

การหาความชุกและการกระจายสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสในผู้ป่วยโรคเบาหวาน
และผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ณ อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ประเทศไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE AND SUBTYPE DISTRIBUTION OF *BLASTOCYSTIS* INFECTION IN
DIABETES MELLITUS PATIENTS AND NON-DIABETIC PEOPLE IN BANG PA-IN,
PHRANAKHON SI AYUTTHAYA PROVINCE, THAILAND



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาความชุกและการกระจายสายพันธุ์ของเชื้อแบลสโตซิสติส ในผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ณ อำเภอบาง ปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ประเทศไทย
โดย	นายณพพล โพธิ์พฤกษ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และ วิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงดาว ปาละสุวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.องอาจ มหิทธิกร

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ชี้อชवालกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงดาว ปาละสุวรรณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.องอาจ มหิทธิกร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรรถกร ปาละสุวรรณ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ดร. วัฒนกุลพานิชย์)

นพพล โพธิ์พฤกษ์ : การหาความชุกและการกระจายสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ณ อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ประเทศไทย. (PREVALENCE AND SUBTYPE DISTRIBUTION OF *BLASTOCYSTIS* INFECTION IN DIABETES MELLITUS PATIENTS AND NON-DIABETIC PEOPLE IN BANG PA-IN, PHRANAKHON SI AYUTTHAYA PROVINCE, THAILAND) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ดวงดา ปาละสุวรรณ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร.องอาจ มหิทธิกร

โรคเบาหวานเป็นหนึ่งในปัญหาด้านสาธารณสุขทั่วโลกโดยพบผู้ป่วยโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โรคเบาหวานเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัสและปรสิต การศึกษาแบบภาคตัดขวางครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุก ชนิดสายพันธุ์ และปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานในพื้นที่อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 ตัวอย่างอุจจาระและแบบสอบถามเก็บรวบรวมจากผู้ป่วยโรคเบาหวาน 130 คนและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน 100 คน โดยนำตัวอย่างอุจจาระทั้งหมดมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี simple smear technique และตรวจหายีน small subunit ribosomal DNA ของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค nested PCR และจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียโดยใช้การทดสอบไคสแควร์และอัตราส่วน odds (odds ratio) ที่ช่วงเชื่อมั่น 95% ผลการศึกษาพบว่า พบผู้ติดเชื้อแบคทีเรียจำนวน 25 คน จากตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด 230 คน คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อแบคทีเรียร้อยละ 10.9 การติดเชื้อชนิดนี้ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานคิดเป็นร้อยละ 12.3 และร้อยละ 9 ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบมากที่สุดประกอบด้วย สายพันธุ์ที่ 3 สายพันธุ์ที่ 1 และสายพันธุ์ที่ 4 ตามลำดับ การศึกษาปัจจัยเสี่ยง ได้แก่ ภาวะโรคเบาหวาน เพศ อายุ ระดับการศึกษา อาชีพ ประเภทห้องน้ำ การมีสัตว์เลี้ยง ความถี่ของการรับประทานอาหารสุกๆดิบๆ การล้างผักและผลไม้ก่อนรับประทาน การล้างมือก่อนและหลังทำกิจกรรมต่างๆ และการขับถ่ายโดยใช้ห้องส้วม ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่ามีแนวโน้มการติดเชื้อแบคทีเรียที่สูงในเพศชาย ผู้ที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 65 ปี ผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน ระยะเวลาการเป็นโรคเบาหวานตั้งแต่ 10 ปีขึ้นไป ผู้ที่ใช้ห้องส้วมแบบราดน้ำหรือนั่งยอง รวมทั้งผู้ที่มีสัตว์เลี้ยง ผลของการศึกษานี้เป็นข้อมูลสำคัญที่เป็นประโยชน์เพื่อใช้ในการกำหนดแนวทางการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานในชุมชนต่อไป

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2563	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6076752537 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Blastocystis sp., diabetes mellitus, small subunit ribosomal DNA, subtype (STs)
 Noppon Popruk : PREVALENCE AND SUBTYPE DISTRIBUTION OF *BLASTOCYSTIS* INFECTION IN DIABETES MELLITUS PATIENTS AND NON-DIABETIC PEOPLE IN BANG PA-IN, PHRANAKHON SI AYUTTHAYA PROVINCE, THAILAND. Advisor: Assoc. Prof. DUANGDAO PALASUWAN, Ph.D. Co-advisor: Assoc. Prof. Aongart Mahittikorn, Ph.D.

Diabetes mellitus (DM) is one of the global public health problems and the prevalence is increasing throughout the world. DM increase risk of infections caused by bacteria, fungi, viruses and parasites. The aim of this cross-sectional study was to determine the prevalence, subtypes, and risk factors of *Blastocystis* infection in DM and non-DM in the Bang Pa-in district, Phra Nakhon Si Ayutthaya Province between November 2019 to February 2020. The stool samples and questionnaires were obtained from 130 DM patients and 100 non-DM individuals. The *Blastocystis* infection was identified by simple smear technique and amplified the partial small subunit ribosomal DNA by nested polymerase chain reaction and subtyped by sequencing. Analysis of potential risk factors was conducted by chi-square and odds ratio with 95% confidence interval. The overall prevalence of *Blastocystis* infection was 10.9% and the prevalence in non-DM and DM groups were 9% and 12.3%, respectively. The most prevalent subtypes were ST3, followed by ST1 and ST4, respectively. All risk factors were not associated with *Blastocystis* infection. The age ≥ 65 years, people with DM, the duration of DM ≥ 10 years, low level of education, and owned the animals increased risk for *Blastocystis* infection. In conclusion, this is the first study of *Blastocystis* infection in DM and found a high prevalence in the study population. Therefore, the health education for promoting the sanitation and hygiene is necessary for reducing and preventing the infection in the community.

Field of Study:	Molecular Science of Medical Microbiology and Immunology	Student's Signature
Academic Year:	2020	Advisor's Signature
		Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยและการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเพราะความกรุณาอย่างสูงจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงดาว ปาละสุวรรณ และ รองศาสตราจารย์ ดร.องอาจ มหิตธิกร ซึ่งเป็นที่ปรึกษาการค้นคว้า โดยให้คำปรึกษาแนะนำวิธีการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มทำวิจัย จนสำเร็จขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่กรุณารับเป็นที่ปรึกษา งานค้นคว้าแนะนำ ชี้แนะแนวความคิดอันเป็นประโยชน์ ท่านได้เมตตาช่วยเหลือตรวจแก้ไขข้อบกพร่องตั้งแต่โครงร่างวิทยานิพนธ์ จนดำเนินการวิจัยแล้วเสร็จ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แนะนำสั่งสอน และให้ความรู้แก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาการศึกษา และขอบพระคุณแพทย์ พยาบาล อาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้านและเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน ณ โรงพยาบาลบางปะอิน และ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ตลอดจนอาจารย์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์นี้ และขอบพระคุณหัวหน้าและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ แผนกสัตวแพทยศาสตร์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (ฝ่ายสหรัฐฯ) ที่ได้สนับสนุนและช่วยเหลือการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัวและเพื่อนๆ ทุกคน ที่ให้กำลังใจผู้วิจัยเสมอมาจนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นพพล โพธิ์พฤกษ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
3. ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อบลาสโตซิสติส.....	6
1.1. รูปร่างลักษณะของเชื้อบลาสโตซิสติส.....	6
1.2. จีโนมของเชื้อบลาสโตซิสติส.....	11
1.3. สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติส.....	11
2. วงจรชีวิตของเชื้อบลาสโตซิสติส.....	15
3. ระบาดวิทยาของเชื้อบลาสโตซิสติส.....	16
4. ความสำคัญทางคลินิก.....	18
4.1. อาการของผู้ติดเชื้อบลาสโตซิสติส.....	18
4.2. กลไกการก่อโรคของเชื้อบลาสโตซิสติส.....	19

5. การตรวจวินิจฉัย.....	21
5.1. การตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	21
5.2. การเพาะเลี้ยงเชื้อบลาสโตซิสติสในอาหารเลี้ยงเชื้อ	22
5.3. การตรวจวินิจฉัยโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	23
5.4. การตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิคอื่นๆ.....	24
6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing.....	24
7. ปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติส	26
8. โรคเบาหวาน	27
8.1. ประเภทของโรคเบาหวาน	28
8.2. อาการของโรคเบาหวาน	31
8.3. ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวาน	32
8.4. ระบาดวิทยาของโรคเบาหวาน.....	32
8.5. ความสำคัญทางคลินิก	34
8.6. ความสัมพันธ์ของโรคเบาหวานต่อการติดเชื้อชนิดต่างๆ	37
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	39
1. สารเคมี วัสดุทางวิทยาศาสตร์.....	39
2. เครื่องมือ	39
3. การออกแบบงานวิจัย	40
4. วิธีการทดลอง	40
4.1. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	40
4.2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อบลาสโตซิสติส	43
4.3. การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน SSU rDNA ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing.....	47
4.4. การวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยโปรแกรม BLAST	47

4.5. การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ข้อมูลลำดับเบสของเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree).....	48
4.6. การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	49
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	50
1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	50
2. ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อบลาสโตซิสติส.....	50
2.1. ผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิค direct smear.....	51
2.2. ผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสโดยการตรวจหายีน SSU rDNA	52
1. ความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติส	53
2. สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติส.....	56
3. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ	58
3.1. ข้อมูลคุณลักษณะพื้นฐานของผู้เข้าร่วมวิจัยและพฤติกรรมด้านสุขอนามัย	58
3.2. ข้อมูลพฤติกรรมด้านสุขอนามัยของผู้เข้าร่วมวิจัย	61
3.3. ผลการทดสอบความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติส.....	61
4. ผลการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ.....	65
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	69
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	76
บรรณานุกรม.....	78
ภาคผนวก.....	102
ภาคผนวก ก.....	102
ภาคผนวก ข.....	103
ประวัติผู้เขียน.....	104

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	ขนาดจีโนมและจำนวนของยีนของเชื้อบลาสโตซิสติส สายพันธุ์ที่ 7 (107).....	11
ตารางที่ 2	รายละเอียด primer ที่ใช้ในเทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR ...	44
ตารางที่ 3	จำนวนตัวอย่างอุจจาระที่ใช้ในการศึกษา แต่ละโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล.....	50
ตารางที่ 4	ผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสในตัวอย่างอุจจาระด้วยเทคนิค direct smear.....	51
ตารางที่ 5	ผลการตรวจหายีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติสขนาด 600 คู่เบส ด้วยเทคนิค conventional PCR	54
ตารางที่ 6	ผลการตรวจหายีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติสขนาด 1,100 คู่เบส ด้วยเทคนิค nested PCR.....	54
ตารางที่ 7	เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิค direct smear เทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR (n=230).....	55
ตารางที่ 8	ผลการตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสจากเทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR โดยใช้โปรแกรม BLAST.....	56
ตารางที่ 9	การกระจายสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสของผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน และผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน โดยการตรวจด้วยเทคนิค nested PCR และ Sanger sequencing.....	58
ตารางที่ 10	แสดงข้อมูลคุณลักษณะพื้นฐานของผู้เข้าร่วมวิจัย (n=230).....	59
ตารางที่ 11	แสดงข้อมูลคุณลักษณะพื้นฐานของผู้เข้าร่วมวิจัยแยกโดยโรคเบาหวาน.....	60
ตารางที่ 12	ข้อมูลพฤติกรรมด้านสุขอนามัยของผู้เข้าร่วมวิจัย (n=230).....	61
ตารางที่ 13	แสดงผลการทดสอบ Chi-Square และ Odd ratios และ 95% confidence interval ของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติส.....	63
ตารางที่ 14	แสดงหมายเลขสายพันธุ์อ้างอิง และชนิดของโฮสต์ของเชื้อบลาสโตซิสติส ที่ใช้ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ.....	66

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 รูปร่างของเชื้อบลาสโตซิสติส ระยะ Vacuolar form [ดัดแปลงจาก Parija SC and Jeremiah S. (92)].....	8
รูปที่ 2 รูปร่างของเชื้อบลาสโตซิสติส ระยะ granular form [ดัดแปลงจาก Parija SC and Jeremiah S. (92)].....	8
รูปที่ 3 รูปร่างของเชื้อบลาสโตซิสติส ระยะ amoeboid form [ดัดแปลงจาก Parija SC and Jeremiah S. (92)].....	9
รูปที่ 4 รูปร่างของเชื้อบลาสโตซิสติส ระยะ cyst form [ดัดแปลงจาก Parija SC and Jeremiah S. (92)].....	10
รูปที่ 5 แบบจำลองวงจรชีวิตของเชื้อบลาสโตซิสติส (138).....	16
รูปที่ 6 ความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1-9 ของประชากรทวีปต่างๆ (44).....	17
รูปที่ 7 แบบจำลองพยาธิสภาพเซลล์บุผิวลำไส้ของโฮสต์จากการติดเชื้อบลาสโตซิสติส (173).....	21
รูปที่ 8 ขั้นตอนการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีแซงเกอร์โดยใช้ BigDye® terminators (194).....	25
รูปที่ 9 ความชุกของโรคเบาหวานในประชากรทวีปต่างๆ ปี ค.ศ. 2017 และปี ค.ศ. 2045 (220) ...	33
รูปที่ 10 การตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา conventional PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน SSU rDNA บน 1.5% agarose gel electrophoresis	52
รูปที่ 11 การตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา nested PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน SSU rDNA บน 1.5% agarose gel electrophoresis.....	53
รูปที่ 12 แสดงแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้วิธี Maximum likelihood analysis เพื่อวิเคราะห์ยีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติส โดยรูปแบบจำลองที่ใช้คือ The General Time Reversible สัญลักษณ์ ▲ แทนกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวาน และ ■ แทนกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน.....	68

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคติดเชื้อพยาธิลำไส้ที่เกิดจากปรสิตหนอนพยาธิและโปรโตซัว ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาทั้งในทวีปแอฟริกา อเมริกาใต้และเอเชีย ปรสิตหนอนพยาธิและโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคได้แก่ *Ascaris lumbricoides*, พยาธิปากขอ, *Trichuris trichiura*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* เป็นต้น (1, 2) และจากรายงานพบว่าทั่วโลกมีจำนวนประชากรมากกว่าห้าพันล้านคนมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิลำไส้ และพบจำนวนผู้ติดเชื้อดังกล่าวประมาณหนึ่งพันล้านคนในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา (1, 3, 4) ข้อมูลการศึกษาความชุกของการติดเชื้อพยาธิลำไส้ที่สำคัญทางการแพทย์ของประชากรในแต่ละประเทศรวมทั้งในประเทศไทยพบว่าจำนวนผู้ติดเชื้อพยาธิลำไส้มีความแตกต่างกัน โดยมีปัจจัยต่างๆที่สำคัญ ได้แก่ สภาพภูมิศาสตร์ ถิ่นที่อยู่อาศัย การสุขาภิบาล พฤติกรรม อายุ ภาวะทางภูมิคุ้มกันของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษารวมทั้งวิธีการตรวจวินิจฉัย (5-9) ขณะเดียวกันการศึกษากการติดเชื้อพยาธิลำไส้ในมนุษย์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ เชื้อบลาสโตซิสติส (*Blastocystis* sp.) ยังพบข้อมูลการศึกษาไม่มากนัก ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบหลักฐานหรือข้อมูลการศึกษาที่ชัดเจนเกี่ยวกับเชื้อบลาสโตซิสติส อันได้แก่ วงจรชีวิต การแพร่กระจายของเชื้อ การก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ ความสำคัญทางคลินิก (10) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบจำนวนผู้ติดเชื้อบลาสโตซิสติสสูงมากกว่าในอดีต (11) ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดอาการในระบบทางเดินอาหารของผู้ติดเชื้อ เช่น ปวดท้อง ท้องเสีย ท้องอืด หรืออาจไม่ก่อให้เกิดอาการใดๆเลยก็ตาม (11, 12) และที่สำคัญสามารถทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงได้ในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ (13, 14) ข้อมูลการศึกษาความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในกลุ่มตัวอย่างต่างๆ เช่น ผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง (15-17) เด็ก (18-20) ผู้สูงอายุ (21) ผู้ที่มีอาการในระบบทางเดินอาหาร (22-25) ผู้ป่วยที่รักษาตัวในโรงพยาบาล (26, 27) รวมทั้งผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ ผู้ป่วยโรคมะเร็ง ผู้ป่วยโรคไต ผู้ป่วยโรคเบาหวาน (28-34) พบอัตราความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสที่สูง โดยสามารถตรวจพบเชื้อบลาสโตซิสติสได้ทั้งในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง

และผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ ในขณะที่การศึกษาความชุกการติดเชื้อบลาสโตซิสติสของประชากรในประเทศไทย พบข้อมูลการศึกษาในปริมาณน้อยและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานั้นส่วนใหญ่พบว่าเป็นผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงรวมทั้งในกลุ่มของเด็ก เช่น เด็กนักเรียน เด็กในสถานเลี้ยงเด็กกำพร้า เป็นต้น ขณะที่การศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำจากโรคต่าง ๆ นั้นพบจำนวนรายงานการศึกษาน้อยมาก (35-41)

เชื้อบลาสโตซิสติสเป็นโปรโตซัวที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งเชื้อชนิดนี้ประกอบด้วยหลายสายพันธุ์ (subtype) ในปัจจุบันพบจำนวนสายพันธุ์ทั้งสิ้น 17 สายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) ของเชื้อบลาสโตซิสติส (42) ซึ่งสายพันธุ์ที่ 1-9 และสายพันธุ์ที่ 12 สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในคนได้ (43) สายพันธุ์ของเชื้อที่ตรวจพบส่วนใหญ่ในคน ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 1-4 (44) ขณะเดียวกันสัตว์ชนิดต่างๆยังสามารถติดเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์เดียวกันกับในคนได้เช่นกัน การติดเชื้อบลาสโตซิสติสนอกจากจะสามารถติดต่อจากคนสู่คนแล้ว ยังสามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้อีกด้วยซึ่งมีสาเหตุหลักจากการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อนเชื้อบลาสโตซิสติสจากสัตว์ ทำให้เกิดการติดเชื้อบลาสโตซิสติส (42, 45, 46) ข้อมูลการศึกษาการติดเชื้อบลาสโตซิสติสจำนวนมากได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสายพันธุ์และการทำให้เกิดโรค ซึ่งพบว่าลักษณะอาการต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายหลังการติดเชื้อมีความสัมพันธ์กับชนิดของสายพันธุ์ของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ (47-51) ดังนั้นการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจึงมีความสำคัญอย่างมากทั้งในด้านการรักษาผู้ติดเชื้อ รวมไปถึงด้านระบาดวิทยาในการศึกษาหาแหล่งที่มาของเชื้อ รูปแบบการแพร่กระจายของเชื้อ รวมทั้งการติดเชื้อจากสัตว์สู่คน (48, 52) การตรวจวินิจฉัยเชื้อบลาสโตซิสติสที่ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว สามารถทำได้โดยสองวิธีหลักๆ คือ การตรวจหาเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) และการตรวจหา ยีน SSU rDNA ของเชื้อโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) สำหรับห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลทั่วไปนั้นอาศัยการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้กล้องจุลทรรศน์เป็นหลัก การตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยวิธีนี้ต้องอาศัยความชำนาญจากผู้ทำการตรวจ อันเนื่องมาจากรูปร่างลักษณะที่หลากหลายของเชื้อบลาสโตซิสติส ในกรณีที่ผู้ติดเชื้อไม่ได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้องอาจส่งผลทำให้เชื้อแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว อีกทั้งวิธีดังกล่าวไม่สามารถระบุชนิดสายพันธุ์หรือแยกความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อที่ตรวจพบในผู้ติดเชื้อ ดังนั้นการจำแนกชนิดสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสจึงไม่สามารถทำได้โดยใช้วิธีดังกล่าว

วิธีทางอณูชีววิทยาเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่ามาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อบลาสโตซิสติส โดยเทคนิคที่นิยมใช้คือ เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งมีความไวของวิธีการตรวจที่สูงกว่าการตรวจหาเชื้อโดยการใช้อัลตร้าสตรัคเจอร์ และยังมีประโยชน์อย่างยิ่งในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ วิธีที่นิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในปัจจุบันคือ การตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SSU rDNA จากผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (53-55) และการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1-7 (subtype-specific sequence-tagged-site, STS) (56) ซึ่งทั้งสองเทคนิคนี้ที่มีความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่สูง

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) เป็นหนึ่งในกลุ่มของโรคไม่ติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทยและมีอัตราการความชุกของโรคสูงเป็นอันดับต้นๆในปัจจุบัน (57) จากข้อมูลรายงานการสำรวจสุขภาพของประชาชนไทยโดยการตรวจร่างกายครั้งที่ 5 ในปี พ.ศ. 2557 ของสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข ได้สำรวจความชุกของโรคเบาหวานในประชากรไทยอายุตั้งแต่ 15 ปี ขึ้นไป พบว่าความชุกของโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 6.9 ในปี พ.ศ. 2552 เป็นร้อยละ 8.9 ในปี พ.ศ. 2557 (58) ปัจจุบันประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคเบาหวานไม่น้อยกว่า 4 ล้านคน ข้อมูลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ไม่ได้รับการดูแลรักษาที่ถูกต้องจะก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนในหลายระบบของร่างกาย ได้แก่ จอตาผิดปกติจากเบาหวาน โรคไตเรื้อรัง โรคหลอดเลือดหัวใจและหลอดเลือดสมอง และภาวะแทรกซ้อนที่เท้าและขา (59) นอกจากภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นแล้ว โรคเบาหวานยังมีความสัมพันธ์ต่อการเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้ออื่นๆตามมา (60-62) ซึ่งรวมถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติและความไวต่อการติดเชื้อที่เพิ่มขึ้น อันเป็นผลมาจากภาวะแทรกซ้อนที่พบบ่อยในโรคเบาหวาน (63) ภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดสูงส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) (64) รวมทั้งลดการตอบสนองของลิมโฟไซต์ชนิดที (T lymphocyte) (65) และเกิดความผิดปกติในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) ส่งผลให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานเกิดภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ ทำให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูงขึ้นกว่าคนปกติ (34, 66-68) การติดเชื้อที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ได้แก่ การติดเชื้อที่ข้อต่อและกระดูก การติดเชื้อที่ดวงตา การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อที่ผิวหนัง การติดเชื้อรา การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น (69) ขณะเดียวกันการติดเชื้อปรสิตหนองพยาธิสามารถพบได้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานเช่นกัน ข้อมูลการศึกษาการติดเชื้อพยาธิในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจพบการติดเชื้อพยาธิชนิดต่างๆในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ได้แก่ พยาธิไส้เดือน, พยาธิปากขอ, *Entamoeba histocytica*, *Schistosoma mansoni* (70-74)

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจทำการศึกษาความชุกและชนิดสายพันธุ์ของการติดเชื้อบลาสโตซิสติส รวมทั้งปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อชนิดนี้ ในผู้ป่วยโรคเบาหวานเปรียบเทียบกับคนที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ปรากฏรายงานการศึกษาการติดเชื้อชนิดนี้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานในประเทศไทย

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน
2. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ การใช้เทคนิค conventional PCR และการใช้เทคนิค nested PCR
3. เพื่อศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสที่ตรวจพบในผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และระดับของความสัมพันธ์ของปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน

3. ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองโครงการวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้โครงการวิจัยเลขที่ 159.2/62 (COA No.231/2562 วันที่รับรอง 25 กันยายน พ.ศ. 2562) โดยทำการเก็บอุจจาระของผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน พื้นที่อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา จำนวนทั้งสิ้น 230 ตัวอย่าง แบ่งเป็นอุจจาระของผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 130 ตัวอย่าง และอุจจาระของผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน จำนวน 100 ตัวอย่าง ตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้เทคนิค direct smear ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำอุจจาระมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหายีน SSU rDNA ด้วยเทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR จากนั้นทำการวิเคราะห์

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SSU rDNA จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี Sanger sequencing และทำการวิเคราะห์หาสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment-Search Tool (BLAST) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อบลาสโตซิสติสเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์อ้างอิงของเชื้อบลาสโตซิสติสโดยสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) เพื่อหาความสัมพันธ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสที่ตรวจพบในผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานในพื้นที่ดังกล่าว

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ทราบความชุกและชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสที่ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
2. ทราบความสัมพันธ์และระดับของความสัมพันธ์ของปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน
3. เจ้าหน้าที่ด้านสาธารณสุขอำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สามารถใช้ข้อมูลงานวิจัยเพื่อเป็นแนวทางในการวางแผนควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อบลาสโตซิสติสในชุมชนได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อบลาสโตซิสติส

เชื้อบลาสโตซิสติสเป็นสิ่งมีชีวิตพหุคาริโอตที่จัดอยู่ในกลุ่มสตาร์มีโนไฟลัส (stramenopiles) ที่ประกอบด้วยกลุ่มของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว (unicellular eukaryotes) และหลายเซลล์ (multicellular eukaryotes) เช่น รา น้ำ ราเมือกและสาหร่ายสีน้ำตาล เป็นต้น (75) และเป็นเพียงจีสเดียวในกลุ่มสตาร์มีโนไฟลัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ (76) เชื้อบลาสโตซิสติสเป็นโปรโตซัวลำไส้ที่พบได้ทั่วไปในมนุษย์และสัตว์ต่างๆหลายชนิด เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงคานและแมลง (42, 47, 77, 78) เนื่องจากการตรวจพบเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้ไม่จำกัดแค่เพียงในมนุษย์เท่านั้น แต่ยังสามารถพบได้ในสัตว์ชนิดอื่นๆทำให้การเรียกชื่อเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้เปลี่ยนจากเดิมคือ “*Blastocystis hominis*” เป็น “*Blastocystis sp.*” หรือ “*Blastocystis spp. subtype n*” โดยที่ “n” หมายถึง ตัวเลขที่ระบุสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติส (79) แม้ว่าโปรโตซัวชนิดนี้ถูกค้นพบมานานมากกว่าหนึ่งร้อยปีแล้ว แต่ข้อมูลเกี่ยวกับวงจรชีวิต กลไกการก่อโรค อาการทางคลินิกและการรักษายังไม่เป็นที่แน่ชัด

1.1. รูปร่างลักษณะของเชื้อบลาสโตซิสติส

เชื้อบลาสโตซิสติสเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว ไม่มีแฟลกเจลลา (80) และเป็นโปรโตซัวที่มีความหลากหลายของรูปร่างลักษณะ (polymorphic protozoa) สามารถพบรูปร่างลักษณะของเชื้อที่แตกต่างกันได้ทั้งในอุจจาระและจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเชื้อบลาสโตซิสติสเป็นโปรโตซัวที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (anaerobic protozoa) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างรวมทั้งขนาดของเชื้อ ด้วยเหตุนี้ทำให้เชื้อบลาสโตซิสติสนั้นมีรูปร่างและขนาดของเชื้อที่หลากหลาย ส่งผลให้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทั่วไปที่อาศัยการตรวจหาเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจพบเชื้อชนิดนี้ได้ยาก และมักเกิดความผิดพลาดบ่อยในการรายงานผล รูปร่างลักษณะของเชื้อสามารถแบ่งออกเป็น 4 แบบ ดังนี้ (11, 77)

1. Vacuolar form

เป็นระยะของเชื้อบลาสโตซิสติสที่ตรวจพบได้บ่อยในอุจจาระของผู้ติดเชื้อและจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (25) จากรูปที่ 1 แสดงลักษณะของเชื้อบลาสโตซิสติสระยะ vacuolar form โดยใช้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์พบว่าเชื้อระยะนี้มีรูปร่างกลม ขอบบาง มีขนาดหลากหลายตั้งแต่ 2-200 ไมโครเมตร โดยเฉลี่ยจะพบขนาดประมาณ 4-15 ไมโครเมตร มีแควิวโอลขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ (central vacuole) คิดเป็นปริมาตรประมาณร้อยละ 90 ของเซลล์ทั้งหมด (77) ภายในแควิวโอลประกอบด้วยแกรนูลขนาดเล็กละเอียดหรืออาจพบสารรวมตัวเกาะกลุ่มกันภายใน โดยหน้าที่หลักของแควิวโอลคือเป็นที่เก็บสะสมอาหาร (81) แควิวโอลที่มีขนาดใหญ่ทำให้ไซโทพลาซึมถูกดันออกไปด้านข้างซีตริมขอบของเซลล์ ทำให้มีลักษณะคล้ายวงแหวนที่มีความหนาไม่สม่ำเสมอ ภายในวงแหวนประกอบด้วยนิวเคลียสและออร์แกเนลล์ต่างๆ ออร์แกเนลล์ที่มีขนาดใหญ่มักจะพบอยู่บริเวณไซโทพลาซึมส่วนที่มีความหนามากกว่า ซึ่งมักจะพบอยู่ที่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ในบางครั้งจะพบว่าบางส่วนของไซโทพลาซึมมันพับเข้าไปในแควิวโอล ทำให้เกิดการสะสมของสารที่อยู่ในไซโทพลาซึม (82) รวมทั้งออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม เช่น ไมโทคอนเดรียอยู่ภายในแควิวโอล (83-85) การสะสมของออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มที่พบอยู่ภายในแควิวโอลปริมาณที่สูงมีความสัมพันธ์กับการเกิดกระบวนการตายของเซลล์ที่เรียกว่า “programmed cell death” (85, 86)

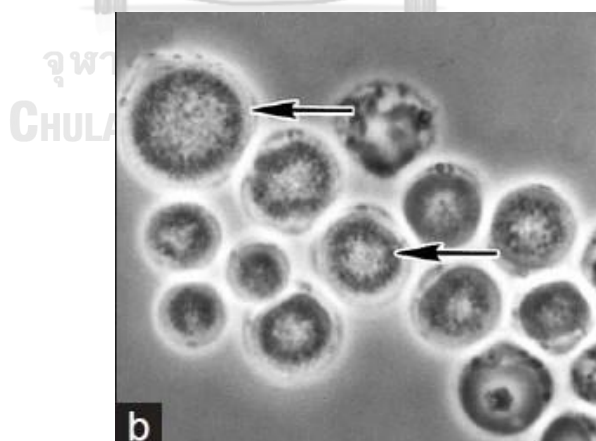
เชื้อในระยะนี้อาจพบนิวเคลียสได้ตั้งแต่ 1-4 นิวเคลียส (77) ด้านนอกของเซลล์มีสารเคลือบผิวเซลล์ซึ่งมีความหนาแตกต่างกัน โดยเซลล์ที่แยกได้จากอุจจาระจะมีความหนาของสารเคลือบผิวเซลล์มากกว่าเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (81, 87) สารที่อยู่บนผิวเซลล์ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตต่างๆ (88, 89) ได้แก่ alpha-D-mannose, alpha-D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine, alpha-L-fucose ไคตินและกรดเซียริก (88) และสารที่อยู่บนผิวเซลล์ดังที่กล่าวมานั้นอาจเป็นเครื่องมือที่ใช้ดักจับแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นอาหาร (90) หรืออาจใช้เป็นกลไกป้องกันการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (81, 90) และพบช่องเปิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจมีส่วนในกระบวนการนำสารภายนอกเข้าสู่เซลล์ (endocytosis) (91)



