้วเทลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาดความจุ 15 มิลลิลิตร โดยกรองผ่านผ้าก๊อชสองชั้นจนได้ปริมาตรประมาณ 10 มิลลิลิตร หรือปรับปริมาตรด้วย 10% formaldehyde ในกรณีตัวอย่างมีปริมาณน้อย

2. เติม diethyl ether ลงในแต่ละหลอด ประมาณหลอดละ 3 มิลลิลิตร อุดปากหลอดด้วยจุกยางให้แน่นแล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปใส่เครื่องสำหรับปั่นเหวี่ยงแล้วปั่นโดยใช้ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

3. นำหลอดแก้วออกจากเครื่องปั่นอย่างเบามือเพื่อไม่ให้ส่วนของกากอุจจาระที่แยกตัวอยู่ด้านบนลงมาผสมกับส่วนของตะกอนที่ต้องการ ค่อย ๆ ใช้ไม้เขี่ยกากอุจจาระในหลอดให้หลุดออกจากนั้นเทส่วนของกากอุจจาระและของเหลวในหลอดทิ้งอย่างรวดเร็วโดยเหลือของเหลวไว้กับตะกอนประมาณ 1 มิลลิลิตร

4. ใช้หลอดหยดผสมส่วนของตะกอนที่กั้นหลอดให้เข้ากัน จากนั้นดูดตะกอนเก็บใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปตรวจหาไข่ของพยาธิ *Trichuris* sp. และปรสิตชนิดอื่น ๆ โดยวิธี simple smear

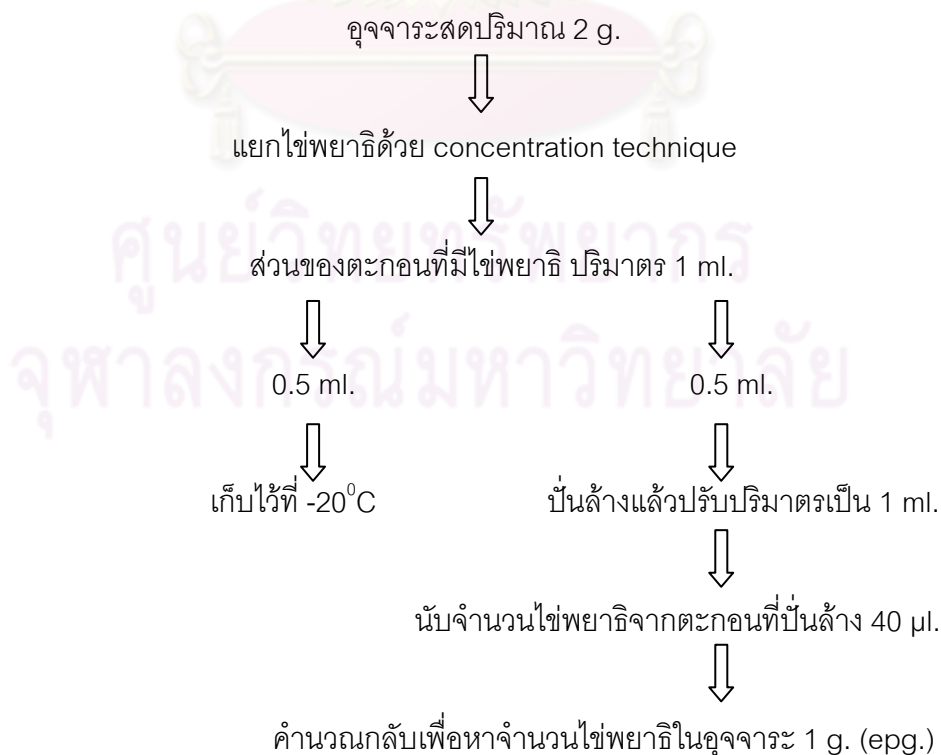
การตรวจหาเชื้อปรสิตโดย simple smear technique

ผสมตะกอนอุจจาระที่ได้จาก concentration technique ให้เข้ากัน ดูดมาหยดลงบนกระจกสไลด์ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วาง cover slip ทับโดยไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ภายใน จากนั้นนำมาตรวจหาไข่พยาธิ *Trichuris* sp. และปรสิตอื่น ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย objective lens เท่ากับ 40X พร้อมทั้งบันทึกข้อมูล

การวัดขนาดไข่พยาธิ

วัดขนาดของไข่พยาธิไส้มาทุกใบที่พบในหนึ่ง smear ในแต่ละตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย objective lens เท่ากับ 40X โดยวัดจาก ocular micrometer และนำขนาดที่ได้มาคำนวณหาขนาดจริงหน่วยเป็นไมโครเมตร บันทึกค่าที่วัดได้ทั้งความกว้างและความยาว จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดไข่พยาธิที่วัดได้ในแต่ละตัวอย่าง โดยหนึ่งตัวอย่างใช้ข้อมูลจากไข่จำนวน 30 ใบ

การนับจำนวนไข่พยาธิโดย simple smear technique



การสกัดดีเอ็นเอจาก *Trichuris trichiura* ตัวเต็มวัย

การได้มาซึ่งดีเอ็นเอจากพยาธิตัวเต็มวัยมีความสำคัญส่วนหนึ่งในการนำมาใช้เป็น positive control ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสสำหรับ *T. trichiura* และเป็น negative control สำหรับ *T. vulpis* นอกจากนี้ยังรวมถึงการนำมาใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18s rRNA gene แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ accession number DQ118536 ซึ่งเป็นสายต้นแบบที่เคยมีการศึกษา เพื่อใช้ในการออกแบบ oligonucleotide ที่มีประสิทธิภาพต่อการจำแนกชนิดของพยาธิ *T. trichiura* และ *T. vulpis*

การสกัดดีเอ็นเอจาก *T. trichiura* ตัวเต็มวัยใช้ชุดสกัด QIAamp[®] DNA Mini Kit มีขั้นตอนดังนี้

1. ล้างตัวพยาธิให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตัดส่วนหัวที่เรียวยาวของพยาธิใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติม ATL buffer ปริมาณ 180 ไมโครลิตร แล้วใช้แท่งพลาสติกสำหรับบดที่สะอาดบดพยาธิจนละเอียด
3. เติม Proteinase K ปริมาณ 20 ไมโครลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง
4. เติม AL buffer 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. เติม absolute ethanol ปริมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
6. คูดสารละลายในหลอดทั้งหมดใส่ลงใน QIAamp Spin Column แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่สารละลายใน collecting tube เก่า และนำ QIAamp Spin Column ใส่ลงใน collecting tube ใหม่
7. เติม AW1 buffer ลงใน QIAamp Spin Column ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่สารละลายใน collecting tube เก่า และนำ QIAamp Spin Column ใส่ลงใน collecting tube ใหม่
8. เติม AW2 buffer ลงใน QIAamp Spin Column ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ที่สารละลายใน collecting tube เก่า และนำ QIAamp Spin Column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

9. ปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเอาสารละลายที่หลงเหลืออยู่ออกให้หมด จากนั้นนำ QIAamp Spin Column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่

10. เติม AE buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้ AE buffer ซึมทั่วแผ่นกรองใน QIAamp Spin Column จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

11. ดูดดีเอ็นเอที่ได้ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น genomic DNA (gDNA) สำหรับกระบวนการ PCR ต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอจากไขพยาธิที่บดด้วย pipette tip

การสกัดดีเอ็นเอจากไขพยาธิมีขั้นตอนที่ยุงยากกว่าการสกัดดีเอ็นเอจากพยาธิตัวเต็มวัย เนื่องจากไขพยาธิมีขนาดเล็กไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เปลือกของไขพยาธิมีความหนา การสกัดดีเอ็นเอจากไขพยาธิจึงจำเป็นต้องมีวิธีการนำสารพันธุกรรมภายในไขออกสู่ภายนอกก่อน นอกจากนี้สารต่าง ๆ ภายนอกหลายชนิดยังมีฤทธิ์ในการย่อยสลายดีเอ็นเอของพยาธิอีกด้วย การสกัดดีเอ็นเอจากไขพยาธิโดยใช้ชุดสกัด QIAamp[®] DNA Mini Kit มีขั้นตอนดังนี้

1. รวบรวมไขพยาธิด้วย concentration technique ในขั้นตอนนี้จะมีการดำเนินการต่างกับที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยนำอุจจาระสดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทั้งอุจจาระนกเรียนและอุจจาระสุนัขตัวอย่างละ 2 กรัม ผสมกับ normal saline แล้วคนให้เข้ากัน จากนั้นกรองผ่านผ้าก๊อซสองชั้นลงในหลอดแก้วสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาดความจุ 15 มิลลิลิตร จนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หรือปรับปริมาตรด้วย normal saline ห้ามใช้ 10% formaldehyde เนื่องจากมีฤทธิ์ในการทำลายดีเอ็นเอ จากนั้นเติม diethyl ether หลอดละประมาณ 3 มิลลิลิตร ชูดด้วยจุกยางแล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนต่อไปจะดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยดูดเก็บตะกอนที่ได้ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. ล้างไขพยาธิโดยดูดตะกอนที่ได้ประมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมน้ำกลั่น 1,000 ไมโครลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนของเหลวทิ้งเบา ๆ เหลือตะกอนไว้ เติมน้ำกลั่นลงไปอีก 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิม ทำซ้ำเช่นเดียวกันนี้ 3 รอบ เติมน้ำกลั่น 1,000 ไมโครลิตรลงในตะกอนรอบสุดท้าย เพื่อเจือจางตะกอนทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกไขพยาธิ

3. นำตะกอนที่ล้างแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้กำลังขยาย objective lens เท่ากับ 4X บดไขพยาธิที่ส่องพบให้แตกด้วยปลาย pipette tip จากนั้นดูดเก็บใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรจนได้จำนวนไข 30 ใบต่อหนึ่งตัวอย่าง ปรับปริมาตรด้วย ATL buffer จนได้ปริมาตรเท่ากับ 180 ไมโครลิตร

4. เติม Proteinase K ปริมาณ 20 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปมที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง

5. เติม AL buffer 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปมที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6. เติม absolute ethanol ปริมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

7. ดูดสารละลายในหลอดทั้งหมดใส่ลงใน QIAamp Spin Column แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่สารละลายใน collecting tube เก่า และนำ QIAamp Spin Column ใส่ลงใน collecting tube ใหม่

8. เติม AW1 buffer ลงใน QIAamp Spin Column ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่สารละลายใน collecting tube เก่า และนำ QIAamp Spin Column ใส่ลงใน collecting tube ใหม่

9. เติม AW2 buffer ลงใน QIAamp Spin Column ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ที่สารละลายใน collecting tube เก่า และนำ QIAamp Spin Column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

10. ปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเอาสารละลายที่หลงเหลืออยู่ออกให้หมด จากนั้นนำ QIAamp Spin Column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

11. เติม AE buffer 30-200 ไมโครลิตร ขึ้นกับจำนวนไขพยาธิที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ AE buffer ซึมทั่วแผ่นกรองใน QIAamp Spin Column จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

12. ดูดดีเอ็นเอที่ได้ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น genomic DNA (gDNA) template สำหรับกระบวนการ PCR ต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอจากไข่พยาธิที่กระแทกด้วยเม็ดแก้ว (glass beads)

1. รวบรวมไข่พยาธิด้วย concentration technique และล้างไข่พยาธิด้วยวิธีการเช่นเดียวกับหัวข้อการบดด้วย pipette tip
2. ดูดตะกอนที่ล้างแล้วปริมาณ 300 ไมโครลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม glass beads ปริมาณ 0.2 กรัม
3. เขย่าด้วยเครื่อง VORTEX-GENIE2 ที่ระดับ 10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ดูดตะกอนที่เขย่าแล้วปริมาณ 180 ไมโครลิตรใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่
5. เติม Proteinase K ปริมาณ 20 ไมโครลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอเช่นเดียวกับหัวข้อการบดด้วย pipette tip

การออกแบบ oligonucleotides สำหรับใช้เป็น PCR Primer

จากการศึกษาทางด้านชีววิทยาโมเลกุลของพยาธิไส้หม่าเท่าที่มีในปัจจุบันพบว่าหลักฐานของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ribosomal RNA นั้นยังมีไม่กว้างขวางเท่าที่ควร โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณของ 18S ribosomal RNA การใช้คุณสมบัติการจำลองตัวเองของสายนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี PCR จะถูกนำมาใช้เพื่อจำแนก *T. trichiura* ออกจาก *T. vulpis* โดยใช้ ribosomal RNA gene เป็นบริเวณเป้าหมาย และใช้อิโกลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มี complementary กับเบสในบริเวณ 18S ribosomal RNA ในการทดสอบ แต่เนื่องจากข้อมูลที่ใช้อ้างอิงในปัจจุบันมีไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการออกแบบอิโกลิโกนิวคลีโอไทด์สำหรับใช้เป็น PCR ไพรมเมอร์ได้ ดังนี้

1. *T. trichiura* มีรายงาน sequence เพียงบางส่วนของบริเวณ 18S (DQ118536) โดยเริ่มต้นตำแหน่งที่ 39 และสิ้นสุดตำแหน่งที่ 1,895 เมื่อเทียบกับ *T. suis* 18S complete sequene (AY851265)
2. *T. vulpis* มีรายงาน sequence เพียงบริเวณ ITS1–5.8S–ITS2 complete sequene

AM234616



DQ118536

การหาบริเวณที่เหมาะสมต่อการออกแบบ forward primer ที่จำเพาะต่อพยาธิไส้เ้มา เริ่มจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S ribosomal RNA gene ของ *T. trichiura*, *T. muris* และ *T. suis* โดยใช้ข้อมูลอ้างอิงจาก www.ncbi.nlm.nih.gov ดังนี้

<i>T. suis</i>	assesion number : AY856093
<i>T. suis</i>	assesion number : AY851265
<i>T. trichiura</i>	assesion number : DQ118536
<i>T. muris</i>	assesion number : AF036637

จากนั้นออกแบบไพรเมอร์โดยใช้วิธีคำนวณจากสูตรอุณหภูมิหลอมตัว (Melting temperature, T_m) ของไพรเมอร์ดังนี้

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

ข้อควรระวังในการออกแบบไพรเมอร์

1. ค่า T_m ของไพรเมอร์ควรใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วง 50-80 องศาเซลเซียส
2. ความยาวของไพรเมอร์ ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 20-30 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยเบสชนิด guanine และ cytosine ประมาณร้อยละ 50-60 ขึ้นไป และมีการกระจายตัวของเบสต่าง ๆ เหมือนกันกับลำดับเบสที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน
3. ควรหลีกเลี่ยงการใช้ไพรเมอร์ที่มี polypurines หรือ polypyrimidine
4. ในส่วนบริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ไม่ควรมีลำดับเบสที่เป็น complementary กัน เพื่อป้องกันการจับคู่กันเองของไพรเมอร์ (primer-dimer)
5. การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละส่วนของไพรเมอร์ไม่ควรมีลำดับเบสที่เหมือนกันเมื่ออ่านจากทิศทาง 5' ไปทาง 3' และ 3' ไปทาง 5' เพื่อป้องกันปลาย 3' งอมาจับกับไพรเมอร์สายเดียวกันเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure)

forward primer ที่ได้อยู่ในตำแหน่งที่ 77-98 (AY851265)

TT18SF0 5' ACGGTGAAGCCGCGAATGGCTC^{3'}

ขั้นตอนต่อไปคือหาบริเวณที่เหมาะสมต่อการออกแบบ reverse primer ที่จำเพาะต่อพยาธิไส้เ็นมาโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S ribosomal RNA gene ของ

T.muris assesion number : AJ299407

T.vulpis assesion number : AM234616

T.suis assesion number : AM229670

reverse primer ที่ได้ อยู่ในตำแหน่งที่ 115–136 ของบริเวณ 5.8S (AM234616)

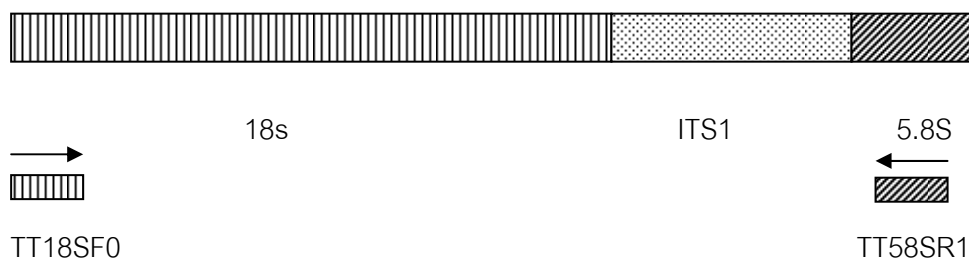
TT58SR0 5'GTTTGATCGACGCTGCAATGTG^{3'}



เนื่องจากการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์สายยาวนี้เป็นแบบ semi-nested PCR ซึ่งในกระบวนการ PCR รอบที่สองจะใช้ forward primer ตัวเดิมคือ TT18SF0 และออกแบบ reverse primer ตัวใหม่

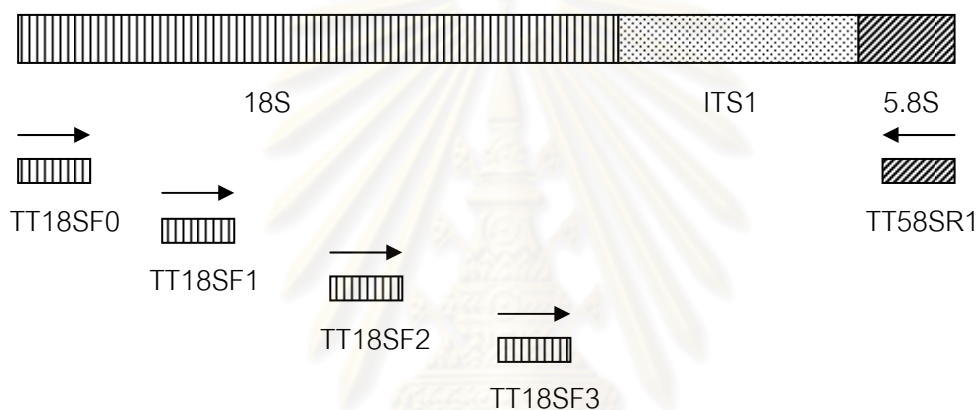
reverse primer ที่ได้ อยู่ในตำแหน่งที่ 101–122 ของบริเวณ 5.8S (AM234616)

TT58SR1 5'GCAATGTGCGTTCAAAGTATTC^{3'}



จากนั้นทำการหาลำดับเบส (sequencing) ของชิ้น DNA ผลิตผลที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ต่างกันอีก 3 สาย เพื่อให้ครอบคลุมส่วนของ 18S, ITS1 และ ส่วน 5' ของ 5.8S ดังนี้

TT18SF1	5' TGAATCGGAATAACTATGCTG ^{3'}	ตำแหน่งที่ 267-287 (AY851265)
TT18SF2	5' CGACTTGAAAGTTTACTTTGAG ^{3'}	ตำแหน่งที่ 758-779 (AY851265)
TT18SF3	5' GACTCTGGCCTACTAACTAG ^{3'}	ตำแหน่งที่ 1,357-1,376 (AY851265)



วิธีการทำโคลน (subclone)

เนื่องจาก gDNA ที่นำมาใช้ในกระบวนการ PCR ได้มาจากไข่มดมากกว่าหนึ่งใบ แต่การหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอผลิตผลมีความจำเป็นที่จะต้องคัดแยกดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์ในสายพันธุ์เสียก่อน ในขั้นตอนนี้จะใช้วิธีการ subclone ในการคัดแยกสายพันธุ์ให้บริสุทธิ์ เริ่มจากนำดีเอ็นเอผลิตผลประมาณ 30 ไมโครลิตรมาตรวจด้วย gel electrophoresis จากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. การตัดแยกดีเอ็นเอที่ใช้ QIAquick gel extraction kit

- 1.1 ตัดชิ้นส่วนอะกาโรสเจลบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วบันทึกน้ำหนักของชิ้นเจล
- 1.2 เติม QG-buffer 3 ส่วน ต่อปริมาณเจล 1 ส่วน (1 มิลลิกรัม = 1 ไมโครลิตร)
- 1.3 ปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จนชิ้นเจลละลาย
- 1.4 ถ่ายสารละลายใส่ spin column ที่ประกอบกับ collecting tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 1 นาที
- 1.5 ทิ้งสารละลายใน collecting tube จากนั้นเติม QG-buffer 500 ไมโครลิตรลงใน spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 1 นาที
- 1.6 ทิ้งสารละลายใน collecting tube จากนั้นเติม PE-buffer 750 ไมโครลิตรลงใน spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 1 นาที
- 1.7 ทิ้งสารละลายใน collecting tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 1 นาที
- 1.8 เติม EB-buffer 30 ไมโครลิตรลงใน spin column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 1 นาที
- 1.9 ดูดีเอ็นเอที่ได้ใส่ใน microcentrifuge tube และเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด (Ligation)

- 2.1 เติม 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2.2 เติม pGEM[®]-T Easy Vector ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
- 2.3 เติมดีเอ็นเอที่ตัดแยกออกจากอะกาโรสเจลปริมาณ 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 2.4 เติม T4 DNA Ligase ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
- 2.5 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง

3. การตกตะกอนดีเอ็นเอลูกผสม

- 3.1 เติม absolute ethanol + 3 M sodium acetate ปริมาณ 25 ไมโครลิตรลงในดีเอ็นเอที่ทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง
- 3.2 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที
- 3.3 ดูดของเหลวทิ้งอย่างเบามือโดยระวังไม่ให้ดีเอ็นเอที่ติดบริเวณก้นหลอดหลุด