รูปที่ 1 รูปร่างของเชื้อบลาสโตซิสติส ระยะ Vacuolar form [ดัดแปลงจาก Parija SC and Jeremiah S. (92)]

2. Granular form

เป็นระยะที่พบบได้น้อยมากทั้งในอุจจาระและการเพาะเลี้ยงเชื้อ เชื้อระยะนี้เป็นเชื้อที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อระยะ vacuolar form ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจากปัจจัยหลายประการ เช่น การเพิ่มความเข้มข้นของซีรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ การถ่ายโอนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน (77) จากรูปที่ 2 แสดงลักษณะของเชื้อบลาสโตซิสติสระยะ granular form พบว่าเชื้อระยะนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อระยะ vacuolar form ยกเว้นในระยะ granular form จะพบแกรนูลขนาดเล็กจำนวนมากภายในไซโทพลาซึมหรืออาจพบได้ภายในแวคิวโอล พบเชื้อระยะนี้ได้บ่อยจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในระยะเวลานานหรือภายหลังจากให้ยาปฏิชีวนะกับเซลล์เพาะเลี้ยง (81)



รูปที่ 2 รูปร่างของเชื้อบลาสโตซิสติส ระยะ granular form [ดัดแปลงจาก Parija SC and Jeremiah S. (92)]

3. Amoeboid form

เชื้อระยะนี้พบได้ไม่บ่อยในอุจจาระแต่อาจมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรค (93) อีกทั้งรูปร่างของเชื้อระยะ amoeboid form ทำให้เกิดความสับสนในการรายงานผล (87, 94, 95) พบเชื้อระยะนี้ได้บ่อยจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลาสั้นหรือภายหลังจากให้ยาปฏิชีวนะกับเซลล์เพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับเชื้อระยะ granular form ซึ่งบางครั้งอาจพบได้ในตัวอย่างอุจจาระของผู้ติดเชื้อ (96) จากรูปที่ 3 แสดงลักษณะของเชื้ออบลาสโตซิสติสระยะ amoeboid form พบว่าเชื้อระยะ amoeboid form มีขนาดเฉลี่ย 2.6 - 7.8 ไมโครเมตร มีรูปร่างคล้ายอะมีบา ขอบของเซลล์ไม่เรียบและไซโทพลาซึมของเซลล์มีลักษณะคล้ายเท้าเทียม (pseudopodia) ภายในเท้าเทียมมีโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายไลโซโซมซึ่งมีแบคทีเรียที่ถูกจับอยู่ภายใน (95)

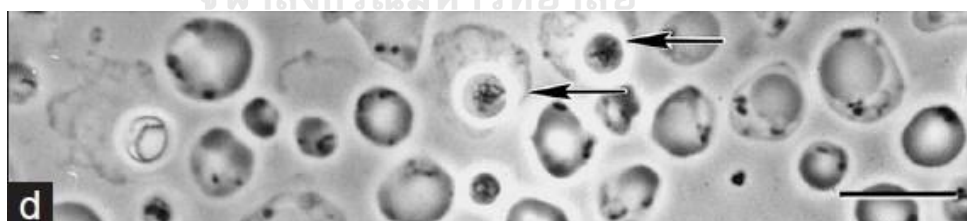


รูปที่ 3 รูปร่างของเชื้ออบลาสโตซิสติส ระยะ amoeboid form [ดัดแปลงจาก Parija SC and Jeremiah S. (92)]

ความแตกต่างของรูปร่างของเชื้อระยะ amoeboid form รวมทั้งบทบาทในวงจรชีวิตของเชื้ออบลาสโตซิสติสยังไม่ทราบแน่ชัดในปัจจุบัน แต่สันนิษฐานว่าเชื้ออบลาสโตซิสติสระยะ amoeboid form เป็นระยะที่อยู่ระหว่างระยะ vacuolar form และระยะ cyst form ซึ่งเชื้อระยะ amoeboid form กินแบคทีเรียเพื่อเป็นสารอาหารสะสมใช้ในภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงจากช่วงที่มีการเจริญเติบโตตามปกติไปสู่ระยะพักตัว (cyst stage) ซึ่งเชื้ออบลาสโตซิสติสจะหยุดการเจริญเติบโต ภาวะดังกล่าวจะเกิดขึ้นในกรณีที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น การขาดแคลนสารอาหาร เป็นต้น (97)

4. Cyst form

แม้จะมีคำอธิบายจำนวนมากเกี่ยวกับเชื้อระยะ vacuolar form และ granular form มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1900 แต่เชื้อระยะ cyst form เพิ่งถูกค้นพบและได้รับการยืนยันในระยะเวลาไม่นานมานี้ (98-101) จากรูปที่ 4 แสดงลักษณะของเชื้อบลาสโตซิสติสระยะ cyst form พบว่าเชื้อระยะ cyst form ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมหรือรี ขนาดเล็กประมาณ 2-5 ไมโครเมตร แต่เชื้อระยะ cyst form ที่พบในมนุษย์นั้นพบว่ามีขนาดเล็กกว่าที่พบในสัตว์ (102) ภายนอกของซิสต์จะพบผนังหลายชั้น ภายในเซลล์ประกอบด้วยนิวเคลียสจำนวน 1-4 นิวเคลียสและพบแวคิวโอลขนาดเล็กจำนวนมาก โดยพบสารจำพวกไกลโคเจนและไขมันสะสมอยู่ (77, 100) การตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์พบว่า ระยะ cyst form ไม่ถูกทำลายเมื่ออยู่ในน้ำ (103) เนื่องจากผนังของซิสต์ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อมให้สามารถทนอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ สามารถอยู่ในแหล่งน้ำได้นานถึง 19 วัน ในอุณหภูมิปกติ แต่ไม่สามารถทนต่อสภาวะที่อุณหภูมิสูงและน้ำยาฆ่าเชื้อได้ (104) ระยะ cyst form เป็นระยะที่พบได้บ่อยที่สุดในธรรมชาติและสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นระยะติดตัวของเชื้อบลาสโตซิสติส (77, 105) เนื่องจากขนาดของเชื้อระยะ cyst form มีขนาดเล็ก ส่งผลให้ตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสในอุจจาระเกิดความสับสนกับตะกอนขยะในกากอุจจาระ หรือไม่ถูกรายงานว่าเป็นเชื้อเนื่องมาจากขนาดของซิสต์ที่เล็กและมักไม่พบระยะ cyst form จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (104)



รูปที่ 4 รูปร่างของเชื้อบลาสโตซิสติส ระยะ cyst form [ดัดแปลงจาก Parija SC and Jeremiah S. (92)]

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อระยะ cyst form ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าในขั้นตอนแรกเกิดการรวมตัวกันของแวคิวโอลขนาดเล็กจำนวนมาก หลังจากนั้นเกิดการหลุดลอกผนังของซิสต์และถูกแทนที่ด้วยสารเคลือบผิวเซลล์ ทำให้เกิดการขยายขนาดของเซลล์ จากนั้นแวคิวโอลเกิดการหลอมรวมกันกลายเป็นแวคิวโอลขนาดใหญ่และพบแกรนูล

ภายในไซโทพลาซึม เกิดเป็นเชื้อระยะ vacuolar form หรือ granular form ในขั้นตอนสุดท้าย (106)

1.2. จีโนมของเชื้อบลาสโตซิสติส

ข้อมูลการศึกษาลักษณะของจีโนมของเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 7 โดยใช้เทคนิค pulsed-field gel electrophoresis และเทคนิค short gun sequencing ทำให้ทราบขนาดของจีโนมของเชื้อที่มีขนาดประมาณ 18.8 ล้านคู่นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยยีนทั้งหมด 6,020 ยีน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 42 ของขนาดจีโนมของเชื้อ โดยแบ่งเป็นลำดับของนิวคลีโอไทด์ในยีนที่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน (exon) ร้อยละ 37 และเป็นลำดับของนิวคลีโอไทด์ในยีนที่ไม่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน (intron) ร้อยละ 5 ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งพบยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โมเลกุลของ ribosomal RNA (rRNA) อยู่ในลักษณะที่เป็นกลุ่มหรือเป็นหน่วยที่เรียกว่า “rRNA transcriptional-unit” รวมทั้งพบ 18S gene, 5.8S gene, และ 28S gene เรียงต่อกัน ซึ่งมีขนาด 1,800 คู่ นิวคลีโอไทด์, 440 คู่ นิวคลีโอไทด์ และ 2,450 คู่ นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ขนาดจีโนมและจำนวนของยีนของเชื้อบลาสโตซิสติส สายพันธุ์ที่ 7 (107)

	Number	Mean length	Median length	Total length (Mb)	Percentage of genome (18.8 Mb)
Genes	6,020	1,299	1,397	7.82	42%
Exons	24,580	280	150	6.88	37%
Introns	18,560	50.5	31	0.94	5%
Intergenic	-	1,801	4,092	10.9	58%
Repeats	2,730	1,747	2,862	4.8	25%

1.3. สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติส

การศึกษาความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสของประชากรในทวีปต่างๆทั่วโลก พบว่าเชื้อบลาสโตซิสติสแต่ละสายพันธุ์มีโฮสต์และการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ รวมทั้งมีวิธีการแพร่กระจายที่แตกต่างกัน ดังนั้นการตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อจึงมีความสำคัญต่อการศึกษาด้านระบาดวิทยา เนื่องจากจะทำให้สามารถทราบข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งที่มา วิธีการแพร่กระจายของเชื้อ รวมทั้ง

การแพร่กระจายของเชื้อจากสัตว์สู่คน (39) จากข้อมูลการศึกษาจากผ่านมาพบว่า เชื้ออบลาสโตซิสติสที่ตรวจพบในมนุษย์และสัตว์ประกอบด้วยหลายสายพันธุ์ (subtype, ST) การตรวจวินิจฉัยเชื้ออบลาสโตซิสติสโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อได้ เนื่องจากรูปร่างลักษณะของเชื้อในทุกสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันมาก (11, 108, 109) วิธีทางอณูชีววิทยาจึงถูกนำมาใช้แยกสายพันธุ์ของเชื้ออบลาสโตซิสติส โดยอาศัยความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้ออบลาสโตซิสติสที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันประกอบด้วยสองวิธีหลัก คือ การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจากการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน SSU rDNA จากผลผลิตจากการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส และการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยตรงจากการใช้เทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่ใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้ออบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1-7 ซึ่งเทคนิคที่สองนี้มีข้อจำกัดอันเนื่องมาจากสามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อได้เพียง 7 สายพันธุ์เท่านั้น (110)

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน SSU rDNA ทำให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้ออบลาสโตซิสติสแต่ละสายพันธุ์ และลำดับเบสของยีน SSU rDNA นั้นมีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ (55, 111) ในขณะที่เชื้ออบลาสติสสายพันธุ์ชนิดเดียวกันนั้นยังพบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันเกิดขึ้นเช่นกัน จากรายงานการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้ออบลาสโตซิสติสที่ตรวจพบในคนโดยใช้วิธี Multilocus Sequence Typing (MLST) พบว่าเชื้ออบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 นั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด โดยลำดับเบสของยีน SSU rDNA มีความแตกต่างกันประมาณ 3% ขณะที่เชื้ออบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 4 นั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (112) การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้ออบลาสโตซิสติสในสายพันธุ์เดียวกันนั้นยังให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในเรื่องของความจำเพาะของเชื้อต่อโฮสต์ ยกตัวอย่างเช่น เชื้ออบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในคนและลิง จากการใช้วิธี MLST ศึกษาถึงความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อ พบว่าสามารถจำแนกเชื้ออบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 ออกเป็น 4 กลุ่มย่อย โดยเชื้อที่แยกได้จากคนที่ติดเชื้ออบลาสโตซิสติสเกือบทั้งหมดบ่งชี้ว่า มีเพียงกลุ่มย่อยกลุ่มเดียวเท่านั้นที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในคน (113) แต่ลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันภายในสายพันธุ์เดียวกันจะส่งผลกระทบต่อลักษณะทางฟีโนไทป์และการทำงานอื่นๆของเชื้อในรูปแบบใดนั้น ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีข้อมูลการศึกษาที่พบว่า ความหลากหลาย

ทางพันธุกรรมที่ตรวจพบในเชื้อบลาสโตซิสติสในสายพันธุ์ที่ 7 ส่งผลต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์ของโฮสต์และทำให้เกิดการดื้อยาที่แตกต่างกัน (114)

การตรวจวิเคราะห์ยีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติส ทำให้สามารถจำแนกเชื้อที่ตรวจพบในโฮสต์ต่างๆ ออกเป็น 17 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ 1-17 และพบว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และนก เป็นโฮสต์กักตุน (reservoir host) ของเชื้อบลาสโตซิสติสซึ่งตรวจพบจำนวนสายพันธุ์มากที่สุด ในสัตว์ดังกล่าว (115) เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1-8 ตรวจพบได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สุนัข หนู รวมทั้งสัตว์ปีก เช่น นก ไก่ เป็นต้น เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 9 มีรายงานการศึกษาพบว่าตรวจพบได้เฉพาะในคนเท่านั้น ในขณะที่เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 10-17 ตรวจพบได้ทั้งในสัตว์เลี้ยงจากการทำปศุสัตว์และสัตว์ป่า เช่น วัว แกะ กวาง ช้าง ยีราฟ เป็นต้น เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1, 2 และ 4 มีความจำเพาะต่อโฮสต์ต่ำและมีแนวโน้มที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อจากสัตว์มาสู่คนได้ (116) ประมาณร้อยละ 95 ของคนที่ติดเชื้อบลาสโตซิสติสนั้นเกิดจากเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1-4 (47) แต่สายพันธุ์ดังกล่าวยังสามารถตรวจพบในโฮสต์อื่นๆ ได้เช่นกัน โดยเฉพาะลิง เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 5-8 พบได้น้อยในคน ซึ่งเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 5 พบได้สูงในสัตว์ที่ใช้ในการทำปศุสัตว์ เช่น โค กระบือ สุนัข แกะและอูฐ เป็นต้น (117) เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 6-7 พบได้ส่วนใหญ่ในสัตว์ปีกจำพวกนก ขณะที่เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 8 พบได้จำกัดในลิงบางชนิด เช่น ลิงที่อาศัยอยู่ในป่าแถบทวีปเอเชียและทวีปอเมริกาใต้ ข้อมูลการศึกษาจำนวนมากพบว่าเชื้อบลาสโตซิสติสบางสายพันธุ์ที่ตรวจพบในสัตว์สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในคนได้ เช่น เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 5 ทำให้เกิดการติดเชื้อในคนที่เลี้ยงสุนัขในฟาร์มสุนัข (118) เช่นเดียวกับเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 8 ทำให้เกิดการติดเชื้อในคนที่ดูแลลิงในสวนสัตว์ (42, 45, 113, 119) ด้วยเหตุนี้ทำให้เชื่อว่าสัตว์อาจเป็นแหล่งสะสมของเชื้อและทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อสู่คนได้ (120-122) ข้อมูลการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการก่อโรคของเชื้อบลาสโตซิสติสที่มีความสัมพันธ์กับชนิดสายพันธุ์ของเชื้อ (79) ซึ่งสันนิษฐานว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ 1, 4 และ 7 นั้นเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในคน (12, 123, 124) ขณะที่สายพันธุ์ที่ 2 และ 3 (123, 124) มักเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดโรคในคน รวมทั้งการติดเชื้อบลาสโตซิสติสอาจมีความสัมพันธ์กับกลุ่มย่อยของสายพันธุ์ของเชื้อ ซึ่งกลุ่มย่อยแต่ละกลุ่มของเชื้อสายพันธุ์เดียวกันอาจมีความสามารถในการก่อโรคที่แตกต่างกัน (10) ดังนั้นการศึกษาเพียงแค่ว่า

ชนิดของสายพันธุ์ของเชื้ออาจไม่เพียงพอต่อการคาดการณ์หรือการทำนายการเกิดโรคของสายพันธุ์นั้นๆ (125) สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสที่ตรวจพบได้บ่อยในคน มีดังนี้

เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1 พบได้ในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด เช่น สุกร ลิง โค กระบือ นก และสัตว์ฟันแทะ (122, 126) บางรายงานการศึกษาพบว่า การติดเชื้อในคนเกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อจากสัตว์ที่เลี้ยงในฟาร์ม (11, 127) เช่น ในประเทศลิเบียพบการติดเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1 เป็นส่วนใหญ่ โดยอาจเกิดจากการสัมผัสอุจจาระของสัตว์ที่เป็นแหล่งสะสมของเชื้อ สำหรับในประเทศไทยพบการติดเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1 และ 2 มากตามลำดับจากการศึกษาการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในกลุ่มเด็กนักเรียนชั้นประถมศึกษา ในภาคกลางของประเทศไทย พบว่าเด็กนักเรียนมากกว่าครึ่งหนึ่งติดเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1 โดยแหล่งที่มาของเชื้ออาจเกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อผ่านทางน้ำดื่มจากแท็งก์น้ำที่ใช้ร่วมกัน (128) นอกจากนี้การตรวจหาการติดเชื้อบลาสโตซิสติสที่สถานสงเคราะห์เด็กหญิง กรุงเทพมหานคร พบเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1 สูงถึงร้อยละ 94 รองลงมาคือ สายพันธุ์ที่ 6 และสายพันธุ์ที่ 2 ตามลำดับ ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อจากคนไปสู่คน (person-to-person transmission) ของเด็กที่อยู่ร่วมกัน (39)

เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 2 พบได้น้อย ความชุกของการติดเชื้อเฉลี่ยประมาณร้อยละ 7 ในทวีปแอฟริกา ออสเตรเลียและเอเชียตะวันออก (44) ข้อมูลการศึกษาในประเทศไอร์แลนด์พบว่า การติดเชื้อบลาสโตซิสติสในคนนั้นเกิดจากสายพันธุ์ที่ 2 มากที่สุด รองลงมาคือ สายพันธุ์ที่ 3 (129) อีกทั้งยังตรวจพบเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 2 ในเด็กและลิงวอกในกาฐมาณฑุ เมืองหลวงของประเทศเนปาลซึ่งอาจบ่งบอกได้ว่าลิงอาจเป็นแหล่งของการแพร่เชื้อในแถบนี้ได้ เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 2 นี้ สามารถตรวจพบได้ในลิงและสุกรได้เช่นกัน (11)

เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 เป็นสายพันธุ์ที่ถูกตรวจพบมากที่สุดในคน พบการกระจายตัวของเชื้อบลาสโตซิสติสทั้งในทวีปเอเชีย ยุโรปและอเมริกาเหนือ เช่น ประเทศญี่ปุ่น สิงคโปร์ ไทย อียิปต์ ตุรกี เยอรมัน ตุรกี รวมทั้งรัฐโอเรกอน ประเทศสหรัฐอเมริกา เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 สามารถตรวจพบได้ในลิงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ ได้ เช่น สุกร สุนัข โค กระบือ และสัตว์ฟันแทะ (112) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อสายพันธุ์ที่ 3 ในผู้ป่วยที่ได้รับการเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลศูนย์ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยทั้งที่มีอาการและไม่มีอาการ

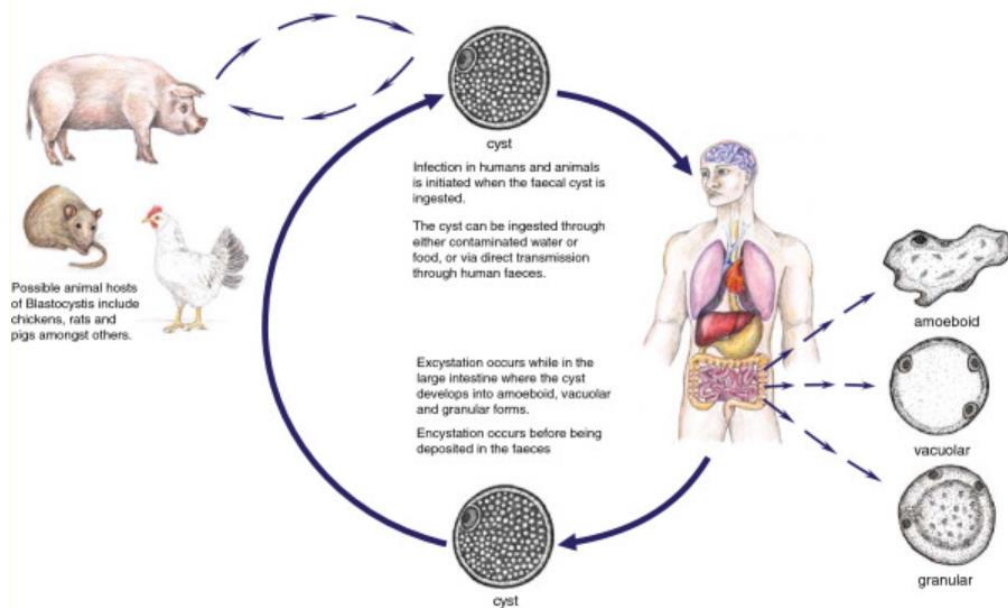
(27) รวมทั้งข้อมูลการศึกษาอื่นๆในหลายพื้นที่ของประเทศไทยให้ผลที่สอดคล้องกันโดยพบว่าคนส่วนใหญ่ติดเชือบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 (130-132)

เชือบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 4 เป็นสายพันธุ์ที่พบได้มากเป็นอันดับสองในสหราชอาณาจักร แต่อาจมีการแพร่กระจายของเชื้ออย่างจำกัดในทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ชนิดนี้ถูกตรวจพบได้น้อยมากในแถบอเมริกาใต้และทางเหนือของทวีปแอฟริกา (44) เชือบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 4 นี้สามารถตรวจพบได้ในลิงและสัตว์ฟันแทะ (112) ในขณะที่เชือบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 5-9 มักไม่พบในอุจจาระของมนุษย์ (12)

2. วงจรชีวิตของเชือบลาสโตซิสติส

วงจรชีวิตของเชือบลาสโตซิสติสยังไม่ทราบแน่ชัดในปัจจุบัน เนื่องจากความหลากหลายของรูปร่าง และมีกระบวนการสืบพันธุ์ได้หลายแบบ (133) เช่น schizogony (97), plasmatomy (134), endodyogeny (135) และ sac-like pouches (136) ทำให้มีหลายแนวคิดเกี่ยวกับวงจรชีวิตของเชือบลาสโตซิสติสได้ถูกนำเสนอในช่วงหลายปีที่ผ่านมา โดยวงจรชีวิตของเชือบลาสโตซิสติสอาจแตกต่างกันตามชนิดของสายพันธุ์และโฮสต์ (11) ทั้งนี้จากการค้นพบเชือบลาสโตซิสติสระยะ cyst form จึงสันนิษฐานว่าเชือบลาสโตซิสติสมีระยะ cyst form เป็นระยะติดต่อซึ่งปนออกมากับอุจจาระและปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่มและติดต่อสู่คนโดย fecal-oral route ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาที่พบว่าแหล่งที่มาที่สำคัญของการแพร่กระจายเชือบลาสโตซิสติสคือ น้ำที่ใช้ในการอุปโภคและบริโภค (35, 128, 137)

แบบจำลองวงจรชีวิตของบลาสโตซิสติส ดังแสดงในรูปที่ 5 สามารถอธิบายโดย เมื่อร่างกายได้รับเชื้อระยะ cyst form จากการปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่ม จากนั้นเชื้อจะออกจากซิสต์ในลำไส้ใหญ่ออกมาเป็นเชื้อระยะ vacuolar form ซึ่งอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปมาระหว่างระยะ vacuolar form เป็นเชื้อระยะ granular form หรือระยะ amoeboid form แล้วแต่สภาวะของโฮสต์ ซึ่งจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแบบ binary fission อยู่ภายในลำไส้ใหญ่ จากนั้นเชื้อระยะ vacuolar form จะเกิดการสร้างซิสต์ขึ้นมาล้อมรอบได้เป็นซิสต์ผนังบาง (thin-wall cyst) ซึ่งทำให้เกิด autoinfection ได้ หรือเป็นซิสต์ผนังหนา (thick-wall cyst) ปนออกมากับอุจจาระออกสู่สิ่งแวดล้อมและติดต่อสู่โฮสต์ใหม่ต่อไป (77)

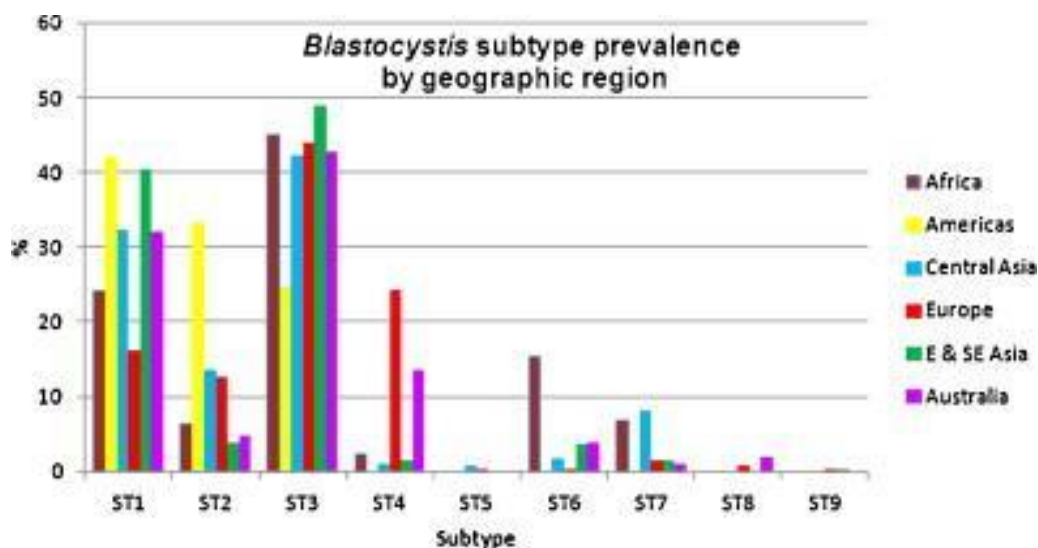


รูปที่ 5 แบบจำลองวงจรชีวิตของเชื้อบลาสโตซิสติส (138)

3. ระบาดวิทยาของเชื้อบลาสโตซิสติส

ในปัจจุบันเชื้อบลาสโตซิสติสมีการแพร่กระจายไปทั่วโลก โดยคาดการณ์ว่าประชากรที่ติดเชื้อนี้มีประมาณ 1,000 ล้านคน (139) ซึ่งมีความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ต่างๆ ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสของประชากรแต่ละทางภูมิศาสตร์ที่สำคัญได้แก่ ทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกา ทวีปยุโรป ทวีปออสเตรเลีย ทวีปเอเชีย ดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่าเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1-3 มีการแพร่กระจายไปทั่วโลก โดยสายพันธุ์ที่ 3 เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์ที่ 4 มีการแพร่กระจายของเชื้ออย่างจำกัดในทวีปอเมริกาและเอเชีย ตรงกันข้ามกับทวีปยุโรปที่พบสายพันธุ์ที่ 4 สูงมากเป็นอันดับที่สอง การติดเชื้อร่วมกันหลายสายพันธุ์อาจพบได้แต่มีเกิดขึ้นระหว่างสายพันธุ์ที่ 1 ร่วมกับสายพันธุ์ที่ 3 หรือ สายพันธุ์ที่ 1 ร่วมกับสายพันธุ์ที่ 2 (11) ในประเทศไทยพบรายงานความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสประมาณร้อยละ 0.19 ถึงร้อยละ 45 ซึ่งศึกษาการติดเชื้อบลาสโตซิสติสของคนกลุ่มต่างๆ เช่น ทหาร

ในค่ายทหาร สถานเลี้ยงเด็กกำพร้า รวมทั้งกลุ่มแรงงานที่อพยพมาจากประเทศพม่า (36, 38, 140-142)



รูปที่ 6 ความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1-9 ของประชากรทวีปต่างๆ (44)

อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการศึกษาความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสของแต่ละประเทศพบว่า ในแต่ละประเทศนั้นมีอัตราความชุกของการติดเชื้อที่แตกต่างกัน อีกทั้งยังมีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากรที่อยู่ในประเทศเดียวกันอีกด้วย (11) สำหรับประเทศที่พัฒนาแล้วพบความชุกของการติดเชื้อประมาณร้อยละ 0.5 ถึงร้อยละ 30 ในขณะที่กลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนานั้นพบความชุกของการติดเชื้อสูงร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 76 (47, 143, 144) โดยทั่วไปแล้วประเทศที่กำลังพัฒนามักพบความชุกของการติดเชื้อนี้สูงกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในประเทศญี่ปุ่นประมาณร้อยละ 0.5 ถึง 1 (145) ประเทศสิงคโปร์ร้อยละ 3.3 (146) สหราชอาณาจักรร้อยละ 3.9 (147) ในขณะที่ความชุกของการติดเชื้อนี้ในประเทศกำลังพัฒนา เช่น ประเทศอินโดนีเซียประมาณร้อยละ 60 (148) ประเทศเซเนกัลสูงถึงร้อยละ 100 (149) อัตราความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสที่สูงอาจสะท้อนถึงการสุขาภิบาลและสุขอนามัยของประชากรที่อยู่ในพื้นที่นั้น (44) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในแถบเขตร้อนโดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนา พบว่าความชุกของการติดเชื้อสูงอันเนื่องมาจากการสุขาภิบาลและสุขอนามัยของประชากรนั้นไม่ดี (40, 150) การติดเชื้อ

บลาสโตซิสติสอาจเกิดจากการสัมผัสกับสัตว์ที่ติดเชื้อ รวมทั้งการดื่มน้ำหรือรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนกับเชื้อเข้าไปทำให้ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย (11, 151) อีกทั้งข้อมูลการศึกษาจำนวนมากพบว่า การติดเชื้อบลาสโตซิสติสสามารถติดต่อกันจากคนสู่คนและสัตว์สู่คนได้เช่นกัน (39, 152, 153) นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วกิจกรรมทางเพศอาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อชนิดนี้ได้เช่นกัน จากรายงานการศึกษาที่ศึกษาการติดเชื้อโปรโตซัวลำไส้ในกลุ่มของชายรักชาย พบว่ามีจำนวนผู้ติดเชื้อโปรโตซัวลำไส้รวมทั้งเชื้อบลาสโตซิสติสสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ใช่ชายรักชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (154)

4. ความสำคัญทางคลินิก

การพิจารณาว่าเชื้อบลาสโตซิสติสจัดเป็นเชื้อก่อโรคหรือไม่นั้น ยังคงเป็นประเด็นที่ถกเถียงกันนับแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ข้อมูลการศึกษาจำนวนมากที่ศึกษาในด้านความสำคัญทางคลินิกของเชื้อล้วนแล้วแต่ให้ผลการศึกษาที่มีไม่สอดคล้องกัน ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น การพบเชื้อบลาสโตซิสติสได้ทั้งในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงและผู้ที่มีอาการในระบบทางเดินอาหาร อาการต่างๆที่พบนั้นมีความรุนแรงไม่มากและแสดงอาการที่ไม่จำเพาะเจาะจง สายพันธุ์ของเชื้อที่แตกต่างกันทำให้เกิดความผิดปกติต่อเซลล์ของโฮสต์ที่แตกต่างกัน รวมทั้งการไม่สามารถหาแบบจำลองที่เหมาะสมเพื่อศึกษาพยาธิชีววิทยาของเชื้อได้ เป็นต้น (11) แต่จากการรวบรวมข้อมูลทางคลินิกจำนวนมากทำให้เชื่อว่าเชื้อบลาสโตซิสติสมีความสามารถที่จะทำให้เกิดโรคในผู้ติดเชื้อได้ อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถหาข้อสรุปได้อย่างแน่ชัดในปัจจุบัน (10)