3.4 เติม cold 70% EtOH ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.5 ดูดของเหลวทิ้งอย่างเบามือโดยเหลือไว้ประมาณ 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2 นาที

3.6 ดูดของเหลวทิ้งอย่างเบามือจนหมดโดยไม่ให้ดีเอ็นเอที่ติดกันหลุดหลุดออก

3.7 ตากดีเอ็นเอบริเวณก้นหลอดให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ต้องปิดฝาหลอด

3.8 เติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตรเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การจำลองดีเอ็นเอลูกผสมและการคัดเลือก

4.1 นำดีเอ็นเอลูกผสมปริมาณ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ *Escherichia coli* ที่ผ่านกระบวนการทำให้เป็น competent cell ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ถ่ายลงสู่ cuvette ที่แช่ในน้ำแข็งจนเย็นจัด

4.2 ผ่านกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 1.8 กิโลโวลต์ สู่ cuvette

4.3 ดูดเชื้อทั้งหมดใน cuvette ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.4 นำเชื้อที่ได้ประมาณ 200-300 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ผสม ampicillin บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.5 คัดเลือกโคโลนีของเชื้อด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ TT18SF0 และ TT58SR1 จากนั้นตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาด้วยวิธี gel electrophoresis

เมื่อได้ลำดับเบสในส่วนของ 18S rRNA แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดเพื่อจำแนก *T. trichiura* ออกจาก *T. vulpis* โดยวิธี nested PCR เริ่มจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA gene ของตัวอย่างที่วิเคราะห์แล้วกับตัวอย่างอ้างอิง ดังนี้

sequence ของ *T. trichiura* คือ D42 และ DQ118536

sequence ของ *T. vulpis* คือ D56_A, D56_B และ D56_C

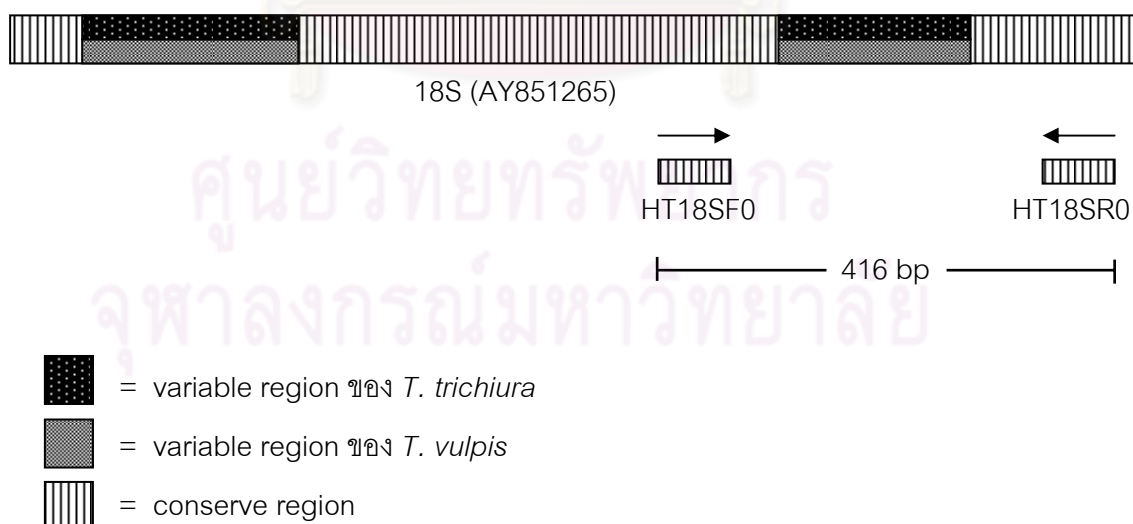
sequence ของ *T. suis* (AY851265)

forward primer ที่ได้อยู่ในตำแหน่งที่ 1,278–1,298 (AY851265)

HT18SF0 5'TCTTGATTCAGTGGGTAGTGG^{3'}

reverse primer ที่ได้อยู่ในตำแหน่งที่ 1,673–1,693 (AY851265)

HT18SR0 5'CTTACTGGGAATTCCTCGTTC^{3'}

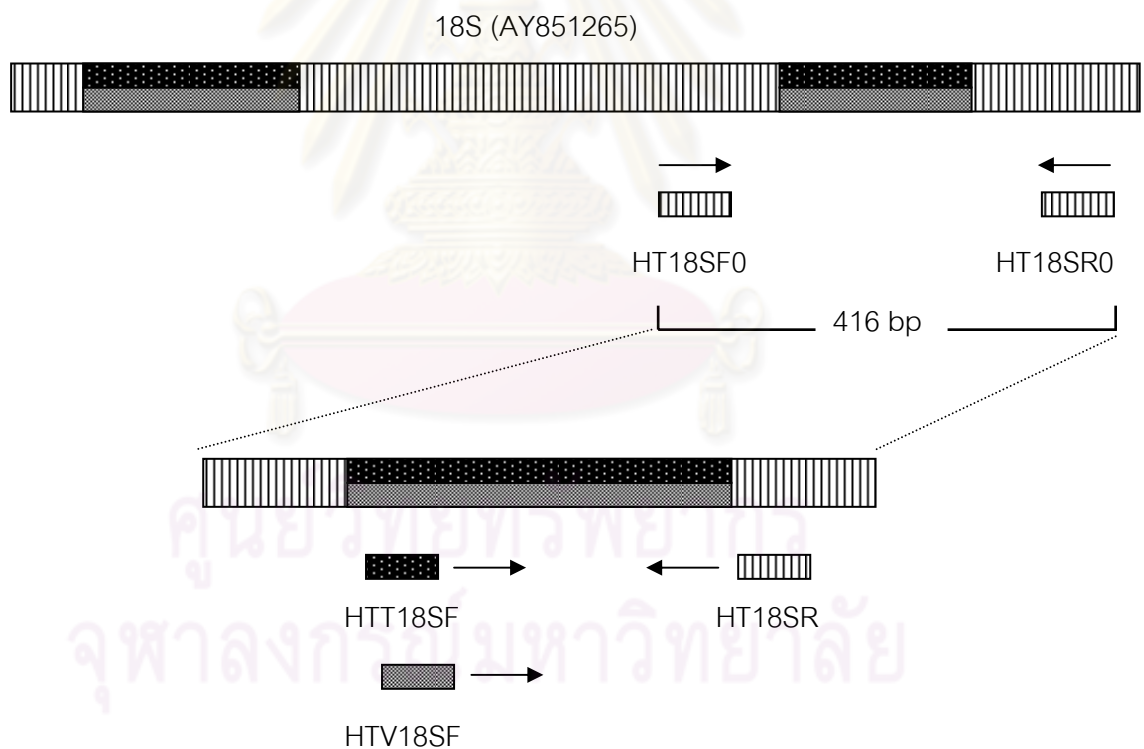





สำหรับ PCR รอบที่สอง ซึ่งใช้ในการจำแนก *T. trichiura* ออกจาก *T. vulpis* ใช้ไพรเมอร์ต่อไปนี้

HTT18SF: 5'AGCGCTCCGCGGAGCACCT^{3'} ตำแหน่งที่ 1,375–1,393 ของตัวอย่างที่ D42
สำหรับตรวจสอบ *T. trichiura*

HTV18SF: 5'CGCCCTTGGAGCAGCA^{3'} ตำแหน่งที่ 1,349–1,365 ของตัวอย่างที่ D56_A
สำหรับตรวจสอบ *T. vulpis*

HT18SR: 5'CTGTCCCAGTCACGAGAAC^{3'} ตำแหน่งที่ 1,537–1,555 ของตัวอย่างที่ D56_A
เป็น reverse primer



-  = variable region ของ *T. trichiura*
-  = variable region ของ *T. vulpis*
-  = conserve region

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณน้อย การทดลองนี้จึงใช้วิธีการ nested PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งมีขั้นตอนของการทำ PCR 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ ด้วยกัน คือ

1. ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสสำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 18S ครอบคลุมไปจนถึง ITS1 และ 5.8 S เพื่อศึกษาลำดับเบสที่สมบูรณ์บริเวณ 18S rRNA gene ของพยาธิไส้เ็น *T. trichiura* และ *T. vulpis* จากตัวอย่างที่เก็บมา ในขั้นตอนนี้จะเลือกใช้ไพรเมอร์ TT18SF1 เป็น forward primer และ TT58SR เป็น reverse primer สำหรับปฏิกิริยาคั้งที่หนึ่ง ซึ่งมีลำดับเบสคือ

TT18SF0 5' ACGGTGAAGCCGCGAATGGCTC 3'
TT58SR0 5' GTTTGATCGACGCTGCAATGTG 3'

ส่วนปฏิกิริยาคั้งที่สองจะเลือกใช้ไพรเมอร์ TT18SF1 เป็น forward primer และ TT58SR1 เป็น reverse primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

TT58SR1 5' GCAATGTGCGTTCAAAGTATTC 3'

1.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับทำ PCR โดยใช้องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยา 1 ตัวอย่างในปริมาณสารละลายสุทธิ 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอที่สกัดไว้ (DNA template), ไพรเมอร์ทั้ง forward และ reverse ความเข้มข้น 30 พิโคโมล, 10X PCR Buffer, MgCl₂, dNTP ที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์, LA Taq DNA polymerase เพื่อใช้เป็นเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยา และน้ำกลั่น ซึ่งใช้ในปริมาณตามตาราง 3A และ 4A

1.2 นำหลอดที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในหลอดทดลอง ประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, ขั้นตอนการทำให้ ไพรเมอร์จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.3 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (primer extension) ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ซึ่งทำปฏิกิริยาทั้งหมด 38 รอบตามตาราง 3B และ 4B จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis

2 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อทดสอบไพรเมอร์สำหรับใช้จำแนกชนิดของพยาธิไส้มา *T. trichiura* ออกจาก *T. vulpis* โดยใช้ไพรเมอร์ HT18SF0 เป็น forward primer และ HT18SR0 เป็น reverse primer สำหรับปฏิกริยาครั้งที่หนึ่ง ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

HT18SF0 5'TCTTGATTCAGTGGGTAGTGG^{3'}
HT18SR0 5'CTTACTGGGAATTCCTCGTTC^{3'}

ส่วนปฏิกริยาครั้งที่สองใช้ไพรเมอร์ HTT18SF, HTV18SF และ HTSF เป็น forward primer ซึ่งคาดว่าจะมีความจำเพาะต่อ *T. trichiura*, *T. vulpis* และ *T. suis* ตามลำดับ และใช้ HT18SR เป็น reverse primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

HTT18SF 5'AGCGCTCCGCGGAGCACCT^{3'}
HTV18SF 5'CGCCCCTTGGAGCAGCA^{3'}
HTSF 5'TCGCGACGCCGTGCCTA^{3'}
HT18SR 5'CTGTCCCAGTCACGAGAAC^{3'}

1. นำดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับทำ PCR โดยใช้องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกริยา 1 ตัวอย่างในปริมาณสารละลายสุทธิ 20 ไมโครลิตร ซึ่งใช้ในปริมาณตามตาราง 5A และ 6A

2. นำหลอดที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนตามตาราง 5B และ 6B

ศูนย์วิทยพัชการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี gel electrophoresis

1. เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1 และร้อยละ 2 สำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอ ผลิตภัณฑ์จาก semi-nested PCR และ nested PCR ตามลำดับ โดยผสมผงอะกาโรสตามอัตราส่วนกับ 0.5X TBE ปริมาณ 100 มิลลิลิตร หลอมเจลด้วยความร้อนแล้วปล่อยให้แข็งตัวในภาชนะเตรียมเจล แล้วจึงนำเจลมาใส่ใน electrophoresis chamber ซึ่งมี 0.5X TBE บรรจุอยู่ในระดับที่ท่วมแผ่นเจล

2. นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมของอะกาโรสเจล ซึ่งใช้ λ Hind III เป็นดีเอ็นเอบอกขนาด (DNA marker) สำหรับผลิตภัณฑ์จาก semi-nested PCR และใช้ 100 bp ladder เป็นดีเอ็นเอบอกขนาดสำหรับเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์จาก nested PCR

3. เดินกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใช้เวลา 30-50 นาที ขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล จากนั้นแผ่นเจลไปย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที

4. ตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพสำหรับวัดขนาดแถบดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอบอกขนาด

sequence analysis

การวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (automated DNA sequencing) เป็นวิธีการหาลำดับเบสของ DNA โดยอาศัยหลักการของ dideoxy chain termination แตกต่างกันตรงที่การติดฉลาก DNA จะใช้สารเรืองแสง เช่น dRhodamine dye terminator แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี โดยอาศัยการติดตามการเรืองแสงของสีต่าง ๆ กัน 4 ชนิด สำหรับเบส 4 ตัว คือ A C G และ T สีที่ใช้ในการติดฉลากแต่ละตัวเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์จะเรืองแสงในช่วงความยาวคลื่นแตกต่างกัน และแสงที่ปรากฏจะแตกต่างกัน โดยจะเห็นเป็นสีเขียว สีดำ สีน้ำเงิน และสีแดง ตามลำดับ ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer

เมื่อได้ลำดับเบสทั้งหมดของบริเวณที่ต้องการศึกษาแล้ว จะนำมาวิเคราะห์ผลโดยการทำ alignment ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ BioEdit และ Clustalx ร่วมกับการตรวจสอบด้วยสายตา เพื่อหาความหลากหลายของลำดับเบสที่เกิดขึ้นในบริเวณ 18S, ITS1 และบางส่วนของ 5.8S

PCR condition

ตารางที่ 3: semi-nested PCR รอบแรกด้วยไพรเมอร์ TT18SF0 และ TT58SR0

A: องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ในปริมาณสารละลายสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Volume (μ l)
H ₂ O	7.26
10X Buffer	2.00
MgCl ₂	2.00
dNTP	3.20
enzyme <i>LA-taq</i>	0.20
forward primer - TT18SF0	0.17
reverse primer – TT58SR0	0.17
DNA template	5.00
total	20.00

B: PCR Cycle Profile

	Temperature ($^{\circ}$ C)	Time (min.)
DNA denaturation	94	1.0
primer-template annealing (38 cycles)	96	0.2
	55	0.3
	62	3.0
extension	72	10.0
hold	20	∞

ตารางที่ 4: semi-nested PCR รอบสองด้วยไพรเมอร์ TT18SF0 และ TT58SR1

A: องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ในปริมาณสารละลายสุทธิ 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Volume (μ l)
H ₂ O	16.39
10X Buffer	3.00
MgCl ₂	3.00
dNTP	4.80
enzyme <i>LA-taq</i>	0.30
forward primer - TT18SF0	0.255
reverse primer – TT58SR1	0.255
DNA template	2.00
total	30.00

B: PCR Cycle Profile

	Temperature ($^{\circ}$ C)	Time (min.)
DNA denaturation	94	1.0
primer-template annealing (38 cycles)	96	0.2
	55	0.3
	62	3.0
extension	72	10.0
Hold	20	∞

ตารางที่ 5: nested PCR รอบแรกด้วยไพรเมอร์ HT18SF0 และ HT18SR0

A: องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ในปริมาณสารละลายสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Volume (μ l)
H ₂ O	14.04
10X Buffer	2.00
dNTP	1.60
enzyme <i>r-taq</i>	0.10
forward primer - HT18SF0	0.13
reverse primer - HT18SR0	0.13
DNA template	2.00
total	20.00

B: PCR Cycle Profile

	Temperature ($^{\circ}$ C)	Time (min.)
DNA denaturation	94	1.0
primer-template annealing (40 cycles)	94	0.3
	62	0.3
	72	1.0
extension	72	5.0
Hold	20	∞

ตารางที่ 6: nested PCR รอบสองด้วยไพรเมอร์ HTT18SF0/HTV18SF0 และ HT18SR

A: องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ในปริมาณสารละลายสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Volume (μ l)
H ₂ O	14.04
10X Buffer	2.00
dNTP	1.60
enzyme <i>r-taq</i>	0.10
forward primer - HTT18SF0/HTV18SF0	0.13
reverse primer - HT18SR	0.13
DNA template	2.00
Total	20.00

B: PCR Cycle Profile

	Temperature ($^{\circ}$ C)	Time (min.)
DNA denaturation	94	1.0
primer-template annealing (30 cycles)	94	0.3
	62	0.3
	72	1.0
extension	72	5.0
Hold	20	∞

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการตรวจหาเชื้อปรสิตในอุจจาระภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ตัวอย่างอุจจาระนักเรียนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ถูกเก็บรวบรวมจากนักเรียนโรงเรียนชุมชนบ้านท่าสองยาง ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2550 รวมทั้งสิ้น 80 คน เป็นนักเรียนชาย 36 คน นักเรียนหญิง 44 คน ภายในช่วงอายุตั้งแต่ 5-18 ปี โดยมีค่าเฉลี่ยของอายุเท่ากับ 9.5 ± 3.0 ปี จากการตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่าด้วย concentration technique ให้ผลบวก 76 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 95 ในจำนวนนี้พบว่าให้ผลบวกต่อ *Trichuris* sp. จำนวน 56 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 70 เป็นเพศชาย 28 คน (77.8%) เพศหญิง 28 คน (63.6%) นอกจากนี้ยังตรวจพบปรสิตอื่น ๆ ทั้งในกลุ่มของหนอนพยาธิตัวกลม หนอนพยาธิตัวแบน และโปรโตซัว ซึ่งมีอัตราการติดเชื้อดังแสดงในตารางที่ 7

ปริมาณการติดเชื้อ *Trichuris* sp. ในอุจจาระนักเรียนซึ่งคิดจากจำนวนไข่พยาธิต่ออุจจาระหนึ่งกรัม (epg.) พบว่านักเรียนที่มีค่า $epg. \leq 10$ มีจำนวน 7 คน นักเรียนที่มีค่า epg. อยู่ระหว่าง 11-100 มีจำนวน 23 คน นักเรียนที่มีค่า epg. ระหว่าง 101-400 จำนวน 19 คน นักเรียนที่มีค่า epg. ระหว่าง 401-1,000 จำนวน 4 คน และนักเรียนที่มีค่า $epg. > 1,000$ จำนวน 1 คน

สำหรับตัวอย่างอุจจาระสุนัขที่รวบรวมได้ภายในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 20 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจหาเชื้อปรสิตเป็นบวกทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30 ในจำนวนนี้พบว่าให้ผลบวกต่อ *Trichuris* sp. จำนวน 4 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 20 ส่วนตัวอย่างอุจจาระสุนัขที่รวบรวมได้จากชุมชนบ้านท่าสองยาง จ.ตาก จำนวน 59 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจหาเชื้อปรสิตเป็นบวก 52 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 88.1 โดยพบ *Trichuris* sp. ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 22 ซึ่งจัดว่ามีอัตราการติดเชื้อ *Trichuris* sp. ใกล้เคียงกับสุนัขในกรุงเทพฯ แต่เมื่อเทียบกับอัตราการติดเชื้อในเด็กนักเรียนซึ่งมาจากพื้นที่เดียวกันพบว่าอัตราการติดเชื้อในสุนัขต่ำกว่าในนักเรียนมาก ในแง่ของปริมาณการติดเชื้อ ไข่พยาธิที่ตรวจพบจากอุจจาระสุนัขในกรุงเทพฯ จำนวน 4 ตัวอย่าง มีค่า epg. เท่ากับ 13, 13, 19 และ 75 ในขณะที่อุจจาระสุนัขจากชุมชนท่าสองยางมีค่า $epg. < 100$ เพียง 3 ตัวอย่าง คือ 3, 6 และ 13 โดยค่า epg. ที่มากที่สุดคือ 75 ส่วนปรสิตอื่น ๆ ที่ตรวจพบ นอกเหนือจากพยาธิไส้เ็นและอัตราการติดเชื้อได้แสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 อัตราการตรวจพบเชื้อปรสิตในทางเดินอาหารชนิดต่าง ๆ ของเด็กนักเรียนที่ใช้ในการวิจัยจำนวนทั้งสิ้น 80 คน

ชนิดของปรสิต ที่ตรวจพบ	เพศชาย (N = 36)		เพศหญิง (N = 44)		รวม (N = 80)	
	จำนวนนักเรียน		จำนวนนักเรียน		จำนวนนักเรียน	
	ที่ติดเชื้อ	(%)	ที่ติดเชื้อ	(%)	ที่ติดเชื้อ	(%)
<i>Trichuris</i> sp.	28	77.8	28	63.6	56	70.0
<i>A. lumbricoides</i>	13	36.1	25	56.8	38	47.5
Hookworm.	9	25.0	5	11.4	14	17.5
<i>S. stercoralis</i>	1	2.8	0	0.0	1	1.3
<i>E. vermicularis</i>	1	2.8	3	6.8	4	5.0
<i>Opisthorchis</i> sp.	3	8.3	2	4.5	5	6.3
<i>Taenia</i> sp.	0	0.0	1	2.3	1	1.3
<i>H. diminuta</i>	0	0.0	1	2.3	1	1.3
<i>E. histolytica</i>	7	19.4	3	6.8	10	12.5
<i>E. coli</i>	20	55.6	17	38.6	37	46.3
<i>E. hartmanni</i>	10	27.8	7	15.9	17	21.3
<i>G. lamblia</i>	5	13.9	9	20.5	14	17.5
<i>B. hominis</i>	33	91.7	33	75.0	66	82.5
<i>Sarcocystis</i> sp.	0	0.0	1	2.3	1	1.3
<i>E. nana</i>	16	44.4	4	9.1	20	25.0
<i>C. mesnili</i>	1	2.8	2	4.5	3	3.8
<i>I. buetschlii</i>	4	11.1	0	0.0	4	5.0

ตารางที่ 8 อัตราการตรวจพบเชื้อปรสิตในทางเดินอาหารชนิดต่าง ๆ ของสุนัขที่ใช้ในการ
วิจัยจำนวนทั้งสิ้น 79 ตัว

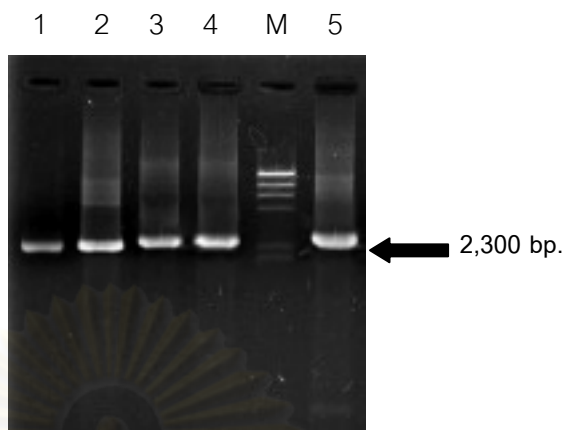
ชนิดของปรสิต ที่ตรวจพบ	ทำสองยาง		กรุงเทพฯ	
	จำนวนตัวอย่างที่ติดเชื้อ	%	จำนวนตัวอย่างที่ติดเชื้อ	%
<i>Trichuris</i> sp.	13	22	4	20
<i>Ascaris lumbricoides</i>	18	30.5	0	0
<i>Spirocerca lupi</i> .	15	25.4	0	0
Hookworm	23	39	4	20
<i>Toxocara canis</i>	13	22	0	0
<i>Paragonimus</i> sp.	1	1.7	0	0
<i>Spirometra</i> sp.	5	8.5	0	0
<i>Taenia</i> sp.	2	3.4	0	0
<i>Giardia lamblia</i>	2	3.4	0	0
<i>Isospora</i> sp.	4	5.1	0	0
Amoeba cyst	1	1.7	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S-ITS1-5.8S ribosomal RNA gene

gDNA ที่นำมาใช้ในขั้นตอนนี้ผ่านการสกัดจากไขพยาธิจำนวนไม่ต่ำกว่า 10 ใบต่อหนึ่งตัวอย่างซึ่งทำการคัดแยกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การศึกษาในขั้นตอนนี้จะเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี semi-nested PCR บน ribosomal RNA gene โดยเลือกใช้ DNA template จาก gDNA 3 แหล่งด้วยกัน คือ gDNA ที่สกัดจากอุจจาระนักเรียนจำนวน 3 ตัวอย่าง gDNA ที่สกัดจากอุจจาระสุนัขในกรุงเทพฯ 1 ตัวอย่าง จากสุนัขใน จ. ตาก 1 ตัวอย่าง และ gDNA ที่สกัดจาก *T. trichiura* ตัวเต็มวัย 1 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง ขั้นตอนเริ่มจากกระบวนการ PCR รอบที่หนึ่งซึ่งใช้ TT18SF0 เป็น forward primer และ TT58SR0 เป็น reverse primer สามารถให้ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอครอบคลุมตั้งแต่ส่วนต้นของบริเวณ 18S ผ่านบริเวณ ITS1 และสิ้นสุดในบริเวณของ 5.8S เมื่อนำดีเอ็นเอผลิตผลมาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1 และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดคือ λ Hind III พบว่าไม่มีตัวอย่างใดที่แสดงแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน และบางตัวอย่างไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเลย ส่วนตัวอย่างจากพยาธิตัวเต็มวัยให้แถบดีเอ็นเอเข้มที่สุด การที่แถบดีเอ็นเอปรากฏไม่ชัดเจนนั้นเนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการ PCR ที่ได้จากไขพยาธิมีปริมาณต่ำและอาจถูก inhibitor บางชนิดรบกวนในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เมื่อนำดีเอ็นเอผลิตผลทั้ง 6 ตัวอย่างที่ได้จาก PCR รอบที่หนึ่งมาใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับการทำ PCR รอบที่สอง โดยมี TT18SF0 เป็น forward primer และ TT58SR1 เป็น reverse primer เมื่อตรวจสอบผลิตผลจาก PCR รอบที่สองทั้ง 5 ตัวอย่างด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1 และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดคือ λ Hind III ในการเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอผลิตผล ให้ผลดังภาพที่ 10

เนื่องจาก gDNA ที่ใช้ในกระบวนการ PCR ได้มาจากไขพยาธิมากกว่าหนึ่งใบและได้จากเนื้อเยื่อของพยาธิตัวเต็มวัย ผลิตผลที่ได้จึงอาจมีหน่วยพันธุกรรมหลายอัลลีล (allele) ซึ่งถูกสังเคราะห์รวมกันอยู่ การที่จะอ่านลำดับเบสบนหน่วยพันธุกรรมนั้นจำเป็นที่จะต้องทำให้ผลิตผล PCR จาก semi-nested PCR รอบที่สองมีความบริสุทธิ์ของหน่วยพันธุกรรมแบบใดแบบหนึ่งเสียก่อน สำหรับการศึกษานี้ใช้วิธีการโคลนขึ้นดีเอ็นเอ (DNA cloning) ในเซลล์แบคทีเรีย และนำเข้าสู่กระบวนการแปลผล 12 โคลน จากผลที่ปรากฏบนแผ่นอะกาโรสเจลพบว่าขึ้นดีเอ็นเอผลิตผลจากทั้ง 12 โคลน มีขนาดประมาณ 2,300-2,500 bp เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของดีเอ็นเอบอกขนาด λ Hind III



ภาพที่ 10 แสดงแถบดีเอ็นเอผลิตผลจาก semi-nested PCR (รอบที่สอง) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยแถวที่ 1 และ 2 คือตัวอย่างที่ได้จากอุจจาระสุนัขในกรุงเทพฯ จำนวน 2 โคลน แถวที่ 3 คือตัวอย่างที่ได้จากอุจจาระสุนัขในจังหวัดตาก แถวที่ 4 คือตัวอย่างจากอุจจาระนักเรียน แถวที่ 5 คือตัวอย่างจากพยาธิตัวเต็มวัย และแถว M คือดีเอ็นเอบอกขนาด (λ Hind III)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S-ITS1-5.8S ribosomal RNA gene

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 12 โคลน (ตารางที่ 9) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิง accession number DQ118536 และ AM234616 จาก www.ncbi.nlm.nih.gov พบว่าใน 4 โคลนที่ได้จากอุจจาระสุนัขให้ผลเป็น *T. vulpis* จำนวน 3 โคลนคือ D56_A, D56_B และ D56_C ส่วนอีกหนึ่งโคลนคือ D42 ให้ผลเป็น *T. trichiura* ในขณะที่ 8 โคลนจากอุจจาระผู้ป่วยและพยาธิตัวเต็มวัยล้วนให้ผลเป็น *T. trichiura* ทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์ถึงลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเบสตำแหน่งแรกที่ไพรเมอร์ TT18SF0 อ่านได้อยู่ในบริเวณของ 18S rRNA gene ซึ่งตรง กับตำแหน่งที่ 39 ของ DQ118536 เมื่อนับไปจนสุดถึงตำแหน่งสุดท้ายของไพรเมอร์ TT58SR0 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *T. vulpis* ทั้ง 3 โคลนมีความยาวเท่ากันคือ 2,367 bp ส่วนลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ *T. trichiura* ทั้ง 9 โคลนมีความยาวหลากหลาย โดยสายนิวคลีโอไทด์ที่ยาวที่สุดได้จากตัวอย่าง D42 มีความยาว 2,599 bp ส่วนสายนิวคลีโอไทด์ที่สั้นที่สุดได้จากตัวอย่าง TST214 มีความยาว 2,575 bp

หากพิจารณาการจัดเรียงตัวของยีนบน ribosomal RNA ทั้ง 3 บริเวณคือ 18S, ITS1 และ 5.8S เรียงกันตามลำดับ เมื่อพิจารณาเฉพาะบริเวณ 18S rRNA gene ซึ่งมีการรักษารูปแบบที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสายพันธุ์ (conserve region) ตามภาพที่ 11 โดยเปรียบเทียบกับ DQ118536 พบว่า *T. trichiura* ทั้ง 9 โคลน มี 7 โคลนที่มีความยาวเท่ากันคือ 1,846 bp ส่วนโคลน TH2_B มีความยาว 1,847 bp เนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของเบส (insertion) 1 ตำแหน่ง คือ G จะเห็นว่าเบสที่เพิ่มขึ้นอยู่ในตำแหน่งที่ 1,241 และอีกโคลนหนึ่งคือ TH2_D มีความยาว 1,854 bp จากการเพิ่มขึ้นของเบส 8 ตำแหน่งติดกันคือ GTTACGG ในตำแหน่งที่ 793 ซึ่ง 7 ตำแหน่งหลังเป็นส่วนที่มีการเรียงตัวซ้ำ (repeat) กับเบส 7 ตำแหน่งถัดไปคือ TTTACGG ส่วนตำแหน่งที่ 1,323 ของทุกโคลนมีการเพิ่มขึ้นของเบสหนึ่งตำแหน่งคือ C นอกจากนี้ยังพบการแทนที่ของเบส (substitution) หนึ่งตำแหน่งในบางบริเวณดังตารางที่ 10 เมื่อพิจารณาถึงอัตราความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% homology) บริเวณ 18S rRNA gene ระหว่าง DQ118536 และโคลน TH2_D ซึ่งมีความยาวมากที่สุด พบว่ามีอัตราความเหมือนกัน 99.13%

ส่วนบริเวณ 18S rRNA gene ของ *T. vulpis* ทั้ง 3 โคลน (D56_A, D56_B และ D56_C) มีความยาวเท่ากันทั้งหมดคือ 1,816 bp เมื่อนำทั้ง 3 โคลนเปรียบเทียบกับพบการเข้าแทนที่ของเบสทั้งหมด 9 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งที่พบในโคลน D56_A คือ 205(A/G), 869(A/G) และ 1540(A/G) โคลน D56_B พบได้ในตำแหน่งที่ 67(A/G) และ 1720(A/G) ส่วนโคลน D56_C พบได้ในตำแหน่งที่ 23(A/T), 1019(T/C), 1175(T/C) และ 1209(T/C) การที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *T. vulpis* ที่ศึกษามีขนาดสั้นกว่า *T. trichiura* เนื่องจากการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 6 บริเวณ เมื่อเปรียบเทียบกับ DQ118536 พบว่าตำแหน่งที่ขาดหายไปคือ ตำแหน่งที่ 108 จำนวน 2 เบส, ตำแหน่งที่ 159 จำนวน 4 เบส, ตำแหน่งที่ 1,346 จำนวน 6 เบส, ตำแหน่งที่ 1,358 จำนวน 7 เบส, ตำแหน่งที่ 1,373 จำนวน 9 เบส และตำแหน่งที่ 1,400 จำนวน 3 เบส สำหรับอัตราความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง *T. trichiura* (DQ118536) และ *T. vulpis* โคลน D56_B มีค่าเท่ากับ 92.07%

ในขณะเดียวกันเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA gene ของ *T. trichiura* และ *T. vulpis* ทั้ง 12 โคลนเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของ *T. suis* (AY851265) จะพบบริเวณที่เป็น homology zone ถึง 3 บริเวณด้วยกัน หากใช้ DQ118536 เป็นเกณฑ์ บริเวณแรกจะอยู่ในตำแหน่งที่ 27-188 บริเวณที่สองอยู่ในตำแหน่งที่ 1,320-1,415 และบริเวณที่สามอยู่ในตำแหน่งที่ 1,713-1,794

ตารางที่ 9 แสดงขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณต่าง ๆ บน ribosomal RNA ของ *T. trichiura* และ *T. vulpis*

samples	resource	Length of sequences (bp.)					
		18S	ITS1	HT18SF0- HT18SR0	HTT18SF- HT18SR	HTV18SF- HT18SR	TT18SF0- TT58SR1
D56_A	Eggs from stray dog, Bangkok	1,816	425	399	-	207	2,367
D56_B		1,816	425	399	-	207	2,367
D56_C		1,816	425	399	-	207	2,367
D42	Eggs from stray dog, Tak	1,846	627	424	212	-	2,599
TH2_A	Adult from human, Bangkok	1,846	606	424	212	-	2,578
TH2_B		1,847	609	425	212	-	2,582
TH2_C		1,846	609	424	212	-	2,581
TH2_E		1,846	609	424	212	-	2,581
TH2_D		1,854	609	424	212	-	2,589
TH1	Eggs from human, Tak	1,846	618	424	212	-	2,590
TST214	Eggs from human, Tak	1,846	603	424	212	-	2,575
TST332	Eggs from human, Tak	1,846	624	424	212	-	2,596

ตารางที่ 10 แสดงการแทนที่ของเบสหนึ่งตำแหน่งบริเวณ 18S rRNA gene ของ *T. trichiura* โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง (DQ118536)

clone	position (nucleotide)	GC content (%)
D42	6 (T/G), 349 (A/G), 520 (C/T), 1240 (A/G) 1260 (A/G), 1274 (T/G), 1285 (T/A)	52.55
TH1	6 (T/G), 860 (A/G), 736 (G/A), 1206 (A/G) 1240 (A/G), 1260 (A/G), 1285 (T/A), 1404 (C/T)	52.49
TH2_A	6 (T/G), 611 (A/G), 1016 (T/C) 1240 (A/G), 1,260 (A/G), 1285 (T/A)	52.60
TH2_B	6 (T/G), 1240 (A/G), 1260 (A/G) 1285 (T/A), 1807 (A/G)	52.57
TH2_C	6 (T/G), 143 (A/G), 1240 (A/G), 1260 (A/G) 1285 (T/A), 1460 (A/G), 1716 (A/G)	52.65
TH2_E	6 (T/G), 1240 (A/G) 1260 (A/G), 1285 (T/A)	52.49
TH2_D	6 (T/G), 122 (T/A), 382 (C/T), 1095 (A/G) 1240 (A/G), 1260 (A/G), 1285 (T/A), 1642 (A/G)	52.53
TST214	6 (T/G), 240 (A/G), 320 (G/A), 489 (A/G) 551 (T/C), 1240 (A/G), 1260 (A/G), 1285 (T/A)	52.60
TST332	6 (T/G), 227 (A/G), 787 (T/C), 1240 (A/G) 1260 (A/G), 1285 (T/A), 1805 (G/T)	52.55

ภาพที่ 11: ข้อมูลแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA gene ของพยาธิไส้เ้า

- ซีดคือตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์

- จุดคือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ DQ118536

```

1 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 ACGGTTAAGC CGCGAATGCC TCATTACAGC AGTCGTTGTT CGCTAGAACT GATGTCCACT TGGATAACTA TGGAAATGCT AGAGCTAATA
#D42      . . . . .G . . . . .
#TH1     . . . . .G . . . . .
#TH2_A   . . . . .G . . . . .
#TH2_B   . . . . .G . . . . .
#TH2_C   . . . . .G . . . . .
#TH2_D   . . . . .G . . . . .
#TH2_E   . . . . .G . . . . .
#TST214  . . . . .G . . . . .
#TST332  . . . . .G . . . . .
#D56_A   . . . . .G . . . . .T.A . . . . .C.A . . . . .A . . . . .ACT . . . . .G . . . . .T . . . . .
#D56_B   . . . . .G . . . . .T.A . . . . .C.A . . . . .A . . . . .ACT . . . . .G . . . . .T . . . . .
#D56_C   . . . . .G . . . . .T . . . . .T.A . . . . .C.A . . . . .A . . . . .ACT . . . . .G . . . . .T . . . . .

```

```

1 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 CATGCCTCGA AGCTCAGTCG CGCGCTGCGC GTCGGAGCGC GTTTATTGTA ACAAACCAA TCGGACGCAG GCTAGCTATT GGTCTGAGTC
#D42      . . . . .
#TH1     . . . . .
#TH2_A   . . . . .
#TH2_B   . . . . .
#TH2_C   . . . . .G . . . . .
#TH2_D   . . . . .
#TH2_E   . . . . .
#TST214  . . . . .A . . . . .
#TST332  . . . . .
#D56_A   . . . . .GA . . . . .TC . . . . .AAT . . . . .G . . . . .A . . . . .A.T . . . . .G . . . . .T . . . . .GAC . . . . .CG . . . . .TC . . . . .C . . . . .
#D56_B   . . . . .GA . . . . .TC . . . . .AAT . . . . .G . . . . .A . . . . .A.T . . . . .G . . . . .T . . . . .GAC . . . . .CG . . . . .TC . . . . .C . . . . .
#D56_C   . . . . .GA . . . . .TC . . . . .AAT . . . . .G . . . . .A . . . . .A.T . . . . .G . . . . .T . . . . .GAC . . . . .CG . . . . .TC . . . . .C . . . . .

```

```

1111111111 1111111112 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222
8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 CGCGAAATGT TGGTGAATCG GAATAACTAT GCTGATCGCA CGGTCCAGTA CCGGCGACGA TGCTTTGAAA CGACTTGCTC ATCAACTTTC
#D42      . . . . .
#TH1     . . . . .
#TH2_A   . . . . .
#TH2_B   . . . . .
#TH2_C   . . . . .
#TH2_D   . . . . .
#TH2_E   . . . . .
#TST214  . . . . .G . . . . .
#TST332  . . . . .G . . . . .
#D56_A   . . . . .C . . . . .CG . . . . .G . . . . .C . . . . .AT . . . . .T . . . . .
#D56_B   . . . . .C . . . . .CG . . . . .G . . . . .C . . . . .AT . . . . .T . . . . .
#D56_C   . . . . .C . . . . .CG . . . . .C . . . . .AT . . . . .T . . . . .

```

```

2222222222 2222222222 2222222223 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333
7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 GATGGTACGC TACGTGCTTA CCATGGTGAC AACGGTTAAC GGAGAATCAG GGTTCGGCTC CGGAGAGGGA GCCTGAGAAA CGGCTACCAC
#D42      . . . . .G . . . . .
#TH1     . . . . .
#TH2_A   . . . . .
#TH2_B   . . . . .
#TH2_C   . . . . .
#TH2_D   . . . . .
#TH2_E   . . . . .
#TST214  . . . . .A . . . . .
#TST332  . . . . .
#D56_A   . . . . .A . . . . .
#D56_B   . . . . .A . . . . .
#D56_C   . . . . .A . . . . .

```

```

3333333333 3333333333 3333333333 3333333334 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444
6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 ATCCAAGGAA GGCAGCAGGC ACGCAAATTA CCCACTCCCA GATCGGGGAG GTAGTGACGA AAAATAACGG AACGTTTCTC CATGAGACGC
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....T.....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....
#D56_A .....A.....
#D56_B .....A.....
#D56_C .....A.....

4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444445 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555
5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 GTTACCGGAA CGATCGAGCC GTACATAAGT TCGGCTAAAT CTATTGGAGG GCAAGTCTGG TGCCAGCAGC CGCGGTAAT CCAGCTCCAA
#D42 .....T.....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....G.....
#TST332 .....
#D56_A .....C.....C.....C.....T.....
#D56_B .....C.....C.....C.....T.....
#D56_C .....C.....C.....C.....T.....

5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555556 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666
4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 TAGCGTATAT TAAAGTTGCT GCGGTTAAAC CGCTCGTAGT TGGATTGCGG ATGTCGACGA CGGTCGCTCT AAGCAGGAGT CGTTCGCTGC
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....G.....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....C.....
#TST332 .....
#D56_A .....TT..TGAA.....C.....
#D56_B .....TT..TGAA.....C.....
#D56_C .....TT..TGAA.....C.....

6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666667 7777777777 7777777777 7777777777
3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 CTCGTCACTT GTTCGATCAA GATTGCCCTG GATGCTCTTC AGTGAGTGTC CTTGGCGACT TGAAAGTTTA CTTTGAGAAA ATGAGAGCCG
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....
#D56_A .....A.....C.....T.....T.....G.....G.....G.....GA.....
#D56_B .....A.....C.....T.....T.....G.....G.....G.....GA.....
#D56_C .....A.....C.....T.....T.....G.....G.....G.....GA.....

7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777778 8888888888
2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 TCAAGGCAAG CCGTAGTGCT TGAACCGTGG TGCAATGGAAT AATGAAAGAT GGCCTCAGTG CTATTTTGTT GG----- TTTACGGCTA
#D42 .....A.....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....GTTTACGG.....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....C.....
#D56_A .....G.....A.....G.....G.....G.....TG.....
#D56_B .....G.....A.....G.....G.....G.....TG.....
#D56_C .....G.....A.....G.....G.....G.....TG.....

```

```

8888888888 8888888888 8888888888 8888888888 8888888888 8888888888 8888888888 8888888888 8888888888 8888888888
1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 TGAGGCAATG ATTAAGAGAG ACTGACGGGG ACATTCGTAT TGCTGCGTTA GAGGTGAAAT TC'TTGGATCG CAGCAAGACG ACCAATTGCG
#D42 .....
#TH1 .....G.....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....
#D56_A C.....A.....G.....A.....
#D56_B C.....A.....
#D56_C C.....A.....