4.1. อาการของผู้ติดเชื้อบลาสโตซิสติส

ผู้ที่ติดเชื้อบลาสโตซิสติสส่วนใหญ่มักไม่ปรากฏอาการแสดงที่ชัดเจน แม้จะพบข้อมูลการติดเชื้อบลาสโตซิสติสจำนวนมากทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ที่มีอาการทางคลินิก โดยตรวจไม่พบเชื้อก่อโรคชนิดอื่นก็ตาม (155) โดยทั่วไปอาการที่ตรวจพบจะแตกต่างกัน อาการส่วนใหญ่ที่พบคือ ท้องเสียและปวดท้อง (11, 12) และอาการที่ไม่จำเพาะอื่นๆ ได้แก่ ท้องอืด เบื่ออาหาร น้ำหนักลด คลื่นไส้ อาเจียน ท้องผูก ซึ่งอาการเหล่านี้ อาจเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อบลาสโตซิสติส (12) รวมทั้งอาจทำให้เกิดอาการของโรคลำไส้ทำงานแปรปรวน ซึ่งทำให้เกิดอาการปวดท้องร่วมกับมีอาการท้องเสียหรือท้องผูก (47, 156) ในขณะที่บางข้อมูลการศึกษาพบผู้ป่วยเกิดอาการกระเพาะและลำไส้อักเสบ

เฉียบพลันโดยมีสาเหตุจากการติดเชื้อบลาสโตซิสติส รวมทั้งการเกิดอาการที่รุนแรงในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องอย่างรุนแรงมีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อบลาสโตซิสติสอีกด้วย (13) โดยสรุปแล้วความรุนแรงของอาการจากการติดเชื้อบลาสโตซิสติสมีตั้งแต่เกิดอาการท้องเสียไม่รุนแรงและเรื้อรังไปจนถึงโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน (11) นอกจากนี้ผู้ติดเชื้อบลาสโตซิสติสบางรายอาจพบอาการในระบบอื่นที่ไม่จำเพาะกับอาการในระบบทางเดินอาหาร เช่น อาการผื่นคัน ลมพิษ เป็นต้น (157-159) ลักษณะอาการทางคลินิกที่ปรากฏภายหลังจากการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในผู้ป่วยแต่ละราย อาจมีความสัมพันธ์กับชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อที่ร่างกายได้รับ รวมทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในสายพันธุ์เดียวกันของเชื้อ (50, 52)

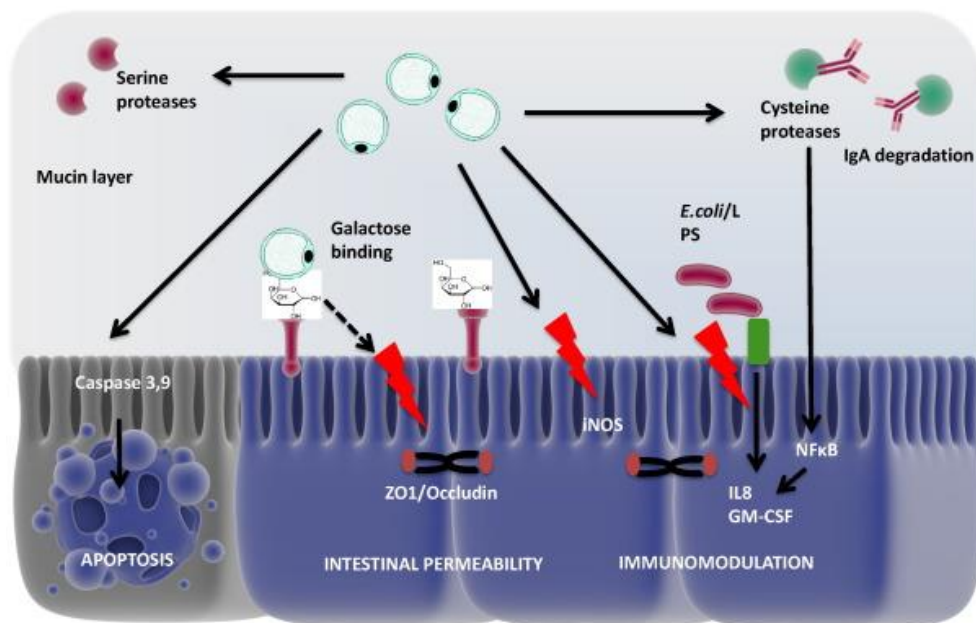
4.2. กลไกการก่อโรคของเชื้อบลาสโตซิสติส

ข้อมูลการศึกษานับแต่อดีตจนถึงปัจจุบันยังคงมีข้อโต้แย้งกันอย่างมากถึงความสามารถและกลไกในการก่อโรคของเชื้อบลาสโตซิสติส ในอดีตเชื่อว่าเชื้อบลาสโตซิสติสก่อโรคเฉพาะในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเท่านั้น แต่ในปัจจุบันกลับพบว่าเชื้อบลาสโตซิสติสสามารถตรวจพบได้ในคนที่มีร่างกายแข็งแรง โดยเชื้อชนิดนี้อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนที่มีสุขภาพแข็งแรงได้เป็นระยะเวลาช้านานโดยไม่ทำอันตรายใดๆ (129, 160) คนส่วนใหญ่ที่ติดเชื้อบลาสโตซิสติสมักไม่มีข้อบ่งชี้หรือแสดงอาการของการติดเชื้อที่แน่ชัด แต่บ่อยครั้งกลับพบว่าเชื้อบลาสโตซิสติสทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงทั้งในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันปกติและผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าเชื้อชนิดนี้มีความสามารถในการก่อโรค (161, 162) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ ความรุนแรงของการติดเชื้อและระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ นอกจากนี้โฮสต์ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องมีแนวโน้มที่สามารถติดเชื้อบลาสโตซิสติสได้สูงกว่าโฮสต์ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติ เช่น ในผู้ป่วยโรคเอดส์ ผู้ป่วยโรคมะเร็ง เป็นต้น (154, 163) กลุ่มคนดังกล่าว ภายหลังจากที่ร่างกายได้รับเชื้อบลาสโตซิสติสนั้นมักแสดงอาการผิดปกติต่างๆ ที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร เกิดภาวะอุจจาระร่วงเรื้อรัง (164) ข้อมูลการศึกษาการติดเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้สัตว์ทดลอง เช่น หนู ไก่ เพื่อศึกษากลไกการเกิดโรคของเชื้อบลาสโตซิสติสในแต่ละสายพันธุ์นั้น อาจไม่เหมาะสมเนื่องจากสัตว์ทดลองดังกล่าวไม่ใช่โฮสต์โดยธรรมชาติที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในคนได้ (79) การศึกษาในปัจจุบันมุ่งเน้นการศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอาการของโรคและสายพันธุ์ของเชื้อ ซึ่งสิ่งสำคัญที่ต้องนำมาพิจารณาคือ วิธีการตรวจวินิจฉัยและกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา เช่น ภูมิคุ้มกัน

ของแต่ละบุคคล โรคประจำตัว เป็นต้น การศึกษาถึงความสัมพันธ์ดังกล่าวรวมทั้งความรุนแรงในการก่อโรคและการติดเชื้อร่วมกันทั้งคนและสัตว์สามารถช่วยทำให้เกิดความเข้าใจถึงการก่อโรคของเชื้อบลาสโตซิสติสได้ (10)

ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อบลาสโตซิสติสยังไม่เป็นที่แน่ชัด จากข้อมูลการศึกษาทั่วโลกในการก่อโรคของบลาสโตซิสติสพบว่าเชื้อบลาสโตซิสติสจะไม่บุกรุกเข้าสู่เยื่อบุลำไส้ของโฮสต์ ซึ่งได้รับการยืนยันจากการไม่พบพยาธิสภาพในระบบทางเดินอาหารจากการตรวจโดยการส่องกล้อง (endoscopy) ของผู้ที่ติดเชื้อบลาสโตซิสติส (165, 166) รวมทั้งผลจากการตรวจชิ้นเนื้อของสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อบลาสโตซิสติสพบว่าพบเชื้อบลาสโตซิสติสที่บริเวณชั้นเยื่อ mucosa ของผนังด้านในลำไส้ แต่ไม่พบการบุกรุกของเชื้อเข้าสู่ชั้นเยื่อ ผนังบริเวณดังกล่าว (105, 167) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาที่ตรวจชิ้นเนื้อเยื่อลำไส้ของสุกร พบว่าเชื้ออยู่บริเวณใกล้เคียงหรือติดกับเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้โดยไม่มีการแทรกเข้าไปในชั้นเยื่อบุผิวลำไส้ และไม่พบพยาธิสภาพเกิดขึ้น (168, 169) บางข้อมูลการศึกษาพบว่าไม่พบโปรตีนที่สร้างขึ้นจากเชื้อบลาสโตซิสติส โดยโปรตีนเหล่านี้ช่วยในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ของโฮสต์ เช่น โกลโคโปรตีน เลคติน เป็นต้น จึงสันนิษฐานว่าเอนไซม์ไฮโดรเลสที่เชื้อผลิตขึ้นอาจทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงที่ชั้นเยื่อเมือกของลำไส้ใหญ่ (107) และอาจทำให้เกิดการอักเสบและบวม (77) การสร้างเอนไซม์ของเชื้ออาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อสามารถอาศัยอยู่ในลำไส้หรือสามารถทำให้ผู้ได้รับเชื้อบลาสโตซิสติสเกิดอาการทางคลินิกได้ เอนไซม์ดังกล่าว ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส (170, 171)

แบบจำลองพยาธิสภาพเซลล์บุผิวลำไส้ของโฮสต์ที่เกิดจากการติดเชื้อบลาสโตซิสติส ดังแสดงในรูปที่ 7 แสดงให้เห็นว่าเชื้อบลาสโตซิสติสมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านและการต้านทานของเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้ มีผลทำให้เกิดการเพิ่มการผ่านเข้าและออกของสารสู่เซลล์ (intestinal permeability) เช่นเดียวกับสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงร่างของเซลล์ (cytoskeleton rearrangement) และเกิดการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ได้ (apoptosis) (172-175)



รูปที่ 7 แบบจำลองพยาธิสภาพเซลล์บุผิวลำไส้ของโฮสต์จากการติดเชื้อแบคทีเรีย (173)

ข้อมูลการศึกษาการวิเคราะห์จีโนมของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 7 พบว่า เชื้อชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสที่สำคัญ โดยพบว่าส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ซิสเตอินโปรตีเอส (cysteine protease) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์และการกระตุ้นโปรเอนไซม์ของโฮสต์ (107) อีกทั้งยังพบเอนไซม์ชนิดนี้บนผิวเซลล์ของเชื้อซึ่งมีความสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของโฮสต์ได้ (176) จึงสันนิษฐานว่าเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้นนั้นอาจเป็นปัจจัยความรุนแรงที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร (107) และทำให้เกิดโรคลำไส้แปรปรวนได้ (177)

5. การตรวจวินิจฉัย

5.1. การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 7

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยทำสเมียร์อุจจาระด้วยน้ำเกลือ (direct smear) และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (40X) เป็นวิธีที่สะดวกและประหยัดแต่พบว่าการไวของวิธีการทดสอบต่ำ (low sensitivity) และมักให้ผลลบเทียมสูง เนื่องจากถ้ามีเชื้อปริมาณน้อยในอุจจาระอาจทำให้ไม่พบเชื้อได้ (115) นอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยเชื้อทำได้ยากเนื่องจากเชื้อมีรูปร่างหลายแบบและมีขนาดที่แตกต่างกันจึงต้องอาศัยทักษะและความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน

เชื้อระยะ vacuolar form เป็นระยะที่พบได้บ่อยในตัวอย่างอุจจาระซึ่งจะมีลักษณะกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8-10 ไมโครเมตร ภายในแควิวโอลพบนิวเคลียสจำนวน 1-4 นิวเคลียส รายงานการศึกษาจำนวนมากเชื่อมโยงความรุนแรงของโรคกับปริมาณเชื้อบลาสโตซิสติสที่ตรวจพบ กล่าวคือ เมื่อตรวจอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียโดยตรวจไม่พบสาเหตุอื่นๆ แต่พบเชื้อบลาสโตซิสติสจำนวนตั้งแต่ห้าตัวขึ้นไปโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (40X) หรือ 1,000 เท่า (100X) ให้พิจารณาว่าเชื้อนี้เป็นสาเหตุของอาการท้องเสียที่เกิดขึ้น (77) ซึ่งปริมาณของเชื้อที่พบจะมีความสัมพันธ์กับการแสดงอาการของโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบเฉียบพลัน (178, 179) อย่างไรก็ตามพบข้อมูลการศึกษาที่มีผลขัดแย้งจากที่กล่าวมา โดยพบว่าเชื้อบลาสโตซิสติส มีบทบาทในการทำให้โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบเฉียบพลันแต่ไม่กลับพบความสัมพันธ์ระหว่างสถานะของโรคและจำนวนเชื้อบลาสโตซิสติสที่ตรวจพบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (180)

การตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการย้อมสี trichrome พบว่ามีค่าความไวสูงกว่าวิธี direct smear ทั้งนี้เนื่องมาจากการย้อมด้วยสี trichrome ทำให้สามารถเห็นเชื้อได้ชัดเจนยิ่งขึ้นและเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อได้มากขึ้น เชื้อที่ติดสีย้อมจะพบแควิวโอลติดสีแดงและนิวเคลียสติดสีม่วง ค่าความจำเพาะของวิธีนี้ต่ำกว่าวิธี simple smear อีกทั้งรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกันของเชื้อทำให้การวินิจฉัยเชื่อนั้นทำได้ยาก อาจจะวินิจฉัยเชื้อชนิดอื่นหรือส่วนประกอบของอุจจาระเป็นเชื้อบลาสโตซิสติสทำให้ค่าผลบวกเทียมนั้นมีสูงกว่า simple smear สำหรับการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยการย้อมสี trichrome หรือการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองในระยะสั้นๆ นั้น มีความไวของการตรวจสอบที่สูงที่สุด (181)

5.2. การเพาะเลี้ยงเชื้อบลาสโตซิสติสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีการทดสอบมาตรฐานซึ่งเป็นที่ยอมรับ เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัย แต่ไม่เป็นที่นิยมทำในห้องปฏิบัติการทั่วไป การเพาะเลี้ยงเชื้อบลาสโตซิสติสในระยะสั้นทำให้สามารถพบเชื้อบลาสโตซิสติสได้ในอัตราที่สูงกว่าวิธีแรก แต่มีข้อเสียเนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสจากการทำสเมียร์อุจจาระด้วยน้ำเกลือ (182) โดยอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อมีหลายชนิด เช่น Jone's media, axenic's media เป็นต้น (183) การเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้โดยนำตัวอย่างอุจจาระมาทำการเพาะเลี้ยงใน Jones medium ที่เพิ่มซีรัม

ของม้าในอาหารเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (181) ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อมีความไวของวิธีการตรวจมากกว่าการตรวจหาเชื้อจากการทำสเมียร์อุจจาระด้วยน้ำเกลือและการย้อมสี trichrome (181, 184, 185)

การเพาะเลี้ยงเชื้ออาจมีข้อจำกัดบางประการที่อาจส่งผลต่อการวินิจฉัยที่ผิดพลาดได้ โดยบางสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสที่เจริญเติบโตช้า เช่น เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 7 ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากเดิม ประมาณ 50 ชั่วโมง ถึง 80 ชั่วโมงเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขณะที่เชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 4 ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากเดิมประมาณ 20 ชั่วโมง ถึง 30 ชั่วโมง (186) การติดเชื้อตั้งแต่สองสายพันธุ์ขึ้นไป ที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตช้าและสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็ว อาจทำให้เกิดการรายงานผลที่ผิดพลาดได้ เนื่องจากในกรณีที่เชื้อเจริญเติบโตช้า การอ่านผลในหลอดเพาะเลี้ยงอาจให้ผลลบลวง และในกรณีที่สองนั้น สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสที่เจริญเติบโตเร็วอาจไปกดการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตช้าทำให้ตรวจพบแค่สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วเพียงสายพันธุ์เดียว ดังนั้นเพื่อความถูกต้องและลดข้อจำกัดบางประการในการตรวจหาเชื้อและตรวจหาสายพันธุ์เชื้อบลาสโตซิสติส จึงนิยมใช้การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อในตัวอย่างอุจจาระโดยตรง (187)

5.3. การตรวจวินิจฉัยโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือเทคนิคพีซีอาร์ ที่นิยมใช้ในปัจจุบันทำโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติส เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส (55) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส (146) เป็นต้น เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยได้ดี (54) มีความไวในการตรวจวินิจฉัยสูงกว่าการตรวจหาเชื้อโดยการทำสเมียร์อุจจาระด้วยน้ำเกลือและการเพาะเลี้ยงเชื้อ (115, 188) ให้ผลการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อและสามารถลดความผิดพลาดจากการวินิจฉัยจากการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสได้ทั้งในตัวอย่างอุจจาระและตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งเทคนิคนี้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจหาการติดเชื้อพยาธิลำไส้ในมนุษย์และสัตว์ และการใช้เทคนิคพีซีอาร์ยังช่วยในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสได้อีกด้วย

ข้อมูลในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่าการเกิดโรคอาจมีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ของเชื้อแบลสโตซิสติส ดังนั้นนอกจากการตรวจหาเชื้อแบลสโตซิสติสแล้วการตรวจวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดสายพันธุ์ของเชื้อแบลสโตซิสติสเป็นสิ่งที่มีความสำคัญเช่นกัน การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบลสโตซิสติสทำโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ การตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน SSU rDNA ของเชื้อแบลสโตซิสติสจากผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสร่วมกับการเปรียบเทียบชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อที่ปรากฏในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (53-55) และการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยตรงจากการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบลสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1-7 (56)

5.4. การตรวจหาเชื้อแบลสโตซิสติสด้วยเทคนิคอื่นๆ

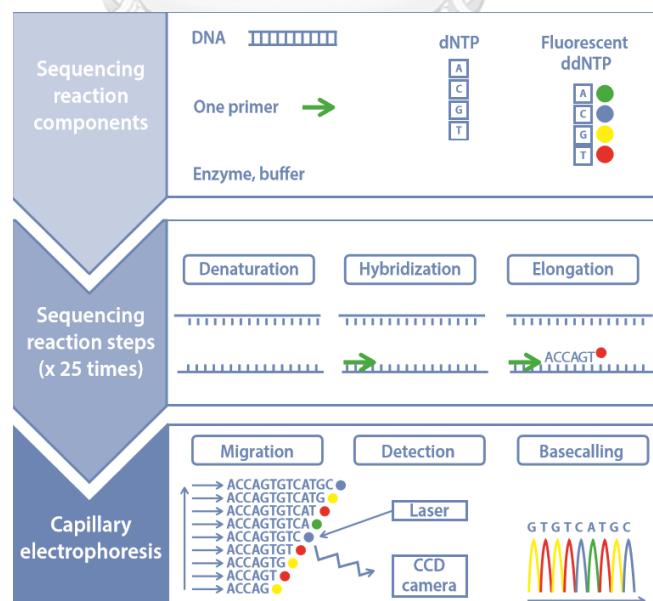
นอกจากการตรวจหาเชื้อแบลสโตซิสติสในตัวอย่างอุจจาระแล้ว ยังสามารถทำได้โดยการทดสอบทางซีโรโลยีโดยการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ แต่มีรายงานการศึกษาไม่มากนักที่ใช้เทคนิคนี้และบางการศึกษาใช้เทคนิค ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดีกับอาการของผู้ติดเชื้อ (189, 190)

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเทคนิคที่ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันเพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่สนใจศึกษา การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์มีหลายวิธีแต่วิธีที่นิยม คือ วิธีที่ใช้หลักการของแซงเกอร์ (Sanger sequencing method) ซึ่งปัจจุบันได้มีการพัฒนามาใช้กับเครื่องอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (Automated DNA sequencing) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเอ็นเอด้วยวิธีแซงเกอร์ ถูกพัฒนาโดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Frederick Sanger ได้พัฒนาเทคนิค dideoxy-chain termination ขึ้นมาในปี ค.ศ. 1977 (191) และถูกนำมาใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ มากมายมาจนถึงปัจจุบัน แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดบางประการ เช่น ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน วิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละไม่มาก ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เป็นต้น (192) ความสามารถในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในปัจจุบัน

ถูกพัฒนาไปอย่างมาก ซึ่งการใช้วิธีแซงเกอร์ร่วมกับ capillary gel electrophoresis มีความสามารถวิเคราะห์ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สูงถึง 1,000 คู่เบส (193)

เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในสารพันธุกรรมที่ได้จากตัวอย่างของผู้ป่วยหรือกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา เทคโนโลยีนี้มีความเที่ยงตรงแม่นยำ มีประสิทธิภาพสูงถือเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการอ้างอิงการตรวจวิเคราะห์ทางอณูพันธุศาสตร์ จากรูปที่ 8 แสดงขั้นตอนการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ABI รุ่น 3730XL (Thermo Scientific, USA) ซึ่งใช้หลักการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีแซงเกอร์ที่ใช้ dye terminator ทำโดยติดฉลาก dideoxynucleotide triphosphate (ddNTP) ทั้ง 4 ชนิดคือ ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP ด้วยสารเรืองแสงที่มีสีแตกต่างกัน ddNTP เหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอสั้นใหม่ขณะทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ซึ่งไม่สามารถเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอไรต์เหมือนกับ dNTP ปกติ จึงยุติการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปเคลื่อนที่ผ่านเจลด้วยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี ทำให้เกิดแถบสีของสารเรืองแสงเรียงกันตามความยาวนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะถูกรวบรวมด้วยเครื่องรับสัญญาณแสงและแปลงเป็นสัญญาณดิจิทัลส่งไปวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์



รูปที่ 8 ขั้นตอนการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีแซงเกอร์โดยใช้ BigDye® terminators (194)

7. ปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติส

รายงานการศึกษาจำนวนมากพบว่าปัจจัยที่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติส ได้แก่ อายุ แหล่งของน้ำดื่ม สุขอนามัยส่วนบุคคล (38, 130, 195) จำนวนสมาชิกในครอบครัว (196) ลักษณะชุมชนที่ศึกษาวิจัย (197) รวมทั้งกลุ่มตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา ซึ่งพบว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติส มีดังนี้

1. ผู้ป่วยโรคเอดส์

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีมีอัตราการติดเชื้อปรสิตมากกว่าคนปกติ ซึ่งจากข้อมูลการศึกษาในประเทศเอธิโอเปียพบว่าผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีที่มีปริมาณ CD4+ T lymphocyte ในเลือดน้อยกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตรร่วมกับการไม่ได้รับยาต้านไวรัสมีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (28) ข้อมูลการศึกษาจำนวนมากพบว่ามักจะตรวจพบเชื้อบลาสโตซิสติสจากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยกลุ่มนี้ (29, 198, 199) ซึ่งผู้ป่วยที่ติดเชื้อบลาสโตซิสติสจะพบอาการปวดท้อง ท้องอืด และอาการท้องร่วง (13) โดยตรวจพบเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 มากที่สุดและเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในกลุ่มผู้ป่วยนี้ (164)

2. ผู้ป่วยโรคมะเร็ง

เชื้อบลาสโตซิสติสเป็นหนึ่งในปรสิตที่พบบ่อยที่สุดจากผู้ป่วยโรคมะเร็ง อาการที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ได้แก่ ปวดท้อง ท้องร่วงและท้องอืด (32) มีข้อมูลการศึกษาที่พบว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อบลาสโตซิสติสอย่างผิดปกติในผู้ป่วยลำไส้ดูดตันที่เกิดจากมะเร็ง (200) สอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาที่พบเชื้อบลาสโตซิสติสในของเหลวในช่องท้องของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมีความสัมพันธ์กับการเจาะผนังลำไส้ (201)

3. เด็ก

เด็กหรือผู้ที่มีอายุน้อยมีความไวสูงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติส (149, 184, 202) ซึ่งอุบัติการณ์ของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสสูงทั้งในเด็กที่มีภูมิคุ้มกันปกติและเด็กที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (203)

4. ผู้ที่มีการสัมผัสกับสัตว์และผลิตภัณฑ์ของสัตว์

ความชุกของเชื้อบลาสโตซิสติสสูงในกลุ่มคนที่ประกอบอาชีพเกี่ยวกับการใช้สัตว์และมีการสัมผัสสัตว์ เช่น กิจกรรมต่างๆในการดูแลสัตว์และการให้อาหารสัตว์ (187, 204, 205) จึงสันนิษฐานว่าเชื้อบลาสโตซิสติสเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดการติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ (11, 111) สอดคล้องกับข้อมูลการสำรวจทางระบาดวิทยาล่าสุดที่พบว่าการสัมผัสกับสุกรและสัตว์ปีกทำให้เกิดการติดเชือบลาสโตซิสติสได้เช่นกัน (12)

นอกเหนือจากกลุ่มตัวอย่างดังกล่าวมาข้างต้น ยังพบการติดเชือบลาสโตซิสติสในกลุ่มของผู้ที่ภาวะภูมิคุ้มกันผิดปกติจากโรคเรื้อรังโดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวาน จากข้อมูลการศึกษาโดย Mohtashamipour และคณะ ตรวจหาการติดเชื้อพยาธิลำไส้และศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อพยาธิในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผลการศึกษาพบว่าพบการติดเชื้อพยาธิลำไส้สูงในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและปัจจัยของการมีโรคเบาหวานทำให้เกิดการติดเชื้อพยาธิที่สูงขึ้นโดยเฉพาะเชื้อบลาสโตซิสติส (206) รวมทั้งยังพบการเกิดอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้เช่นกัน (207) นับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันพบว่าการศึกษาคความชุกของการติดเชือบลาสโตซิสติสรวมทั้งปัจจัยที่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวานยังพบการรายงานการศึกษาน้อยมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาการติดเชือดังกล่าวในผู้ป่วยโรคเบาหวานในประเทศไทย ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างดังกล่าวโดยผู้วิจัยได้อธิบายเรื่องของโรคเบาหวานเบื้องต้นในหัวข้อลำดับถัดไป

8. โรคเบาหวาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โรคเบาหวานเป็นกลุ่มของโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติในการเผาผลาญสารอาหาร ซึ่งโรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่รักษาไม่หายขาด เกิดจากการที่ร่างกายมีระดับน้ำตาลในกระแสเลือดสูงเป็นเวลานาน อันเนื่องมาจากความผิดปกติในการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน (abnormal insulin-secretion) หรือความสามารถในการตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลินในเนื้อเยื่อเป้าหมายลดลง (insulin resistance) หรือทั้งสองประการ ทำให้มีผลต่อกระบวนการเผาผลาญอาหารจำพวกแป้ง โปรตีนและไขมันในร่างกาย เป็นผลทำให้ร่างกายมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ ซึ่งโดยปกติร่างกายมีการผลิตฮอร์โมนอินซูลินจากเบต้าเซลล์ (β -cell) ในไอส์เลตส์ ออฟ แลงเกอร์ฮาน (islets of langerhans) ของตับอ่อน ฮอร์โมนอินซูลินมีหน้าที่ในการนำน้ำตาลกลูโคสจาก

กระแสเลือดเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆทั่วร่างกาย ถ้าขาดฮอร์โมนอินซูลินหรือมีการทำงานของเซลล์ที่ผิดปกติ ทำให้มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลินลดลง มีผลให้น้ำตาลกลูโคสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ทำให้เกิดน้ำตาลสะสมในกระแสเลือดและเกิดภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดสูง (hyperglycemia) หรือโรคเบาหวานตามมา เมื่อมีระดับน้ำตาลในกระแสเลือดสูงเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดความผิดปกติต่อโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะต่างๆ เช่น ตา ไต เส้นประสาท หลอดเลือดและหัวใจ มีโอกาสเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น การอุดตันของเส้นเลือดที่ไปเลี้ยงเส้นประสาทส่วนปลายทำให้เกิดอาการชาและการติดเชื้อง่าย มีอาการตามัวไปจนถึงตาบอดได้ การทำงานของไตลดลงจนไปถึงเป็นโรคไตระยะสุดท้าย เป็นต้น (208)

8.1. ประเภทของโรคเบาหวาน

โรคเบาหวาน แบ่งเป็น 4 ชนิดตามสาเหตุของการเกิดโรค (208, 209) ดังนี้

1. โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) โรคเบาหวานชนิดนี้พบประมาณร้อยละ 5-10 ในผู้ป่วยโรคเบาหวานทั้งหมด โรคเบาหวานชนิดนี้พบได้น้อยแต่มีความรุนแรงสูง ซึ่งแต่เดิมจะเรียกว่า “โรคเบาหวานชนิดที่ต้องรักษาด้วยฮอร์โมนอินซูลิน” (Insulin-dependent diabetes mellitus) โรคเบาหวานชนิดนี้ส่วนใหญ่พบในผู้ที่มีอายุน้อย สาเหตุของโรคเบาหวานชนิดนี้แบ่งเป็นสองประเภทคือ

1.1. โรคเบาหวานที่เกิดจากภูมิคุ้มกันร่างกาย (Immune-mediated diabetes) พบว่าเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของโรคเบาหวานชนิดที่ 1 จากการศึกษาพบว่า เป็นผลมาจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไปทำลายกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่าเบต้าเซลล์ในตับอ่อน เรียกว่าภาวะภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง (autoimmune) โดยสร้างสารภูมิต้านทานต่อตัวเอง (autoantibody) ขึ้นมาทำลายเบต้าเซลล์ จึงทำให้ตับอ่อนผลิตฮอร์โมนอินซูลินได้น้อยหรือไม่สามารถผลิตฮอร์โมนอินซูลินได้ ทำให้น้ำตาลกลูโคสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ ดังนั้นการรักษาผู้ป่วยในกลุ่มนี้จึงใช้วิธีการฉีดฮอร์โมนอินซูลินทดแทนการสร้างฮอร์โมนอินซูลินจากตับอ่อนเพื่อควบคุมระดับน้ำตาลให้ปกติ ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการสามารถพบสารภูมิต้านทานต่อตัวเองได้แก่ Islet cell autoantibodies, Insulin-autoantibodies, GAD65, Tyrosine phosphatase IA-2 and IA-2 β autoantibodies เป็นต้น ซึ่งมักจะพบสารภูมิต้านทานต่อตัวเองเหล่านี้ประมาณ 80-95% จากการตรวจวัดระดับน้ำตาลในครั้งแรกๆของการตรวจผู้ป่วยโรคเบาหวานในกลุ่มนี้ อัตราการทำลายเบต้าเซลล์ในตับอ่อน