```

```

9999999999 9999999999 9999999999 9999999999 9999999999 9999999999 9999999999 9999999999 9999999999 9999999999
0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 AAAGCATTGT TCAAGATGT TTTCAATTAAT CAAGAACGAA AGTTAGAGGT TCGAAGGCGA TCAGATACCG CCCTAGTTGT GACCGTAAC
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....
#D56_A .....
#D56_B .....
#D56_C .....

```

```

1 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
9999999990 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 GATGCCAACG AGCGATTTCG CGATGTTCTT TTTGTGACTC GCTGAGCAGC TTCCGGGAAA CCAAAGTGTT TCGGTTCCCG GGAAGTATG
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....C.....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....
#D56_A .....C.....C..A.....T.....
#D56_B .....C.....C..A.....T.....
#D56_C .....C.....C..A.....T.....

```

```

1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
0000000000 0000000001 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 GTTGCAAAGC TGAACCTTAA AGGAATTGAC GGAAGGCAC CACCAGGAGT GGAGCATGCG GCTTAATTGT ACTCAACACG GAAAACTCA
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....G.....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....
#D56_A .....
#D56_B .....
#D56_C .....

```

```
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
1111111111 1111111111 1111111112 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222
7777777778 8888888889 9999999999 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 CCCGTCCCGA ACGCTGCAG GATTGACAGA TCAAGAGCTC TTCCTTGATT CAGTGGGTAG TGGTGCATGA -CCGTCTCTA GTTGGTGGAA
#D42 .....G.....
#TH1 .....G.....
#TH2_A .....G.....
#TH2_B .....G.....
#TH2_C .....G.....
#TH2_D .....G.....
#TH2_E .....G.....
#TST214 .....G.....
#TST332 .....G.....
#D56_A .....T.....
#D56_B .....T.....
#D56_C .....C.....T.....C.....

1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
2222222222 2222222222 2222222222 2222222223 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333
6666666667 7777777778 8888888889 9999999999 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 CGATTGTGCT GGCTAATTC GATATCGAAC GAGACTCTGG CCTACTAACT AGCGGCGGTA TT-ACGTCCT CCGCGCGAGC CCGCGCTGCG
#D42 .....G.....A.....
#TH1 .....A.....
#TH2_A .....A.....
#TH2_B .....A.....
#TH2_C .....A.....
#TH2_D .....A.....
#TH2_E .....A.....
#TST214 .....A.....
#TST332 .....A.....
#D56_A .....A.....G.....C.T.C...T.ACG.GG.-----
#D56_B .....A.....G.....C.T.C...T.ACG.GG.-----
#D56_C .....A.....G.....C.T.C...T.ACG.GG.-----

1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333334 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444
5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999999 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 CTGCGGCTGA GCACAGTCGT CGCCGTTTGC GCGAGCGCTC CGCGGAGCAC CTGCAGTGCC GGCAGCCGCT TCTTAGAGGG ACCAGCGACA
#D42 .....
#TH1 .....T.....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....
#D56_A -.....AC.C ..-G.C...C..TT.....-.....C...
#D56_B -.....AC.C ..-G.C...C..TT.....-.....C...
#D56_C -.....AC.C ..-G.C...C..TT.....-.....C...

1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444445 5555555555 5555555555 5555555555
4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999999 0000000001 1111111112 2222222223
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 CTTTCGCAAG CCGCACGAGA AAGAGCAATA ACAGGCTCTGT GATGCCCTTA GATGTACGGG GCTGCACGCG TGCTACACTG ACGGCGCTCAG
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....G
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....
#D56_A .....
#D56_B .....
#D56_C .....
```

```

1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555556 6666666666 6666666666
3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 CGTGCCTTCA AGCCCGGCCT GGCAAGGCCA GGAATCGGT TGAACGTTG TCGTGACTGG GACAGGGAAT TGCAATTATT TCCCTCGAAC
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....
#D56_A .....G .....T.G .....
#D56_B .....T.G .....
#D56_C .....T.G .....

```

```

1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666667 7777777777
2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 GAGGAATTC CAGTAAGCGC GAGTCATCAG CTTGCGTTGA CTACGTCCTT GCCCTTTGTA CACACCGCCC GTCGCTACTA CCGATTGGAT
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....G .....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....
#D56_A .....
#D56_B .....
#D56_C .....

```

```

1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777778
1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 GACTTAGTGA GGCCTTTGGA CCGATGCCGC CGGTGTTCCG CCGT-CAGGT TGAACCACGG CGTTGAAAA CTGGCCGAAC CAAGCCATCT
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....G .....
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....
#D56_A ..T.....C.....A..A.C...CG.T...G..G...C..G...A...A.....
#D56_B ..T.....G.....C.....A..A.C...CG.T...G..G...C..G...A...A.....
#D56_C ..T.....C.....A..A.C...CG.T...G..G...C..G...A...A.....

```

```

1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
8888888888 8888888888 8888888888 8888888888
0000000001 1111111112 2222222223 3333333334
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#DQ118536 AGAGGAAGTA AAAGTCGTAA CAAGGTTTCC GTAGGTGAAC
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....G .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....T.....
#D56_A .....
#D56_B .....
#D56_C .....

```

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ 5.8S ของทุกโคลนในการศึกษานี้จะนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของ *T. vulpis* (AM234616) ตามภาพที่ 12 เมื่อพิจารณาเฉพาะบริเวณ ITS1 ของพยาธิ *T. trichiura* พบว่ามีความแปรผันในขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง จากทั้งหมด 9 โคลนพบว่ามีความยาว 603, 606, 609, 618, 624 และ 627 bp ดังตารางที่ 9 และยังพบความหลากหลายของจำนวน repeat ที่ไม่เท่ากันของเบส 3 ตัวคือ AGC ในตำแหน่งที่ 75 และ 81, GGC ในตำแหน่งที่ 190, GCA ตำแหน่งที่ 255 และ CTG จำนวน 3 ซ้ำในตำแหน่งที่ 609 ดังสรุปไว้ในตารางที่ 11 ส่วนบริเวณ ITS1 ของ *T. vulpis* ทั้ง 3 โคลนมีความยาว 425 bp. เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ AM234616 พบการเพิ่มขึ้นของเบสหลายตำแหน่ง นอกจากนี้ยังพบการซ้ำกันของเบส CGG จำนวน 5 ซ้ำในตำแหน่งที่ 428 และการซ้ำกันของเบส CCGA จำนวน 3 ซ้ำในตำแหน่งที่ 508 ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 12 ทั้งนี้เมื่อพิจารณาบริเวณ ITS1 ทั้ง 12 โคลนร่วมกับ *T. suis* (accession number: AM229670) พบว่ามีความเป็น homology zone สูงทั้งบริเวณ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ในส่วนของ 5.8S เริ่มตั้งแต่ตำแหน่งที่ 634 ไปจนถึงตำแหน่งที่ 745 ซึ่งเป็นตำแหน่งสุดท้ายตามภาพที่ 12 บริเวณนี้พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน *T. vulpis* เพียงหนึ่งตำแหน่งคือตำแหน่งที่ 677 โดยลำดับเบสเปลี่ยนจาก C เป็น T ส่วน *T. trichiura* พบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ (intraspecific variation) ได้ในตำแหน่งที่ 636, 646, 647, 665, 676 และ 690 นอกจากนี้พบว่าการเรียงตัวซ้ำกันของเบส CGG จำนวน 2 ซ้ำในตำแหน่งที่ 643 และ GAA จำนวน 2 ซ้ำในตำแหน่งที่ 671 ของ *T. vulpis* ทั้งสามโคลน เหมือนกันกับการศึกษาของ Cutillas และคณะ, 2007 ซึ่งรายงานว่าลักษณะการเรียงตัวซ้ำกันเช่นนี้สามารถพบได้ใน *T. vulpis*, *T. leporis*, *T. skrjabini*, *T. muris*, *T. arvicolae* แต่ลักษณะของการเรียงตัวซ้ำกันเช่นนี้ไม่มีความแน่นอนใน *T. trichiura*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11: แสดงตำแหน่งที่มีการเรียงตัวซ้ำกันของนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของ *T. trichiura*

nucleotides	position	No. of repeat units	samples
AGC	81-113	9	TST332
AGC	75-113	13	D42
	75-113	9	TH1
	75-113	5	TST214
	75-110	5	TH2_A
	75-113	6	TH2_B, TH2_C, TH2_D, TH2_E
GGC	190-201	3	D42, TH1, TST214
	190-201	4	TH2_A, TH2_B, TH2_C, TH2_D, TH2_E, TST332
GCA	255-266	3	D42T, ST214
	255-263	3	TH1,
	255-260	2	TH2_A, TH2_B, TH2_C, TH2_D, TH2_E, TST332

ตารางที่ 12: แสดงความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณ ITS1 ระหว่าง *T. vulpis* จากงานวิจัยกับ ลำดับเบสอ้างอิง (AM234616) และตำแหน่งที่มีการเรียงตัวซ้ำกันของนิวคลีโอไทด์

samples	nucleotides repeat	no. of repeat units (position)	insertion (position)	substitution (position)
AM234616	CGG	4 (428)	-	-
	CCGA	3 (508)	-	-
D56_A, D56_B, D56_C	CGG	5 (428)	C (142), C (151),	C/T (452), A/T (454),
	CCGA	3 (508)	GGTGGCGTCGT (441), C (459), T (493)	AA/GG (456), A/C (461), C/T (474), A/G (561), [D56_A = A/G (576)]

ภาพที่ 12: ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ 5.8S rRNA gene ของพยาธิไส้เ็น

- ซีดคือตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์
- จุดคือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ AM234616
- สีเทาคือลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S rRNA gene

	1	1111111112	222222223	333333334	444444445	555555556	666666667	777777778	888888889
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
#AM234616	ATCAGAAGGG	AAGAA-GATG	ACGACAAGCG	CCTGCACCGG	C-----	---GCGCCG	TTAGC----	-----	-----
#D56_A
#D56_B
#D56_C
#D42CAC	.GC..CAGCA	G.ACA....	G.C.T.G.T.	.CGTGCCTTG	TAG...T..	.CC..TGGCC	TGCTAGCAGC	AGCAGCAGCA
#TH1CCC	.GC..CAGCA	G.ACA....	G.C.T.G.T.	.CGTGCCTTG	TAG...T..	.CC..TGGCC	TGCTAGCAGC	AGCAGC----
#TH2_ACAC	.GC..CAGCA	G.ACA....	G.C.T.G.T.	.CGTGCCTTG	TAG...T.G	.CC..TGGCC	TGCTAGC---	-----
#TH2_BCAC	.GC..CAGCA	G.ACA....	G.C.T.G.T.	.CGTGCCTTG	TAG...T.G	.CC..TGGCC	TGCTAGC---	-----
#TH2_CCAC	.GC..CAGCA	G.ACA....	G.C.T.G.T.	.CGTGCCTTG	TAG...T..	.CC..TGGCC	TGCTAGC---	-----
#TH2_DCAC	.GC..CAGCA	G.ACA....	G.C.T.G.T.	.CGTGCCTTG	TAG...T.G	.CC..TGGCC	TGCTAGC---	-----
#TH2_ECAC	.GC..CAGCA	G.ACA....	G.C.T.G.T.	.CGTGCCTTG	TAG...T..	.CC..TGGCC	TGCTAGC---	-----
#TST214CAC	.GC..CAGCA	G.ACA....	G.C.T.G.T.	.CGTGCCTTG	TAG...T..	.CC..TGGCC	TGCTAGCAGC	AGC-----
#TST332CAC	.GC..CAGCA	G.ACA....	G.C.T.G.T.	.CGTGCCTTG	TAG...T..	.CC..TGGCC	TGCTAGCAGC	AGCAGCAGCA
	1	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111
	9999999990	0000000001	1111111112	222222223	333333334	444444445	555555556	666666667	777777778
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
#AM234616	-----	-----	----GCGAC	AGCGCGGAGC	CTGCT--GCT	C-GTGGTGGT	-GCGCAGC--	-----	TCCAGGTCTG
#D56_A	-----	-----C.....	C.....	-----
#D56_B	-----	-----C.....	C.....	-----
#D56_C	-----	-----C.....	C.....	-----
#D42	GCAGCAGCAG	CAGCAGCAGC	AGCAG...CT	G.T.T.C.T	T...CG.TC	.GA..CGA.C	AA..TC..CC	GGCTTACAGT
#TH1	-----AG	CAGCAGCAGC	AGCAG...CT	G.T.T.C.T	T...CC.TC	.GA..CGA.C	AA..TC..CC	GGCTTACAGT
#TH2_A	-----AG	CAGCAGCAGC	AG...CT	G.T.T.C.T	T...CG.TC	.GA..CGA.C	AA..TC..CC	GGCCTACAGT
#TH2_B	-----AG	CAGCAGCAGC	AGCAG...CT	G.T.T.C.T	T...CG.TC	.GA..CGA.C	AA..TC..CC	GGCCTACAGT
#TH2_C	-----AG	CAGCAGCAGC	AGCAG...CT	G.T.T.C.T	T...CG.TC	.GA..CGA.C	AA..TC..CC	GGCCTACAGT
#TH2_D	-----AG	CAGCAGCAGC	AGCAG...CT	G.T.T.C.T	T...CG.TC	.GA..CGA.C	AA..TC..CC	GGCCTACAGT
#TH2_E	-----AG	CAGCAGCAGC	AGCAG...CT	G.T.T.C.T	T...CG.TC	.GA..CGA.C	AA..TC..CC	GGCCTACAGT
#TST214	-----AGC	AGCAG...CT	G.T.T.C.T	T...CG.TC	.GA..CGA.C	AA..TC..CC	GGCTTACAGT
#TST332	GC-----AG	CAGCAGCAGC	AGCAG...CT	G.T.T.C.T	T...CG.T.	.GA..CGA.C	AA..TC..CC	GGCCTACAGT
	1111111111	1111111112	222222222	222222222	222222222	222222222	222222222	222222222	222222222
	8888888889	9999999990	0000000001	1111111112	222222223	333333334	444444445	555555556	666666667
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
#AM234616	-----	-----	-----CCGG	CCTGCGG--	-----	-----	-----CCGG	TTGGGCCGCG	GC-----
#D56_A	-----	-----
#D56_B	-----	-----
#D56_C	-----	-----
#D42	AAGAGCGCAG	GCGGCG--G	CTCGTT...C	.G...GCG	AGTCGTCGAT	CGTCGCCGTC	ACCGGCT..A	.CA...A.A	...--AATTT
#TH1	AAGAGCGCAG	GCGGCG--G	CTCGTT...C	.G...GAA	GCAGTCGAT	CGTCGCCGTC	ACCGGCT..A	.C...A.A	..AGCGGTTT
#TH2_A	AAGAGCGCAG	GCGGCGGCGG	CTCGTT...C	.G...GCG	AGTCGTCGAT	CGTCGCCGTC	ACCGGCT..A	.CA...A.A	...--GGTTT
#TH2_B	AAGAGCGCAG	GCGGCGGCGG	CTCGTT...C	.G...GCG	AGTCGTCGAT	CGTCGCCGTC	ACCGGCT...A	.CA...A.A	...--GGTTT
#TH2_C	AAGAGCGCAG	GCGGCGGCGG	CTCGTT...C	.G...GCG	AGTCGTCGAT	CGTCGCCGTC	ACCGGCT..A	.CA...A.A	...--GGTTT
#TH2_D	AAGAGCGCAG	GCGGCGGCGG	CTCGTT...C	.G...GCG	AGTCGTCGAT	CGTCGCCGTC	ACCGGCT..A	.CA...A.A	...--GGTTT
#TH2_E	AAGAGCGCAG	GCGGCGGCGG	CTCGTT...C	.G...GCG	AGTCGTCGAT	CGTCGCCGTC	ACCGGCT..A	.CA...A.A	...--GGTTT
#TST214	AAGAGCGCAG	GCGGCG--G	CTCGTT...C	.G...GCG	AGTCGTCGAT	CGTCGCCGTC	ACCGGCT..A	.CA...A.A	...--AATTT
#TST332	AAGAGCGCAG	GCGGCGGCGG	CTCGTT...C	.G...GCG	AGTCGTCGAT	CGTCGCCGTC	ACCGGCT..A	.CA...A.A	...--GGTTT
	222222222	222222222	222222223	333333333	333333333	333333333	333333333	333333333	333333333
	777777778	8888888889	9999999990	0000000001	1111111112	222222223	333333334	444444445	555555556
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
#AM234616	-----	---CGTCGACA	TTGTGCA---	-CCGGTACCT	GCTCCGCTTG	GGCTCCTGTG	---GCGGCAG	TGTGGATCTG	GCTGTCGCCG
#D56_A	-----
#D56_B	-----
#D56_C	-----
#D42	TCACTTGCTG	CT..C..C.T	GC.C...GTC	A.....	.T...T.GT	...CT.C...	GCT.....	.T.....TTA
#TH1	TCACTTGCTG	CT..C..C.T	GC.C...GTC	A.....	.T...T.GT	...CT.C...	GCT.....	.T.....TTA
#TH2_A	TCACTTGCTG	CT..C..C.T	GC.C...GTC	A.....	.T...T.GT	...CT.C...	GCT.....	.T.....TTA
#TH2_B	TCACTTGCTG	CT..C..C.T	GC.C...GTC	A.....	.T...T.GT	...CT.C...	GCT.....	.T.....TTA
#TH2_C	TCACTTGCTG	CT..C..C.T	GC.C...GTC	A.....	.T...T.GT	...CT.C...	GCT.....	.T.....TTA
#TH2_D	TCACTTGCTG	CT..C..C.T	GC.C...GTC	A.....	.T...T.GT	...CT.C...	GCT.....	.T.....TTA
#TH2_E	TCACTTGCTG	CT..C..C.T	GC.C...GTC	A.....	.T...T.GT	...CT.C...	GCT.....	.T.....TTA
#TST214	TCACTTGCTG	CT..C..C.T	GC.C...GTC	A.....	.T...T.GT	...CT.C...	GCT.....	.T.....TTA
#TST332	TCACTTGCTG	CT..C..C.T	GC.C...GTC	A.....	.T...T.GT	...CT.C...	GCT.....	.T.....TTA

```

3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444
6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#AM234616 TGGCCGCCGG TGGCAGTCT- ---CGCTGCT GGGCGAG--- ----ACCAG- GTTCAAAGAA CGGGAGTCGG CGGGCGCGGC -----
#D56_A .....
#D56_B .....
#D56_C .....
#D42 GC..... .T.....GA CCGT.....C CC...C..TAG TTGC..TG.C .C.G..GA.G .A.CG.CTA. .T..A..AG GTTCAAAGAA
#TH1 GC..... .T.....GA CCGT.....C .C..C..TAG TCGC.GTG.C .C.G..GA.G ..CG.CTA. .T..A..AG GTTCAAAGAA
#TH2_A GC..... .T.....GA CCGT.....C CC...C..TAG TTGC..TG.C .C.G..GA.G .A.CG.CTA. .T..A..AG GTTCAAAGAA
#TH2_B GC..... .T.....GA CCGT.....C CC...C..TAG TTGC..TG.C .C.G..GA.G .A.CG.CTA. .T..A..AG GTTCAAAGAA
#TH2_C GC..... .T.....GA CCGT.....C CC...C..TAG TTGC..TG.C .C.G..GA.G .A.CG.CTA. .T..A..AG GTTCAAAGAA
#TH2_D GC..... .T.....GA CCGT.....C CC...C..TAG TTGC..TG.C .C.G..GA.G .A.CG.CTA. .T..A..AG GTTCAAAGAA
#TH2_E GC..... .T.....GA CCGT.....C CC...C..TAG TTGC..TG.C .C.G..GA.G .A.CG.CTA. .T..A..AG GTTCAAAGAA
#TST214 GC..... .T.....GA CCGT.....C CC...C..TAG TTGC..TG.C .C.G..GA.G .A.CG.CTA. .T..A..AG GTTCAAAGAA
#TST332 GC..... .T.....GA CCGT.....C CC...C..TAG TTGC..TG.C .C.G..GA.G .A.CG.CTA. .T..A..AG GTTCAAAGAA

```

```

4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444445 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555
5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#AM234616 -CGACAAC-G AC-----G CCGCCGACGG CTCGTCGCCG GT-GTAAGGC GGA---GCCG ACCGACCGAC G---ACAGTG TCGGTGCGCT
#D56_A TT.T.GG.C.C.----- .T..... .T..... .T.....
#D56_B TT.T.GG.C.C.----- .T..... .T..... .T.....
#D56_C TT.T.GG.C.C.----- .T..... .T..... .T.....
#D42 CA.C.GTTC..CTCGAGCA T..AG..... .T.G..AAA .A.AAA..A. CTTC...AGT .CAC.AG.C. ...TC.TA..
#TH1 CA.C.GTTC..CTCGAGCA T..AG..... .T.G..AAA .A.AAA..A. CTTC...AGT .CAC.AG.C. ...TC.TA..
#TH2_A CA.C.GTTC..CTCGAGCA T..AG..... .T.G..AAA .A.AAA..A. CTTC...AGT .CAC.AG.C. ...TC.TA..
#TH2_B CA.C.GTTC..CTCGAGCA T..AG..... .T.G..AAA .A.AAA..A. CTTC...AGT .CAC.AG.C. ...TC.TA..
#TH2_C CA.C.GTTC..CTCGAGCA T..AG..... .T.G..AAA .A.AAA..A. CTTC...AGT .CAC.AG.C. ...TC.TA..
#TH2_D CA.C.GTTC..CTCGAGCA T..AG..... .T.G..AAA .A.AAA..A. CTTC...AGT .CAC.AG.C. ...TC.TA..
#TH2_E CA.C.GTTC..CTCGAGCA T..AG..... .T.G..AAA .A.AAA..A. CTTC...AGT .CAC.AG.C. ...TC.TA..
#TST214 CA.C.GTTC..CTCGAGCA T..AG..... .T.G..AAA .A.AAA..A. CTTC...AGT .CAT.AG.C. ...TC.TA..
#TST332 CA.C.GTTC..CTCGAGCA T..AG..... .T.G..AAA .A.AAA..A. CTTC...AGT .CAC.AG.C. ...TC.TA..