จะรวดเร็วในผู้ป่วยที่เป็นเด็กทารกและเด็ก แต่มีอัตราการทำลายซ้ำในผู้ป่วยที่เป็นผู้ใหญ่ การทำลายเบต้าเซลล์ในตับอ่อนดังที่กล่าวมานั้นเกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางพันธุกรรมและปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่ไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัด และโรคเบาหวานชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับ HLA DQA DQB ซึ่งการตรวจพบ autoantibody ต่างๆในญาติพี่น้องของผู้ป่วย แต่ยังไม่เกิดภาวะเบาหวาน สามารถพยากรณ์การเกิดโรคในบุคคลนั้นๆว่ามีโอกาสเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ได้ (210) ในบางกรณีผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 อาจจะพบร่วมกับโรคภูมิคุ้มกันผิดปกติชนิดอื่นๆ เช่น Graves' s disease, Hashimoto's thyroiditis, Addison's disease, vitiligo, celiac sprue, autoimmune hepatitis, myasthenia gravis, pernicious anemia เป็นต้น

1.2. โรคเบาหวานไม่ทราบสาเหตุ (Idiopathic diabetes) คือกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะเหมือน autoimmune type 1 diabetes แต่ไม่ได้พบภาวะภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติดังกล่าวข้างต้น ผู้ป่วยมีระดับฮอร์โมนอินซูลินต่ำแบบถาวรและมักจะพบภาวะเลือดเป็นกรดจากเบาหวาน ผู้ป่วยในกลุ่มนี้พบได้ในกลุ่มประชากรในทวีปเอเชียและแอฟริกา ซึ่งโรคเบาหวานชนิดนี้จะไม่มีความสัมพันธ์กับ HLA ชนิดต่างๆ

2. โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) โรคเบาหวานชนิดนี้พบประมาณร้อยละ 90-95 ของผู้ป่วยโรคเบาหวานทั้งหมด ซึ่งแต่เดิมจะเรียกว่า “โรคเบาหวานชนิดที่ไม่ต้องรักษาด้วยฮอร์โมนอินซูลิน” (Non-insulin-dependent diabetes mellitus) โรคเบาหวานชนิดนี้มักเกิดในผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 40 ปีขึ้นไป แต่ในปัจจุบันพบผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มากขึ้นในวัยเด็กและวัยรุ่น โรคเบาหวานชนิดนี้พบมากขึ้นในหญิงที่มีประวัติการเป็นเบาหวานขณะตั้งครรภ์และพบได้ในผู้ที่มีความดันโลหิตสูงเช่นกัน ซึ่งโรคเบาหวานชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมมากกว่าโรคเบาหวานชนิดที่ 1 เนื่องจากร่างกายของผู้ป่วยมีการผลิตฮอร์โมนอินซูลินปกติ แต่มีความผิดปกติที่เซลล์ต่างๆของร่างกายมีความสามารถต่อการตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลินลดลงหรือที่เรียกว่า “ภาวะดื้อต่อฮอร์โมนอินซูลิน” ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดยังคงสูง จึงเป็นความแตกต่างจากลักษณะของโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ถ้าไม่ได้รับการรักษาจะทำให้เกิดความผิดปกติของเบต้าเซลล์ตามมาและไม่สามารถสร้างฮอร์โมนอินซูลินได้เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายได้ การผลิตฮอร์โมนอินซูลินที่ไม่เพียงพอและการเกิดภาวะดื้อต่อฮอร์โมนอินซูลินในผู้ป่วยนั้นยังไม่ทราบถึงสาเหตุที่จำเพาะเจาะจงอย่างแน่ชัด ทั้งนี้พบว่าผู้ป่วย

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 มีความเชื่อมโยงกับภาวะโรคอ้วน ซึ่งอีกปัจจัยที่นำไปสู่สาเหตุของการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 นี้ โรคเบาหวานชนิดนี้มักไม่ได้รับการวินิจฉัยเป็นเวลาหลายปี อันเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในกระแสเลือดแบบค่อยเป็นค่อยไปและไม่มีอาการแสดงที่เด่นชัด ในระยะแรกที่จะทำให้ผู้ป่วยสังเกตความผิดปกติเกี่ยวกับโรคเบาหวานและมักจะไม่พบภาวะเลือดเป็นกรดจากเบาหวานในผู้ป่วยกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามผู้ป่วยดังกล่าวมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นในการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคหลอดเลือดสมอง โดยที่ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดนี้จะพบมากเมื่อมีอายุสูงขึ้น มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ความอ้วน และการขาดการออกกำลังกาย (208)

3. โรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์ (gestational diabetes mellitus, GDM) พบในผู้หญิงที่กำลังตั้งครรภ์โดยที่ประวัติก่อนหน้านี้ไม่พบว่ามีอาการของโรคเบาหวาน แต่ขณะตั้งครรภ์พบว่า มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงยาวนานและต่อเนื่อง โดยมีโอกาสที่จะพัฒนาไปเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (211) ผู้หญิงที่กำลังตั้งครรภ์ที่มีอายุตั้งแต่ 40 ปี ขึ้นไป มีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวาน ปัจจุบันโรคเบาหวานกลุ่มนี้ตรวจพบประมาณ 1 ใน 6 ของผู้หญิงที่กำลังตั้งครรภ์ ซึ่งโรคเบาหวานในผู้หญิงที่กำลังตั้งครรภ์นี้มีสาเหตุจากการสร้างฮอร์โมนอินซูลินไม่เพียงพอ หรืออาจมีสาเหตุจากการไม่ตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินเหมือนในกรณีโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งอาจเป็นผลอันเนื่องมาจากฮอร์โมนหลายชนิดที่สร้างจากรกเป็นตัวยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนอินซูลิน ทำให้มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนลดลง (212) โรคเบาหวานในผู้หญิงที่กำลังตั้งครรภ์มีผลต่อทั้งแม่และเด็ก ระดับน้ำตาลในเลือดสูงนั้นส่งผลให้เกิดภาวะโรคแทรกซ้อน เช่น ภาวะความดันโลหิตสูงระหว่างการคลอด เด็กทารกตัวโตและมีโอกาสเกิดความพิการตั้งแต่กำเนิด และส่งผลต่อพัฒนาการของสมองทารกอีกด้วย โดยทั้งแม่และเด็กมีโอกาสสูงที่จะพัฒนาเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในอนาคต (213)

4. โรคเบาหวานที่มีสาเหตุจำเพาะอื่นๆ (Other specific types of diabetes mellitus) สาเหตุของการเกิดโรคเบาหวานชนิดนี้ (208) ได้แก่

4.1. โรคเบาหวานที่เกิดจากความผิดปกติของสารพันธุกรรมที่ควบคุมการทำงานของเบต้าเซลล์ คือ Maturity-onset diabetes in the young (MODY) หลากหลายรูปแบบและความผิดปกติของ mitochondrial DNA

4.2. โรคเบาหวานที่เกิดจากความผิดปกติบนสายพันธุกรรมที่ควบคุมการทำงานของฮอร์โมนอินซูลิน เช่น Type A insulin resistance, Leprechaunism, Lipoatrophic diabetes เป็นต้น

4.3. โรคเบาหวานที่เกิดจากโรคของตับอ่อน เช่น โรคตับอ่อนอักเสบเรื้อรัง การตัดตับอ่อน เนื่องจากตับอ่อน โรคซิสติกไฟโบรซิส (cystic fibrosis)

4.4. โรคเบาหวานที่เกิดจากโรคของระบบต่อมไร้ท่อ เช่น acromegaly, Cushing syndrome, hyperthyroidism, glucagonoma

4.5. โรคเบาหวานที่เกิดจากได้รับยาหรือสารเคมีบางชนิด เช่น pentamidine, glucocorticoids, phenytoin, gamma-interferon, nicotinic acid, diazoxide

4.6. โรคเบาหวานที่พบร่วมกับกลุ่มอาการต่างๆ เช่น Down syndrome, Turner syndrome, Klinefelter syndrome, Huntington chorea, myotonic dystrophy, porphyria

8.2. อาการของโรคเบาหวาน

อาการที่เด่นชัดที่พบในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 คือ มีอาการปัสสาวะบ่อย (polyuria) กระหายน้ำ (polydipsia) ตื่นน้ำมาก อ่อนเพลีย น้ำหนักลด อาจเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและรุนแรง ซึ่งบางกรณีพบภาวะเลือดเป็นกรดจากสารคีโตน (ketoacidosis) เป็นอาการแสดงแรกของโรค หรือมีการดำเนินโรคช้าๆจากระดับน้ำตาลที่สูงปานกลางแล้วเกิดภาวะเลือดเป็นกรดจากสารคีโตน เมื่อมีการติดเชื้ออื่น ๆ ร่วมด้วยหรือสิ่งกระตุ้นชนิดอื่น ซึ่งมักจะพบการดำเนินโรคในกรณีหลังนี้ ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 โดยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 นั้นอาการแสดงจะไม่ปรากฏอย่างเด่นชัด ในระยะเริ่มแรก (208, 209) ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จำนวนประมาณ 1 ใน 3 ถึงครึ่งหนึ่งไม่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานเนื่องจากผู้ป่วยไม่แสดงอาการของโรคเป็นเวลานานหลายปี ส่งผลทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรังและเกิดภาวะแทรกซ้อนตามมา ผู้ป่วยบางรายได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานก็ต่อเมื่อภาวะแทรกซ้อนได้เกิดขึ้นแล้ว เช่น มีแผลที่เท้า เกิดความผิดปกติในการมองเห็น เกิดการติดเชื้อ หรือเกิดภาวะไตวาย (59)

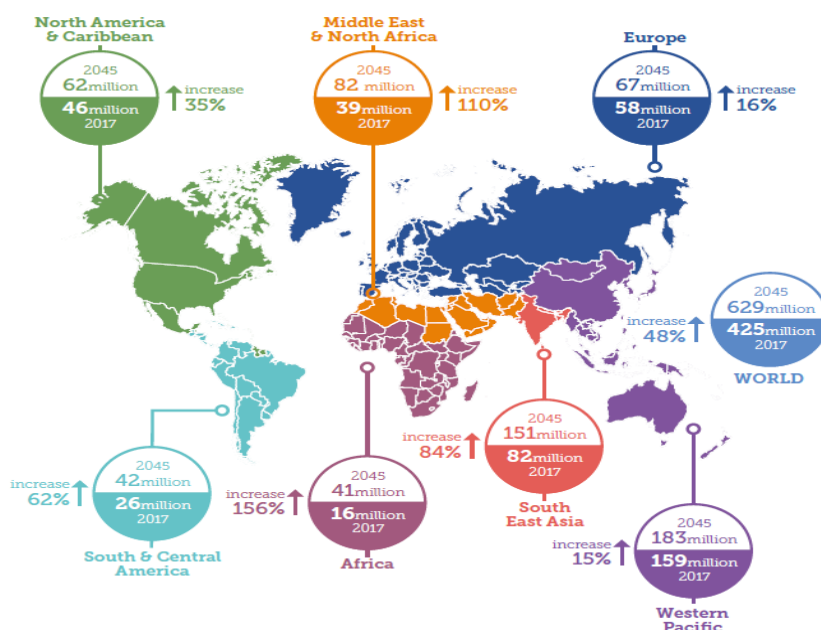
8.3. ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวาน

ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 1 นั้นยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด แต่เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าโรคเบาหวานชนิดที่ 1 เป็นผลมาจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนและปัจจัยสิ่งแวดล้อม แม้จะไม่สามารถบอกถึงปัจจัยเฉพาะเหล่านั้นที่ทำให้พบผู้ป่วยจำนวนมากก็ตาม สำหรับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางพันธุกรรม การเผาผลาญสารอาหาร เชื้อชาติ ประวัติครอบครัวที่มีญาติเป็นเบาหวาน การเป็นเบาหวานขณะตั้งครรภ์ก่อนหน้านี้ อายุที่มากขึ้น น้ำหนักตัวเกินและโรคอ้วน การรับประทานอาหารที่ทำให้สุขภาพเสีย การไม่ออกกำลังกาย และการสูบบุหรี่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของไขมันส่วนเกิน แต่เมื่อพิจารณาจากหลักฐานต่างๆ ในปัจจุบันสามารถสรุปได้ว่า อาหารและกิจกรรมทางกายของแต่ละบุคคลสามารถก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดนี้มากที่สุด ภาวะน้ำหนักเกินและโรคอ้วนร่วมกับการไม่ออกกำลังกายนั้นเป็นสาเหตุหลักของภาวะโรคเบาหวานทั่วโลก (214) ค่าดัชนีมวลกาย (body mass index) มีความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เช่นกัน โดยพบว่ามีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละกลุ่มประชากร (215) เช่น การตรวจพบโรคเบาหวานในกลุ่มคนที่มีดัชนีมวลกายต่ำแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตรงกันข้ามกับกลุ่มประชากรแถบยุโรปที่สามารถตรวจพบโรคเบาหวานได้ในคนที่มีดัชนีมวลกายสูงกว่า (216) สำหรับปัจจัยความเสี่ยงของการเกิดโรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์ ได้แก่ อายุที่มากขึ้น ภาวะน้ำหนักเกินไปในระหว่างตั้งครรภ์ ประวัติครอบครัวที่มีญาติเป็นเบาหวาน ประวัติทารกในครรภ์เสียชีวิตและการคลอดทารกที่มีความผิดปกติ การตรวจพบกลูโคสในปัสสาวะขณะตั้งครรภ์ ผู้ที่เป็นโรคเบาหวานก่อนการตั้งครรภ์รวมทั้งขณะตั้งครรภ์มักมีความเสี่ยงที่จะทำให้ทารกที่คลอดออกมาเกิดโรคอ้วนและก่อให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ในอนาคต (217)

8.4. ระบาดวิทยาของโรคเบาหวาน

สถานการณ์โรคเบาหวานทั่วโลกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากรายงานสถานการณ์โรคเบาหวานทั่วโลกขององค์การอนามัยโลก พบผู้ป่วยโรคเบาหวานเสียชีวิต 2.2 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2012 และในปี ค.ศ. 2014 พบผู้ป่วยโรคเบาหวานประมาณ 422 ล้านคน อีกทั้งพบว่าทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตก่อนวัยอันควร โดยเฉลี่ยเสียชีวิตก่อนอายุ 70 ปีในประเทศที่มีรายได้ต่ำและปานกลาง (59) ในปี ค.ศ. 2017 พบผู้เสียชีวิตด้วยโรคเบาหวานจำนวน 5 ล้านคนโดยอยู่ในช่วงอายุระหว่าง 20 ปีถึง 79 ปี และมีจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานทั่วโลกประมาณ 451 ล้าน หรือคิดเป็นร้อยละ 8.4 ของจำนวนประชากรทั่วโลก ซึ่งอยู่ในช่วงอายุระหว่าง 18 ปี ถึง 99 ปี และคาดว่าจะพบ

ผู้ป่วยโรคเบาหวานเพิ่มจำนวนเป็น 693 ล้านคนในปี ค.ศ. 2045 หรือคิดเป็นร้อยละ 9.9 ของจำนวนประชากรทั่วโลก (218) สำหรับสถานการณ์โรคเบาหวานในภาคพื้นแปซิฟิก ในปี พ.ศ. 2560 ประเทศไทยมีจำนวนผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน 4.4 ล้านคน มากเป็นอันดับ 4 รองจาก จีน อินเดีย ญี่ปุ่น (219)



รูปที่ 9 ความชุกของโรคเบาหวานในประชากรทวีปต่างๆ ปี ค.ศ. 2017 และปี ค.ศ. 2045 (220)

จากข้อมูลรายงานการสำรวจสุขภาพของประชาชนไทยโดยการตรวจร่างกายครั้งที่ 5 ในปี พ.ศ. 2557 ของสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข สำรวจความชุกของโรคเบาหวานในประชากรอายุตั้งแต่ 15 ปี ขึ้นไป พบว่าความชุกของโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 6.9 หรือ 3.3 ล้านคน ในปี พ.ศ. 2552 เป็นร้อยละ 8.9 หรือ 4.8 ล้านคน ใน พ.ศ. 2557 โดยความชุกของโรคเบาหวานในผู้หญิงสูงกว่าผู้ชาย ความชุกของโรคเบาหวานในผู้ชายเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 6 ในปี 2552 เป็นร้อยละ 7.8 ในปี 2557 ส่วนในผู้หญิงความชุกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 7.7 เป็นร้อยละ 9.8 ตามลำดับ และความชุกเพิ่มขึ้นตามอายุจากร้อยละ 2.1 ในกลุ่มอายุ 15-29 ปี โดยพบความชุกเพิ่มขึ้นสูงสุดในกลุ่มอายุ 60-69 ปี เท่ากับร้อยละ 19.2 การกระจายความชุกของโรคเบาหวานในแต่ละภาค พบว่ามีความแตกต่างระหว่างเพศโดยในผู้หญิงพบความชุกสูงสุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ร้อยละ 11.7) รองลงมาคือ ภาคกลาง (ร้อยละ 10.8) ภาคเหนือ ภาคใต้และกรุงเทพฯ ตามลำดับ

ส่วนในผู้ชายพบความชุกสูงสุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ร้อยละ 9 รองลงมาคือ ภาคกลาง (ร้อยละ 8.5) ภาคเหนือ กรุงเทพฯ และภาคใต้ ตามลำดับ (58)

8.5. ความสำคัญทางคลินิก

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก เนื่องจากเป็นสาเหตุให้เกิดโรคแทรกซ้อนซึ่งมีอันตรายถึงชีวิตและมีความรุนแรงมากขึ้นในปัจจุบัน ภาวะเบาหวานมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของร่างกายอย่างมาก ยิ่งถ้าผู้ป่วยเบาหวานไม่ได้รับการควบคุมเป็นระยะเวลานาน จะมีผลต่อการทำงานของร่างกายและเกิดโรคแทรกซ้อนเรื้อรังได้ ภาวะแทรกซ้อนเฉียบพลันมีส่วนสำคัญต่อการสูญเสียชีวิต ค่ารักษาพยาบาลและส่งผลให้คุณภาพชีวิตไม่ดี ภาวะแทรกซ้อนเฉียบพลันก่อให้เกิดอันตรายแก่ชีวิตได้ เช่น ภาวะกรดคั่งในเลือดจากสารคีโตนในโรคเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 ภาวะโคม่าจากน้ำตาลในเลือดสูง (hyperosmolar glycemc syndrome) ในโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดต่ำผิดปกติ (hypoglycemia) สามารถเกิดขึ้นได้ในเบาหวานทุกชนิดอาจทำให้เกิดอาการชักหรือหมดสติ โดยมีสาเหตุจากการไม่ได้รับประทานอาหารหรือออกกำลังกายมากกว่าปกติหรือได้รับยาต้านโรคเบาหวานสูงเกินไป เมื่อเวลาผ่านไปโรคเบาหวานสามารถทำลายหัวใจ หลอดเลือด ตา ไตและเส้นประสาทและเพิ่มความเสี่ยงของโรคหัวใจและโรคหลอดเลือดสมอง ความเสียหายดังกล่าวอาจส่งผลให้การไหลเวียนของเลือดลดลงซึ่งรวมกับความเสียหายของเส้นประสาทส่วนปลายที่เท้า ทำให้เพิ่มโอกาสของการเป็นแผลที่เท้าและการติดเชื้อจนในที่สุดอาจต้องตัดขา เบาหวานขึ้นจอประสาทตาเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ตาบอดได้ซึ่งเกิดขึ้นจากการเพิ่มขึ้นของหลอดเลือดขนาดเล็กที่มีความผิดปกติในจอประสาทตา อีกทั้งโรคเบาหวานเป็นสาเหตุสำคัญของภาวะไตวาย (59) โรคเบาหวานที่ไม่มีการควบคุมในขณะตั้งครรภ์สามารถส่งผลกระทบต่อทั้งแม่และเด็ก โดยเพิ่มความเสี่ยงของการสูญเสียของทารกในครรภ์ ความผิดปกติของทารกภายหลังคลอด การเสียชีวิตของทารกภายหลังคลอด (221)

การเปลี่ยนแปลงวิถีการเผาผลาญสารอาหาร (metabolic pathway) อันเนื่องจากการมีระดับน้ำตาลที่สูงนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในร่างกายที่มีผลต่อเนื่องและเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานโดยสรุปได้ ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงการทำงานของวิถีโพลีออล (polyol pathway) ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงส่งผลให้เนื้อเยื่อต่างๆมีปริมาณกลูโคสสูงขึ้นด้วย เนื่องจากกลูโคส

สามารถเข้าสู่เซลล์เหล่านี้ได้โดยไม่ต้องอาศัยฮอร์โมนอินซูลิน เช่น ที่เลนส์ตา เนื้อเยื่อประสาท ส่วนปลายของกรวยไต ทำให้กลูโคสถูกรีดิวซ์เป็นซอร์บิทอลซึ่งอนุพันธ์รูปนี้ไม่สามารถผ่านออกจากเซลล์ได้ ทำให้เกิดการสะสมของซอร์บิทอลจนมีผลให้เกิดแรงดันออสโมซิสสูง โดยเฉพาะในเลนส์ตา เป็นผลให้เกิดต้อกระจก (cataract) ที่เลนส์ตาได้ นอกจากนี้ในวิถีโพลีออลจำเป็นต้องใช้ NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) ร่วมกับอัลโดสรีดักเทส (aldose reductase) ในการเปลี่ยนจากกลูโคสเป็นซอร์บิทอล ทำให้ขาด NADPH ซึ่งจำเป็นต้องใช้ในการเปลี่ยนกลูตาไทโอนูรีดิวซ์ (oxidized glutathione: GSSG) เป็นรูปรีดิวซ์ (reduced glutathione: GSH) โดยอาศัยเอนไซม์กลูตาไทโอนูรีดักเทส (glutathione reductase) ทำให้ในร่างกายมีปริมาณ GSH ลดลง ซึ่งความสำคัญของ GSH ถือเป็นหนึ่งในสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญภายในเซลล์ มีหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของชีวโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ โดยเฉพาะในเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นการลดลงของระดับของ GSH ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน จึงมีผลให้เซลล์เพิ่มความเสียหายต่อสารอนุมูลอิสระมากขึ้น (222)

2. การเพิ่มผลลัพธ์จากปฏิกิริยาไกลเคชัน (glycation) ปฏิกิริยาไกลเคชันเป็นปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสกับโปรตีนหรือไขมันทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้เกิดการสะสมของผลลัพธ์ปฏิกิริยาไกลเคชัน (advanced glycation end products: AGEs) ซึ่งเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ และเชื่อมโยงกับภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน โดย AGEs มีคุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพที่เป็นอันตรายต่อเซลล์หลายชนิด โดยมักจะจับอยู่บนคอลลาเจนและมีการเปลี่ยนแปลงคอลลาเจนบริเวณนั้น เช่น บริเวณผนังหลอดเลือด ทำให้ผนังหลอดเลือดหนาขึ้น นอกจากนี้ AGEs ยังกระตุ้นตัวรับสำหรับ AGEs (AGE receptor: RAGE) ซึ่งพบบริเวณพื้นผิวของเซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์ผนังหลอดเลือด (endothelial cell) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) เซลล์ประสาท (neuron) โมโนไซต์ (monocyte) แมคโครฟาจ (macrophage) รวมทั้งอวัยวะปริทันต์ (periodontium) ซึ่งปฏิกิริยาระหว่าง AGEs และ RAGE นี้เป็นผลทำให้เซลล์นั้นมีโครงสร้างหรือการทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงไปดังนี้

a) AGEs ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ ซึ่งโดยปกติโปรตีนนี้มีความสำคัญในการควบคุมการถอดรหัสของยีน (gene transcription)

b) AGEs สามารถแพร่ออกจากเซลล์และเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของสารประกอบระหว่างเซลล์ (extracellular matrix) ที่อยู่ใกล้ๆทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณระหว่างเมทริกซ์และเซลล์มีผลให้เกิดการทำหน้าที่ผิดปกติของเซลล์ (cellular dysfunction)

c) AGEs สามารถแพร่ออกจากเซลล์และเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเลือด เช่น อัลบูมิน จนสามารถจับกับ RAGE ที่พื้นผิวของเซลล์และกระตุ้นการสร้างสารก่อการอักเสบ (inflammatory cytokines) และสารกระตุ้นการเจริญ (growth factor) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดพยาธิวิทยาของระบบหลอดเลือด (223)

d) หลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) ทั้งชนิดท่อเลือดแดงและหลอดเลือดแดง เนื่องจากผลของ AGEs ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนในผนังหลอดเลือด ทำให้ผนังหลอดเลือดหนาและแข็งตัว (224)

e) เซลล์ถูกทำลายได้ง่ายด้วยกระบวนการอักเสบเรื้อรัง เนื่องจาก AGEs จับกับ RAGE ที่อยู่บนมาโครฟาจและโมโนไซต์ที่มีผลกระตุ้นการสร้างสารก่อการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 (Interleukin-1) และทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา (TNF- α), อินเตอร์ลิวคิน-ซิกซ์ (Interleukin-6) และแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (matrix metalloproteinase) (225)

3. การกระตุ้นโปรตีนไคเนสซี (protein kinase C: PKC) ภายในเซลล์ ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงทำให้เกิดกระบวนการสลายกลูโคส เกิดการสังเคราะห์โมเลกุลที่เรียกว่า ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol: DAG) ซึ่งสามารถกระตุ้นโปรตีนไคเนสซีซึ่งเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตของกระบวนการทางชีวโมเลกุลในการสร้างสารกระตุ้นการเจริญต่างๆ เช่น วาสคูลาร์เอ็นโดทีเลียลโกรทแฟกเตอร์ (vascular endothelial growth factor : VEGF) ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติไปและเกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) กระตุ้นการสร้างทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์เบตา (TGF- β) ทำให้มีการไหลเวียนของเลือดผิดปกติเกิดการอุดตันของหลอดเลือด (vascular occlusion) (226)

4. ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกรบกวน เนื่องจากผนังหลอดเลือดหนาและแข็งตัวทำให้เกิดความล้มเหลวในการส่งผ่านระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งชนิดฟั้งเซลล์ (cellular) และในสารน้ำ (humoral) (227) นอกจากนี้ระดับน้ำตาลที่สูงยังมีผลลดการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ทั้งในด้านการเคลื่อนที่ (chemotaxis), การยึดเกาะ (adherence),

การกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) และความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) ทำให้มีการติดเชื้อง่ายและแผลหายช้า (228, 229)

5. การติดเชื้อแบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria infection) สูงขึ้น เนื่องจากผนังหลอดเลือดแข็งตัวลดการส่งผ่านออกซิเจนทางหลอดเลือดและมีการสร้างไกลโคฮีโมโกลบิน (glycohemoglobin) ชนิด HbA1c ซึ่งทำให้มีประสิทธิภาพในการส่งผ่านออกซิเจนน้อยกว่าฮีโมโกลบินปกติ (230)

8.6. ความสัมพันธ์ของโรคเบาหวานต่อการติดเชื้อชนิดต่างๆ

ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อในระบบต่างๆของร่างกายรวมทั้งทำให้เกิดความรุนแรงของการติดเชื้อที่เพิ่มมากขึ้น (34, 231) การติดเชื้อเหล่านั้น ได้แก่ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะที่เกิดจากเชื้อ *Escherichia coli* โรคปอดบวมและภาวะติดเชื้อที่ผิวหนังหรือเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Streptococcus* sp. การติดเชื้อราที่ผิวหนังที่เกิดจากเชื้อ *Candida* เป็นต้น (232) ซึ่งจะพบว่าเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุของการติดเชื้อส่วนใหญ่ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อวัณโรคมากกว่าคนที่ไม่เป็นเบาหวานสามเท่า (233) และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตอันเนื่องมาจากการรักษาวัณโรคที่ไม่ได้ผลในผู้ป่วยโรคเบาหวาน อีกทั้งผู้ป่วยโรคเบาหวานมีความเสี่ยงสูงมากกว่าคนปกติถึงสิบสองเท่าต่อการเป็นโรคเมลิออยโดซิส ซึ่งโรคนี้เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิด *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งพบว่าผู้ป่วยโรคเมลิออยโดซิสมากกว่าครึ่งหนึ่งนั้นเป็นผู้ที่มีประวัติเป็นโรคเบาหวาน การศึกษาจำนวนมากได้แสดงความสัมพันธ์ของภาวะเบาหวานต่อการเพิ่มความเสี่ยงในการติดเชื้อและทำให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *M. tuberculosis* และ *B. pseudomallei* ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตภายในเซลล์ของผู้ติดเชื้อ (intracellular bacteria) การติดเชื้อดังกล่าวส่งผลทำให้เกิดการทำงานที่ผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีหน้าที่จับกินเชื้อโรค รวมถึงส่งผลต่อความผิดปกติในการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดทีลิมโฟไซต์ ทำให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีความไวสูงต่อการติดเชื้อก่อโรคอื่นๆตามมา (234) (235) อย่างไรก็ตามการติดเชื้อที่พบได้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานไม่ได้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว อาจมีสาเหตุจากเชื้อก่อโรคอื่นๆนอกเหนือจากกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียดังที่กล่าวข้างต้น เช่น เชื้อไวรัส เชื้อรา เชื้อปรสิตหนองพยาธิ เป็นต้น

โปรโตซัวและหนอนพยาธิจัดเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (236) การศึกษาการติดเชื้อพยาธิในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานพบว่า ผู้ที่เป็นโรคเบาหวานมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดการติดเชื้อพยาธิชนิดต่างๆ เช่น โรคลิชมาเนีย เกิดจากการติดเชื้อชนิด obligate intracellular protozoa ที่เรียกว่า ลิชมาเนีย (*Leishmania* sp.) (237, 238) บางการศึกษาพบความชุกการติดเชื้อพยาธิในผู้ป่วยโรคเบาหวานสูงถึงร้อยละ 18.7 โดยพบว่ามี การติดเชื้อพยาธิไส้เดือน พยาธิปากขอ ที่สูงอย่างมีนัยสำคัญ (71) ในขณะที่การศึกษาการติดเชื้อโปรโตซัวนั้นพบว่า ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีการติดเชื้อ *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* สูงกว่าผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคเบาหวาน (72) การศึกษาความสัมพันธ์ของโรคเบาหวานและโรคมาลาเรียในประเทศแถบแอฟริกาพบว่า ผู้ที่เป็นโรคเบาหวานจะเพิ่มความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อมาลาเรียชนิดพาลัสซึม (*Plasmodium falciparum*) ซึ่งโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้มีความรุนแรงของโรคสูงและทำให้เสียชีวิตได้ (239) และพบว่า ผู้ที่เป็นโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงมีอัตราการตายและความรุนแรงของโรคสูงถ้าผู้ป่วยนั้นมีโรคเบาหวานร่วมด้วย (240) การศึกษาในประเทศลาวพบความสัมพันธ์ระหว่างโรคเบาหวานและการติดเชื้อพยาธิ โดยพบว่ามี การติดเชื้อ *Opisthorchis viverrini* ในปริมาณที่สูงในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวาน (241) เช่นเดียวกับผลการศึกษาที่ศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อโปรโตซัวที่สำคัญผู้ป่วยโรคเบาหวาน คือ เชื้อบลาสโตซิสติส โดยสันนิษฐานว่าอาจทำให้เกิดการติดเชื้อแบบฉวยโอกาส (opportunistic infection) ในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำหรือภูมิคุ้มกันบกพร่อง เมื่อกลุ่มคนดังกล่าวได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะก่อให้เกิดอาการระงว (206, 207) ซึ่งในปัจจุบันการติดเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้ในคนมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นโดยเป็นผลมาจากเชื้อบลาสโตซิสติสมีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปในหลายทวีปที่สำคัญทั่วโลก (242)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี วัสดุทางวิทยาศาสตร์

สารเคมี วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย

สารเคมีและวัสดุทางวิทยาศาสตร์สำหรับตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสในอุจจาระ ประกอบด้วย กระปุกพลาสติกสำหรับเก็บอุจจาระ 0.9% normal saline และน้ำยาไอโอดีนจากห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

สารเคมีและวัสดุทางวิทยาศาสตร์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างอุจจาระประกอบด้วย ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp® Fast DNA stool Mini Kit ผลิตภัณฑ์บริษัท QIAGEN จำกัด ประเทศเยอรมนี หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Eppendorf จำกัด ประเทศไทย

สารเคมีและวัสดุทางวิทยาศาสตร์สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ประกอบด้วย ไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด ประเทศไทย ไพรมเมอร์จากบริษัท Bio Basic จำกัด ประเทศแคนาดา หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร บริษัท Eppendorf จำกัด ประเทศไทย

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ประกอบด้วยวุ้น agarose ผลิตภัณฑ์บริษัท SERVA จำกัด ประเทศเยอรมนี น้ำยา Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer ผลิตภัณฑ์ของบริษัท First Base ประเทศสิงคโปร์ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด ประเทศไทย

2. เครื่องมือ

เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) บริษัท Scientific Industries จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Heat block) บริษัท Robbins Scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง (Micro high speed refrigerate centrifuge) บริษัท Eppendorf จำกัด ประเทศเยอรมนี เครื่องปั่นตกตะกอน บริษัท Gibthai จำกัด ประเทศไทย เครื่อง Thermo cycler บริษัท MJ Research จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา และเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส (Gel electrophoresis) บริษัท Biorad จำกัด ประเทศไทย

3. การออกแบบงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (cross-sectional study) ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 โดยเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบจำเพาะเจาะจงคือ ผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ทำการศึกษาความชุกและสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสในผู้ป่วยโรคเบาหวานเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน รวมทั้งศึกษาปัจจัยที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติส

4. วิธีการทดลอง

4.1. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นตัวอย่างอุจจาระที่ได้จากผู้เข้าร่วมวิจัยที่ยินยอมให้ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างอุจจาระและเก็บข้อมูลจากแบบสอบถาม โดยมีรายละเอียดต่อไปนี้

4.1.1. การคำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

การคำนวณจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในการศึกษานี้ อ้างอิงจากรายงานการศึกษาของปาละสุวรรณและคณะที่ได้ทำการศึกษาความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสของผู้ที่อาศัยอยู่ริมแม่น้ำเจ้าพระยา ในเขตพื้นที่อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยาในช่วงระหว่างเดือนกันยายน ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 พบความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสร้อยละ 5.9 (41) ในขณะที่เดียวกันกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ ผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน การกำหนดขนาดของกลุ่มตัวอย่างมีด้วยกันหลากหลายวิธีแต่เนื่องจากไม่ทราบขนาดจำนวนประชากรที่แน่นอนในพื้นที่ทำการศึกษา แต่ทราบสัดส่วนของผู้ที่ติดเชื้อบลาสโตซิสติสจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา

ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ผู้วิจัยเลือกใช้การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างโดยใช้สูตรของคอกแรน (243) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่ความคลาดเคลื่อน $\pm 5\%$ ดังนี้

$$n = \frac{P(1-P)Z^2}{d^2}$$

n แทนขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการ

P แทนสัดส่วนการติดเชื้อบลาสโตซิสติสจากรายงานที่ผ่านมา (0.59)

Z แทนระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 มีค่า Z เท่ากับ 1.96

d แทนระดับความคลาดเคลื่อนที่ยอมให้เกิดขึ้นได้ (0.05)

แทนค่าในสูตร

$$n = (0.59) (1-0.59) (1.96)^2 / (0.05)^2$$

$$n = (0.2419) (3.8416) / (0.0025)$$

$$n = 372$$

ดังนั้นจะได้ขนาดของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดเท่ากับ 372 คน โดยแบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคเบาหวานและไม่เป็นโรคเบาหวาน กลุ่มละ 186 คน

4.1.2. เกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional Study) เพื่อความสอดคล้องกับวัตถุประสงค์การวิจัย ผู้วิจัยเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบจำเพาะเจาะจงคือ ผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ในการคัดเลือกอาสาสมัครทั้งสองกลุ่มเพื่อเข้าร่วมโครงการวิจัย ผู้วิจัยประชาสัมพันธ์เชิญชวน ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยใช้เกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัยดังนี้

- เกณฑ์คัดเข้าโครงการวิจัย มีดังนี้ เป็นผู้ป่วยโรคเบาหวานและไม่เป็นโรคเบาหวาน เพศชายและเพศหญิงอายุตั้งแต่ 40 ปีขึ้นไป, มีถิ่นที่อยู่อาศัยในเขตอำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา, ไม่มีประวัติเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร, ไม่ได้รับประทาน

ยาถ่ายพยาธิในช่วง 3 เดือนก่อนเริ่มทำการวิจัย, สามารถเก็บอุจจาระได้ปริมาณอย่างน้อย 1 ใน 4 ของกระปุกสำหรับใส่ตัวอย่างอุจจาระ

- เกณฑ์คัดออกโครงการวิจัย ดังนี้ ผู้เข้าร่วมวิจัยต้องการออกจากการศึกษา ในกรณีที่เป็นการถอนตัวของผู้เข้าร่วมวิจัยเอง

4.1.3. การเก็บตัวอย่างอุจจาระและการเก็บข้อมูลจากแบบสอบถาม

การประชาสัมพันธ์โครงการวิจัยให้แก่ผู้มาใช้บริการด้านสุขภาพ ณ หน่วยบริการสาธารณสุข นั้นๆ ได้ทราบถึงรายละเอียดของโครงการวิจัย ได้แก่ ที่มาของงานวิจัย วัตถุประสงค์ ขั้นตอนการปฏิบัติของผู้เข้าร่วมวิจัย การเก็บตัวอย่างอุจจาระ ประโยชน์จากการเข้าร่วมโครงการวิจัย ความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น ให้ผู้สนใจได้ทราบรายละเอียดเพื่อใช้ในการพิจารณาเข้าร่วมงานวิจัยอย่างอิสระ ในกรณีที่มีผู้สนใจเข้าร่วมโครงการวิจัย ผู้เข้าร่วมวิจัยต้องลงนามยินยอมโดยสมัครใจในเอกสารข้อมูลสำหรับผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย และหนังสือแสดงยินยอมเข้าร่วมวิจัย และต้องตอบคำถามจากแบบสอบถาม โดยแบบสอบถามสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัยมีรายละเอียดแบ่งเป็น 4 ส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1 เป็นคำถามแบบเติมคำเกี่ยวกับลักษณะพื้นฐานของผู้เข้าร่วมวิจัย ได้แก่ เพศ อายุ โรคประจำตัวหรือโรคอื่นๆ ระยะเวลาที่เป็นโรคเบาหวาน (สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน)

ส่วนที่ 2 เป็นคำถามแบบเติมคำเกี่ยวกับสถานะทางเศรษฐกิจและสังคม ได้แก่ อาชีพ ระดับการศึกษา

ส่วนที่ 3 เป็นคำถามแบบเลือกตอบและเติมคำ เกี่ยวกับสภาพความเป็นอยู่ และการสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อม ได้แก่ แหล่งน้ำดื่ม ลักษณะส้วมที่ใช้ภายในบ้าน การมีสัตว์เลี้ยง

ส่วนที่ 4 เป็นคำถามแบบเลือกตอบเกี่ยวกับสุขอนามัยส่วนบุคคล ได้แก่ การล้างมือก่อนรับประทานอาหาร การล้างมือภายหลังเข้าห้องส้วม การล้างมือภายหลังสัมผัสสัตว์เลี้ยง การขับถ่ายโดยใช้ส้วม การล้างผักหรือผลไม้สดก่อนรับประทานอาหาร ความบ่อยของการรับประทานอาหารสุกๆดิบๆ

ภายหลังจากที่ผู้เข้าร่วมวิจัยลงนามยินยอมโดยสมัครใจและตอบคำถามจากการสัมภาษณ์ในแบบสอบถามเสร็จสิ้นแล้ว ผู้วิจัยจะมอบชุดอุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างอุจจาระให้กับผู้เข้าร่วมวิจัยจำนวน 1 ชุด เพื่อใช้สำหรับเก็บตัวอย่างอุจจาระจำนวน 1 ครั้ง ประกอบด้วย กระปุกใส่อุจจาระที่มีรหัสผู้เข้าร่วมวิจัย ปากกา ซ้อนพลาสติก ถุงพลาสติก โดยมีขั้นตอนการเก็บอุจจาระดังนี้

- เตรียมชุดอุปกรณ์เก็บอุจจาระ

- เก็บตัวอย่างอุจจาระช่วงเช้าในห้องส้วม โดยใช้ปากกาเขียน วันที่และเวลาที่ถ่ายอุจจาระบนลงฉลากข้างกระปุก จากนั้นนั่งถ่ายอุจจาระให้อุจจาระอยู่ในถุงพลาสติกเท่านั้น เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

- ใช้ซองพลาสติกตักอุจจาระจากในถุงพลาสติกจำนวน 2 ซอง หรือใส่อุจจาระปริมาณ 1 ใน 4 ของกระปุกอุจจาระ

- นำตัวอย่างอุจจาระมาส่ง ณ จุดรับตัวอย่าง ที่โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล ได้ตั้งแต่เวลา 8.30-10.00 น. ภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากที่ถ่ายอุจจาระ

การขนส่งตัวอย่างอุจจาระ ณ จุดรับตัวอย่าง จากอำเภอบางปะอินถึงห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ทำโดยนำกระปุกเก็บอุจจาระทั้งหมดแช่เย็นในกล่องโฟมที่บรรจุไอซ์แพค

4.2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อบลาสโตซิสติส

ตัวอย่างอุจจาระถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิค direct smear ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งทำการตรวจอุจจาระภายในระยะเวลา 4-6 ชั่วโมงโดยนับตั้งแต่เริ่มเก็บตัวอย่างอุจจาระ ส่วนที่สองแบ่งอุจจาระใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 2 มิลลิลิตร ปริมาณ 2-3 หัวไม้ขีดไฟแล้วเก็บหลอด microcentrifuge ที่บรรจุตัวอย่างอุจจาระไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในลำดับถัดไป

4.2.1. การตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิค direct smear ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำตัวอย่างอุจจาระตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยวิธี simple smear โดยทำการหยดน้ำเกลือ 0.9% ลงบนกระจกสไลด์ประมาณ 1 หยด ใช้ไม้เขี่ยอุจจาระประมาณเท่าหัวไม้ขีดไฟนำมาป้ายลงในน้ำยาแล้วผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่าและ 400 เท่า ตามลำดับ ตรวจนับและรายงานผลเป็น cell(s)/high field

4.2.2 การตรวจหายีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติส

การตรวจหายีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติสในการวิจัยครั้งนี้ใช้เทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรสสองเทคนิคประกอบด้วยเทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR

โดย primer ที่ใช้ในการวิเคราะห์ยีนที่ควบคุมการสร้าง small subunit ribosomal RNA ของเชื้อ
 บลาสโตซิสติส อธิบายในตารางที่ 2 โดยแสดงรายละเอียดของ primer ทั้งหมดที่ใช้ในการวิจัยนี้

ตารางที่ 2 รายละเอียด primer ที่ใช้ในเทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR

เทคนิค	ชื่อ primer	ลำดับเบส (5'-3')	PCR product size (คู่เบส)	ที่มา
Conventional PCR	RD5 BhRDr	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT GAGCTTTTTAACTGCAACAACG	600	(55)
Nested PCR 1 st reaction	RD3 RD5	GGGATCCTGATCCTCCGAGGTTACCTAC GGAAGCTTATCTGGTTGATCCTGCCAGTA	1,800	(108, 146)
2 nd reaction	Forward primer Reverse primer	GGAGGTAGTGAC AATAAATC ACTAGGAATTCCTCGTTCATG	1,100	

a. การสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างอุจจาระ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอุจจาระโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp® Fast DNA stool-Mini Kit ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยมีขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ดังนี้

- นำหลอด microcentrifuge ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่บรรจุอุจจาระออกจากตู้แช่แข็ง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที
- ปิเปต proteinase K ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- ปิเปตสาร InhibitEX ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดตัวอย่างอุจจาระ เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1 นาทีหรือจนกว่าตัวอย่างอุจจาระละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- นำหลอดตัวอย่างอบที่กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

- นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดเก็บส่วนน้ำใสปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มี proteinase k
- ปิเปตบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 15 วินาที
- นำหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อบที่กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- นำหลอด microcentrifuge ออกจากกล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นปิเปต เอทานอลแช่เย็นปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำมาเขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 15 วินาที
- ดูดเก็บส่วนน้ำใสปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่ลงในชุด QIAamp spin column จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที
- นำ QIAamp spin column ใส่ลงใน collection tube ชุดใหม่ จากนั้นปิเปต สารละลาย AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที
- นำ QIAamp spin column ใส่ลงใน collection tube ชุดใหม่ จากนั้นปิเปต สารละลาย AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที
- นำ QIAamp spin column ใส่ลงใน collection tube ชุดใหม่ นำไปปั่นตกตะกอน ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที
- นำ QIAamp spin column ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย AE ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
- เก็บหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน SSU rDNA ในขั้นตอนต่อไป

b. การเพิ่มปริมาณยีน SSU rDNA ด้วยเทคนิค conventional PCR

ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน SSU rDNA ของเชื้อออบลาสโตซิสติส ในปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย standard buffer *Taq* reaction

ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร magnesium chloride ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 25 มิลลิโมล ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 16 ไมโครลิตร และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาตร 2 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นหลอดควบคุมลบ และดีเอ็นเอของเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 เป็นหลอดควบคุมบวก ปฏิกริยา conventional-PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาดังต่อไปนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เก็บผลผลิต PCR อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอตรวจสอบผลผลิตในขั้นตอนต่อไป

c. การเพิ่มปริมาณยีน SSU rDNA ด้วยเทคนิค nested PCR

ทำการเพิ่มสารปริมาณพันธุกรรมของยีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติส ในปฏิกริยาช่วงที่ 1 ซึ่งมีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย standard buffer *Taq*-reaction ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร magnesium chloride ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 25 มิลลิโมล ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร forward primer (RD3) และ reverse primer (RD5) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 16 ไมโครลิตร และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาตร 2 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นหลอดควบคุมลบและดีเอ็นเอของเชื้อบลาสโตซิสติส สายพันธุ์ที่ 3 เป็นหลอดควบคุมบวก ปฏิกริยา nested PCR ช่วงที่ 1 เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาดังต่อไปนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

ในปฏิกิริยาช่วงที่ 2 ซึ่งมีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ใช้ส่วนประกอบที่มีปริมาตรของสารเช่นเดียวกับในปฏิกิริยาช่วงที่ 1 ยกเว้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ปฏิกิริยาช่วงที่ 2 คือ ผลผลิต PCR ของปฏิกิริยาในช่วง 1 ปฏิกิริยา nested PCR ช่วงที่ 2 เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาดังต่อไปนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บผลผลิต PCR อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอตรวจสอบผลผลิตในขั้นตอนต่อไป

d. การตรวจสอบผลผลิตจากเทคนิค conventional PCR และ nested PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยนำผลผลิตที่ได้จากแต่ละปฏิกิริยา PCR ทั้งสองเทคนิค ปริมาตร 4 ไมโครลิตรผสมกับ nucleic acid dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตรก่อนนำไปเคลื่อนผ่านบนกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้แผ่น agarose ที่มีความเข้มข้น 1.5% ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาทีสำหรับผลผลิตจากปฏิกิริยา conventional PCR และเวลา 45 นาทีสำหรับผลผลิตจากปฏิกิริยา nested PCR จากนั้นนำแผ่น agarose ไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที และแช่ไว้ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที นำวุ้นไปตรวจสอบผลผลิตโดยใช้เครื่อง UV transilluminator สังเกตแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบ

4.3. การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน SSU rDNA ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของ SSU rDNA จากผลผลิตปฏิกิริยา PCR โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ ABI รุ่น 3730XL (Thermo Scientific, USA) โดยบริษัท Bio Basic จำกัด ประเทศสิงคโปร์

4.4. การวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยโปรแกรม BLAST

ข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิต PCR นำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม BioEdit (version 7.2.5) โดยนำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในแต่ละตัวอย่างในรูปแบบ

ของ FASTA format มาใช้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อบลาสโตซิสติสที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI ที่ปรากฏในเวปไซด์ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> โดยใช้โปรแกรมคำสั่ง BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ซึ่งจะแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างว่า มีความเหมือนหรือใกล้เคียงกันมากที่สุดกับเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ใดในฐานข้อมูล ซึ่งพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ของความเหมือนในการจำแนกสายพันธุ์ (% identities)

4.5. การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ข้อมูลลำดับเบสของเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

นำข้อมูลลำดับเบสของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสและข้อมูลลำดับเบสอ้างอิง (reference sequence) จากฐานข้อมูล Genbank database มาจัดเรียงลำดับสายดีเอ็นเอ (multiple alignment of DNA sequences) ในโปรแกรม Bioedit โดยใช้คำสั่ง ClustalW เมื่อทำการจัดเรียงสายดีเอ็นเอทั้งหมดเสร็จเรียบร้อยแล้ว นำสายดีเอ็นเอทั้งหมดมาสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA 6 โดยมีขั้นตอนดังนี้ ลำดับแรกต้องหาแบบจำลอง (model) ที่เหมาะสมกับข้อมูลลำดับเบสของตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับเชื้อบลาสโตซิสติสในการศึกษานี้ โดยใช้วิธี Maximum likelihood ซึ่งใช้คำสั่ง Find best DNA/Protein model ของโปรแกรม MEGA 6 เมื่อได้แบบจำลองที่เหมาะสมแล้ว จะนำไปวิเคราะห์หาแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการต่อไป โดยใช้คำสั่งในโปรแกรมนี้เช่นเดียวกัน เมื่อทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการเสร็จแล้วจะต้องมีการตรึงรากแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการโดยส่วนของรากต้นไม้อาจใช้สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียง (outgroup) กับสิ่งที่นำมาศึกษา ในการศึกษานี้ใช้ outgroup สองชนิด โดยเลือกมาจากสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงทิศทางพันธุกรรมกับเชื้อบลาสโตซิสติส ได้แก่ *Karotomorpha* sp. และ *Proteromonas lacertae* มาเป็นจุดในการตรึงราก ซึ่งจะทำให้เกิดการกำหนดทิศทางให้กับลักษณะของข้อมูลลำดับเบสแต่ละสายดีเอ็นเอภายในกลุ่มที่ต้องการศึกษา

การประเมินแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการด้วยวิธีบูทสเตร็ป (bootstrap) อาศัยหลักการปรับเปลี่ยนข้อมูลการจัดเรียงลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่ทำซ้ำกัน โดยในการศึกษานี้ทำการประมวลผลของบูทสเตร็ปจำนวน 1,000 ครั้ง แล้วนำมาวิเคราะห์หาความสอดคล้องหรือความ

เหมือนร่วมกันโดยแสดงค่าเป็นร้อยละ ถ้ามีค่าใกล้เคียงร้อยละ 100 จะสามารถมั่นใจได้ว่ากิ่งหรือ clade นั้นน่าจะเกิดขึ้นจริงตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ถูกต้อง

4.6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS version 22.0 โดยใช้สถิติเชิงพรรณาในการแจกแจงข้อมูลเพื่อหาค่าร้อยละของความชุกและชนิดสายพันธุ์ของการติดเชื้อบลาสโตซิสติส รวมทั้งข้อมูลลักษณะพื้นฐานและข้อมูลด้านสุขอนามัยของผู้เข้าร่วมวิจัยจากแบบสอบถาม การทดสอบไคสแควร์ (Chi-square test) ใช้เพื่อประเมินความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติส การทดสอบ odds ratio และ 95% Confidence Interval (95% CI) ใช้เพื่อวิเคราะห์หาอัตราเสี่ยงสัมพัทธ์ของปัจจัยแต่ละด้านต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสของผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา



บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างอุจจาระทั้งหมดจำนวน 230 ตัวอย่าง เก็บได้จากผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ที่เข้ารับบริการสุขภาพ ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล 7 แห่ง อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยาในช่วงเดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2562 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 แบ่งเป็นตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้จากผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน จำนวน 130 และ 100 ตัวอย่าง ตามลำดับ

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างอุจจาระที่ใช้ในการศึกษา แต่ละโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล

โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.)	จำนวนอุจจาระ (ตัวอย่าง)	ร้อยละ
รพ.สต. คลองเปรม	16	7
รพ.สต. คู้งลาน	21	9.1
รพ.สต. ตลิ่งชัน	21	9.1
รพ.สต. บางประแดง	22	9.6
รพ.สต. วัดยม	45	19.6
รพ.สต. ขนอนหลวง	50	21.7
รพ.สต. ขนอนเหนือ	55	23.9
รวม	230	100

2. ผลการตรวจวินิจฉัยเช็อบลาสโตซิสติส

ตัวอย่างอุจจาระจำนวน 230 ตัวอย่าง ที่เก็บได้จากผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน นำมาตรวจหาเช็อบลาสโตซิสติสจาก 3 วิธี คือ การตรวจหาเชื้อโดยใช้เทคนิค

direct smear ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การตรวจหา SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้เทคนิค conventional PCR การตรวจหา SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้เทคนิค nested PCR ซึ่งได้ผลการตรวจดังนี้

2.1. ผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิค direct smear

การตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสในตัวอย่างอุจจาระด้วยเทคนิค direct smear ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำโดยผู้วิจัยซึ่งได้รับการตรวจยืนยันจากเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ผลการศึกษาพบเชื้อบลาสโตซิสติสทั้งหมด 9 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสร้อยละ 3.9 จากจำนวนตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด 230 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเชื้อบลาสโตซิสติสที่พบในผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.1 และผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานจำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5 ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง อีกทั้งพบการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อบลาสโตซิสติสและโปรโตซัวชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Entamoeba coli* ระยะ cyst และ *Endolimax nana* ระยะ cyst เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบเชื้อโปรโตซัว *Giardia intestinalis* ในผู้ป่วยโรคเบาหวานเพศหญิงจำนวน 1 ตัวอย่าง ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสในตัวอย่างอุจจาระด้วยเทคนิค direct smear

กลุ่มตัวอย่าง	เพศ	ผลการตรวจพบเชื้อบลาสโตซิสติส (%)		จำนวน (%)
		ตรวจไม่พบเชื้อ	ตรวจพบเชื้อ	
ผู้ป่วยโรคเบาหวาน	ชาย	43 (33.1%)	0 (0%)	43 (33.1%)
	หญิง*	83 (63.8%)	4 (3.1%)	87 (66.9%)
	รวม	126 (96.9%)	4 (3.1%)	130 (100%)
ผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน	ชาย	31 (31%)	3 (3%)	34 (34%)
	หญิง**	64 (64%)	2 (2%)	66 (66%)
	รวม	95 (95%)	5 (5%)	100 (100%)
รวม		221 (96.1%)	9 (3.9%)	230 (100%)

*พบเชื้อ *Giardia intestinalis* ในผู้ป่วยโรคเบาหวานเพศหญิง จำนวน 1 ราย

**พบการติดเชื้อร่วมกันของ *Blastocystis* sp. และ *Entamoeba coli* และ *Endolimax nana* ในผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานเพศหญิง จำนวน 1 ราย

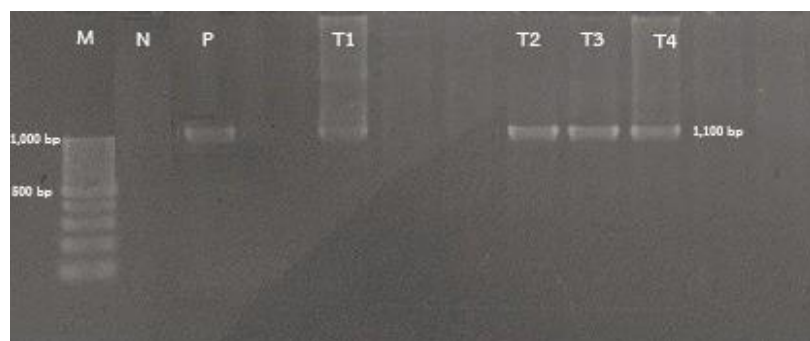
2.2. ผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสโดยการตรวจหายีน SSU rDNA

ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างอุจจาระ ดีเอ็นเอของเชื้อบลาสโตซิสติส สายพันธุ์ที่ 3 สำหรับควบคุมผลบวก และน้ำกลั่นสำหรับควบคุมผลลบ ถูกนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน SSU rDNA ด้วยเทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR ดังที่อธิบายในบทวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 4.2.2. (c) นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา conventional PCR มาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis บนแผ่น agarose ที่มีความเข้มข้น 1.5% ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส รูปที่ 10 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายของ 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ใช้ตรวจสอบผลผลิต conventional PCR M คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส N คือแถวของตัวควบคุมลบที่เป็นน้ำกลั่นโดยไม่พบแถบดีเอ็นเอ P คือแถวตัวควบคุมบวกที่เป็นดีเอ็นเอของเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 พบแถบดีเอ็นเอของยีน SSU rDNA ขนาด 600 คู่เบส T1 คือแถวของดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โดยพบแถบดีเอ็นเอของยีน SSU rDNA ขนาด 600 คู่เบส



รูปที่ 10 การตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา conventional PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน SSU rDNA บน 1.5% agarose gel electrophoresis

รูปที่ 11 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายของ 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ใช้ตรวจสอบผลผลิต nested PCR M คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส N คือแถวของตัวควบคุมลบที่เป็นน้ำกลั่นโดยไม่พบแถบดีเอ็นเอ P คือแถวตัวควบคุมบวกเป็นดีเอ็นเอของเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 พบแถบดีเอ็นเอของยีน SSU rDNA ขนาด 1,100 คู่เบส ในขณะที่ T1-T4 คือแถวดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โดยพบแถบดีเอ็นเอของยีน SSU rDNA ขนาด 1,100 คู่เบส



รูปที่ 11 การตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา nested PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน SSU rDNA บน 1.5% agarose gel electrophoresis

เทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR สามารถตรวจหายีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติสในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานได้จากผลการทดสอบของทั้งสองเทคนิคในการศึกษานี้พบว่า การตรวจหายีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้เทคนิค nested PCR พบจำนวนผู้ติดเชื้อมากกว่าการใช้เทคนิค conventional PCR สำหรับผลของความชุกของการติดเชื้อและสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสมีดังนี้

1. ความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติส

ผลการตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR พบเชื้อบลาสโตซิสติสจำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อร้อยละ 8.7 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 230 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 14 ตัวอย่างและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อร้อยละ 10.8 และร้อยละ 6 ตามลำดับ ในขณะที่ผลการตรวจด้วยเทคนิค nested PCR พบเชื้อบลาสโตซิสติสจำนวนทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อร้อยละ 10.9 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 230 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 16 ตัวอย่างและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสร้อยละ 12.3 และร้อยละ 9 ตามลำดับ ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 5 และตารางที่ 6 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ผลการตรวจหายีน SSU rDNA ของเชื้อแบคทีเรียโศซิสติสขนาด 600 คู่เบส ด้วยเทคนิค conventional PCR

กลุ่มตัวอย่าง	ผลการตรวจหายีน SSU rDNA		จำนวนตัวอย่าง (%)
	จำนวนตัวอย่างที่มีผลตรวจเป็น ผลลบ (%)	จำนวนตัวอย่างที่มีผลตรวจเป็น ผลบวก (%)	
ผู้ป่วยโรคเบาหวาน	116 (89.2%)	14 (10.8%)	130 (100%)
ผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน	94 (94%)	6 (6%)	100 (100%)
รวม	210 (91.3%)	20 (8.7%)	230 (100%)

ตารางที่ 6 ผลการตรวจหายีน SSU rDNA ของเชื้อแบคทีเรียโศซิสติสขนาด 1,100 คู่เบส ด้วยเทคนิค nested PCR

กลุ่มตัวอย่าง	ผลการตรวจหายีน SSU rDNA		จำนวนตัวอย่าง (%)
	จำนวนตัวอย่างที่มีผลตรวจเป็น ผลลบ (%)	จำนวนตัวอย่างที่มีผลตรวจเป็น ผลบวก (%)	
ผู้ป่วยโรคเบาหวาน	114 (87.7%)	16 (12.3%)	130 (100%)
ผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน	91 (91%)	9 (9%)	100 (100%)
รวม	205 (89.1%)	25 (10.9%)	230 (100%)

การตรวจหายีน SSU rDNA ของเชื้อแบคทีเรียโศซิสติสจากดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างอุจจาระ โดยใช้เทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR ให้ผลการตรวจที่แตกต่างกัน กล่าวคือ จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 25 ตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจเป็นผลบวกโดยใช้เทคนิค nested PCR แต่ให้ผลการตรวจเป็นผลบวกทั้งหมด 20 ตัวอย่างเมื่อใช้เทคนิค conventional PCR ซึ่งพบว่ามีจำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่างให้ผลการตรวจเป็นผลลบ แต่เมื่อนำตัวอย่างเดียวกันนั้นมาตรวจหายีน SSU rDNA ด้วยเทคนิค nested PCR พบว่าตัวอย่างเหล่านั้นมีผลการตรวจเป็นผลบวก

กล่าวโดยสรุป การตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสในตัวอย่างอุจจาระของผู้เข้าร่วมวิจัยในการศึกษานี้ทำโดย 3 วิธีประกอบด้วย การตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิค direct smear ภายใต้วัยกล้องจุลทรรศน์ วิธีที่สองโดยการตรวจหาเชื้อโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิค conventional PCR และวิธีที่สามคือเทคนิค nested PCR ผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสในการศึกษานี้แสดงใน ตารางที่ 7 โดยผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิค direct smear ภายใต้วัยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อบลาสโตซิสติสทั้งหมด 9 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อร้อยละ 3.9 การตรวจหายีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้เทคนิค conventional PCR พบเชื้อบลาสโตซิสติสทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อร้อยละ 8.7 และการตรวจหายีน SSU rDNA โดยใช้เทคนิค nested PCR พบเชื้อบลาสโตซิสติสทั้งหมด 25 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อร้อยละ 10.9 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 230 ตัวอย่าง ในขณะที่พบการติดเชื้อบลาสโตซิสติสร่วมกับการติดเชื้อโปรโตซัวชนิดอื่นๆ จำนวน 1 ตัวอย่างจากการตรวจหาเชื้อภายใต้วัยกล้องจุลทรรศน์ การตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR ให้ผลการทดสอบที่แตกต่างกัน 5 ตัวอย่าง

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิค direct smear เทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR (n=230)

วิธีการตรวจ	ผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติส	จำนวน	ร้อยละ
Direct smear	ผลลบ	221	96.1
	ผลบวก (<i>Blastocystis</i> sp.)	8	3.5
	ผลบวก (<i>Blastocystis</i> sp. + <i>E. coli</i> + <i>E. Nana</i>)	1	0.4
Conventional PCR	ผลลบ	210	91.3
	ผลบวก	20	8.7
Nested PCR	ผลลบ	205	89.1
	ผลบวก	25	10.9

2. สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติส

เมื่อนำผลการตรวจวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสที่ได้ภายหลังจากการส่งผลผลิตปฏิกิริยา conventional PCR และ nested PCR ที่เป็นผลบวก ตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Bio Basic จำกัด ประเทศสิงคโปร์ มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม BioEdit และนำข้อมูลลำดับเบสของเชื้อบลาสโตซิสติสในการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อบลาสโตซิสติสที่มีรายงานการตรวจพบแล้วในฐานข้อมูล Genbank database โดยใช้โปรแกรม BLAST เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติส พบว่าการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิตปฏิกิริยา conventional PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง และการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสผลผลิตปฏิกิริยา nested PCR ขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ข้อมูลลำดับเบสของทุกตัวอย่างจากการศึกษานี้มีความเหมือนกับข้อมูลลำดับเบสของสายพันธุ์จากการศึกษาอื่นๆในฐานข้อมูลซึ่งพบค่าความเหมือนที่สูงมากกว่าร้อยละ 98 ซึ่งผลจากการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิค nested PCR พบเชื้อบลาสโตซิสติสทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ 1 จำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24 สายพันธุ์ที่ 3 จำนวน 18 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 72 และสายพันธุ์ที่ 4 คิดเป็นร้อยละ 4 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 25 ตัวอย่าง โดยสายพันธุ์ที่มีความชุกมากที่สุดคือสายพันธุ์ที่ 3 สายพันธุ์ที่ 1 และสายพันธุ์ที่ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 ผลการตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสจากเทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR โดยใช้โปรแกรม BLAST

ตัวอย่าง ลำดับที่	ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม BLAST					
	ลำดับเบสจากผลผลิตปฏิกิริยา conventional PCR (600 คู่เบส)			ลำดับเบสจากผลผลิตปฏิกิริยา nested PCR (1,100 คู่เบส)		
	สายพันธุ์	% Identity	Similar GenBank reference sequence	สายพันธุ์	% Identity	Similar GenBank reference sequence
1	3	99.65	MT039545	3	99.53	KT819620
2	1	99.31	MN658579	1	99.44	MH104999
3	1	99.83	MK930362	1	99.44	GU992416

ตัวอย่าง ลำดับที่	ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม BLAST					
	ลำดับเบสจากผลผลิตปฏิกิริยา conventional PCR (600 คู่เบส)			ลำดับเบสจากผลผลิตปฏิกิริยา nested PCR (1,100 คู่เบส)		
	สายพันธุ์	% Identity	Similar GenBank reference sequence	สายพันธุ์	% Identity	Similar GenBank reference sequence
4	1	98.96	MK511790	1	99.5	MH104999
5	3	99.48	MN836837	3	98.52	KT819620
6	3	99.65	MT039545	3	99.44	KT819620
7	3	100	MT039544	3	99.26	KT819620
8	3	99.48	MN836837	3	99.9	MH104993
9	3	99.47	KY019160	3	99.26	KT819622
10	4	98.28	MN526920	4	99.8	MH127499
11	3	99.29	MG905616	3	99.8	MG214877
12	3	99.82	MG905616	3	99.9	MK375226
13	3	99.82	KY610149	3	100	MK375226
14	3	99.82	KY019160	3	99.8	MK375226
15	3	99.65	KY019164	3	99.9	MK375226
16	3	99.81	KX618192	3	99.81	KX618192
17	3	99.81	KT819620	3	99.81	KT819620
18	3	99.46	KY675330	3	99.81	KT819620
19	3	99.65	KY610153	3	99.63	KX618192
20	3	98.79	KY675327	3	99.54	MN914073
21	-	-	-	1	99.07	EU679349
22	-	-	-	3	98.44	KT819620
23	-	-	-	1	98.98	MK801358
24	-	-	-	3	99.17	KT819620
25	-	-	-	1	98.99	MK801358

ตารางที่ 9 การกระจายสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสของผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน และผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน โดยการตรวจด้วยเทคนิค nested PCR และ Sanger sequencing

กลุ่มตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่มีผลตรวจเป็น ผลบวก (%)			จำนวนตัวอย่างที่มีผลตรวจเป็นผลบวก (%)
	สายพันธุ์ที่ 1	สายพันธุ์ที่ 3	สายพันธุ์ที่ 4	
ผู้ป่วยโรคเบาหวาน	4/130 (3%)	12/130	0/130 (0%)	16/130 (12.3%)
ผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน	2/100 (2%)	6/100 (6%)	1/100 (1%)	9/100 (9%)

3. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่เก็บรวบรวมจากแบบสอบถามถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 22.0) ผลของการศึกษามีดังนี้

3.1. ข้อมูลคุณลักษณะพื้นฐานของผู้เข้าร่วมวิจัยและพฤติกรรมด้านสุขอนามัย

การศึกษานี้ประกอบด้วยผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งสิ้นจำนวน 230 คน เป็นเพศชาย 77 คน คิดเป็นร้อยละ 33.5 และเป็นเพศหญิง 153 คน คิดเป็นร้อยละ 66.5 ผู้เข้าร่วมวิจัยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มอายุ 64-73 ปี โดยอายุเฉลี่ยของผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งหมดเท่ากับ 66.77 ปี การศึกษานี้ประกอบด้วยผู้เข้าร่วมวิจัยสองกลุ่มคือ กลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานและกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีจำนวน 130 คน คิดเป็นร้อยละ 56.5 ซึ่งมีระยะเวลาเฉลี่ยของการเป็นโรคเบาหวานในผู้ป่วยกลุ่มนี้เท่ากับ 10.02 ปีและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานมีจำนวน 100 คน คิดเป็นร้อยละ 43.5 ตามลำดับ ผู้เข้าร่วมวิจัยร้อยละ 85.7 ได้รับการศึกษาในระดับชั้นประถมศึกษา จำนวนผู้เข้าร่วมวิจัยมากกว่าครึ่งหนึ่งของทั้งหมดไม่ได้ประกอบอาชีพ ผู้เข้าร่วมวิจัยจำนวนสามในสี่ของทั้งหมดบริโภคน้ำจืดจากน้ำบรรจขวด ในขณะที่ประเภทส้วมที่ใช้ภายในบ้านส่วนใหญ่เป็นแบบ โถชักโครกและผู้เข้าร่วมวิจัยเกินครึ่งหนึ่งของทั้งหมดมีสัตว์เลี้ยง ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลคุณลักษณะพื้นฐานของผู้เข้าร่วมวิจัย (n=230)

ปัจจัย		จำนวน (คน)	ร้อยละ
เพศ	เพศชาย	77	33.5
	เพศหญิง	153	66.5
อายุ	44 - 53 ปี	19	8.3
	54 - 63 ปี	67	29.1
	64 - 73 ปี	85	37
	74 - 83 ปี	50	21.7
	มากกว่า 83 ปี	9	3.9
โรคเบาหวาน	มีโรคเบาหวาน	130	56.5
	ไม่มีโรคเบาหวาน	100	43.5
ระยะเวลาที่เป็นโรคเบาหวาน	น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 ปี	83	63.8
	มากกว่า 10 ปี	47	36.2
ระดับการศึกษา	ไม่ได้รับการศึกษา	7	3
	ระดับชั้นประถมศึกษา	197	85.7
	ระดับชั้นมัธยมศึกษา	23	10
	สูงกว่าระดับชั้นมัธยมศึกษา	3	1.3
อาชีพ	แม่บ้าน/พ่อบ้าน	124	53.9
	รับจ้าง	61	26.5
	ธุรกิจส่วนตัว	37	16.1
	เกษตรกรกรรม	8	3.5
แหล่งของน้ำดื่ม	น้ำดื่มบรรจุขวด	173	75.2
	น้ำประปา	41	17.8
	น้ำบ่อ/น้ำบาดาล	12	5.2
	น้ำฝน	4	1.7
ประเภทของส้วม	ส้วมแบบโถชักโครก	139	60.4
	ส้วมแบบรดน้ำหรือนั่งยอง	91	39.6
การมีสัตว์เลี้ยง	ไม่มีสัตว์เลี้ยง	97	42.2
	มีสัตว์เลี้ยง	133	57.8

ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลคุณลักษณะพื้นฐานของผู้เข้าร่วมวิจัยแยกโดยโรคเบาหวาน

ปัจจัย		จำนวน ผู้ป่วย โรคเบาหวาน (%)	จำนวน ผู้ที่ไม่เป็น โรคเบาหวาน (%)
เพศ	เพศชาย	43 (55.8%)	34 (44.2%)
	เพศหญิง	87 (56.9%)	66 (43.1%)
อายุ	44 - 53 ปี	9 (47.4%)	10 (52.6%)
	54 - 63 ปี	37 (55.2%)	30 (44.8%)
	64 - 73 ปี	51 (60%)	34 (40%)
	74 - 83 ปี	29 (58%)	21 (42%)
	มากกว่า 83 ปี	4 (44.4%)	5 (55.6%)
ระดับการศึกษา	ไม่ได้รับการศึกษา	7 (100%)	0 (0%)
	ระดับชั้นประถมศึกษา	113 (57.4%)	84 (42.6%)
	ระดับชั้นมัธยมศึกษา	10 (43.5%)	13 (56.5%)
	สูงกว่าระดับชั้นมัธยมศึกษา	0 (0%)	3 (100%)
อาชีพ	แม่บ้าน/พ่อบ้าน	66 (53.2%)	58 (46.8%)
	รับจ้าง	37 (60.7%)	24 (39.3%)
	ธุรกิจส่วนตัว	25 (67.6%)	12 (32.4%)
	เกษตรกร	2 (25%)	6 (75%)
แหล่งของน้ำดื่ม	น้ำดื่มบรรจุขวด	94 (54.3%)	79 (45.7%)
	น้ำประปา	24 (58.5%)	17 (41.5%)
	น้ำบ่อ/น้ำบาดาล	8 (66.7%)	4 (33.3%)
	น้ำฝน	4 (100%)	0 (0%)
ประเภทของส้วม	ส้วมแบบโถชักโครก	82 (59%)	57 (41%)
	ส้วมแบบราดน้ำหรือนั่งยอง	48 (52.7%)	43 (47.3%)
การมีสัตว์เลี้ยง	ไม่มีสัตว์เลี้ยง	53 (54.6%)	44 (45.4%)
	มีสัตว์เลี้ยง	77 (57.9%)	56 (42.1%)

3.2. ข้อมูลพฤติกรรมด้านสุขอนามัยของผู้เข้าร่วมวิจัย

ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 12 พบว่าผู้เข้าร่วมวิจัยส่วนใหญ่ไม่บริโภคอาหารสุกๆดิบๆ ล้างผักและผลไม้ก่อนรับประทานเป็นประจำ รวมทั้งผู้เข้าร่วมวิจัยส่วนใหญ่ล้างมือก่อนรับประทาน อาหารและล้างมือหลังเข้าส้วม และล้างมือหลังจากสัมผัสสัตว์เลี้ยงรวมทั้งใช้ชั๊บถ่ายโดยใช้ห้องส้วม มีเพียงผู้เข้าร่วมวิจัยส่วนน้อยที่ยังคงชั๊บถ่ายโดยไม่ใช้ห้องส้วม

ตารางที่ 12 ข้อมูลพฤติกรรมด้านสุขอนามัยของผู้เข้าร่วมวิจัย (n=230)

ปัจจัย		จำนวนคน	ร้อยละ
การบริโภคอาหาร สุกๆดิบๆ	ไม่เคย	217	94.3
	1-2 ครั้งต่อสัปดาห์	10	4.3
	มากกว่า 2 ครั้งต่อสัปดาห์	3	1.3
การล้างผักและผลไม้ก่อน รับประทาน	ไม่เคย	1	0.4
	บางครั้ง	22	9.6
	ทุกครั้ง	207	90
การล้างมือก่อนรับประทาน อาหาร	ไม่เคย	0	0
	บางครั้ง	39	17
	ทุกครั้ง	191	83
การล้างมือหลังเข้าห้องส้วม	ไม่เคย	0	0
	บางครั้ง	14	6.1
	ทุกครั้ง	216	93.9
การล้างมือหลังจากสัมผัสกับสัตว์ เลี้ยง	ไม่เคย	3	2.3
	บางครั้ง	32	24.1
	ทุกครั้ง	98	73.1
การชั๊บถ่ายในห้องส้วม	ไม่เคย	0	0
	บางครั้ง	2	0.9
	ทุกครั้ง	228	99.1

3.3. ผลการทดสอบความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติส

การทดสอบความสัมพันธ์ของปัจจัยด้านคุณลักษณะและสุขอนามัยของผู้เข้าร่วมวิจัย ต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสใช้การทดสอบไคสแควร์ เนื่องจากข้อมูลคุณลักษณะและสุขอนามัย ที่เก็บรวบรวมจากการตอบแบบสอบถามของผู้เข้าร่วมวิจัย มีลักษณะตัวแปรที่พบทั้งตัวแปร

ที่บอกปริมาณ (quantitative variable) และตัวแปรที่บอกคุณภาพ (qualitative variable) ในการวิเคราะห์ข้อมูลตัวแปรที่เป็นปัจจัยศึกษาและผลต่อการเกิดโรคในงานวิจัยทางคลินิก มักวัดเป็น binary variable ดังนั้นผู้วิจัยได้ปรับเปลี่ยนชนิดของตัวแปรให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ โดยเปลี่ยนเป็นชนิดตัวแปร binary variable ทำให้เป็นตัวแปรที่มีความหมายในทางคลินิก

ผลการทดสอบความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในการศึกษานี้ พบว่าปัจจัยด้านเพศ อายุ โรคเบาหวาน ระยะเวลาที่เป็นโรคเบาหวาน ระดับการศึกษา อาชีพ แหล่งของน้ำดื่ม ประเภทห้องส้วม การมีสัตว์เลี้ยง การบริโภคอาหารสุกๆดิบๆ การล้างผักและผลไม้ ก่อนรับประทาน การล้างมือก่อนรับประทานอาหาร การล้างมือหลังเข้าห้องส้วม การล้างมือ ภายหลังจากสัมผัสกับสัตว์เลี้ยง การขับถ่ายในห้องส้วมของผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งหมด ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่การทดสอบ Odds ratios และ 95% CI เพื่อวิเคราะห์หาอัตราเสี่ยงสัมพัทธ์ของปัจจัยแต่ละด้านต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสนั้นพบว่า อัตราเสี่ยงสัมพัทธ์ของปัจจัยแต่ละด้านต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบแนวโน้มการติดเชื้อที่สูงในบางปัจจัย เช่น เพศชายมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 1.373 เท่า (95% CI=0.586-3.218) เมื่อเปรียบเทียบกับเพศหญิง ผู้ที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 65 ปีขึ้นไปมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 1.63 เท่า (95% CI=0.673-3.949) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่มีอายุน้อยกว่า 65 ปี ผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 1.419 เท่า (95% CI=0.599-3.36) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ผู้ที่เป็นโรคเบาหวานมากกว่า 10 ปี มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 1.439 เท่า (95% CI=0.499-4.153) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่เป็นโรคเบาหวานน้อยกว่า หรือเท่ากับ 10 ปี ผู้ที่มีระดับการศึกษาต่ำ (น้อยกว่าหรือเท่ากับระดับชั้นประถมศึกษา) มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 1.525 เท่า (95% CI=0.338-6.877) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่มีระดับการศึกษาสูง (มากกว่าหรือเท่ากับระดับชั้นมัธยมศึกษา) ผู้ที่ไม่ได้ประกอบอาชีพ เช่น แม่บ้าน พ่อบ้าน ที่ไม่ได้ประกอบอาชีพทำงานประจำ มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสสูงเป็น 1.321 เท่า (95% CI=0.567-3.078) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่มีอาชีพ ผู้ที่บริโภคน้ำบรรจุขวดหรือน้ำประปา มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 1.895 เท่า (95% CI=0.239-14.99) เมื่อเปรียบเทียบกับ

กับผู้ที่บริโภคน้ำจากบ่อ บ่อบาดาลหรือน้ำฝน ผู้ที่ใช้ห้องส้วมแบบราดน้ำหรือนั่งยองมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 1.228 เท่า (95% CI=0.531-2.838) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ใช้ส้วมแบบชักโครก ผู้ที่มีสัตว์เลี้ยงที่บ้านมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 1.337 เท่า (95% CI=0.565-3.167) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่สัตว์เลี้ยง ผู้ที่ไม่บริโภคอาหารสุกๆดิบๆ มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 1.492 เท่า (95% CI=0.186-11.988) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ทานอาหารสุกๆดิบๆเป็นบางครั้ง ผู้ที่ล้างมือเป็นประจำก่อนรับประทานอาหารมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 2.533 เท่า (95% CI=0.572-11.217) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ล้างมือเป็นบางครั้งก่อนรับประทานอาหาร ผู้ที่ล้างมือทุกครั้งหลังจากที่ได้สัมผัสกับสัตว์เลี้ยงมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 1.631 เท่า (95% CI=0.436-6.104) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ล้างมือเป็นบางครั้งหลังจากที่ได้สัมผัสกับสัตว์เลี้ยง ผู้ที่ขับถ่ายโดยใช้ห้องส้วมเป็นบางครั้งมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสเป็น 8.5 เท่า (95% CI=0.515-140.325) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ขับถ่ายโดยใช้ห้องส้วมเป็นประจำ

ตารางที่ 13 แสดงผลการทดสอบ Chi-Square และ Odd ratios และ 95% confidence interval ของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติส

ปัจจัย		จำนวนผู้ติดเชื้อ บลาสโตซิสติส (%)	Chi-Square test (p-value)	Odd Ratios (95% CI)
เพศ	เพศชาย	10 (13%)	0.536 (0.464)*	1.373 (0.586-3.218)
	เพศหญิง	15 (9.8%)		1
อายุ	น้อยกว่า 65 ปี	8 (8.2%)	1.19 (0.275)*	1
	มากกว่าหรือเท่ากับ 65 ปี	17 (12.8%)		1.63 (0.673-3.949)
โรคเบาหวาน	ไม่มีโรคเบาหวาน	9 (9%)	0.638 (0.424)*	1
	มีโรคเบาหวาน	16 (12.3%)		1.419 (0.599-3.36)

ปัจจัย		จำนวนผู้ติดเชื้อ บลาสโตซิสติส (%)	Chi-Square test (p-value)	Odd Ratios (95% CI)
ระยะเวลาที่เป็น โรคเบาหวาน	น้อยกว่าเท่ากับ 10	9 (10.8%)	0.456 (0.499)*	1
	มากกว่า 10 ปี	7 (14.9%)		1.439 (0.499-4.153)
ระดับ การศึกษา	ระดับต่ำ	23 (11.3%)	0.305 (0.748)**	1.525 (0.338-6.877)
	ระดับสูง	2 (7.7%)		1
อาชีพ	ไม่ได้ประกอบอาชีพ	15 (12.1%)	0.418 (0.518)*	1.321 (0.567-3.078)
	ประกอบอาชีพ	10 (9.4%)		1
แหล่งน้ำดื่ม	ผ่านการฆ่าเชื้อ	24 (11.2%)	0.379 (1)**	1.895 (0.239-14.99)
	ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ	1 (6.3%)		1
ประเภทของ ส้วม	แบบโถชักโครก	14 (10.1%)	0.231 (0.631)*	1
	แบบราดน้ำ/ นั่งยอง	11 (12.1%)		1.228 (0.531-2.838)
การมีสัตว์เลี้ยง	ไม่มีสัตว์เลี้ยง	9 (9.3%)	0.438 (0.508)*	1
	มีสัตว์เลี้ยง	16 (12%)		1.337 (0.565-3.167)
การบริโภค อาหาร สุกๆ ดิบๆ	ไม่เคย	24 (11.1%)	1.44 (1)**	1.492 (0.186-11.988)
	บางครั้ง	1 (7.7%)		1
การล้างผัก และผลไม้ก่อน รับประทาน	ไม่เคย/บางครั้ง	0 (0%)	2.967 (0.142)**	-
	ทุกครั้ง	25 (12%)		-

ปัจจัย		จำนวนผู้ติดเชื้อ บลาสโตซิสติส (%)	Chi-Square test (<i>p</i> -value)	Odd Ratios (95% CI)
การล้างมือก่อน รับประทานอาหาร	บางครั้ง	2 (5.1%)	1.598 (0.268)**	1
	ทุกครั้ง	23 (12%)		2.533 (0.572-11.217)
การล้างมือหลัง เข้าห้องส้วม	บางครั้ง	0 (0%)	1.818 (0.374)**	-
	ทุกครั้ง	25 (11.6%)		-
การล้างมือ หลังจากสัมผัส กับสัตว์เลี้ยง	ไม่เคย/ บางครั้ง	3 (8.6%)	0.537 (0.559)**	1
	ทุกครั้ง	13 (13.3%)		1.631 (0.436-6.104)
การขับถ่ายโดย ใช้ห้องส้วม	บางครั้ง	1 (50%)	3.189 (0.206)**	8.5 (0.515-140.325)
	ทุกครั้ง	24 (10.5%)		1

*Pearson Chi-Square, **Fisher's Exact Test

4. ผลการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ

ข้อมูลลำดับเบสของยีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติสที่มีผลบวกทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ถูกส่งเข้าสู่ฐานข้อมูล Genbank database เพื่อทำการบันทึกและกำหนดหมายเลขรหัสจำเพาะในแต่ละข้อมูลลำดับเบส (accession number) ลำดับเบสจากการศึกษานี้ได้รับหมายเลขจำเพาะทั้งหมด 25 หมายเลข ดังนี้ MT330258-MT330260, MT330263, MT330265-MT330267, MT330269-MT330277 และ MT947108-MT947116 ในขณะที่ข้อมูลลำดับเบสของสายพันธุ์ที่ใช้ในการอ้างอิง (reference sequence) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบสำหรับการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ มีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ 1-4 จำนวนทั้งสิ้น 18 ข้อมูลลำดับเบส เป็นสายพันธุ์ที่ตรวจพบเชื้อบลาสโตซิสติสในตัวอย่างจากคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ดังแสดงในตารางที่ 14

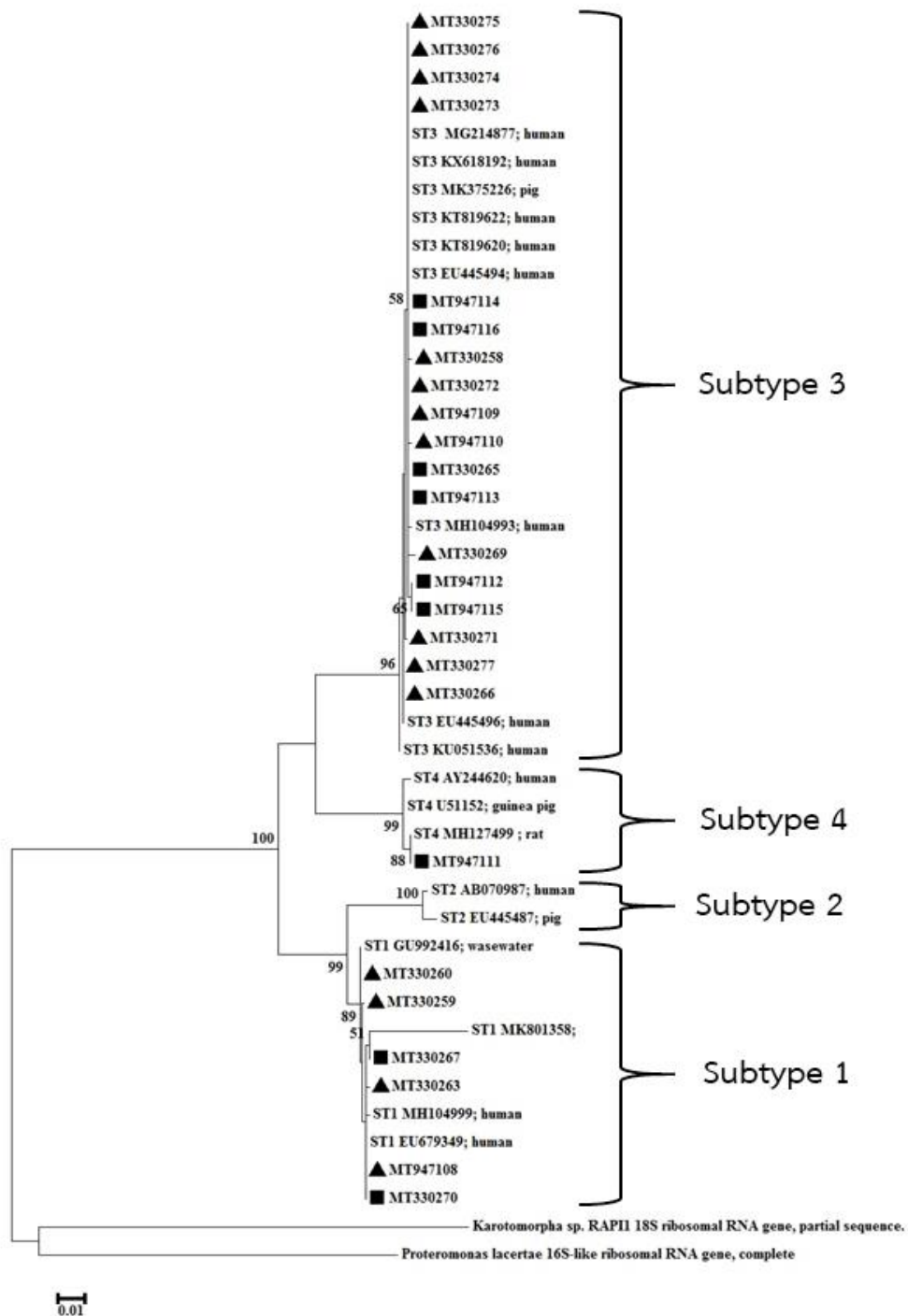
ตารางที่ 14 แสดงหมายเลขสายพันธุ์อ้างอิง และชนิดของโฮสต์ของเชื้อบลาสโตซิสติสที่ใช้ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ

สายพันธุ์ที่	หมายเลขสายพันธุ์อ้างอิง	ชนิดของโฮสต์
1	EU679349	คน (244)
	GU992416	น้ำเสีย (245)
	MH104999	คน (246)
	MK801358	สุกร (247)
2	AB070987	คน (121)
	EU445487	สุกร (248)
3	EU445494	คน (248)
	EU445496	คน (248)
	KT819620	คน (249)
	KT819622	คน (249)
	KU051536	คน (41)
	KX618192	คน (250)
	MG214877	คน (ไม่ได้ตีพิมพ์)
	MH104993	คน (246)
4	MK375226	สุกร (251)
	AY244620	คน (53)
	MH127499	หนู (252)
	U51152	หนูตะเภา (76)

จากผลการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้ยีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติสในการศึกษานี้พบว่า สามารถจัดกลุ่มของข้อมูลลำดับเบสของตัวอย่างที่ต้องการศึกษาได้ตามชนิดสายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการอ้างอิง โดยพบว่าทุกตัวจับกลุ่มเป็นกลุ่มวิวัฒนาการเดี่ยว (monophyletic group) แยกจาก *Karotomorpha* sp. และ *Proteromonas lacertae* ที่เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มศึกษา จากรูปที่ 12 สามารถอธิบายได้โดยก่อนการแยกสายไปในแต่ละกิ่งของแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการมีค่าบูทสเตรี่ปสูงถึงร้อยละ 100 ทำให้ได้ข้อสรุปว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากเทคนิค nested PCR ที่ในการศึกษานี้เป็นเชื้อชนิดเดียวกันทั้งหมดคือเชื้อบลาสโตซิสติส

สำหรับในแต่ละกิ่งที่แยกออกไปในแต่ละสายพันธุ์มีค่าบุทสแตร์ปสูงถึงร้อยละ 96-99 ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างในลำดับเบสของสายดีเอ็นเอตามแต่ละสายพันธุ์





รูปที่ 12 แสดงแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้วิธี Maximum likelihood analysis เพื่อวิเคราะห์ ยีน SSU rDNA ของเชื้อบลาสโตซิสติส โดยรูปแบบจำลองที่ใช้คือ The General Time Reversible สัญลักษณ์ ▲ แทนกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวาน และ ■ แทนกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

เชื้อบลาสโตซิสติสเป็นโปรโตซัวที่พบได้ทั่วไปในสัตว์ชนิดต่างๆ รวมทั้งในคน เชื้อชนิดนี้ได้แพร่กระจายไปทั่วโลกโดยพบผู้ติดเชื้อบลาสโตซิสติสราว 1 พันล้านคน ซึ่งสันนิษฐานว่าการแพร่กระจายของเชื้อเกิดโดยการได้รับเชื้อจากการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อน เชื้อชนิดนี้เข้าไป แม้ว่าจะพบการติดเชื้อบลาสโตซิสติสที่สูงในคนแต่กลับพบว่าคนส่วนใหญ่ที่ได้รับเชื้อชนิดนี้มักไม่มีอาการใดๆ หรือแสดงอาการที่จำเพาะต่อการติดเชื้อชนิดนี้ อีกทั้งยังพบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนที่มีสุขภาพแข็งแรงได้เป็นระยะเวลานานนับสิบปี (160)

เชื้อบลาสโตซิสติสถูกจำแนกออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้การตรวจวิเคราะห์ยีน SSU rDNA ในปัจจุบันพบจำนวนทั้งสิ้น 17 สายพันธุ์ คนส่วนใหญ่ติดเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1-4 (44) แต่ขณะเดียวกันมีรายงานการพบเชื้อชนิดนี้ในคนแล้วประมาณ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 1-9 และสายพันธุ์ที่ 12 (43) แม้ว่าจะมีข้อมูลการศึกษาการติดเชื้อบลาสโตซิสติสต่างๆ มากมาย แต่ความสำคัญทางคลินิกยังไม่เป็นที่แน่ชัด อันเนื่องมาจากข้อมูลเกี่ยวกับวงจรชีวิต ความสามารถในการก่อโรค อาการและการรักษายังไม่เป็นที่แน่ชัด (253)

การศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษาความชุกและการกระจายสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติส รวมทั้งหาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัยต่อการติดเชื้อชนิดนี้ โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระและข้อมูลจากแบบสอบถามของผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานจำนวนทั้งสิ้น 230 คน ซึ่งผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งสองกลุ่มอาศัยอยู่ในอำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยเกณฑ์การแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานพิจารณาจากการตรวจวัดค่าระดับน้ำตาลในกระแสเลือดภายหลังจากการอดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมง (fasting blood glucose) ของผู้เข้าร่วมวิจัย ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล อำเภอบางปะอิน ในการศึกษาครั้งนี้อาจมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ภาวะภูมิคุ้มกันของผู้เข้าร่วมวิจัยแต่ละคนที่มีระดับต่างกัน อาจส่งผลกระทบต่อการศึกษาการติดเชื้อบลาสโตซิสติส ซึ่งในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัยโดยใช้การเป็นโรคเบาหวานของแต่ละบุคคลได้พิจารณาจากผลการตรวจคัดกรองโรคเบาหวานที่ปรากฏในเวชระเบียนเท่านั้น กรณีที่เป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานผู้วิจัยไม่ทราบถึงประวัติของระดับน้ำตาล

ช่วงที่ผ่านมาของแต่ละบุคคล ซึ่งจากที่ผู้วิจัยได้อธิบายถึงโรคเบาหวานเบื้องต้นว่าการควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดีนั้นส่งผลต่อการติดเชื้อต่างๆสูงขึ้นได้

การตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสทำโดยนำตัวอย่างอุจจาระมาตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้เทคนิค direct smear ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้ในการตรวจหายีน SSU rDNA ที่จำเพาะต่อเชื้อชนิดนี้โดยใช้เทคนิค conventional PCR และเทคนิค nested PCR ผลการศึกษาพบว่าความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสสูงสุดโดยการใช้เทคนิค nested PCR และเทคนิค conventional PCR และการใช้กล้องจุลทรรศน์ ตามลำดับ เป็นที่ทราบเบื้องต้นแล้วว่าการตรวจหาเชื้อปรสิตรวมทั้งเชื้อบลาสโตซิสติสในห้องปฏิบัติการทั่วไปนิยมใช้การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์เป็นหลัก ข้อมูลการศึกษาต่างๆจำนวนมากแสดงถึงลักษณะของเชื้อบลาสโตซิสติสที่มีขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกันไปในแต่ละระยะ การตรวจวินิจฉัยโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ทำได้ยากอาจเกิดการรายงานที่ผิดพลาดเป็นเชื้อชนิดอื่นหรือเป็นเศษขยะที่พบในอุจจาระได้ ทำให้ความชุกของการติดเชื้อต่ำกว่าความเป็นจริง (11, 254) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังคงมีประสิทธิภาพและถูกใช้ในการตรวจหาเชื้อปรสิตชนิดต่างๆ เช่น พยาธิปากขอ, *Trichuris trichiura*, *Giardia intestinalis* เป็นต้น แต่ผลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจโดยวิธีนี้ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้ในการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติส ส่งผลให้พบจำนวนผู้ติดเชื้อนั้นลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่ง นอกจากนี้เชื้อบลาสโตซิสติสที่ถูกตรวจพบในการศึกษานี้ยังพบเชื้อโปรโตซัวชนิดอื่น ได้แก่ *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Roberts และคณะ ที่ได้รายงานการพบเชื้อโปรโตซัวชนิดดังกล่าวร่วมกับการติดเชื้อบลาสโตซิสติส (255) ผลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค PCR ทั้งสองเทคนิคนั้นมีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสได้ ทำให้พบจำนวนผู้ติดเชื้อสูงกว่าการใช้วิธีที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาอื่นๆที่รายงานว่าการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติส การตรวจหายีนที่จำเพาะต่อเชื้อโดยใช้เทคนิค PCR มีความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจวินิจฉัยที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหาเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน สามารถตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างได้ และสามารถประยุกต์ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจคัดกรองการติดเชื้อบลาสโตซิสติสและใช้ในการศึกษาวิจัยความชุกของการติดเชื้อชนิดนี้ได้อีกเช่นกัน (54, 115, 256)

การศึกษาวิจัยส่วนใหญ่ใช้ประโยชน์จากวิธีทางอณูชีววิทยาทั้งในแง่ของการตรวจหาความชุกและสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสควบคู่กัน เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการศึกษาอย่างแพร่หลายในการตรวจหาเชื้อและสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติส ในปัจจุบันพบสองเทคนิคหลักๆคือ วิธีแรกใช้การตรวจหายีน SSU rDNA ควบคู่กับการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสจากผลผลิตปฏิกิริยา PCR วิธีที่สองใช้การตรวจหายีนที่จำเพาะต่อเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1-7 โดยตรง ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้วิธีแรกในการตรวจหาเชื้อและสายพันธุ์ของเชื้อ เนื่องจากวิธีการตรวจหาเชื้อโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะในวิธีที่สองนั้นสามารถตรวจหาเชื้อได้เพียง 7 สายพันธุ์ ในขณะที่ตัวอย่างอาจจะมียีสต์บลาสโตซิสติสสายพันธุ์อื่นๆ นอกเหนือจากสายพันธุ์ที่ 1-7 จะส่งผลให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อสายพันธุ์นั้นได้ (110) เทคนิค PCR ที่ใช้ในการตรวจหาความชุกและสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสของของการศึกษานี้คือ เทคนิค nested PCR การตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสโดยเทคนิคนี้ทำโดยการเพิ่มจำนวนยีน SSU rDNA 2 ปฏิกิริยาโดยใช้ชนิดของไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน โดยปฏิกิริยาแรกทำการเพิ่มจำนวนยีน SSU rDNA ที่มีขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส (108) ในขณะที่ปฏิกิริยาที่สองทำการเพิ่มจำนวนยีน SSU rDNA ที่มีขนาดต้องการประมาณ 1,100 คู่เบส (146) อีกทั้งในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้เทคนิค conventional PCR โดยเพิ่มจำนวนยีน SSU rDNA ที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส เทคนิคนี้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยในปัจจุบัน (55, 257) ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสจากการใช้เทคนิค conventional PCR มีค่าใกล้เคียงกับผลที่ได้จากการใช้เทคนิค nested PCR อย่างไรก็ตาม การตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้เทคนิค PCR ทั้งสองชนิดให้ผลการตรวจที่แตกต่างกันจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยที่เทคนิค nested PCR ให้ผลการทดสอบที่เป็นบวกต่อเชื้อบลาสโตซิสติส ขณะที่เทคนิค conventional PCR ให้ผลการทดสอบที่เป็นลบนั้น ผู้วิจัยขออภิปรายถึงสาเหตุที่อาจเป็นไปได้ที่ทำให้ผลการทดสอบนั้นแตกต่างกัน ประการแรกเกิดจากเทคนิคการตรวจที่แตกต่างกันโดยหลักการของเทคนิค nested PCR ทำโดยการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการจำนวน 2 ช่วงปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ปฏิกิริยาช่วงที่ 1 จะได้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่มีจำนวนยีนที่ต้องการในปริมาณมากกว่าดีเอ็นเอที่สกัดมาจากตัวอย่างในครั้งแรก ในขณะที่เทคนิค conventional PCR ทำการเพิ่มจำนวนยีนเพียงแค่ 1 ช่วงปฏิกิริยา ทำให้ได้จำนวนยีนที่ต้องการในผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่แตกต่างกัน และผู้วิจัยได้สรุปสาเหตุที่เป็นไปได้อีกประการหนึ่งอาจเกิดจากปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างที่มีน้อย

มากภายหลังจากการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างอุจจาระ เนื่องจากผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดสอบหาปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค conventional PCR หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบใน 1.5% agarose gel อาจจะมีพบยีน SSU rDNA ขนาดประมาณ 600 คู่เบสอยู่จริง แต่แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏนั้นอาจจะบางมากจนไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า จึงคาดว่าสาเหตุทั้งสองประการที่กล่าวมาน่าจะทำให้ผลการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสจากการใช้เทคนิค PCR ทั้งสองเทคนิคมีความแตกต่างกัน กล่าวโดยสรุป ผลจากการศึกษานี้พบว่าเทคนิค nested PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสและให้ผลการตรวจที่มีความถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค conventional PCR

เพื่อเป็นการลดการแพร่กระจายของเชื้อบลาสโตซิสติสของคนในชุมชน ผู้วิจัยมีความเห็นว่าการตรวจหาเชื้อดังกล่าวในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทั่วไปควรนำเทคนิค PCR มาใช้ แม้ว่าวิธีดังกล่าวจะใช้งบประมาณ เครื่องมือ รวมทั้งระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัยที่สูงก็ตาม เนื่องจากในโรงพยาบาลส่วนใหญ่ยังคงอาศัยการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นหลัก เมื่อพิจารณาจากผลการศึกษานี้พบว่าการใช้เทคนิค PCR ให้ผลการตรวจพบจำนวนผู้ติดเชื้อสูงกว่าการหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์สองถึงสามเท่า โดยเฉพาะเทคนิค nested PCR ถึงแม้ว่าจะใช้ระยะเวลาในการตรวจหาเชื้อที่มากกว่าเทคนิค conventional PCR แต่สามารถให้ผลการตรวจที่มีความน่าเชื่อถือ ถูกต้อง และบ่งชี้การติดเชื้อที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริงในแต่ละบุคคล

การศึกษานี้พบความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสร้อยละ 10.9 จากจำนวนผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งสิ้น 230 คน ซึ่งผลความชุกของการติดเชื้อชนิดนี้ต่ำกว่ารายงานการศึกษาที่ผ่านมาที่ทำการศึกษาในพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย เช่น การศึกษาที่ค่ายทหารจังหวัดชลบุรีพบความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสร้อยละ 44 (36) การตรวจพบเชื้อบลาสโตซิสติสจำนวนร้อยละ 13.7 จากผู้เข้ารับบริการการตรวจสุขภาพประจำปี โดยคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล (37) การศึกษาในจังหวัดเชียงรายที่พบความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสจำนวนร้อยละ 23 (131) สำหรับในประเทศไทยพบรายงานความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสสูงสุดร้อยละ 45 โดยเป็นการศึกษาการติดเชื้อชนิดนี้ในกลุ่มเด็กที่สถานเลี้ยงเด็กกำพร้า จังหวัดปทุมธานี (141) ข้อมูลการศึกษาจำนวนมากพบว่าความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่

ที่ทำการศึกษา โดยพบว่ากลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาพบความชุกของการติดเชื้อชนิดนี้สูงสุดถึงร้อยละ 100 (149) ตรงกันข้ามกับประเทศที่พัฒนาแล้วตรวจพบการติดเชื้อชนิดนี้เพียงร้อยละ 0.5-30 (47) อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสของแต่ละประเทศพบว่า ในแต่ละประเทศนั้นมีอัตราความชุกของการติดเชื้อที่แตกต่างกัน อีกทั้งยังมีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากรที่อยู่ในประเทศเดียวกันอีกด้วย (11)

สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสที่ตรวจพบจากการศึกษาในครั้งนี้พบเชื้อบลาสโตซิสติสจำนวนทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 3 และสายพันธุ์ที่ 4 โดยเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 ถูกตรวจพบเป็นจำนวนมากที่สุด ผลจากการศึกษานี้สอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาในประเทศไทยส่วนใหญ่ที่ตรวจพบว่าเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 มีความชุกมากที่สุด เช่น การศึกษาในเด็ก ณ ศูนย์เด็กพิเศษ ชุมชนคลองเตย (130) การศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นผู้ป่วยในที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลที่จังหวัดขอนแก่น (27) การศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นเด็กนักเรียนหลายภูมิภาคของประเทศไทย (132) ในขณะเดียวกันการศึกษาในต่างประเทศยังพบว่าเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 นั้นเป็นสายพันธุ์ที่ถูกตรวจพบได้มากที่สุด เช่น ญี่ปุ่น บังคลาเทศ ปากีสถาน (53) รวมทั้งประเทศจีน (258) ในขณะเดียวกันผลของการศึกษาในครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาวางการศึกษาในประเทศไทยที่พบว่าเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1 เป็นสายพันธุ์ที่ถูกตรวจพบมากที่สุดในการศึกษานั้น (39, 128) จากข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 3 เป็นสายพันธุ์ที่ถูกตรวจพบมากที่สุดในคน ทั้งในแถบทวีปยุโรป แอฟริกา เอเชีย และออสเตรเลีย ยกเว้นทวีปอเมริกาที่พบสายพันธุ์ที่ 1 มากที่สุด (44) อย่างไรก็ตามเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1-4 ถือเป็นสายพันธุ์ที่ถูกตรวจพบได้ในคนมากที่สุด (12, 42) ผลของการศึกษาในครั้งนี้พบเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1 มากเป็นอันดับที่สอง จากข้อมูลที่เก็บรวบรวมจากแบบสอบถามทำให้ทราบว่าคนที่ติดเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1 เกือบทั้งหมดนั้นมีสัตว์เลี้ยงที่บ้าน ข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1 อาจมีความเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเชื้อชนิดนี้จากสัตว์สู่คน ผู้วิจัยจึงเชื่อว่าการติดเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 1 ในกลุ่มตัวอย่างของการศึกษานี้อาจมีสาเหตุมาจากการสัมผัสสัตว์เลี้ยงหรืออุจจาระของสัตว์ที่มีเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ดังกล่าว และเข้าสู่ร่างกายโดยปนเปื้อนอาหารและน้ำดื่ม ในขณะที่สายพันธุ์ที่ 4 เป็นสายพันธุ์ที่ตรวจพบจากการศึกษานี้เช่นกันแต่พบจำนวนน้อย

มาก โดยตรวจพบในตัวอย่างอุจจาระของผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่าเชื้อบลาสโตซิสติสสายพันธุ์ที่ 4 นี้พบได้น้อยในแถบทวีป แอฟริกา อเมริกา และเอเชีย (44)

ผลการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสของผู้เข้าร่วมวิจัยจำนวน 230 คน ในการศึกษาพบว่า การติดเชื้อบลาสโตซิสติสไม่มีความสัมพันธ์กับปัจจัยต่างๆ ทั้งปัจจัยด้านคุณลักษณะและพฤติกรรมสุขอนามัย ข้อมูลจากแบบสอบถามแสดงให้เห็นว่าผู้ที่ติดเชื้อส่วนใหญ่มีสุขอนามัยพื้นฐานที่ดี เช่น ล้างมือก่อนรับประทานอาหาร ล้างมือหลังจากเข้าห้องส้วม ขับถ่ายโดยใช้ห้องส้วม รวมถึงการดื่มน้ำสะอาด ซึ่งผลของการศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาต่างๆ ที่ระบุว่า การติดเชื้อบลาสโตซิสติสมีความสัมพันธ์กับคุณภาพของน้ำดื่มอย่างมีนัยสำคัญ โดยผู้ที่ดื่มน้ำจากแหล่งน้ำสะอาดหรือผ่านการฆ่าเชื้อ จะพบการติดเชื้อบลาสโตซิสติสที่น้อยลง (35, 195, 259) การติดเชื้อบลาสโตซิสติสโดยทาง fecal oral route ยังคงเป็นวิธีการหลักในแพร่กระจายของเชื้อเข้าสู่ร่างกาย (11) การติดเชื้อบลาสโตซิสติสของการศึกษานี้ที่ส่วนใหญ่พบในผู้ที่มีกรล้างมือเป็นประจำก่อนและหลังทำกิจกรรมต่างๆ ผู้วิจัยเชื่อว่าอาจมีสาเหตุมาจากการล้างมือด้วยน้ำเปล่าโดยปราศจากการใช้สารทำความสะอาดต่างๆ ทำให้ไม่สามารถกำจัดเชื้อบลาสโตซิสติสที่อาจติดอยู่ที่มือของผู้นั้น ดังนั้นเชื้อจึงสามารถเข้าสู่ร่างกายจากการสัมผัสกับน้ำดื่มหรืออาหารที่รับประทานเข้าไปทำให้เกิดการติดเชื้อ ซึ่งมีข้อมูลที่สนับสนุนสมมติฐานดังกล่าวโดยข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าระยะ cyst form ของเชื้อบลาสโตซิสติสนั้นไม่ถูกทำลายเมื่ออยู่ในน้ำเนื่องจากผนังของซิสต์ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อมให้สามารถทนอยู่ได้ในสภาวะไม่เหมาะสมได้ สามารถอยู่ในแหล่งน้ำได้นานกว่าสองสัปดาห์ในอุณหภูมิปกติ แต่ไม่สามารถทนต่อสภาวะที่อุณหภูมิสูงและน้ำยาฆ่าเชื้อได้ (103, 104) เช่นเดียวกับข้อมูลการศึกษาที่ศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อหนอนพยาธิที่ติดต่อผ่านดิน (soil-transmitted helminth infection) พบว่าการล้างมือด้วยสบู่และน้ำสะอาดทำให้อัตราการติดเชื้อดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (260) สำหรับผลการวิเคราะห์หาอัตราเสี่ยงสัมพัทธ์ของปัจจัยแต่ละด้านต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสในการศึกษานี้พบว่า ปัจจัยแต่ละด้านมีอัตราเสี่ยงสัมพัทธ์ต่อการติดเชื้อที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าค่าของ odd ratio มากกว่า 1 และช่วงค่าเชื่อมั่นที่ได้จากการคำนวณทางสถิติจะพบค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดที่ครอบคลุม

ค่าของ 1 จะไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามในทางคลินิกถือว่าปัจจัยดังกล่าวอาจจะมีความเสี่ยงแม้จะยังไม่พบหลักฐานที่ชัดเจนหรือหลักฐานที่มีนัยสำคัญทางสถิติมาสนับสนุนก็ตาม จากการวิเคราะห์ผลของการศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสที่ผู้วิจัยได้อธิบายความเป็นไปได้ข้างต้นว่า การล้างมือที่ไม่ถูกต้องอาจจะส่งผลต่อการติดเชื้อที่สูง ดังนั้นในการแปลผลจากการวิเคราะห์หาอัตราเสี่ยงสัมพัทธ์ของปัจจัยต่างๆต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสนั้น ไม่ควรนำปัจจัยสุขอนามัยที่เกี่ยวข้องกับการล้างมือในการทำกิจกรรมต่างๆมาพิจารณาร่วมด้วย



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้ศึกษาความชุกและการกระจายสายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสที่ตรวจจากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานจำนวน 230 คนในพื้นที่อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ในระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 พบว่ามีการติดเชื้อบลาสโตซิสติสทั้งในผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานและผู้ที่เป็นโรคเบาหวานในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน การตรวจหาความชุกของการติดเชื้อบลาสโตซิสติสทำได้โดย 3 วิธี โดยการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสด้วยเทคนิค direct smear ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ให้ผลการตรวจพบเชื้อบลาสโตซิสติสได้น้อยที่สุด รองลงมาคือเทคนิค conventional PCR ในขณะที่เทคนิค nested PCR ให้ผลการตรวจพบเชื้อบลาสโตซิสติสมากที่สุด จำนวน 25 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อร้อยละ 10.9 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 230 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 16 ตัวอย่างและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวานจำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อร้อยละ 12.3 และร้อยละ 9 ตามลำดับ สามารถสรุปได้ว่าวิธีการตรวจหาเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้เทคนิค nested PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ การตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้เทคนิค Sanger sequencing และโปรแกรม BLAST พบว่าสายพันธุ์ที่มีความชุกมากที่สุดในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ สายพันธุ์ที่ 3 สายพันธุ์ที่ 1 และสายพันธุ์ที่ 4 ตามลำดับ เชื้อบลาสโตซิสติสทั้งสามสายพันธุ์นี้สามารถตรวจพบได้ทั้งในคนและสัตว์ชนิดอื่นๆได้เช่นกัน ทั้งนี้การติดเชื้ออาจเกิดการแพร่กระจายของเชื้อจากสัตว์สู่คน คนสู่สัตว์ หรือจากคนสู่คนในชุมชน โดยผ่านทางการบินเปื้อนจากอาหารและน้ำดื่มเข้าสู่ร่างกาย อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจหาการติดเชื้อชนิดนี้ในสัตว์เลี้ยงรวมทั้งแหล่งของน้ำดื่มเพื่อหาความสัมพันธ์และที่มาของการแพร่กระจายของเชื้อที่ตรวจพบทั้งในคนและสัตว์

การศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้สถิติโคสแควร์ในการทดสอบ พบว่าการติดเชื้อบลาสโตซิสติสไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปัจจัยด้านเพศ อายุ การเป็นโรคเบาหวาน ระยะเวลาในการเป็นโรคเบาหวาน ระดับการศึกษา อาชีพ

แหล่งของน้ำดื่ม การมีสัตว์เลี้ยง ประเภทของห้องส้วมที่ใช้ การล้างผักและผลไม้ก่อนรับประทาน การรับประทานอาหารสุกๆดิบๆ การใช้ห้องส้วมในการขับถ่าย การล้างมือก่อนรับประทานอาหาร การล้างมือภายหลังจากสัมผัสกับสัตว์เลี้ยง การล้างมือภายหลังจากการเข้าห้องส้วม การศึกษาหาอัตราเสี่ยงสัมพัทธ์ของปัจจัยต่างๆต่อการติดเชื้อบลาสโตซิสติสโดยใช้การทดสอบ Odd ratio และ 95% CI พบว่าปัจจัยแต่ละด้านมีอัตราเสี่ยงสัมพัทธ์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สามารถอธิบายได้ว่าปัจจัยศึกษานั้นๆว่ามีแนวโน้มหรือความเสี่ยงที่จะติดเชื้อบลาสโตซิสติสสูงหรือต่ำเพียงใด

การติดเชื้อบลาสโตซิสติสในอัตราส่วนที่สูงของคนทั้งสองกลุ่มในชุมชนที่นำมาศึกษานั้น อาจนำไปสู่การแพร่กระจายของเชื้อในวงกว้างต่อไปได้ การให้ความรู้ทางด้านสุขภาพและอนามัย ที่ถูกต้องกับประชาชนที่อาศัยอยู่ในชุมชน เป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้สามารถลดการแพร่กระจายของเชื้อได้



บรรณานุกรม

1. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez M-G, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(7):e2865.
2. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. 2016;388(10053):1459-544.
3. Utzinger J, Becker SL, Knopp S, Blum J, Neumayr AL, Keiser J, et al. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13727.
4. Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & Vectors*. 2014;7(1):37.
5. Okhuysen PC, White AC, Jr. Parasitic infections of the intestines. *Curr Opin Infect Dis*. 1999;12(5):467-72.
6. Drake LJ, Jukes MCH, Sternberg RJ, Bundy DAP. Geohelminth infections (ascariasis, trichuriasis, and hookworm): Cognitive and developmental impacts. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 2000;11(4):245-51.
7. Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The Lancet*. 2006;367(9521):1521-32.
8. de Silva NR, Brooker S, Hotez PJ, Montresor A, Engels D, Savioli L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol*. 2003;19(12):547-51.
9. Siddiqui ZA. An overview of parasitic infections of the gastro-intestinal tract in developed countries affecting immunocompromised individuals. *J Parasit Dis*. 2017;41(3):621-6.
10. Scanlan PD. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol*. 2012;28(8):327-34.

11. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):639-65.
12. Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen KE, et al. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. Epidemiol Infect. 2009;137(11):1655-63.
13. Cirioni O, Giacometti A, Drenaggi D, Ancarani F, Scalise G. Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. Eur J Epidemiol. 1999;15(4):389-93.
14. Lucia JF, Aguilar C, Betran A. *Blastocystis hominis* colitis in a haemophilic patient as a cause of lower gastrointestinal bleeding. Haemophilia. 2007;13(2):224-5.
15. Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, et al. Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. Infection, Genetics and Evolution. 2015;31:296-9.
16. AbuOdeh R, Ezzedine S, Samie A, Stensvold CR, ElBakri A. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in healthy individuals in Sharjah, United Arab Emirates. Infection, Genetics and Evolution. 2016;37:158-62.
17. Ben Abda I, Maatoug N, Ben Romdhane R, Bouhelmi N, Zallegua N, Aoun K, et al. Prevalence and Subtype Identification of *Blastocystis* sp. in Healthy Individuals in the Tunis Area, Tunisia. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2017;96(1):202-4.
18. Graczyk TK, Shiff CK, Tamang L, Munsaka F, Beitin AM, Moss WJ. The association of *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* with diarrheal stools in Zambian school-age children. Parasitology Research. 2005;98(1):38.
19. Dacal E, Saugar JM, de Lucio A, Hernández-de-Mingo M, Robinson E, Köster PC, et al. Prevalence and molecular characterization of *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Blastocystis* spp. isolates in school children in Cubal, Western Angola. Parasites & Vectors. 2018;11(1):67.
20. Fréalte E, El Safadi D, Cian A, Aubry E, Certad G, Osman M, et al. Acute *blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. Emerging infectious diseases. 2015;21(1):91-4.

21. Levy Y, George J, Shoenfeld Y. Severe *Blastocystis hominis* in an elderly man. *Journal of Infection*. 1996;33(1):57-9.
22. Cekin AH, Cekin Y, Adakan Y, Tasdemir E, Koclar FG, Yolcular BO. *Blastocystosis* in patients with gastrointestinal symptoms: a case-control study. *BMC Gastroenterology*. 2012;12(1):122.
23. Olivo-Diaz A, Romero-Valdovinos M, Gudiño-Ramirez A, Reyes-Gordillo J, Jimenez-Gonzalez DE, Ramirez-Miranda ME, et al. Findings related to IL-8 and IL-10 gene polymorphisms in a Mexican patient population with irritable bowel syndrome infected with *Blastocystis*. *Parasitology Research*. 2012;111(1):487-91.
24. Piubelli C, Soleymanpoor H, Giorli G, Formenti F, Buonfrate D, Bisoffi Z, et al. *Blastocystis* prevalence and subtypes in autochthonous and immigrant patients in a referral centre for parasitic infections in Italy. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210171.
25. Elghareeb AS, Younis MS, El Fakahany AF, Nagaty IM, Nagib MM. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in diarrheic patients. *Tropical parasitology*. 2015;5(1):36-41.
26. Dogruman-Al F, Yoshikawa H, Kustimur S, Balaban N. PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in a major hospital in Ankara, Turkey. *Parasitology Research*. 2009;106(1):263-8.
27. Jantermtor S, Pinlaor P, Sawadpanich K, Pinlaor S, Sangka A, Wilailuckana C, et al. Subtype identification of *Blastocystis* spp. isolated from patients in a major hospital in northeastern Thailand. *Parasitol Res*. 2013;112(4):1781-6.
28. Adamu H, Wegayehu T, Petros B. High Prevalence of Diarrhoeagenic Intestinal Parasite Infections among Non-ART HIV Patients in Fitcha Hospital, Ethiopia. *PLoS One*. 2013;8(8):e72634.
29. Paboriboune P, Phoumindr N, Borel E, Sourinphoumy K, Phaxayaseng S, Luangkhot E, et al. Intestinal Parasitic Infections in HIV-Infected Patients, Lao People's Democratic Republic. *PLoS One*. 2014;9(3):e91452.
30. Omrani VF, Fallahi S, Rostami A, Siyadatpanah A, Barzgapour G, Mehravar S, et al. Prevalence of intestinal parasite infections and associated clinical symptoms among patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Infection*. 2015;43(5):537-44.

31. Mohammadi Manesh R, Hosseini Safa A, Sharafi SM, Jafari R, Bahadoran M, Yousefi M, et al. Parasites and chronic renal failure. *Journal of renal injury prevention*. 2014;3(4):87-90.
32. Tasova Y, Sahin B, Koltas S, Paydas S. Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. *Acta Med Okayama*. 2000;54(3):133-6.
33. Padukone S, Mandal J, Parija SC. Severe *Blastocystis* subtype 3 infection in a patient with colorectal cancer. *Tropical parasitology*. 2017;7(2):122-4.
34. Muller LM, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman AI, et al. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Infect Dis*. 2005;41(3):281-8.
35. Taamasri P, Mungthin M, Rangsin R, Tongupprakarn B, Areekul W, Leelayoova S. Transmission of intestinal *blastocystosis* related to the quality of drinking water. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2000;31(1):112-7.
36. Taamasri P, Leelayoova S, Rangsin R, Naaglor T, Ketupanya A, Mungthin M. Prevalence of *Blastocystis hominis* carriage in Thai army personnel based in Chonburi, Thailand. *Mil Med*. 2002;167(8):643-6.
37. Yaicharoen R, Sripochang S, Sermsart B, Pidetcha P. Prevalence of *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals from Bangkok, Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2005;36 Suppl 4:17-20.
38. Pipatsatitpong D, Rangsin R, Leelayoova S, Naaglor T, Mungthin M. Incidence and risk factors of *Blastocystis* infection in an orphanage in Bangkok, Thailand. *Parasit Vectors*. 2012;5:37.
39. Thathaisong U, Siripattanapibong S, Mungthin M, Pipatsatitpong D, Tan-ariya P, Naaglor T, et al. Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the Home for Girls, Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(2):352-8.
40. Popruk S, Udonsom R, Koompapong K, Mahittikorn A, Kusolsuk T, Ruangsittichai J, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* in Thai-Myanmar border, Thailand. *The Korean journal of parasitology*. 2015;53(1):13-9.

41. Palasuwan A, Palasuwan D, Mahittikorn A, Chiabchalard R, Combes V, Popruk S. Subtype Distribution of *Blastocystis* in Communities along the Chao Phraya River, Thailand. *Korean J Parasitol*. 2016;54(4):455-60.
42. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, et al. Genetic diversity of *blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist*. 2013;164(4):497-509.
43. Stensvold CR, Tan KSW, Clark CG. *Blastocystis*. *Trends in Parasitology*. 2020;36(3):315-6.
44. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop*. 2013;126(1):11-8.
45. Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(4):588-92.
46. Yoshikawa H, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals. *J Parasitol*. 2003;89(3):585-94.
47. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitol*. 2013;82:1-32.
48. Stensvold CR. Thinking *Blastocystis* out of the box. *Trends in Parasitology*. 2012;28(8):305.
49. Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, Gómez-Muñoz MT, Borrás R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitology Research*. 2009;105(4):949.
50. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KEP, Nielsen HV. *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(6):883-5.
51. Wu Z, Mirza H, Teo JDW, Tan KSW. Strain-Dependent Induction of Human Enterocyte Apoptosis by *Blastocystis* Disrupts Epithelial Barrier and ZO-1 Organization in a Caspase 3- and 9-Dependent Manner. *BioMed Research International*. 2014;2014:11.
52. Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. *Trends in Parasitology*. 2009;25(1):23-9.

53. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IKMD, Hossain MB, et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology Research*. 2004;92(1):22-9.
54. Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol*. 2006;92(5):1081-7.
55. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *blastocystis*. *Protist*. 2006;157(1):77-85.
56. Yoshikawa H, Iwamasa A. Human *Blastocystis* subtyping with subtype-specific primers developed from unique sequences of the SSU rRNA gene. *Parasitology international*. 2016;65(6, Part B):785-91.
57. Nanditha A, Ma RCW, Ramachandran A, Snehalatha C, Chan JCN, Chia KS, et al. Diabetes in Asia and the pacific: Implications for the global epidemic. *Diabetes Care*. 2016;39(3):472-85.
58. Aekplakorn W. Thai National Health Examination Survey, NHES V. Health Systems Research Institute (HSRI).
59. Organization WH. Global report on diabetes 2016 [cited 2019 Jan 12]. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/204871>.
60. Pozzilli P, Leslie RDG. Infections and Diabetes: Mechanisms and Prospects for Prevention. *Diabetic Medicine*. 1994;11(10):935-41.
61. Calvet HM, Yoshikawa TT. INFECTIONS IN DIABETES. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2001;15(2):407-21.
62. Shah BR, Hux JE. Quantifying the Risk of Infectious Diseases for People With Diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(2):510.
63. Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16 Suppl 1:S27-36.
64. Stegenga ME, van der Crabben SN, Blümer RME, Levi M, Meijers JCM, Serlie MJ, et al. Hyperglycemia enhances coagulation and reduces neutrophil degranulation, whereas hyperinsulinemia inhibits fibrinolysis during human endotoxemia. *Blood*. 2008;112(1):82.