```

```

5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555556 6666666666 6666666666 6666666666
4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#AM234616 CCGCA-ACGA A----- AAAAAGAAG CTTAGAGAAA GTTCGAAAAA GTGCTAGC-- --TTTGAA-- -----AA AGAAAAGGAA
#D56_A .....C.----- G..... .G.....
#D56_B .....C.----- G..... .G.....
#D56_C .....C.----- G..... .G.....
#D42 A...CG.CG .TGTGCCTTC G.C.C.C..A .ACT.CTGTC .GCGC..TG. .C....TAG CA..C...CT GCTGCTGT.C GCGC.G.A..
#TH1 A...TG.CG .CGTGCCCTTC G.C.C.C..A .ACT.CTGTC .GCGC..TG. .C....TAG CA..C...CT GCTGCTGT.C GCGC.G.A..
#TH2_A A...CG.CG .TGTGCCTTC G.C.C.C..A .ACT.CTGTC .GCGC..TG. .C....TAG CA..C...CT GCTGCTGT.C GCGC.G.A..
#TH2_B A...CG.CG .TGTGCCTTC G.C.C.C..A .ACT.CTGTC .GCGC..TG. .C....TAG CA..C...CT GCTGCTGT.C GCGC.G.A..
#TH2_C A...CG.CG .TGTGCCTTC G.C.C.C..A .ACT.CTGTC .GCGC..TG. .C....TAG CA..C...CT GCTGCTGT.C GCGC.G.A..
#TH2_D A...CG.CG .TGTGCCTTC G.C.C.C..A .ACT.CTGTC .GCGC..TG. .C....TAG CA..C...CT GCTGCTGT.C GCGC.G.A..
#TH2_E A...CG.CG .TGTGCCTTC G.C.C.C..A .ACT.CTGTC .GCGC..TG. .C....TAG CA..C...CT GCTGCTGT.C GCGC.G.A..
#TST214 A...CG.CG .TGTGCCTTC G.C.C.C..A .ACT.CTGTC .GCGC..TG. .C....TAG CA..C...CT GCTGCTGT.C GCGC.G.A..
#TST332 A...CG.CG .TGTGCCTTC G.C.C.C..A .ACT.CTGTC .GCGC..TG. .C....TAG CA..C...CT GCTGCTGT.C GCGC.G.A..

```

```

6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666667 7777777777 7777777777
3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#AM234616 CGACATTCG AACGCGGAT CACTTGGCTC GTAGGTCGTT GAAGAACGAC GTGACACTCG AGAATTGATG TGAATTGCAG ACACACTGAA
#D56_A .....
#D56_B .....
#D56_C .....
#D42 GT..... .T..... .A.....
#TH1 GT..... .TA... .A.....
#TH2_A GT..... .A.....
#TH2_B GT..... .T..... .G.....
#TH2_C GT..C... .T... .A.....
#TH2_D GT..... .T... .A.....
#TH2_E GT..... .T... .A.....
#TST214 GT..... .T... .A.....
#TST332 GT..... .T... .A.....

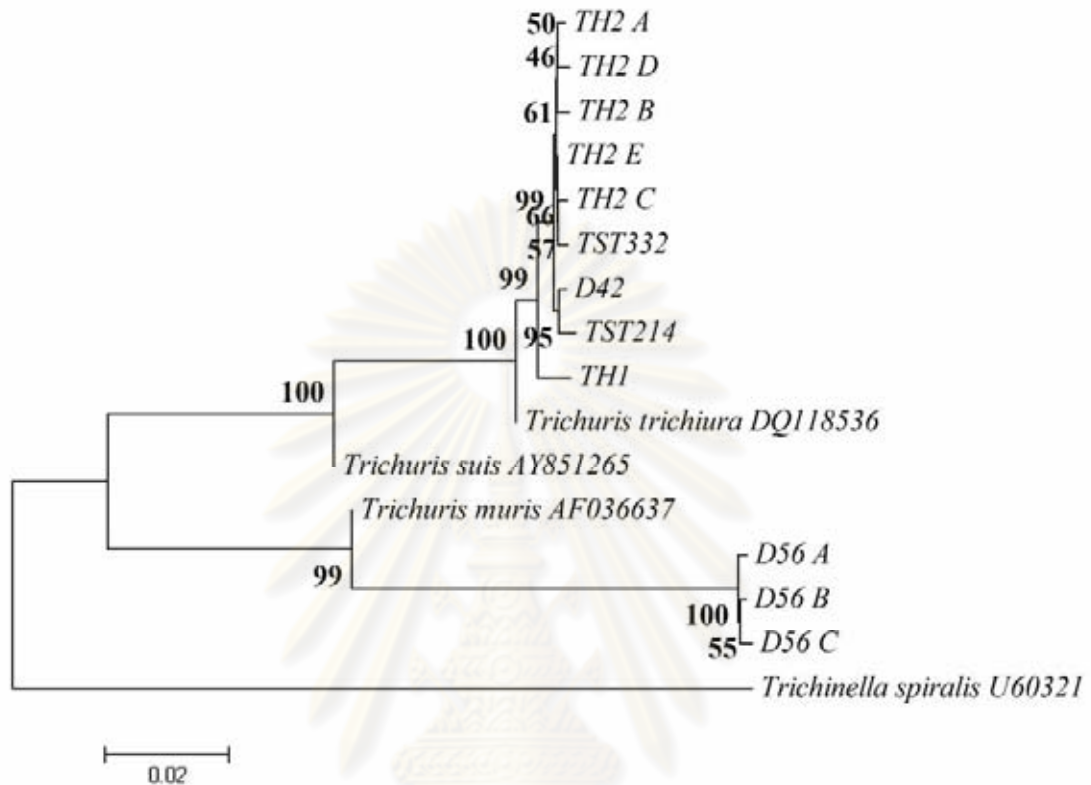
```

```

7777777777 7777777777 77777
2222222223 3333333334 44444
1234567890 1234567890 12345
#AM234616 CTTGAATACT TTGAACGCAC ATTGC
#D56_A .....
#D56_B .....
#D56_C .....
#D42 .....
#TH1 .....
#TH2_A .....
#TH2_B .....
#TH2_C .....
#TH2_D .....
#TH2_E .....
#TST214 .....
#TST332 .....

```

ผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของ *T. trichiura* และ *T. vulpis*



ภาพที่ 13: แสดง phylogenetic tree ของ *T. trichiura* และ *T. vulpis*

การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของ *T. trichiura* และ *T. vulpis* บริเวณ ribosomal RNA gene โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงใน Genbank ของ พยาธิไส้หมัก และ *Trichinella spiralis* ซึ่งเป็นหนอนพยาธิกลุ่มอื่นที่มีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ พยาธิไส้หมัก อาศัยการวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining บนพื้นฐาน parameter ของ Juke และ Cantor ระดับความเชื่อมั่นของการแยกสายพันธุกรรมทดสอบโดยวิธี bootstrap โดยทำการจำลอง ลำดับเบสที่แตกต่างกันไปทั้งหมด 1,000 ครั้ง พบว่า *T. trichiura* และ *T. vulpis* จัดอยู่ในคนละกลุ่ม ของสายวิวัฒนาการ โดยมีรายละเอียดดังนี้คือ แขนงของ phylogenetic tree ของพยาธิไส้หมักแบ่ง ออกเป็นสองกลุ่ม โดยแขนงทางด้านบนเป็นกลุ่มของ *T. trichiura* จำนวน 9 โคลนซึ่งประกอบด้วย TH1, TH2_A, TH2_B, TH2_C, TH2_D, TH2_E, TST214, TST332 และ D42 รวมถึงตัวอย่าง อ้างอิงคือ DQ118536 ซึ่งกลุ่มของ TH2 ทั้ง 5 โคลนได้มาจาก gDNA ของพยาธิตัวเดียวกัน จึงมี รูปแบบทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด ส่วน TST332 ที่ได้จากไข่พยาธิในอุจจาระนักเรียนจัด

ว่ามีความใกล้เคียงกับ TH2 เช่นเดียวกัน อีกกลุ่มหนึ่งซึ่งแยกออกมาประกอบด้วย TST214 และ D42 ซึ่งทั้งสองโคลนได้จากไข่พยาธิในอุจจาระนักเรียนและอุจจาระสุนัขจากชุมชนบ้านท่าสองยาง ตามลำดับ นั้นแสดงถึงความสามารถในการแพร่ระบาดของ *T. trichiura* ในโฮสต์ทั้งสองชนิด ร่วมกันภายในชุมชน ส่วนโคลน TH1 ซึ่งได้จากไข่พยาธิในอุจจาระนักเรียน พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างออกไปจากตัวอย่างกลุ่มที่ได้กล่าวไปแล้ว อย่างไรก็ตามตัวอย่าง *T. trichiura* ที่ใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่มที่แยกออกมาจากตัวอย่าง DQ118536 สำหรับแขนงทางด้านล่างเป็นกลุ่มของ *T. vulpis* จำนวน 3 โคลน คือ D56_A, D56_B และ D56_C ซึ่งได้จากไข่พยาธิจำนวนหลายใบในตัวอย่างเดียวกัน นอกจากนี้พบว่า *T. vulpis* มีความใกล้เคียงทางสายวิวัฒนาการกับ *T. muris* (AF036637) ในขณะที่แขนงของ *T. trichiura* มีความใกล้เคียงกับ *T. suis* (AY851265) ในระดับที่สูงกว่า และแยกสายวิวัฒนาการออกจากกลุ่มของ *T. vulpis* และ *T. muris* อย่างไรก็ตามลักษณะทางพันธุกรรมบน ribosomal RNA gene ของพยาธิไส้เ็นได้แยกสายวิวัฒนาการออกจากพยาธิ *Trichinella spiralis* (U60321) อย่างชัดเจน

ผลการวินิจฉัย *T. trichiura* และ *T. vulpis* โดยวิธี PCR จากตัวอย่างในธรรมชาติ

การศึกษาในขั้นตอนนี้ใช้วิธี nested PCR สังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอผลิตผลสายสั้น ๆ โดย gDNA จากตัวอย่างทั้งหมดจะถูกใช้ในการทดสอบไพรเมอร์ ซึ่ง PCR รอบที่หนึ่งมี HT18SF0 เป็น forward primer และ HT18SR0 เป็น reverse primer ที่จำเพาะต่อ *Trichuris* sp. ในบริเวณ 18S เมื่อนำดีเอ็นเอผลิตผลมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2 และใช้ดีเอ็นเอบอกขนาดคือ 100 bp DNA Ladder พบว่าตัวอย่างที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 300–350 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ถูกต้องเมื่ออ้างอิงจากลำดับเบสบริเวณ 18S ที่ได้ศึกษาแล้ว อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอไม่สามารถบอกได้ว่าให้ผลเป็นลบหรือไม่ เนื่องจากบางตัวอย่างอาจให้ผลิตผล PCR ในปริมาณที่ต่ำเกินไป เมื่อนำดีเอ็นเอผลิตผลทั้งหมดจาก PCR รอบที่หนึ่งมาใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับทำ PCR รอบที่สอง โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ คือ HT18SF, HTV18SF และ HTSF เป็น forward primer ซึ่งจำเพาะต่อ *T. trichiura*, *T. vulpis* และ *T. suis* ตามลำดับ มี HT18SR เป็น reverse primer เมื่อทำการตรวจสอบผลิตผล PCR ด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2 แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาดคือ 100 bp DNA Ladder ผลที่ได้ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 bp (ภาพที่ 14 และ 15) ซึ่งจัดว่าให้ผลบวกเนื่องจากอยู่ในช่วงขนาดที่ถูกต้องเมื่ออ้างอิงจากลำดับเบสบริเวณ 18S ที่ได้ศึกษาไว้แล้วดังตารางที่ 9

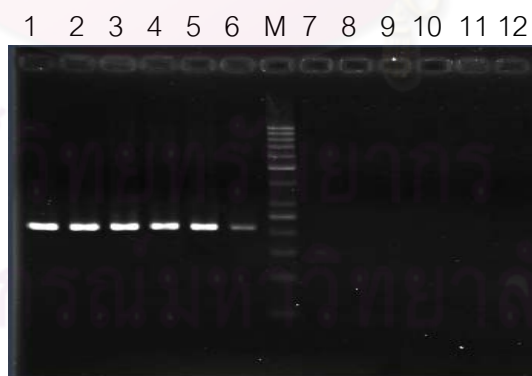


ภาพที่ 14: แสดงแถบดีเอ็นเอผลิตผลจาก nested PCR รอบที่สอง (A: ใช้ HTT18SF เป็น forward primer, B: ใช้ HTV18SF เป็น forward primer) แถวที่ 1-3 (D56, D58 และ D59 ตามลำดับ) คือตัวอย่างจากอุจจาระสุนัขในกรุงเทพฯ / แถวที่ 4 (D41) คือตัวอย่างอุจจาระสุนัขใน จ.ตาก ที่มี inhibitor ต่อกระบวนการ PCR / แถวที่ 5 (TST30) คือตัวอย่างจากอุจจาระนักเรียนใน จ.ตาก / แถวที่ 6 (TH2) คือตัวอย่างจากพยาธิตัวเต็มวัย / แถวที่ 7 (D42) คือตัวอย่างจากอุจจาระสุนัขใน จ.ตาก / แถวที่ 8 คือ negative control / แถว M คือดีเอ็นเอบอกขนาด (100 bp. DNA Ladder)

ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างอุจจาระนักเรียนที่ตรวจพบไข่พยาธิ *Trichuris* sp. จากกล้องจุลทรรศน์ทั้งหมด 56 ตัวอย่าง ให้ผลบวกจาก PCR รอบที่สองทั้ง 56 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผลบวกต่อ *T. trichiura* 50 ตัวอย่าง (89.3%) และผลบวกร่วมกันระหว่าง *T. trichiura* กับ *T. vulpis* (mixed infection) จำนวน 6 ตัวอย่าง (10.7%) โดยไม่มีตัวอย่างใดให้ผลบวกต่อ *T. vulpis* เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ทั้ง 56 ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีบดไข่พยาธิโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถให้ผลการสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงถึง 100% ในขณะที่เมื่อสุ่มเอา 18 ตัวอย่างจาก 56 ตัวอย่างนี้มาสกัดดีเอ็นเอโดยการกระแทกไข่พยาธิด้วย glass bead เพื่อเปรียบเทียบกันพบว่าให้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี PCR เพียง 8 ตัวอย่าง หรือประมาณ 44.4% เท่านั้น

สำหรับอุจจาระสุนัขที่ตรวจพบไข่พยาธิ *Trichuris* sp. จากกล้องจุลทรรศน์จำนวน 17 ตัวอย่าง (อุจจาระสุนัขใน จ.ตาก 13 ตัวอย่าง และในกรุงเทพฯ 4 ตัวอย่าง) เมื่อทดสอบด้วยวิธี PCR รอบที่สองแล้วพบว่าให้ผลบวกทั้งสิ้น 14 ตัวอย่าง (82.4%) ในจำนวนนี้แบ่งเป็นผลบวกต่อ *T. trichiura* จำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งล้วนแต่เป็นตัวอย่างจากอุจจาระสุนัขใน จ. ตาก และอีก 4 ตัวอย่างพบว่าให้ผลบวกต่อ *T. vulpis* ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้จากอุจจาระสุนัขในกรุงเทพฯ ทั้งหมด จึงกล่าวได้ว่าภายในเขตชุมชนท่าสองยาง จ.ตาก และในเขตชุมชนของกรุงเทพมหานคร มีการกระจายตัวของพยาธิไส้หม่าทั้งสองชนิดแยกจากกันอย่างชัดเจนภายในโฮสต์ที่เป็นสุนัข และตัวสุนัขเองยังสามารถทำหน้าที่เป็นโฮสต์โดยบังเอิญ (accidental host) ต่อ *T. trichiura* อีกด้วย ซึ่งสามารถสนับสนุนผลการศึกษาศึกษาของ Traub และคณะ (2002) ได้เป็นอย่างดี จากการตรวจพบไข่พยาธิ *T. trichiura* ในอุจจาระสุนัขภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เนื่องจากการทดลองในอุจจาระสุนัขให้ผลการวินิจฉัยโดยวิธี PCR รอบที่สองเป็นลบถึง 3 ตัวอย่าง จาก 17 ตัวอย่าง (17.6%) จึงได้มีการทดสอบถึงประสิทธิภาพและข้อจำกัดของวิธีการที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากไข่พยาธิ และความสามารถของไพรเมอร์ในการเข้าจับกับหน่วยพันธุกรรมต้นแบบ โดยการผสม positive control DNA (TH2) ซึ่งสกัดได้จากตัวเต็มวัยลงในดีเอ็นเอตั้งต้นทั้ง 3 ตัวอย่างก่อนเข้าสู่กระบวนการ nested PCR เช่นเดิม พบว่าผลจาก PCR รอบที่สองเป็นลบทั้ง 3 ตัวอย่างซึ่งไม่ต่างจากเดิม จึงกล่าวได้ว่าภายใน gDNA ที่สกัดจากอุจจาระด้วยวิธีการนี้ยังไม่สามารถกำจัดตัวยับยั้ง (inhibitor) ต่อกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ได้ทั้งหมด



ภาพที่ 15: แสดงแถบดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์จาก nested PCR รอบที่สอง ใช้ตัวอย่างอุจจาระนักเรียนใน จ.ตาก จำนวน 6 ตัวอย่าง คือ TST1, TST11, TST13, TST14, TST21 และ TST25 ตามลำดับ โดยแถวที่ 1-6 ใช้ HTT18SF เป็น forward primer แถวที่ 7-12 ใช้ HTSF เป็น forward primer และแถว M คือดีเอ็นเอบอกขนาด (100 bp. DNA Ladder)

**การทดสอบความไวและความจำเพาะของไพรเมอร์ที่มีต่อ *Trichuris trichiura*
และ *Trichuris vulpis***

จากการสุ่มเอาตัวอย่างอุจจาระของเด็กนักเรียนจำนวน 2 ตัวอย่าง (TST137, TST377) และอุจจาระของสุนัข 2 ตัวอย่าง (D58, D59) มาทำการสกัดดีเอ็นเอจากจำนวนไข่พยาธิที่ต่างกัน สามกลุ่มทดลอง คือ 1 ไข่ 5 ไข่ และ 10 ไข่ เพื่อใช้ทดสอบความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ทั้งสองคู่คือ HTT18SF–HT18SR และ HTV18SF–HT18SR ตามลำดับ ด้วยวิธี nested PCR กลุ่มทดลองละ 6 ซ้ำ ซึ่งผลการทดสอบดังตารางที่ 13 พบว่า gDNA กลุ่มที่สกัดจากไข่พยาธิ 5 ไข่และ 10 ไข่จากทั้ง 4 ตัวอย่างให้ผลเป็นบวกทั้ง 6 ซ้ำหรือ 100% ส่วน gDNA กลุ่มที่สกัดจากไข่ 1 ไข่เมื่อทดสอบด้วยคู่ของไพรเมอร์ HTT18SF–HT18SR ให้ผลเป็นบวก 4 ใน 6 ครั้งต่อ TST137 และให้ผลเป็นบวกทั้ง 6 ครั้งต่อ TST377 หรือคิดเป็น 83.3% ส่วนคู่ของไพรเมอร์ HTV18SF–HT18SR ให้ผลผลิต PCR เป็นบวกทั้ง 6 ครั้งต่อ D58 และ 5 ใน 6 ครั้งต่อ D59 (91.7%)

เมื่อพิจารณาจากลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนอะกาโรสเจลพบว่าความหนาของแถบดีเอ็นเอและความเข้มของการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณไข่พยาธิที่นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอดังภาพที่ 16 จึงกล่าวได้ว่าไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอตั้งต้นได้ดีแม้ว่าจะสกัดได้จากไข่พยาธิเพียงใบเดียวเท่านั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่13: แสดงประสิทธิภาพของกระบวนการ PCR ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของ *T. trichiura* และ *T. vulpis* ที่สกัดได้จากไขพยาธิจำนวน 1 ใบ 5 ใบ และ 10 ใบ

ตัวอย่าง	ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ	จำนวนไขพยาธิ ที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ	จำนวนครั้งที่ให้ผลบวก จาก PCR ทั้งหมด 6 ครั้ง
TST137	HTT18SF-HT18SR	1	4
		5	6
		10	6
TST377	HTT18SF-HT18SR	1	6
		5	6
		10	6
D58	HTV18SF-HT18SR	1	6
		5	6
		10	6
D59	HTV18SF-HT18SR	1	5
		5	6
		10	6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



ภาพที่ 16: แสดงแถบดีเอ็นเอผลิตผลจากวิธี PCR โดยใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นที่สกัดจากไข่พยาธิจำนวนต่างกัน