65. Kumar M, Roe K, Nerurkar PV, Orillo B, Thompson KS, Verma S, et al. Reduced immune cell infiltration and increased pro-inflammatory mediators in the brain of Type 2 diabetic mouse model infected with West Nile virus. *J Neuroinflammation*. 2014;11:80.
66. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999;26(3-4):259-65.
67. Peleg AY, Weerathna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23(1):3-13.
68. Delamaire M, Maugeudre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med*. 1997;14(1):29-34.
69. Carey IM, Critchley JA, DeWilde S, Harris T, Hosking FJ, Cook DG. Risk of Infection in Type 1 and Type 2 Diabetes Compared With the General Population: A Matched Cohort Study. *Diabetes Care*. 2018;41(3):513.
70. Zaccone P, Hall SW. Helminth infection and type 1 diabetes. The review of diabetic studies : RDS. 2012;9(4):272-86.
71. Akinbo FO, Olujobi SO, Omoregie R, Egbe C. Intestinal parasitic infections among diabetes mellitus patients. *Biomarkers and Genomic Medicine*. 2013;5(1):44-7.
72. Elnadi NA, Hassanien HA, Ahmad AM, Abd Ellah AK. Intestinal Parasites in Diabetic patients in Sohag university hospitals, EGYPT. *J Egypt Soc Parasitol*. 2015;45(2):443-9.
73. Tahapary DL, de Ruitter K, Martin I, van Lieshout L, Guigas B, Soewondo P, et al. Helminth infections and type 2 diabetes: a cluster-randomized placebo controlled SUGARSPIN trial in Nangapanda, Flores, Indonesia. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15(1):133.
74. Majidiani H, Dalvand S, Daryani A, Galvan-Ramirez MdLL, Foroutan-Rad M. Is chronic toxoplasmosis a risk factor for diabetes mellitus? A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016;20:605-9.
75. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2012;59(5):429-514.
76. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature*. 1996;380:398.

77. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev. 1996;9(4):563-84.
78. Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. Veterinary parasitology. 2004;120(3):235-42.
79. Tan KS, Mirza H, Teo JD, Wu B, Macary PA. Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. Curr Infect Dis Rep. 2010;12(1):28-35.
80. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, et al. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. J Eukaryot Microbiol. 2002;49(1):42-53.
81. Boreham PF, Stenzel DJ. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. Adv Parasitol. 1993;32:1-70.
82. Suresh K, Chong SY, Howe J, Ho LC, Ng GC, Yap EH, et al. Tubulovesicular elements in *Blastocystis hominis* from the caecum of experimentally-infected rats. International journal for parasitology. 1995;25(1):123-6.
83. Stenzel DJ, Boreham PFL, McDougall R. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. International journal for parasitology. 1991;21(7):807-12.
84. Pakandl M. *Blastocystis* sp. from pigs: Ultrastructural changes occurring during polyxenic cultivation in Iscove's modified Dulbecco's medium. Parasitology Research. 1999;85(8-9):743-8.
85. Tan KS, Howe J, Yap EH, Singh M. Do *Blastocystis hominis* colony forms undergo programmed cell death? Parasitol Res. 2001;87(5):362-7.
86. Nasirudeen AMA, Tan KSW, Singh M, Yap EH. Programmed cell death in a human intestinal parasite, *blastocystis hominis*. Parasitology. 2001;123(3):235-46.
87. Dunn LA, Boreham PF, Stenzel DJ. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. International journal for parasitology. 1989;19(1):43-56.
88. Lanuza MD, Carbajal JA, Borrás R. Identification of surface coat carbohydrates in *Blastocystis hominis* by lectin probes. International journal for parasitology. 1996;26(5):527-32.
89. YOSHIKAWA H, KUWAYAMA N, ENOSE Y. Histochemical Detection of Carbohydrates of *Blastocystis hominis*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 1995;42(1):70-4.

90. Zaman V, Howe J, Ng M. Observations on the surface coat of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res. 1997;83(7):731-3.
91. Stenzel DJ, Dunn LA, Boreham PFL. Endocytosis in cultures of *Blastocystis hominis*. International journal for parasitology. 1989;19(7):787-91.
92. Parija SC, Jeremiah S. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. Tropical parasitology. 2013;3(1):17-25.
93. Katsarou-Katsari A, Vassalos CM, Tzanetou K, Spanakos G, Papadopoulou C, Vakalis N. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. Acta Derm Venereol. 2008;88(1):80-1.
94. McClure HM, Strobert EA, Healy GR. *Blastocystis hominis* in a pig-tailed macaque: a potential enteric pathogen for nonhuman primates. Lab Anim Sci. 1980;30(5):890-4.
95. Tan SW, Singh M, Yap EH, Ho LC, Moe KT, Howe J, et al. Colony formation of *Blastocystis hominis* in soft agar. Parasitol Res. 1996;82(4):375-7.
96. ZIERDT CH. Studies of *Blastocystis hominis*. The Journal of Protozoology. 1973;20(1):114-21.
97. Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. Parasitology Research. 1995;81(5):446-50.
98. Stenzel DJ, Boreham PF. A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. International journal for parasitology. 1991;21(5):613-5.
99. Zaman V, Howe J, Ng M. Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. Parasitology Research. 1997;83(3):306-8.
100. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. Parasitology Research. 1999;85(2):103-8.
101. Zaman V, Zaki M, Manzoor M, Howe J, Ng M. Postcystic development of *Blastocystis hominis*. Parasitology Research. 1999;85(6):437-40.
102. Stenzel DJ, Lee MG, Boreham PF. Morphological differences in *Blastocystis* cysts- an indication of different species? Parasitol Res. 1997;83(5):452-7.
103. Zaman V, Howe J, Ng M. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. Parasitol Res. 1995;81(6):465-9.

104. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Ng GC, et al. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitology Research*. 1996;82(5):439-44.
105. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology Research*. 1997;83(4):319-25.
106. Chen XQ, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Yap EH. In vitro encystation and excystation of *Blastocystis ratti*. *Parasitology*. 1999;118(2):151-60.
107. Denoëud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, et al. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome biology*. 2011;12(3):R29-R.
108. Clark CG. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1997;87(1):79-83.
109. Yoshikawa H, Nagano I, Wu Z, Yap EH, Singh M, Takahashi Y. Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Molecular and Cellular Probes*. 1998;12(3):153-9.
110. Stensvold CR. Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *J Clin Microbiol*. 2013;51(1):190-4.
111. Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, Pandey BD, Sherchand JB, Yanagi T, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Veterinary parasitology*. 2009;160(3):295-300.
112. Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12(2):263-73.
113. Alfellani MA, Jacob AS, Perea NO, Krecek RC, Taner-Mulla D, Verweij JJ, et al. Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology*. 2013;140(8):966-71.
114. Wu Z, Mirza H, Tan KSW. Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* subtype-7. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(5):e2885-e.

115. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Mølbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007;59(3):303-7.
116. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary parasitology*. 2010;169(1):8-17.
117. Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International journal for parasitology*. 2009;39(4):473-9.
118. Wang W, Owen H, Traub RJ, Cuttall L, Inpankaew T, Bielefeldt-Ohmann H. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Veterinary parasitology*. 2014;203(3):264-9.
119. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol*. 2011;49(3):975-83.
120. Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates. *Veterinary parasitology*. 2003;113(3-4):321-5.
121. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *blastocystis* isolates. *Parasitology*. 2003;126(Pt 1):1-9.
122. Yoshikawa H, Abe N, Wu Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology*. 2004;150(Pt 5):1147-51.
123. Stensvold CR, Arendrup MC, Nielsen HV, Molbak K. [*Blastocystis*--an enigmatic parasite]. *Ugeskr Laeger*. 2009;171(34):2388-90.
124. Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitology Research*. 2009;105(6):1589.
125. Nagel R, Cuttall L, Stensvold CR, Mills PC, Bielefeldt-Ohmann H, Traub RJ. *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Intern Med J*. 2012;42(11):1187-95.

126. Thathaisong U, Worapong J, Mungthin M, Tan-Ariya P, Viputtigul K, Sudatis A, et al. *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 2003;41(3):967-75.
127. Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, et al. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. J Clin Microbiol. 2005;43(1):348-55.
128. Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, et al. Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2008;79(3):401-6.
129. Scanlan PD, Marchesi JR. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. Isme j. 2008;2(12):1183-93.
130. Pipatsatitpong D, Leelayoova S, Mungthin M, Aunpad R, Naaglor T, Rangsin R. Prevalence and Risk Factors for *Blastocystis* Infection Among Children and Caregivers in a Child Care Center, Bangkok, Thailand. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2015;93(2):310-5.
131. Yowang A, Tsaousis AD, Chumphonsuk T, Thongsin N, Kullawong N, Popluechai S, et al. High diversity of *Blastocystis* subtypes isolated from asymptomatic adults living in Chiang Rai, Thailand. Infection, Genetics and Evolution. 2018;65:270-5.
132. Srichaipon N, Nuchprayoon S, Charuchailbovorn S, Sukkapan P, Sanprasert V. A Simple Genotyping Method for Rapid Differentiation of *Blastocystis* Subtypes and Subtype Distribution of *Blastocystis* spp. in Thailand. Pathogens (Basel, Switzerland). 2019;8(1):38.
133. Govind SK, Khairul AA, Smith HV. Multiple reproductive processes in *Blastocystis*. Trends in Parasitology. 2002;18(12):528.
134. Tan TC, Suresh KG. Evidence of plasmotomy in *Blastocystis hominis*. Parasitology Research. 2007;101(6):1521-5.
135. Zhang X, Qiao JY, Zhou XJ, Yao FR, Wei ZC. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and in vitro. Parasitology Research. 2007;101(1):43-51.

136. Suresh K, Mak JW, Chuong LS, Ragunathan T, Init I. Sac-like pouches in *Blastocystis* from the house lizard *Cosymbotus platyurus*. *Parasitology Research*. 1997;83(6):523-5.
137. Zaman V, Khan KZ, Khan MA, Khan MA. Isolation of *Blastocystis hominis* from sewage. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1994;25(1):211.
138. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut pathogens*. 2014;6:17-.
139. Scanlan PD, Stensvold CR. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends in Parasitology*. 2013;29(11):523-9.
140. Mungthin M, Suwannasaeng R, Naaglor T, Areekul W, Leelayoova S. Asymptomatic intestinal microsporidiosis in Thai orphans and child-care workers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95(3):304-6.
141. Saksirisampant W, Nuchprayoon S, Wiwanitkit V, Yenthakam S, Ampavasiri A. Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani province. *J Med Assoc Thai*. 2003;86 Suppl 2:S263-70.
142. Saksirisampant W, Prownebon J, Kulkumthorn M, Yenthakam S, Janpla S, Nuchprayoon S. Prevalence of intestinal parasitic infections among school children in the central region of Thailand. *J Med Assoc Thai*. 2006;89(11):1928-33.
143. Bart A, Wentink-Bonnema EM, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJ, van Vugt M, et al. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis*. 2013;13:389.
144. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, et al. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis*. 2013;1(5):167-78.
145. Hirata T, Nakamura H, Kinjo N, Hokama A, Kinjo F, Yamane N, et al. Prevalence of *Blastocystis hominis* and *Strongyloides stercoralis* infection in Okinawa, Japan. *Parasitol Res*. 2007;101(6):1717-9.
146. Wong KHS, Ng GC, Lin RTP, Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KSW. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitology Research*. 2008;102(4):663-70.

147. Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004;23(6):509-11.
148. Pegelow K, Gross R, Pietrzik K, Lukito W, Richards AL, Fryauff DJ. Parasitological and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1997;28(1):173-90.
149. El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, et al. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. BMC infectious diseases. 2014;14:164-.
150. Poulsen CS, Efunshile AM, Nelson JA, Stensvold CR. Epidemiological Aspects of *Blastocystis* Colonization in Children in Ilero, Nigeria. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2016;95(1):175-9.
151. Eroglu F, Koltas IS. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. Parasitology Research. 2010;107(4):841-5.
152. Lee LI, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK. *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? Parasit Vectors. 2012;5:130.
153. Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, et al. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38(4):1324-30.
154. Stark D, Fotedar R, van Hal S, Beebe N, Marriott D, Ellis JT, et al. Prevalence of enteric protozoa in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative men who have sex with men from Sydney, Australia. Am J Trop Med Hyg. 2007;76(3):549-52.
155. Tan KSW, Singh M, Yap EH. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. International journal for parasitology. 2002;32(7):789-804.
156. Andersen LO, Brien, Stensvold CR. *Blastocystis* in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective? Journal of Clinical Microbiology. 2016;54(3):524.
157. Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzen A, Stopsack K, Heinrich-Gräfe U, et al. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. Parasitology international. 2010;59(3):469-71.

158. Casero RD, Mongi F, Sánchez A, Ramírez JD. *Blastocystis* and urticaria: Examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. *Acta Tropica*. 2015;148:156-61.
159. Verma R, Delfanian K. *Blastocystis hominis* Associated Acute Urticaria. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2013;346(1):80-1.
160. Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilić-Stojanović M, Heilig HGJ, De Vos WM, O'Toole PW, et al. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*. 2014;90(1):326-30.
161. Idris NS, Dwipoerwantoro PG, Kurniawan A, Said M. Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response. *J Infect Dev Ctries*. 2010;4(5):309-17.
162. Dinleyici EC, Eren M, Dogan N, Reyhanioglu S, Yargic ZA, Vandenplas Y. Clinical efficacy of *Saccharomyces boulardii* or metronidazole in symptomatic children with *Blastocystis hominis* infection. *Parasitol Res*. 2011;108(3):541-5.
163. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitology Research*. 2008;102(5):853-60.
164. Tan TC, Ong SC, Suresh KG. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitology Research*. 2009;105(5):1283.
165. Zuckerman MJ, Watts MT, Ho H, Meriano FV. *Blastocystis hominis* Infection and Intestinal Injury. *The American Journal of the Medical Sciences*. 1994;308(2):96-101.
166. CHEN T-L, CHAN C-C, CHEN H-P, FUNG C-P, LIN C-P, CHAN W-L, et al. Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;69(2):213-6.
167. Abou El Naga IF, Negm AY. Morphology, histochemistry and infectivity of *Blastocystis hominis* cyst. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 2001;31(2):627-35.
168. Fayer R, Elsasser T, Gould R, Solano G, Urban J, Santin M. *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitology Research*. 2014;113(4):1465-72.

169. Wang W, Bielefeldt-Ohmann H, Traub RJ, Cuttell L, Owen H. Location and pathogenic potential of *Blastocystis* in the porcine intestine. PLoS One. 2014;9(8):e103962-e.
170. Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KSW. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. Parasitology Research. 2005;97(5):386-9.
171. Sio SWS, Puthia MK, Lee ASY, Lu J, Tan KSW. Protease activity of *Blastocystis hominis*. Parasitology Research. 2006;99(2):126-30.
172. Puthia MK, Sio SWS, Lu J, Tan KSW. *Blastocystis ratti* induces Contact-Independent Apoptosis, F-Actin Rearrangement, and Barrier Function Disruption in IEC-6 Cells. Infection and Immunity. 2006;74(7):4114.
173. Ajjampur SSR, Tan KSW. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. — Interpreting results from in vitro and in vivo studies. Parasitology international. 2016;65(6, Part B):772-9.
174. Mirza H, Wu Z, Teo JDW, Tan KSW. Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. Cellular Microbiology. 2012;14(9):1474-84.
175. Dagci H, Ustun S, Taner MS, Ersoz G, Karacasu F, Budak S. Protozoon infections and intestinal permeability. Acta Tropica. 2002;81(1):1-5.
176. Wu B, Yin J, Texier C, Roussel M, Tan KS. *Blastocystis* legumain is localized on the cell surface, and specific inhibition of its activity implicates a pro-survival role for the enzyme. J Biol Chem. 2010;285(3):1790-8.
177. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. PLoS Pathogens. 2012;8(3).
178. Kaya S, Cetin ES, Aridogan BC, Arikan S, Demirci M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. Turkiye Parazitol Derg. 2007;31(3):184-7.
179. Moghaddam DD, Ghadirian E, Azami M. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. Parasitology Research. 2005;96(4):273-5.
180. Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. Journal of clinical microbiology. 1990;28(1):116-21.

181. Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, Thathaisong U, Nimmanon T, Taamasri P, et al. The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol Res.* 2004;93(6):445-7.
182. Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M. In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002;96(8):803-7.
183. Clark CG, Diamond LS. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clinical Microbiology Reviews.* 2002;15(3):329.
184. Londono AL, Mejia S, Gomez-Marin JE. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitism in preschool children from the urban area of Calarca, Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota).* 2009;11(1):72-81.
185. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, et al. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research.* 2010;106(5):1033-8.
186. Mirza H, Tan KSW. *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitology Research.* 2009;104(2):355-61.
187. Parkar U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, et al. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology.* 2006;134(3):359-67.
188. Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of blastocystis sp. in clinical stool samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(2):308-12.
189. Hussain R, Jaferi W, Zuberi S, Baqai R, Abrar N, Ahmed A, et al. Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56(3):301-6.
190. Mahmoud MS, Saleh WA. Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections. *J Egypt Soc Parasitol.* 2003;33(1):13-30.

191. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7.
192. McCourt CM, McArt DG, Mills K, Catherwood MA, Maxwell P, Waugh DJ, et al. Validation of Next Generation Sequencing Technologies in Comparison to Current Diagnostic Gold Standards for BRAF, EGFR and KRAS Mutational Analysis. *PLoS One*. 2013;8(7):e69604.
193. Karger BL, Guttman A. DNA sequencing by CE. *Electrophoresis*. 2009;30 Suppl 1(Suppl 1):S196-S202.
194. Technologies L. Applied Biosystems® Genetic Analyzers 2013 [26 October 2020]. Available from: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fbrochures%2Fbrochure-ab-genetic-analyzers.pdf&title=QXBwbGllZCBCaW9zeXN0ZW1zJnJlZzsgR2VuZXRpYyBBbmFseXplcnM=>.
195. Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Ahmed A, Surin J, Mak JW. Drinking water is a significant predictor of *Blastocystis* infection among rural Malaysian primary schoolchildren. *Parasitology*. 2012;139(8):1014-20.
196. Mohammad NA, Al-Mekhlafi HM, Moktar N, Anuar TS. Prevalence and risk factors of *Blastocystis* infection among underprivileged communities in rural Malaysia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2017;10(5):491-7.
197. Nithyamathi K, Chandramathi S, Kumar S. Predominance of *Blastocystis* sp. Infection among School Children in Peninsular Malaysia. *PLoS One*. 2016;11(2):e0136709.
198. Kurniawan A, Karyadi T, Dwintasari SW, Sari IP, Yuniastuti E, Djauzi S, et al. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103(9):892-8.
199. Hailemariam G, Kassu A, Abebe G, Abate E, Damte D, Mekonnen E, et al. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS and HIV seronegative individuals in a Teaching Hospital, Ethiopia. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2004;57(2):41-3.

200. Horiki N, Kaneda Y, Maruyama M, Fujita Y, Tachibana H. Intestinal blockage by carcinoma and *Blastocystis hominis* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(3):400-2.
201. Patino WD, Cavuoti D, Banerjee SK, Swartz K, Ashfaq R, Gokaslan T. Cytologic diagnosis of *blastocystis hominis* in peritoneal fluid: a case report. *Acta Cytol.* 2008;52(6):718-20.
202. Nimri LF. Evidence of an epidemic of *Blastocystis hominis* infections in preschool children in northern Jordan. *J Clin Microbiol.* 1993;31(10):2706-8.
203. Noureldin MS, Shaltout AA, El Hamshary EM, Ali ME. Opportunistic intestinal protozoal infections in immunocompromised children. *J Egypt Soc Parasitol.* 1999;29(3):951-61.
204. Requena I, Hernandez Y, Ramsay M, Salazar C, Devera R. [Prevalence of *Blastocystis hominis* among food handlers from Caroni municipality, Bolivar State, Venezuela]. *Cad Saude Publica.* 2003;19(6):1721-7.
205. Khan ZA, Alkhalife IS. Prevalence of *Blastocystis hominis* among "healthy" food handlers in Dammam, Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol.* 2005;35(2):395-401.
206. Mohtashampour M, Ghaffari Hoseini SG, Pestehchian N, Yousefi H, Fallah E, Hazratian T. Intestinal parasitic infections in patients with Diabetes Mellitus: A case-control study. *J Anal Res Clin Med.* 2015;3(3):157-63.
207. Sheehan JP, Ulchaker MM. *Blastocystis hominis* Treatable Cause of Diabetic Diarrhea. *Diabetes Care.* 1990;13(8):906.
208. Association AD. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care.* 2018;41(Supplement 1):S13.
209. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* 2017;40(Supplement 1):S11.
210. Chiang JL, Kirkman MS, Laffel LM, Peters AL. Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2014;37(7):2034-54.
211. Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes Care.* 1998;21 Suppl 2:B161-7.

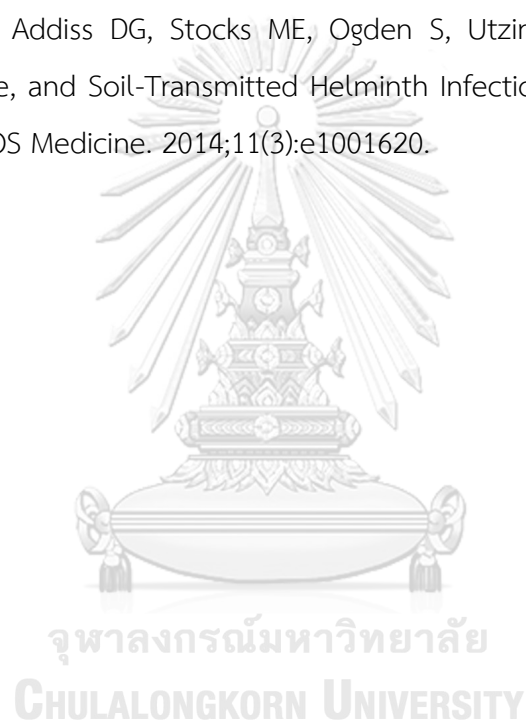
212. Buchanan TA, Xiang AH, Page KA. Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy. *Nature reviews Endocrinology*. 2012;8(11):639-49.
213. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med*. 2008;358(19):1991-2002.
214. Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, Bachman VF, Biryukov S, Brauer M, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;386(10010):2287-323.
215. Vazquez G, Duval S, Jacobs DR, Jr., Silventoinen K. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. *Epidemiol Rev*. 2007;29:115-28.
216. Ramachandran A, Ma RC, Snehalatha C. Diabetes in Asia. *Lancet*. 2010;375(9712):408-18.
217. Anna V, van der Ploeg HP, Cheung NW, Huxley RR, Bauman AE. Sociodemographic correlates of the increasing trend in prevalence of gestational diabetes mellitus in a large population of women between 1995 and 2005. *Diabetes Care*. 2008;31(12):2288-93.
218. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2018;138:271-81.
219. Gestational diabetes 2019 [cited 2019 Jan 12]. Available from: <https://www.dmthai.org/index.php/understand-diabetes/diabetes-pregnant>.
220. International Diabetes Federation Atlas-8th Edition 2017 [cited 2019 Jan 12]. Available from: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>.
221. Wendland EM, Torloni MR, Falavigna M, Trujillo J, Dode MA, Campos MA, et al. Gestational diabetes and pregnancy outcomes--a systematic review of the World Health Organization (WHO) and the International Association of Diabetes in Pregnancy Study Groups (IADPSG) diagnostic criteria. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2012;12:23.
222. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007:61038-.

223. Rhee SY, Kim YS. The Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Vascular Complications. *Diabetes Metab J*. 2018;42(3):188-95.
224. LALLA E, LAMSTER IB, DRURY S, FU C, SCHMIDT AM. Hyperglycemia, glycooxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontology* 2000. 2000;23(1):50-62.
225. Lalla RV, D'Ambrosio JA. Dental management considerations for the patient with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2001;132(10):1425-32.
226. Gerald P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*. 2010;106(8):1319-31.
227. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod*. 2003;29(6):383-9.
228. Saiki O, Negoro S, Tsuyuguchi I, Yamamura Y. Depressed immunological defence mechanisms in mice with experimentally induced diabetes. *Infect Immun*. 1980;28(1):127-31.
229. Alba-Loureiro TC, Munhoz CD, Martins JO, Cerchiaro GA, Scavone C, Curi R, et al. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(8):1037-44.
230. Charles PG, Uçkay I, Kressmann B, Emonet S, Lipsky BA. The role of anaerobes in diabetic foot infections. *Anaerobe*. 2015;34:8-13.
231. Benfield T, Jensen JS, Nordestgaard BG. Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome. *Diabetologia*. 2007;50(3):549-54.
232. Dunachie S, Chamnan P. The double burden of diabetes and global infection in low and middle-income countries. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018;113(2):56-64.
233. Jeon CY, Murray MB. Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies. *PLOS Medicine*. 2008;5(7):e152.
234. Dooley KE, Tang T, Golub JE, Dorman SE, Cronin W. Impact of Diabetes Mellitus on Treatment Outcomes of Patients with Active Tuberculosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;80(4):634-9.

235. Jenjaroen K, Chumseng S, Sumonwiriya M, Ariyaprasert P, Chantratita N, Sunyakumthorn P, et al. T-Cell Responses Are Associated with Survival in Acute Melioidosis Patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(10):e0004152.
236. Ferreira MS, Borges AS. Some Aspects of Protozoan Infections in Immunocompromised Patients: A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97:443-57.
237. Sharquie KE, Najim RA, Hussein AK. Reinfestation in cutaneous leishmaniasis: a new look at predisposing conditions. *Saudi Med J*. 2000;21(5):464-7.
238. Weisser M, Khanlari B, Terracciano L, Arber C, Gratwohl A, Bassetti S, et al. Visceral leishmaniasis: a threat to immunocompromised patients in non-endemic areas? *Clinical Microbiology and Infection*. 2007;13(8):751-3.
239. Danquah I, Bedu-Addo G, Mockenhaupt FP. Type 2 diabetes mellitus and increased risk for malaria infection. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(10):1601-4.
240. Thatoi PK. Diabetes and Severe Malaria—Clinical Profile and Outcome. *Diabetes*. 2018;67(Supplement 1):2388-PUB.
241. Htun NSN, Odermatt P, Paboriboune P, Sayasone S, Vongsakid M, Phimolsarn-Nusith V, et al. Association between helminth infections and diabetes mellitus in adults from the Lao People's Democratic Republic: a cross-sectional study. *Infectious Diseases of Poverty*. 2018;7(1):105.
242. Organization WH. Guidelines for Drinking-water Quality. Third ed2008.
243. Cochran WG. Sampling Techniques. Third ed1977. 448 p.
244. Whipps CM, Boorom K, Bermudez LE, Kent ML. Molecular characterization of *Blastocystis* species in Oregon identifies multiple subtypes. *Parasitology Research*. 2010;106(4):827-32.
245. Banaticla JE, Rivera WL. Detection and subtype identification of *Blastocystis* isolates from wastewater samples in the Philippines. *Journal of water and health*. 2011;9(1):128-37.
246. Udonsom R, Prasertbun R, Mahittikorn A, Mori H, Changbunjong T, Komalamisra C, et al. *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2018;65:107-11.

247. Wylezich C, Belka A, Hanke D, Beer M, Blome S, Höper D. Metagenomics for broad and improved parasite detection: a proof-of-concept study using swine faecal samples. *International journal for parasitology*. 2019;49(10):769-77.
248. Rivera WL. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Veterinary parasitology*. 2008;156(3-4):178-82.
249. Pintong AR, Sunyanusin S, Prasertbun R, Mahittikorn A, Mori H, Changbunjong T, et al. *Blastocystis* subtype 5: Predominant subtype on pig farms, Thailand. *Parasitology international*. 2018;67(6):824-8.
250. Chavatte J-M, Rol, Juréen. Incidental Detection of *Cyclospora Cayetanensis* during General Health Screening: A Case Study from Singapore. *Journal of Tropical Diseases & Public Health*. 2016;4:1-5.
251. Han JQ, Li Z, Zou Y, Pu LH, Zhu XQ, Zou FC, et al. Prevalence, Molecular Characterization and Risk Factors of *Blastocystis* sp. from Farmed Pigs in Yunnan Province, Southwestern China. *Acta Parasitologica*. 2020.
252. Katsumata M, Yoshikawa H, Tokoro M, Mizuno T, Nagamoto T, Hendarto J, et al. Molecular phylogeny of *Blastocystis* isolates from wild rodents captured in Indonesia and Japan. *Parasitol Res*. 2018;117(9):2841-6.
253. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RCA, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends in Parasitology*. 2007;23(3):93-6.
254. Utzinger J, Botero-Kleiven S, Castelli F, Chiodini PL, Edwards H, Köhler N, et al. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: a comparison among European reference laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(3):267-73.
255. Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *blastocystis* sp. in clinical stool samples. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(2):308-12.
256. Souppart L, Sancier G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitology Research*. 2009;105(2):413.

257. Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark GC, Evengård B. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2012;31(7):1689-96.
258. Deng L, Chai Y, Zhou Z, Liu H, Zhong Z, Hu Y, et al. Epidemiology of *Blastocystis* sp. infection in China: a systematic review. *Parasite (Paris, France)*. 2019;26:41-.
259. Zhang S-X, Kang F-Y, Chen J-X, Tian L-G, Geng L-L. Risk factors for *Blastocystis* infection in HIV/AIDS patients with highly active antiretroviral therapy in Southwest China. *Infectious Diseases of Poverty*. 2019;8(1):89.
260. Strunz EC, Addiss DG, Stocks ME, Ogden S, Utzinger J, Freeman MC. Water, Sanitation, Hygiene, and Soil-Transmitted Helminth Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS Medicine*. 2014;11(3):e1001620.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

แบบสอบถามผู้เข้าร่วมวิจัย

(รหัสผู้เข้าร่วมวิจัย:.....)

โครงการวิจัย เรื่อง การหาความชุกและการกระจายสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วย
โรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ณ อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ประเทศไทย

ส่วนที่ 1 : เพศ () ชาย () หญิง

อายุ ปี

โรคประจำตัว/โรคอื่นๆ:

ระยะเวลาที่เป็นโรคเบาหวาน ปี

ส่วนที่ 2 : อาชีพ:

ระดับการศึกษา:

ส่วนที่ 3 : แหล่งน้ำดื่ม

น้ำประปา () น้ำประปาที่กรองภายในบ้าน () น้ำขวดตามท้องตลาด ()

น้ำบาดาล () น้ำจากแม่น้ำ () น้ำฝน () อื่นๆ

ส้วมที่ใช้ภายในบ้าน

ส้วมแบบชักโครก () ส้วมแบบราดน้ำ () ส้วมหลุม ()

สัตว์เลี้ยง

ไม่มี () มี () ระบุชนิด

ส่วนที่ 4 : รับประทานอาหารสุกๆดิบๆ

มากกว่า 2 ครั้ง/สัปดาห์ () 1-2 ครั้ง/สัปดาห์ () ไม่เคย ()

ล้างผักหรือผลไม้สดก่อนรับประทาน ทุกครั้ง () บางครั้ง () ไม่เคย ()

ล้างมือก่อนรับประทานอาหาร ทุกครั้ง () บางครั้ง () ไม่เคย ()

ล้างมือหลังจากเข้าห้องส้วม ทุกครั้ง () บางครั้ง () ไม่เคย ()

ล้างมือหลังจากสัมผัสสัตว์เลี้ยง ทุกครั้ง () บางครั้ง () ไม่เคย ()

ขับถ่ายโดยใช้ห้องส้วม ทุกครั้ง () บางครั้ง () ไม่เคย ()

ภาคผนวก ข.

AF 02-12



คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสถาบัน ชุตที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
254 อาคารจามจุรี 1 ชั้น 2 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์: 0-2218-3202, 0-2218-3049 E-mail: eccu@chula.ac.th

COA No. 231/2562

ใบรับรองโครงการวิจัย

โครงการวิจัยที่ 159.