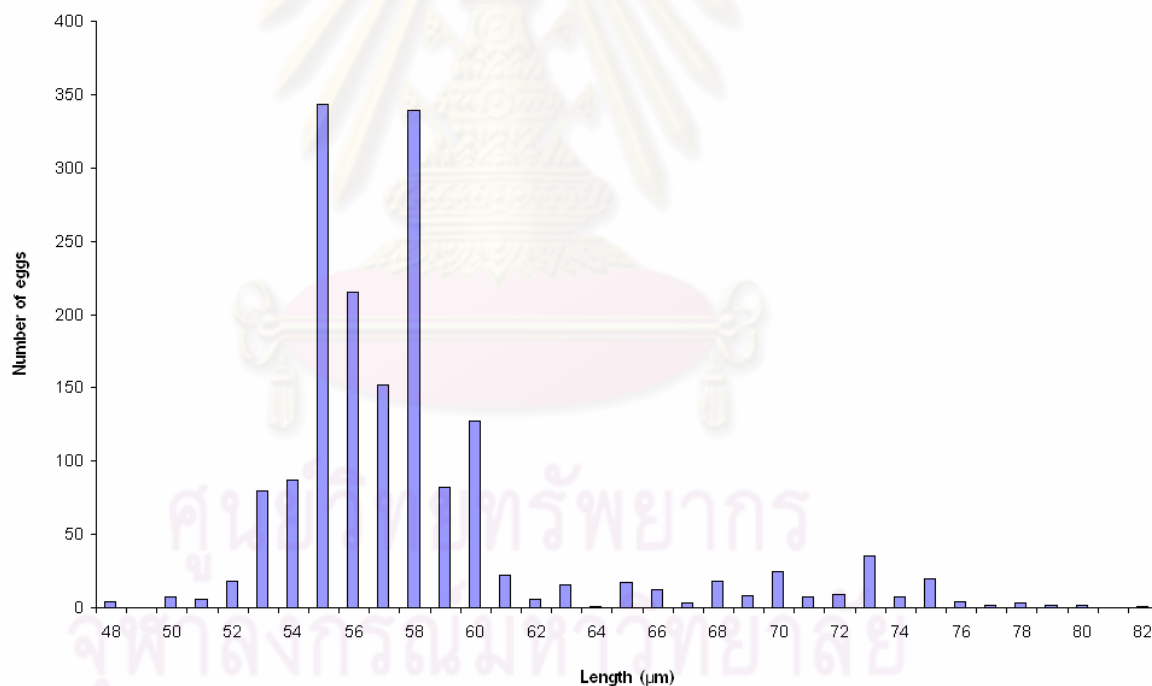
แถวที่ 1-6 ใช้ไพรเมอร์ HTT18SF-HT18SR ดีเอ็นเอตั้งต้นคือ positive control, *T. trichiura* DNA จากไข่ 10 ใบ, 5 ใบ, 1 ใบ, *T. vulpis* DNA และ negative control ตามลำดับ

แถวที่ 7-12 ใช้ไพรเมอร์ HTV18SF-HT18SR ดีเอ็นเอตั้งต้นคือ positive control, *T. vulpis* DNA จากไข่ 10 ใบ, 5 ใบ, 1 ใบ, *T. trichiura* DNA และ negative control ตามลำดับ

สำหรับการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ HTT18SF0-HT18SR0 ต่อ *T. trichiura* และ HTV18SF0-HT18SR0 ต่อ *T. vulpis* เมื่อนำไพรเมอร์ทั้งสองคู่มาทดสอบด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ gDNA จากปรสิตชนิดอื่น ๆ ที่มักพบได้ในอุจจาระร่วมกับพยาธิไส้เ็น คือ *Ascaris lumbricoides*, Hookworm, *Taenia* sp., *Strongyloides stercoralis*, *Opisthorchis viverrini*, *Toxocara canis*, *Spirometra* sp., *Paragonimus* sp., *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia*, *Isospora* sp. และ *Entamoeba coli* โดยตัวอย่างที่นำมาทดสอบส่วนหนึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หลังจากตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลโดยมี *T. trichiura* และ *T. vulpis* เป็น positive control พบว่าไม่มีผลิตผล PCR จากปรสิตชนิดใดปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังนั้นไพรเมอร์ทั้งสองคู่ที่นำมาใช้จึงจัดว่ามีความจำเพาะต่อ *T. trichiura* และ *T. vulpis*

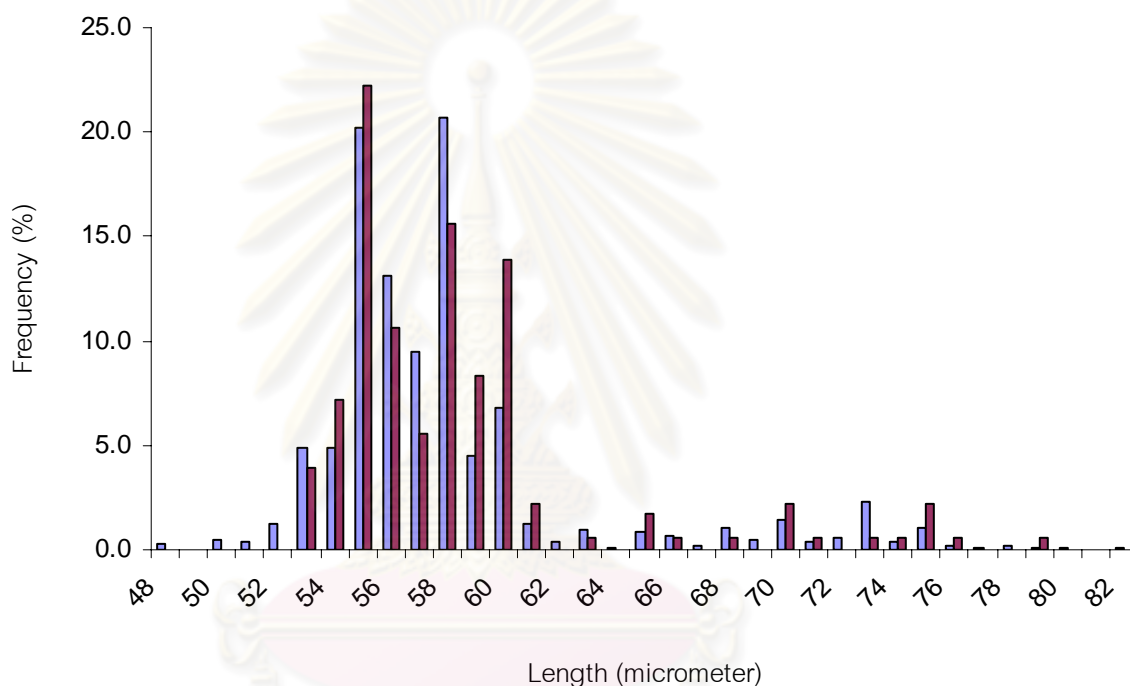
ความสัมพันธ์ระหว่างสัณฐานวิทยาของไข่พยาธิและชนิดของพยาธิไส้หม่า

เมื่อนำตัวอย่างอุจจาระนักเรียนที่ให้ผลบวกต่อ *Trichuris* sp. จากการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้ง 56 ตัวอย่างมาทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของไข่พยาธิโดยการวัดขนาดไข่ทั้งความยาว (length) และความกว้าง (width) จำนวน 30 ใบต่อหนึ่งตัวอย่าง พบว่าจากไข่พยาธิ 1,680 ใบ มีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 58.0 ± 5.0 ไมโครเมตร โดยค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดคือ 82.0 และ 47.5 ไมโครเมตร ตามลำดับ ความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 27.9 ± 2.4 ไมโครเมตร โดยค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดคือ 45.5 และ 23.8 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่วัดได้ทั้งหมดมาสร้างแผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและจำนวนไข่พยาธิ พบว่าความถี่ของไข่พยาธิไส้หม่าที่ขนาดต่าง ๆ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มขนาดเล็กซึ่งมีความยาว < 64 ไมโครเมตร และกลุ่มขนาดใหญ่ที่มีความยาว > 64 ไมโครเมตร (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17: แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนไข่พยาธิไส้หม่า 1,680 ใบจากอุจจาระนักเรียนที่ความยาวต่าง ๆ

อย่างไรก็ตามผลการวินิจฉัยทาง PCR ของไข่พยาธิ 1,680 ใบนี้พบว่าให้ผลบวกเป็นสองกรณีคือกลุ่มไข่พยาธิที่ให้ผลบวกร่วมกันระหว่างพยาธิไส้เ้ม้าทั้งสองชนิดมีทั้งสิ้น 180 ใบ และกลุ่มที่ให้ผลบวกเฉพาะ *T. trichiura* จำนวน 1,500 ใบ เมื่อนำมาสร้างแผนภูมิโดยเทียบจำนวนไข่พยาธิที่ขนาดต่าง ๆ เป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่ารูปแบบของการกระจายตัวเป็นไปในทิศทางเดียวกัน (ภาพที่ 18)



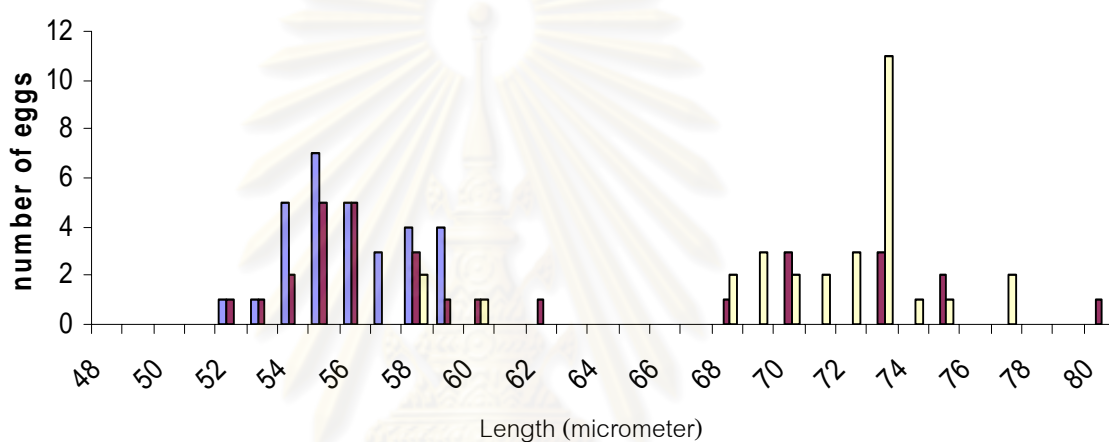
ภาพที่ 18: แผนภูมิแท่งแสดงความถี่ของจำนวนไข่พยาธิไส้เ้ม้ากลุ่มที่ให้ผลบวกต่อ *T. trichiura* และกลุ่มที่ให้ผลบวกร่วมกันระหว่าง *T. trichiura* และ *T. vulpis* จากอุจจาระนักเรียน ที่ความยาวต่าง ๆ

สีฟ้า: ไข่พยาธิจากอุจจาระนักเรียนที่ให้ผล PCR เป็น *T. trichiura*

สีม่วง: ไข่พยาธิจากอุจจาระนักเรียนที่ให้ผล PCR เป็น mixed infection

จากการพิจารณาไข่พยาธิในอุจจาระนักเรียนที่ให้ผล PCR เป็นบวกต่อ *T. trichiura* พบว่าแต่ละตัวอย่างมีรูปแบบการกระจายตัวของขนาดไข่พยาธิที่ต่างกัน (ภาพที่ 19) ดังนี้คือ

1. ตัวอย่างที่ความยาวไข่พยาธิครอบคลุมทั้งกลุ่มขนาดใหญ่และกลุ่มขนาดเล็ก เช่น TST60
2. ตัวอย่างที่ความยาวไข่จัดอยู่ในกลุ่มขนาดเล็กทั้งหมด เช่น TST33
3. ตัวอย่างที่ความยาวไข่ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มขนาดใหญ่ ซึ่งพบเพียงตัวอย่างเดียวคือ TST66



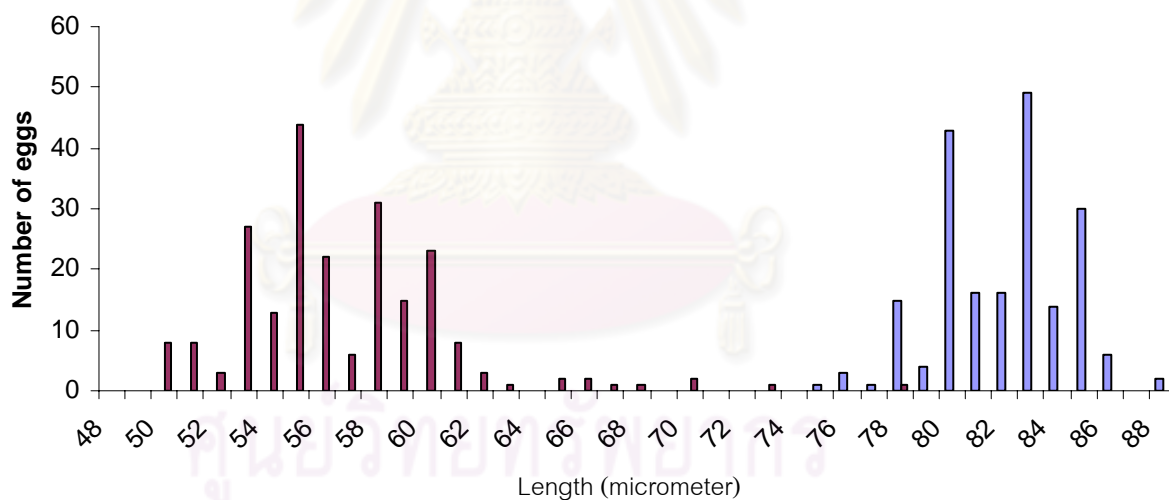
ภาพที่ 19: แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนไข่พยาธิไส้เมาจากอุจจาระนักเรียนเป็นรายตัวอย่างที่ให้ผล PCR เป็นบวกต่อ *T. trichiura* ที่ความยาวต่าง ๆ

สีฟ้า: ไข่พยาธิจากอุจจาระนักเรียน ตัวอย่าง TST33 (n=100)

สีม่วง: ไข่พยาธิจากอุจจาระนักเรียน ตัวอย่าง TST60 (n=100)

สีขาวย: ไข่พยาธิจากอุจจาระนักเรียน ตัวอย่าง TST66 (n=100)

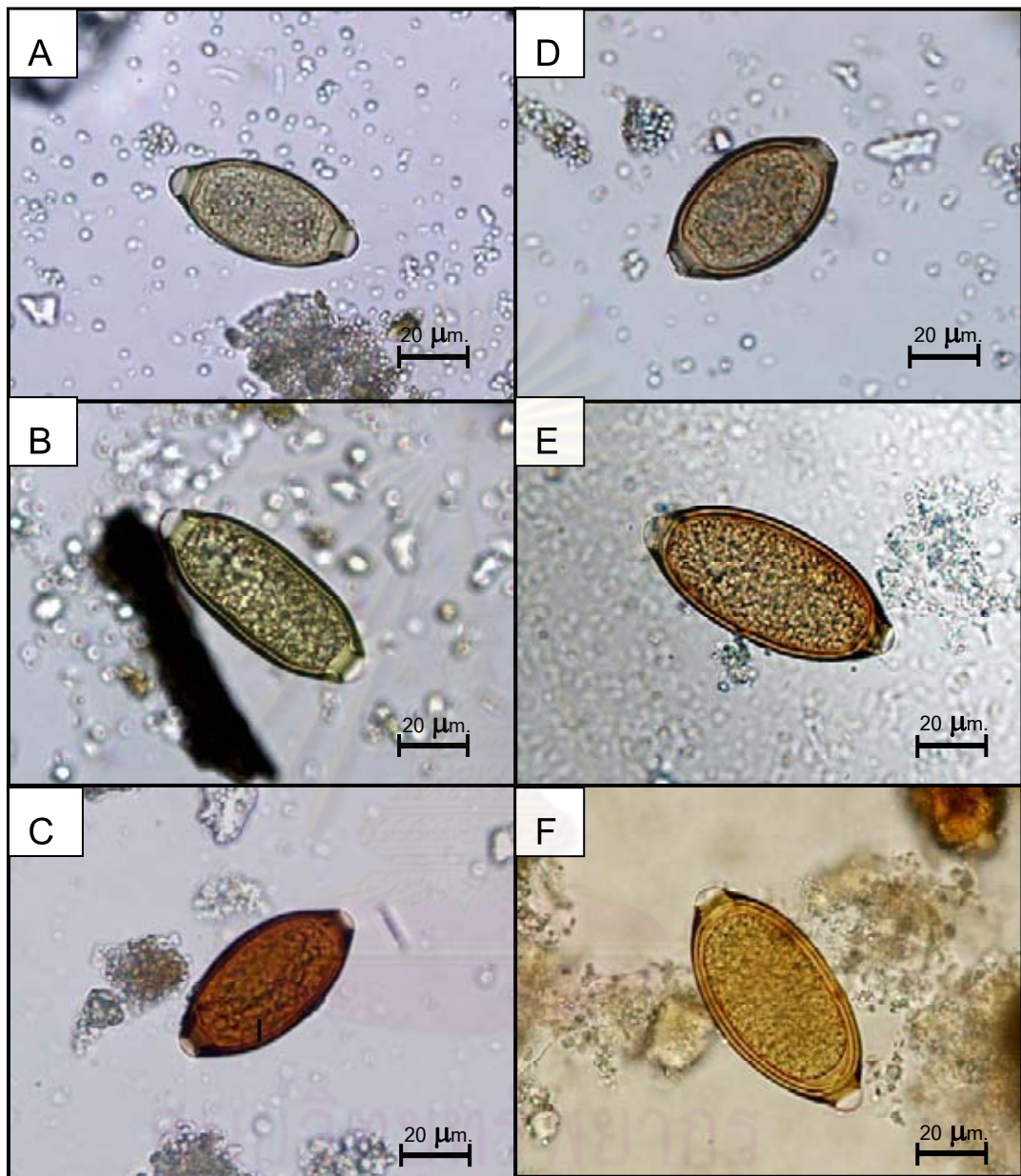
สำหรับตัวอย่างอุจจาระสุนัขที่ให้ผลบวกต่อ *Trichuris* sp. จากการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งหมด 17 ตัวอย่างนั้น เนื่องจากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR ที่ผ่านมาเป็นตัวบ่งชี้ว่า *T. vulpis* กับ *T. trichiura* มีการกระจายตัวในโฮสต์ที่เป็นสุนัขจากคนละแหล่งอย่างชัดเจน การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของไข่พยาธิจึงแบ่งกลุ่มศึกษาออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกคือกลุ่มอุจจาระสุนัขในกรุงเทพฯ จำนวน 4 ตัวอย่าง ทำการวัดขนาดไข่ตัวอย่างละ 50 ใบรวมเป็น 200 ใบ ได้ค่าความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 81.8 ± 2.4 ไมโครเมตร โดยค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดคือ 87.5 และ 75.0 ไมโครเมตร ตามลำดับ ความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 40.0 ± 1.6 ไมโครเมตร โดยค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดคือ 48.8 และ 37.5 ไมโครเมตร ตามลำดับ กลุ่มที่สองเป็นอุจจาระจากสุนัขใน จ.ตาก 13 ตัวอย่าง ทำการวัดขนาดไข่ทั้งสิ้น 222 ใบ ได้ค่าความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 56.5 ± 4.0 ไมโครเมตร โดยค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดคือ 77.5 และ 49.5 ไมโครเมตร ตามลำดับ ความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 27.8 ± 1.6 ไมโครเมตร โดยค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดคือ 35.5 และ 24.5 ไมโครเมตร ตามลำดับ แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและจำนวนไข่พยาธิแสดงไว้ในภาพที่ 20



ภาพที่ 20: แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนไข่พยาธิจากอุจจาระสุนัขที่ขนาดความยาวต่าง ๆ โดยแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ

สีม่วง: ไข่พยาธิจากอุจจาระสุนัขใน จ. ตาก ซึ่งให้ผล PCR เป็น *T. trichiura* (n=222)

สีฟ้า: ไข่พยาธิจากอุจจาระสุนัขในกรุงเทพฯ ซึ่งให้ผล PCR เป็น *T. vulpis* (n=200)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 21: ภาพถ่ายไข่พยาธิไส้หม่า *T. trichiura* และ *T. vulpis* จากการศึกษานี้โดย simple smear technique ภายใต้กำลังขยาย 400 เท่า

A และ B: ไข่พยาธิไส้หม่าที่ตรวจพบในอุจจาระนักเรียน

C และ D: ไข่พยาธิไส้หม่าที่ตรวจพบในอุจจาระสุนัขจากจังหวัดตาก

E และ F: ไข่พยาธิไส้หม่าที่ตรวจพบในอุจจาระสุนัขในเขตกรุงเทพฯ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ระบาดวิทยาของโรคพยาธิไส้เมาจากงานวิจัยนี้ เมื่อพิจารณาจากขั้นตอนการตรวจหาไข่พยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าสามารถตรวจพบไข่พยาธิได้ทั้งในอุจจาระเด็กนักเรียนและอุจจาระสุนัขจากชุมชนบ้านท่าสองยาง อ.ท่าสองยาง จ. ตาก โดยอัตราการติดเชื้อในเด็กนักเรียนมีค่าสูงถึง 70% และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง 14.2% ส่วนอัตราการติดเชื้อของสุนัขภายในพื้นที่ศึกษาเดียวกันมีค่าเท่ากับ 22% ซึ่งน้อยกว่าอัตราการติดเชื้อในนักเรียนอย่างชัดเจน แต่สัมพันธ์กับอัตราการติดเชื้อของสุนัขในกรุงเทพฯ ซึ่งตรวจอุจจาระด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วให้อัตราการติดเชื้อ 20%

สำหรับผลการวินิจฉัยชนิดของพยาธิไส้เมาจากที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ HTT18SF-HT18SR ในการตรวจหา *T. trichiura* และ HTV18SF-HT18SR สำหรับตรวจหา *T. vulpis* พบว่าเด็กนักเรียนจากโรงเรียนชุมชนบ้านท่าสองยางมีอัตราการติดโรคพยาธิไส้เมาจาก *T. trichiura* ทั้งหมด 70% ซึ่งมากเป็นอันดับหนึ่งของหนอนพยาธิที่ตรวจพบ รองลงมาคือ *A. lumbricoides* และ Hookworm ตามลำดับ สำหรับ *T. vulpis* (7.5%) ที่ตรวจพบในอุจจาระนักเรียนนั้นมีการติดเชื้อร่วมกับ *T. trichiura* ทุกตัวอย่าง ในขณะที่อุจจาระสุนัขจากชุมชนบ้านท่าสองยางให้ผลการตรวจเป็น *T. trichiura* ทั้งหมด ดังนั้นถึงแม้ว่าประชากรในหมู่บ้านท่าสองยางจะมีระบบการส่งจ่ายน้ำและการใช้ส้วมที่เข้าถึงทุกครัวเรือนก็ตาม แต่การมีสุนัขจรจัดที่เป็นพาหะของ *T. trichiura* ซึ่งพบคลุกคลีหรืออยู่ใกล้ชิดกับมนุษย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเด็กนักเรียน ย่อมเป็นตัวการสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อต่อประชากรในชุมชนบ้านท่าสองยาง นอกจากนี้พบว่าเด็กนักเรียนจำนวนหนึ่งของโรงเรียนมิได้มีภูมิลำเนาอยู่ในชุมชนบ้านท่าสองยาง ซึ่งรวมถึงนักเรียน 6 คนที่ติดโรคจาก *T. vulpis* ด้วย จึงเป็นไปได้ว่านักเรียนทั้ง 6 คนอาจติดโรคจาก *T. vulpis* มาจากภูมิลำเนาของตน หรืออีกกรณีหนึ่งระบาดวิทยาของ *T. vulpis* ในสุนัขของชุมชนบ้านท่าสองยางอาจมีอัตราที่ต่ำมากจนไม่สามารถสุ่มตัวอย่างเจอหรือตรวจพบได้ด้วยวิธีการส่องกล้องจุลทรรศน์

สำหรับผลการวินิจฉัยด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างอุจจาระสุนัขจรจัดในเขตกรุงเทพฯ ให้ผลเป็น *T. vulpis* ทั้งหมด โดยอัตราของการติดเชื้อมีแนวโน้มที่จะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเทียบกับการศึกษาในอดีตของ Hinz (1980) และการศึกษาของอาคม และ สุพจน์ (2544) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับ Hookworm, *Toxocara canis* และ *Spirocerca lupi* ที่มีอัตราของการติดเชื้อลดลงเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14: แสดงผลสำรวจอัตราการติดเชื้อปรสิตหนอนพยาธิ 4 ชนิด ในสุนัขจรจัดเขตกรุงเทพฯ เปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2523 และ พ.ศ. 2544

ชนิดของ หนอนพยาธิ	ปี พ.ศ. ที่รายงาน	อัตราที่พบ (%)		เอกสารอ้างอิง
		กรุงเทพฯ	ตาก	
<i>Trichuris vulpis</i>	2523	54.2	-	Hinz (1980)
	2544	33.0	-	อาคม และ สุพจน์ (2544)
	2552	20.0	0.0	-
Hookworm.	2523	-	-	-
	2544	70.0	-	อาคม และ สุพจน์ (2544)
	2552	20.0	39.0	-
<i>Toxocara canis</i>	2523	6.5	-	Hinz (1980)
	2544	5.0	-	อาคม และ สุพจน์ (2544)
	2552	0.0	20.3	-
<i>Spirocerca lupi</i>	2523	17.8	-	Hinz (1980)
	2544	9.0	-	อาคม และ สุพจน์ (2544)
	2552	0.0	25.4	-

ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในครั้งนี้กล่าวได้ว่าบริเวณ 18S rRNA ของ *Trichuris* sp. มีการคงไว้ซึ่งลักษณะเฉพาะตัวสูงจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้บริเวณนี้เป็นเป้าหมายในการตรวจวินิจฉัยพยาธิในกลุ่ม Trichurid และนอกจากนี้จากการมี homology zone ถึงสี่บริเวณจึงสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอเพื่อจำแนกชนิดของพยาธิได้ สำหรับบริเวณ ITS1 นั้นเมื่อกล่าวอ้างถึงผลการทดลองใน *T. vulpis* ของ Cutillus, de Rojas และ Ariza (2007) จะพบการเรียงตัวซ้ำกันของ CGG จำนวน 4 ซ้ำ และ CCGA จำนวน 3 ซ้ำเช่นเดียวกัน

เมื่อวิเคราะห์ผลทางสัณฐานวิทยาของไข่พยาธิร่วมกับวิธีการทางชีวโมเลกุล ไข่พยาธิที่ตรวจพบจากสุนัขในกรุงเทพฯ ทุกตัวอย่างให้ผลการตรวจด้วยวิธี PCR เป็น *T. vulpis* ทั้งหมด ในขณะที่ไข่พยาธิ 200 ใบที่ทำการวัดขนาดมีความยาวเฉลี่ย 81.8 ± 2.4 ไมโครเมตร และความกว้างเฉลี่ย 40.0 ± 1.6 ไมโครเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Yoshikawa และคณะ (1989) ได้รายงานไว้คือความยาวเฉลี่ย 82.9 ± 2.7 ไมโครเมตร และความกว้างเฉลี่ย 41.0 ± 4.6 ไมโครเมตร สำหรับไข่พยาธิจากอุจจาระนักเรียนและอุจจาระสุนัขที่ให้ผลการตรวจด้วยวิธี PCR เป็น *T. trichiura* นั้นเมื่อนำมาสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไข่พยาธิที่พบกับความยาวของไข่โดยแยกเป็นกลุ่มอุจจาระนักเรียนและกลุ่มอุจจาระสุนัขพบว่าการกระจายตัวของจำนวนไข่พยาธิที่ขนาดต่าง ๆ นั้นเป็นไปในรูปแบบเดียวกัน โดยสามารถแบ่งกลุ่มขนาดไข่พยาธิได้เป็นกลุ่มขนาดเล็กที่มีความยาวไข่น้อยกว่า 64 ไมโครเมตร และกลุ่มขนาดใหญ่ซึ่งความยาวไข่มากกว่า 64 ไมโครเมตร เมื่อนำจำนวนไข่จากทั้งสองกลุ่มประชากรมาคิดรวมกันจะได้ค่าสัดส่วนของจำนวนไข่พยาธิขนาดเล็กต่อจำนวนไข่พยาธิขนาดใหญ่เป็น 90.2% ต่อ 9.7%

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าขนาดไข่พยาธิ *T. trichiura* และ *T. vulpis* มีการเหลื่อมล้ำกันที่ขนาดตั้งแต่ 75-82 ไมโครเมตร ดังนั้นขนาดไข่พยาธิที่มีความยาวตั้งแต่ 75 ไมโครเมตรขึ้นไปแท้จริงแล้วอาจเป็นไข่ *T. vulpis* เมื่อพิจารณาภาพที่ 18 จะเห็นได้ว่าไข่พยาธิจากอุจจาระนักเรียน 6 ตัวอย่างที่ให้ผลเป็น mixed infection มีสัดส่วนของจำนวนไข่ในช่วงความยาวตั้งแต่ 75 ไมโครเมตรขึ้นไป สูงกว่าจำนวนไข่พยาธิกลุ่มที่ให้ผล PCR เป็น *T. trichiura* เพียงอย่างเดียว

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ปัจจุบันโรคพยาธิไส้ม้ายังคงเป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขในหลายประเทศ พบการกระจายของเชื้อได้ทั่วโลกโดยเฉพาะในประเทศเขตร้อนแถบศูนย์สูตร เช่น อินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และประเทศไทย เป็นต้น ถึงแม้ว่าอัตราการเสียชีวิตของประชากรที่ติดโรคพยาธิไส้ม้ายังจะไม่สูงนัก แต่ผลเสียต่อสุขภาพและคุณภาพชีวิตของประชากรโดยรวมจัดเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการพัฒนาประเทศทั้งในด้านแรงงาน เศรษฐกิจ และสังคม ปัจจุบันพบว่าสภาวะการติดโรคพยาธิไส้มาของประชากรในประเทศไทยยังคงมีอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ แต่จะมีความชุกของโรคสูงที่สุดในภาคใต้เนื่องจากการมีสภาพทางภูมิศาสตร์ที่เอื้อต่อการกระจายของโรคพยาธิไส้มา นอกจากนี้ยังพบอัตราการติดโรคสูงในแหล่งชุมชนที่มีมาตรฐานของการสุขาภิบาลต่ำ ประชากรไม่ได้รับการศึกษาอย่างทั่วถึง โดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรที่อาศัยอยู่บริเวณชายแดนของประเทศ เช่น ชายแดนไทย-พม่า ซึ่งพบโรคนี้ได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ประเทศไทยจัดเป็นประเทศเกษตรกรรม ประเทศหนึ่งซึ่งประชากรส่วนใหญ่ของประเทศประกอบอาชีพทางการเกษตร การมีวิถีชีวิตที่ใกล้ชิดกับพื้นดิน จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่เอื้อต่อการติดโรคปรสิตแบบ soil-transmitted รวมถึงโรคพยาธิไส้มาด้วย

ปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการแพร่กระจายของโรคพยาธิไส้มาอีกทางหนึ่งก็คือความใกล้ชิดกันระหว่างมนุษย์กับสัตว์พาหะ ปัจจุบันพบว่าสุนัขนอกจากจะมีความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อ *T. vulpis* สุนัขแล้ว สุนัขยังมีบทบาทในการแพร่เชื้อ *T. trichiura* สุนัขได้เช่นกัน โดยทำหน้าที่เป็นโฮสต์กักตุนโรค การศึกษาในด้านความชุกและการกระจายของพยาธิทั้งสองชนิดในสุนัขจึงมีความสำคัญเนื่องจากสุนัขเป็นสัตว์เลี้ยงที่อยู่ร่วมกับสังคมไทยมาช้านานไม่ว่าจะในสังคมชนบทหรือสังคมเมืองหลวงก็ตาม

โดยทั่วไปแล้วการวินิจฉัยโรคติดต่อปรสิตจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลหรือการศึกษาระบาดวิทยาของโรคจะใช้วิธีการตรวจทางสัณฐานวิทยาของตัวเชื้อเป็นสำคัญ อย่างไรก็ตามระยะของเชื้อปรสิตบางชนิดที่จำเป็นต้องใช้ในการวินิจฉัยโรคมักมีรูปร่างลักษณะที่เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันมากระหว่างสปีชีส์หรือจันส์ จนไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน การนำวิธีการทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการวินิจฉัยจัดเป็นหนทางหนึ่งที่สามารถใช้จำแนกชนิดของปรสิตที่มีความคลุมเครือในรูปร่างลักษณะได้อย่างถูกต้องและน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ยังทำให้ทราบถึงการระบาดของปรสิตบาง

ชนิดในท้องถิ่นซึ่งเดิมไม่มีการรายงานว่าเป็นเขตปรากฏโรค (Putapornitip และคณะ, 2009; Traub และคณะ, 2009)

Yoshikawa และคณะ (1989) ทำการศึกษาไข่พยาธิในมดลูกของ *T. trichiura* จำนวน 30 ตัว พบว่าพยาธิ 14 ตัวให้ไข่พยาธิขนาดปกติทั้งหมด ในขณะที่ 15 ตัวให้ไข่พยาธิทั้งขนาดปกติและขนาดใหญ่ ส่วนอีกหนึ่งตัวพบไข่พยาธิขนาดใหญ่ทั้งหมด ซึ่งรูปแบบของความหลากหลายในขนาดไข่พยาธิเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลของการศึกษานี้ ปัจจุบันถึงแม้ว่าการจำแนก *T. vulpis* ออกจาก *T. trichiura* โดยพิจารณาจากสัณฐานวิทยาของไข่พยาธิเพียงอย่างเดียวจะได้รับการยอมรับโดยมีหลักเกณฑ์ที่ใช้ทั่วไปคือ ไข่พยาธิ *T. vulpis* จะมีรูปทรงคล้ายถังเปียร์มากกว่า และมักมีสัดส่วนของความกว้างมากกว่าไข่ *T. trichiura* อย่างไรก็ตามจากการศึกษาไข่พยาธิ *T. vulpis* ภายในมดลูกโดย Yoshikawa และคณะ พบว่ามีความยาวได้ตั้งแต่ 75 ไมโครเมตรขึ้นไปและมักมีรูปร่างเรียวกว่าไข่ *T. trichiura* ในกลุ่มขนาดใหญ่ ในกรณีเช่นนี้ไข่พยาธิ *T. vulpis* ที่ออกมาจากผู้ป่วยใหม่ ๆ อาจมีรูปร่างที่คล้ายกับไข่ *T. trichiura* ขนาดใหญ่ ซึ่งอาจก่อให้เกิดความสับสนและนำมาซึ่งการวินิจฉัยที่ผิดพลาดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อร่วมกันระหว่างพยาธิทั้งสองชนิด จากความคล้ายคลึงในรูปร่างลักษณะและความเหลื่อมล้ำกันของขนาดไข่พยาธิเหล่านี้เอง การจำแนกชนิดของพยาธิไส้เมาจากรูปร่างลักษณะของไข่พยาธิเพียงอย่างเดียวจึงไม่มีความน่าเชื่อถือและอาจทำให้ข้อมูลด้านการแพร่กระจายของเชื้อผิดไป

จากรายงานการตรวจพบ *T. vulpis* ในผู้ป่วยเกือบทั้งหมดอาศัยการตรวจพบไข่พยาธิในอุจจาระ (Kenney และ Yermakov, 1980; Dunn และคณะ, 2002) และรายงานอื่น ๆ ซึ่งอาศัยการซักประวัติและวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาในการวินิจฉัย *T. vulpis* ที่ทำให้เกิด visceral larva migrans ในผู้ป่วย (Sakano และคณะ, 1980; Masuda และคณะ, 1987) อย่างไรก็ตามจากความคล้ายคลึงกันทางสัณฐานวิทยาของตัวพยาธิทำให้ยากที่จะวินิจฉัยชนิดของพยาธิไส้เมาจากการตรวจทางเนื้อเยื่อ ในขณะที่เดียวกันการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อพยาธิไส้เอนี้สามารถเกิดขึ้นได้ (Coulter และคณะ, 1981; Kradin และคณะ, 2006) วิธีการ PCR ที่ได้ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์หลักเพื่อขจัดความไม่แน่ใจและความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในการวินิจฉัยชนิดของพยาธิไส้เอนี้ที่พบในผู้ป่วยไม่ว่าจากการสังเกตลักษณะทางกายสัณฐานของพยาธิหรือการใช้วิธีทดสอบทางภูมิคุ้มกันก็ตาม ถึงแม้วิธีการ PCR ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ไม่ได้มีวัตถุประสงค์ในการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างจากชิ้นเนื้อของพยาธิ แต่ก็ยังเป็นวิธีการที่สามารถนำไปปรับใช้กับตัวอย่างพยาธิจากแหล่งต่าง ๆ ที่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้

อีกหนึ่งการศึกษาโดยใช้วิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) ในการวินิจฉัย *T. trichiura* จากไขพยาธิในอุจจาระโดย Martinez และคณะ (2003) พบว่าการมีสารพันธุกรรมอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการปะปนอยู่ในดีเอ็นเอที่สกัดได้ เป็นตัวการสำคัญซึ่งรบกวนการแสดง ออกของ ผลการทดลองและทำให้การวินิจฉัยนั้นผิดพลาดไป ในขณะที่วิธีการทาง PCR เมื่อใช้ร่วมกับการ สกัดดีเอ็นเอจากอุจจาระในการศึกษานี้พบว่าสารพันธุกรรมที่ไม่ต้องการซึ่งปะปนอยู่ในดีเอ็นเอไม่มี ผลกระทบต่อกระบวนการ PCR นอกจากนี้เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในด้านความไวและความ จำเพาะของไพรเมอร์ HTT18SF-HT18SR และ HTV18SF-HT18SR พบว่าไพรเมอร์ทั้งสองคู่มี ประสิทธิภาพสูงในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผลิตผล โดยสามารถใช้ gDNA ตั้งต้นจากไขพยาธิเพียง หนึ่งใบและไม่เกิดการ cross reacted ต่อหนอนพยาธิและปรสิตชนิดอื่น ๆ ทำให้สามารถใช้วิธีการ PCR นี้เพื่อจำแนก *T. trichiura* ออกจาก *T. vulpis* ได้อย่างแม่นยำและน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตาม อุปสรรคสำคัญอย่างหนึ่งต่อความสำเร็จของกระบวนการ PCR ที่มีแหล่งของดีเอ็นเอเป็นอุจจาระ ก็คือประสิทธิภาพของกระบวนการที่ใช้สกัดดีเอ็นเอและการมีอยู่ของตัวยับยั้งกระบวนการ PCR (PCR inhibitor) ซึ่งการจัดตัวยับยั้งนี้ได้มีการทดลองและให้ผลสำเร็จต่อกระบวนการ PCR ในการ วินิจฉัยไขพยาธิ *Opisthorchis sp.* ในอุจจาระ (Duengjai และคณะ, 2008)

เนื่องจากวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยการบดไขพยาธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในการศึกษานี้ไม่ สามารถหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดจากตัวยับยั้งกระบวนการ PCR ได้อย่างสมบูรณ์ นั่นคือให้ผลบวก จากวิธี PCR 70 ตัวอย่างจากตัวอย่างที่ติดเชื้อทั้งหมด 73 ตัวอย่าง (95.9%) แต่ข้อดีก็คือส่วน ประกอบของอุจจาระที่ไม่ต้องการจะผ่านเข้าสู่ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอในปริมาณที่ต่ำมากจึงเป็น การขจัดตัวยับยั้งในกระบวนการ PCR ได้ทางหนึ่ง นอกจากนี้ดีเอ็นเอตั้งต้นที่นำมาใช้ย้อมมีสาร พันธุกรรมของพยาธิที่ได้จากการบดไขรวมอยู่อย่างแน่นอน แม้จะมีข้อจำกัดอีกประการหนึ่งคือ ผู้ทำการตรวจวินิจฉัยจำเป็นต้องตรวจพบไขพยาธิจากการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เสียก่อนจึง สามารถนำไขพยาธิมาสกัดดีเอ็นเอได้ อย่างไรก็ตามจากการทดลองสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการกระแทก ไขพยาธิในอุจจาระให้แตกด้วย glass bead (bead beating method) โดยใช้ตัวอย่างอุจจาระ นักเรียนที่ตรวจพบไขพยาธิทางกล้องจุลทรรศน์แล้วนั้น พบว่าให้ผลบวกจากวิธี PCR เพียง 44.4% ซึ่งจัดว่าประสิทธิภาพของการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการนี้ต่ำกว่ามาก ปัจจุบันถึงแม้จะยังไม่มีวิธีการ ใดที่สามารถใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากไขพยาธิในอุจจาระให้บริสุทธิ์จากตัวยับยั้งการทำงานของ Taq DNA polymerase ได้ 100% แต่หากตัดข้อจำกัดในเรื่องนี้แล้ว เทคนิคในการวินิจฉัยพยาธิ แล้มี *T. trichiura* และ *T. vulpis* ในงานทดลองนี้จัดว่าประสบผลสำเร็จอย่างดี

ผลการศึกษาอัตราการติดโรคพยาธิไส้เฒ่าของสุนัขในเขตชุมชนบ้านท่าสองยางมีค่าประมาณ 20% ของตัวอย่างทั้งหมดซึ่งใกล้เคียงกับสุนัขในกรุงเทพฯ โดยพบอัตราการติดเชื้อประมาณ 22% และสอดคล้องกับการศึกษาของ Inpankaew และคณะ (2007) ซึ่งรายงานอัตราการติดโรคพยาธิไส้เฒ่าของสุนัขจรจัดในกรุงเทพฯ ประมาณ 20.5% หากพิจารณาการศึกษาของ Traub และคณะ (2002) ซึ่งใช้วิธีการ PCR-RFLP ในการศึกษาหน่วยพันธุกรรมบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของไข่พยาธิ *Ascaris* sp. ที่ตรวจพบในอุจจาระสุนัข พบว่าไข่พยาธิทั้งหมดมีลักษณะพันธุกรรมเช่นเดียวกับ *A. lumbricoides* ที่พบเป็นปรสิตในมนุษย์ จึงเป็นการแสดงให้เห็นถึงบทบาทของสุนัขในการเป็นโฮสต์กักตุนและแพร่กระจายโรคภายในท้องถิ่นที่ศึกษา และจากการศึกษาเดียวกันนี้ได้ตรวจพบไข่พยาธิ *T. trichiura* ในอุจจาระสุนัข โดยให้การวินิจฉัยจากลักษณะทางกายวิภาคของไข่พยาธิเท่านั้น โดยไม่มีการคำนึงถึงความแปรผันในขนาดของไข่พยาธิในแต่ละตัวอย่าง กรณีเช่นนี้ไม่สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องเสมอไป เนื่องจากนักเรียน 6 คนที่ติดโรคพยาธิไส้เฒ่าทั้งสองชนิดร่วมกันจากการวินิจฉัยด้วยวิธี PCR เมื่อศึกษารูปร่างลักษณะและขนาดของไข่พยาธิที่มีขนาดใหญ่แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างที่สามารถบอกชนิดของไข่พยาธิได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ *T. ovis* และ *T. skrjabini* ซึ่งเป็นปรสิตในแกะก็มีความหลากหลายในรูปร่างลักษณะของไข่พยาธิโดยสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มเช่นเดียวกัน ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงลักษณะเฉพาะตัวที่สามารถพบได้ในพยาธิจิ้งจอก *Trichuris*

จากการศึกษานี้หากกล่าวในแง่ของการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR สามารถพิสูจน์ได้ถึงบทบาทของสุนัขในการเป็นโฮสต์กักตุนและแพร่กระจายโรคพยาธิไส้เฒ่า *T. trichiura* สุ่มนุษย์ในขณะเดียวกัน *T. vulpis* ซึ่งเป็นปรสิตในสุนัขก็สามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้เช่นกัน สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA gene และ ITS1 ของพยาธิไส้เฒ่าทั้งสองชนิดทำให้ทราบถึงความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการของพยาธิ โดย *T. trichiura* มีความใกล้ชิดกับ *T. suis* ในขณะที่ *T. vulpis* มีความใกล้ชิดกับ *T. muris* มากกว่า สำหรับการรักษาโรคพยาธิไส้เฒ่าจากพยาธิทั้งสองชนิดแม้จะใช้วิธีการรักษาเหมือนกัน แต่การวินิจฉัย *T. vulpis* ในมนุษย์ให้ถูกต้องก็ยังคงมีความสำคัญในแง่ของการศึกษาอัตราการก่อโรค การติดตามแหล่งปรากฏโรค รวมถึงการให้คำแนะนำในการป้องกันการติดโรคพยาธิไส้เฒ่าจากสุนัขอีกด้วย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุล, ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ, และประยงค์ ระดมยศ, บรรณาธิการ. 2549. ตำราปรสิตวิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: เมดิคัล มีเดีย.

นิมิตร มรกต, และเกตุรัตน์ สุขวัจน์, บรรณาธิการ. 2546. ปรสิตวิทยาทางการแพทย์: โปรโตซัวและหนอนพยาธิ. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: โครงการตำรา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สรรพเชษฐ เบญจวงศ์กุลชัย. พยาธิวิทยาโรคติดต่อปาราสิต. ภาควิชาพยาธิวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคม สังข์วรานนท์ และ สุพจน์ ไพบูลย์รัตนวงศ์. 2544. อุบัติการณ์ของการติดหนอนพยาธิในทางเดินอาหารและพยาธิหนอนหัวใจในสุนัขจรจัดในกรุงเทพมหานคร. สัตวแพทยสาร 52(3): 53-60.

ภาษาอังกฤษ

Ash, L. R., and Orihel, T. C. 1984. Atlas of human parasitology, 2nd ed. Chicago: American society of Clinical Parasitologist.

Bastos, O. M., et al. 1996. Experimental paleoparasitology: identification of *Trypanosoma cruzi* DNA in desiccated mouse tissues. Paleopathol. News. 94: 5-8.

Baylis, H. A. 1932. Three notes on parasitic nematodes. Ann. Mus. Nat. Hist. 10: 497-502.

Beaver, P. C., Jung, R. C., and Cupp, E. W. 1984. Clinical parasitology. 9th ed. Philadelphia: Lea and Febiger.

Beer, R. J. S. 1976. The relationship between *Trichuris trichiura* (Linnaeus 1758) of man and *Trichuris suis* (Schrank 1788) of the pig. Res. Vet. Sci. 93: 189-95.

Brooker, S., Clements, A. C. A., and Bundy, D. A. P. 2006. Global epidemiology, Ecology and control of soil-transmitted helminth infections. Advances in parasitology 62: 222-65.

- Bundy, D. A. P., and Cooper, E. S. 1989. *Trichuris* and trichuriasis in humans. Advances in parasitology 28: 107-73.
- Bundy, D. A. P., and Cooper, E. S. 1990. Trichuriasis. Cite in Warren, K. S., and Mahmoud, A. A. F. Tropical and geographical medicine. 2nd ed. New York: McGraw-Hill.
- Chacon, M. R., Rodriguez, E., Parkhouse, R. M. E., Burrow, P. R., and Garate, T. 1994. The differentiation of parasitic nematodes using random amplified polymorphic DNA. J. Helminthol. 68: 109-113.
- Chandler, A. C. 1930. Specific characters in the genus *Trichuris* with a description of a new species, *Trichuris tenuis*, from a camel. J. Parasitol. 16: 198-206.
- Chilton, N. B., Gasser, R. B., and Beveridge, I. 1995. Differences in a ribosomal DNA sequence of morphologically indistinguishable species within the *Hypodontus macropi* complex (Nematoda: Strongyloidea). Int. J. Parasitol. 25: 647-51.
- Chitwood, B. G. 2009. The structure of the esophagus in the Trichuroidea. J. Parasitol. 17: 35- 42.
- Corrêa, L. L., Yamanaka, M. T., Corrêa, M. O. A., Silva, M. I. P. G., and Silva, R. M. 1980. Ocorrência de ovos grandes de *Trichuris trichiura* em fezes humanas. Rev. Inst. Adolfo. Lutz. 0: 59-64.
- Coulter, J. B., Jewsbury, J. M., Beesley, W. N.; and Bailey, W. 1981. Visceral larva migrans and *Trichuris vulpis*. Arch. Dis. Child. 56: 406.
- Creplin, F. C. H. 1825. Observaciones de Entozoos (Gryphisw.). pp: 86.
- Cutillus, C., Oliveros, R., de Rojas, M., and Guevara, D. C. 2002. Determination of *Trichuris muris* from murid hosts and *T. arvicolae* (Nematoda) from arvicolid rodents by amplification and sequentiation of the ITS1-5.8S-ITS2 segment of the ribosomal DNA. Parasitol. Res. 88: 574-582.
- Cutillus, C., Oliveros, R., de Rojas, M., and Guevara, D. C. 2004. Determination of *Trichuris skrjabini* by sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 segment of the ribosomal DNA: comparative molecular study of different species of trichurids. J. Parasitol. 90: 648-652.

- Cutillas, C., de Rojas, M., Ariza, C., Ubeda, J. M.; and Guevara, D. 2007. Molecular identification of *Trichuris vulpis* and *Trichuris suis* isolated from different hosts. Parasitol. Res. 100: 383-389.
- Data, B. J. O. 1979. A new technique for the recovery of *Toxocara* eggs from soil. J. Helminthol. 53: 141-144.
- Duengai, K., et al. 2008. Improvement of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in human stool samples. J. Clin. Microbiol. 46: 366-368.
- Dunn, J. J., Columbus, S. T., Aldeen, W. E., Davis, M., and Carroll, K. C. 2002. *Trichuris vulpis* recovered from a patient with chronic diarrhea and five dogs. J. Clin. Microbiol. 40: 7: 2703-704.
- Dvorak, G., Spickler, A. R., and Roth, J. A. (n.d.). Handbook for zoonotic diseases of companion animals. (n.p.).
- Ehrenberg, J. P., de Merida, A. M., and Sentz, J. 2003. An epidemiological overview of geohelminth and schistosomiasis in the Caribbean. Washington DC: Pan-American Health Organization (PAHO).
- Feachem, R., Bradley, D., Garelick, H.; and Mora, D. 1983. Sanitation and diseases : health aspects of excreta and wastewater management. Chichester. John Wiley and Sons.
- Feigen, G. M., and M. D. 1987. Suppurative anal cryptitis associated with *Trichuris trichiura*. Dis. Col. & Rect. 30: 620-22.
- Ferreira, L. F., et al. 2000. Paleoparasitology of chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. Acta. Trop. 75: 79-84.
- Fishman, J. A., and Perrone, T. L. 1984. Colonic obstruction and perforation due to *Trichuris trichiura*. Am. J. Med. 77: 154-156.
- Foreyt, W. J. 1986. Recovery of nematode eggs and larvae in deer; evaluation os fecal preservation methods. Javma. 189: 1065-1067.
- Garcia, L. S. 2001. Diagnostic medical parasitology. 4th ed. Washington DC: ASM Press.
- Green, E. A., Beer, R. J. S., Jenkins, D. C., McFadzeran, J. A.; and Pugh, I. M. 1973. Transmission of *Trichuris Trichiura*. Br. Med. J. 7: 48-52.

- Gutierrez, Y. 1990. Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Hall, J. E., and Sonnenberg, B. 1956. An apparent case of human infection with the whipworm of dog, *Trichuris vulpis* (Froelich, 1789). J. Parasitol. 42: 197-199.
- Harper, K. L., Garfield, M. D., and Ehrenford, F. A. 1964. Human infection with canine whipworm. J. Indiana State. Med. Assoc. 7: 24-27.
- Hinz, E. 1980. Intestinal helminths in Bangkok stray dogs and their role in public health. Zentralbl. Bakteriol. Microbiol. Hyg. 171: 79-85.
- Inpankaew, T., Traub, R., Thompson, R. C.; and Sukthana, Y. 2007. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 38: 247-255.
- Joshi, B. N., and Sabne, S. S. 1977. Incidence of *Toxocara canis* infection in stray dogs in Miraj area. Indian J. Pathol. Microbiol. 20: 239-42.
- Kagei, N., Hayashi, S., and Kato, K. 1986. Human cases of infection with canine whipworms, *T. vulpis* (Froelich, 1789), in Japan. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 39: 177-184.
- Katz, M., Despommier, D. D., and Gwadz, R. 1989. Parasitic disease. 2nd ed. New York: Springer-Verlag.
- Kahn, A. R.; and Huq, F. 1978. Disease agents carried by flies in Dacca city. Bangladesh Med. Res. Counc Bull 4: 86-93.
- Kenney, M.; and Yermakov, V. 1980. Infection of man with *Trichuris vulpis*, the whipworm of dogs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 1205-1208.
- Kinfu, A., and Erko, B. 2008. Cockroaches as carriers of human intestinal parasites in two localities in Ethiopia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.
- Knight, R. A. 1971. Redescription of *Trichuris discolor* (Von Linstow, 1906) and *T. skrjabini* (Baskakov, 1924) from domestic ruminants in the United States and comparisons with *T. ovis* (Abildgaard, 1795). J. Parasitol. 57: 302-10.
- Knight, R. A. 1984. Morphological differences in *Trichuris ovis* associated with different host species. J. Parasitol. 70: 842-43.

- Kradin, R. L., Badizadegan, K., Auluck, P., Korzenik, J.; and Lauwers, G. Y. 2006. Iatrogenic *Trichuris suis* infection in a patient with Crohn disease. Arch. Pathol. Lab. Med. 130: 718-720.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P., Butler, J. M., and Blagburn, B. L. 1997. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. Vet. Parasitol. 73: 27-33.
- Loreille, O., Roumat, E., Verneau, O., Bouchet, F., and Hanni, C. 2001. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. Int. J. Parasitol. 31: 1101-1106.
- Maipanich, W., et al. 1995. Contamination of soil-transmitted helminth eggs in soil samples from Nakhon Si-Thammarat province. J. Trop. Med. Parasitol. 18: 22-30.
- Manning, G. S., Sukhawat, K., Viyanant, V.; and Subhakul, M. 1969. Zoonotic potential of the parasites of dog in Bangkok, Thailand. J. Med. Assoc. Thailand 52: 425-431.
- Martinez, E. M., et al. 2003. Random amplified polymorphic DNA analysis of DNA extracted from *Trichuris trichiura* (Linnaeus, 1771) eggs and its prospective application to paleoparasitological studies. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro Vol. 98: 59-62.
- Masuda, Y., Kishimoto, T., Ito, H., and Tsuji, M. 1987. Visceral larva migrans caused by *Trichuris vulpis* presenting as a pulmonary mass. Thorax 42: 990-991.
- Meloni, B. P., Thompson, R. C. A., Hopkins, R. M., Reynoldson, J. A., and Gracey, M. 1993. The prevalence of *Giardia* and other intestinal parasites in children, dogs and cats from Aboriginal communities in the Kimberley. Med. J. Aust. 158: 157-59.
- Meyer, M. C., and Olsen, O. W. 1971. Essentials of parasitology. Iowa: WMC Brown.
- Minvielle, M. C., Pezzani, B. C., and Basualdo Farjat, J. A. 1993. Frequency of finding helminths eggs in canine stool samples collected in public places in the La Plata city, Argentina. Bol. Chil. Parasitol. 48: 63-65.
- Mirdha, B. R., Singh, Y. G., Samantaray, J. C., and Mishra, B. 1998. *Trichuris vulpis* infection in slum children. Indian J. Gastroenterol. 17: 154.

- Nagano, I., Wu, Z., Matsuo, A., Pozio, E., and Takahashi, Y. 1999. Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. Int. J. Parasitol. 29: 1113-1120.
- Nanivadekar, S. A., Kuloor, P. L., Tandon, N. H., Chougule, U. K., and Deodhar, K. P. 1984. Whipworm dysentery in an adult. Indian J. Gastroenterol. 3: 237-238.
- Nilanthi, R. de S., Brooker, S., Hotez, P. J., Montresor, A., Engels, D.; and Savioli, L. 2003. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. TRENDS in Parasitology. 19: 547-551.
- Norhayati, M., Fatmah, M. S., Yusof, S.; and Edariah, A. B. 2003. Intestinal parasitic infections in man: a review. Med. J. Malaysia 58: 296-305.
- Oliveros, R., Cutillas, C., Arias, P., and Guevara, D. 1998. Morphologic, biometric and isoenzyme characterization of *Trichuris suis*. Parasitol. Res. 84: 513-515.
- Oliveros, R., Cutillas, C., de Rojas, M., and Arias, P. 2000. Characterization of four species of *Trichuris* (Nematoda: Enoplida) by their second internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence. Parasitol. Res. 86: 1008-1013.
- Panesar, T. S., and Croll, N. A. 1980. The location of parasites within their hosts: site selection by *Trichuris muris* in the laboratory mouse. Int. J. Parasitol. 10: 261-94.
- Pavlovski, E. N., and Sondak, V. A. 1951. On the specific differences between the whipworm of man and swine. Parazitol. Sbornik. Zool. Inst. ANSSSR. 13: 35-44.
- Pedersen, S., and Murrell, K. D. 2001. Whipworms-nutrition interaction. Trends. Parasitol. 17: 470.
- Putaporntip, C., Hongsrimuang, T., Seethamchai, S., Kobasa, T., Limkittikul, K., Cui, L.; and Jongwutiwes, S. 2009. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. J. Infect. Dis. 199: 1143-1150.
- Ramdath, D. D., Simeon, S. T., Wong, M. S., and Grantham-Mcgregor, S. M. 1995. Iron status of school children with varying intensities of *Trichuris trichiura* infection. Parasitology 110: 347-351.

- Robert, F., Houze, S., Cabie, A., and Dupouy-Camet, J. 1996. Detection by polymerase chain reaction of *Trichinella spiralis* larvae in blood of infected patients. Parasite 3: 391-393.
- Robinson, R. D., Thompson, D. L., and Lindo, J. F. 1989. A survey of intestinal helminthes of well-cared-for dogs in Jamaica, and their potential public health significance. J. Helminthol. 63: 32-38.
- Rukmono, B. 1980. Infection route of roundworm and hookworm with reference to the development and viability in soil of the infective stage. Cite in Collected papers on the control of soil-transmitted helminthiases. Vol. 1. Tokyo: Asian Parasite Control Organization.
- Sakano, T., et al. 1980. Visceral larva migrans caused by *Trichuris vulpis*. Arch. Dis. Child. 55: 631-633.
- Sambroock, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a Laboratory manual. vol. 2, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarwar M. M. 1959. Reconstruction of the genus *Trichuris*, and a short review of its taxonomy and morphology. Biologia (Lahore) 5: 19-34.
- Schneider, T., Heise, M., and Epe, C. 1999. Genus-specific per for the differentiation of eggs or larvae from gastrointestinal nematodes of ruminantes. Parasitol. Res. 85: 895-898.
- Schwartz, B. 1926. A possible new source of infection of man with *Trichuris*, with a consideration of the question of physiological varieties among helminths. Arch. Schiffs. Trop. Hyg. 9: 544-77.
- Silva, A. J., et al. 1999. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. Molecular Diagnosis. 4: 57-64.
- Sondak, V. A. 1948. On the question of species independence of whipworms of man and swine. Parazitol. Sbornik. Zool. Inst. ANSSSR. 10: 195-204.
- Spakulova, M. 1994. Discriminant analysis as a method for the numerical evaluation of taxonomic characters in male trichurid nematodes. Systematic Parasitology. 29: 113-19.

- Spakulova, M., Lysek, H. 1981. A biometric study of two populations of *Trichocephalus suis* Schrank, 1788 from swine and wild boars. Helminthologia 18: 91-98.
- Sprehn, E. W. 1927. Lehrbuch der helminthologie. Berlin.
- Sukano, T., Hamamoto, K., Kobayashi, Y., Sakata, Y., Tsuji, M.; and Usui, T. 1980. Visceral larva migrans caused by *Trichuris vulpis*. Arch. Dis. Child. 55: 631-633.
- Tay, J., Salazar-Schettino, P. M., de Haro Arteaga, I., and Bucio Torres, M. I. 1976. Incidence of intestinal helminthiasis in Mexico. Revista de Investigacion en Salud Publica. 36: 241-80.
- Thienpont, D., Rochette, F., and Vanparijs, O. F. J. 1979. Diagnosing helminthiasis through coprological examination. Belgium: Janssen research foundation.
- Traub, R. J., Robertson, I. D., Irwin, P., Mencke, N., and Thompson, R. C. A. 2002. The role of dogs in transmission of gastrointestinal parasites in a remote Tea-Growing community in northeastern India. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67: 5: 539-45.
- Traub, R. J., Macaranas, J., Mungthin, M., Leelayoova, S., Cribb, T., Murrell, K. D.; and Thompson, R. C. 2009. A new PCR-based approach indicates the range of *Clonorchis sinensis* now extends to central Thailand. PLoS. Negl. Trop. Dis. 3: e367.
- Umeche, N. 1989. Helminth ova in soil from children's playgrounds in Calabar, Nigeria. Cent. Afr. J. Med. 35: 432-434.
- Uparanukraw, P., and Morakote, N. 1997. Detection of circulating *Trichinella spiralis* larvae by polymerase chain reaction. Parasitol. Res. 83: 52-56.
- Vazquez, T. O., Martinez, B. I. I., Romero, C. R., Valencia, R. S., and Tay, Z. J. 1997. Mixed infection by *Trichuris trichiura* and *Trichuris vulpis*. Rev. Gastroenterol. Peru 17: 255-58.
- Wassal, D. A., and Denham, D. A. 1969. A method for the recovery of nematode eggs from faeces. Parasitology 59: 279-282.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Rafalski, J. A., and Tinger, S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

- Williams-Blangero, S., et al. 2002. Genetic component to susceptibility to *Trichuris trichiura*: evidence from two Asian populations. Genet. Epidemiol. 22: 254-264.
- Wilson. 1846. Cited in Sarwar, M. M. 1959. Reconstruction of the genus *Trichuris*, and a short review of its taxonomy and morphology. Biologia (Lahore) 5: 19-34.
- Ybanez, M. R. R., Garijo, M., Goyena, M., and Alonso, F. D. 2000. Improved methods for recovering eggs of *Toxocara canis* from soil. J. Helminthol. 74: 349-353.
- Yoshikawa, H., Yamada, M., Matsumoto, Y., and Yoshida, Y. 1989. Variations in egg size of *Trichuris trichiura*. Parasitol. Res. 75: 649-54.
- Zaman, V. 1984. Scanning electron microscopy of *Trichuris trichiura* (Nematoda). Acta. Trop. 41: 287-92.
- Zarlenga, D. S., McManus, D. P., Fan, P. C., and Cross, J. H. 1991. Characterization and detection of a newly described Asian Taeniid using closed ribosomal DNA fragments and sequence amplification by polymerase chain reaction. Exp. Parasitol. 72: 174-83.
- Zarlenga, D. S., Stringfellow, F., Nobary, M., and Lichtefels, J. R. 1994. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from three species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and identification of PCR primers for rapid differentiation. Exp. Parasitol. 78: 28-36.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

การเตรียม TBE buffer (10x)

Tris base	108 g.
Boric acid	55 g.
EDTA	7.4 g.

ผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุทธิ 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.3 จากนั้นจึงนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง* ก่อนใช้

การเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาด

DNA marker	20 μ l.
Dye	80 μ l.
TE buffer	360 μ l.

การเตรียม TE buffer (10x)

1 M Tris	800 ml.
0.5 M EDTA	200 ml.

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง* ก่อนใช้

การเตรียม 1 M Tris (pH 7.8)

Tris base	121.1 g.
น้ำกลั่น	800 ml.

ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl ให้มีค่าเท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุทธิ 1 ลิตร นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อ ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง* ก่อนใช้

* ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

การเตรียม gel-loading buffers

bromophenol blue 0.25 g.

xylene cyanol FF 0.25 g.

glycerol in water 30 g.

ละลายในน้ำกลั่น โดยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายปณตทัต อารีกุล เกิดเมื่อวันที่ 24 ธันวาคม พ.ศ. 2525 จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2547 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย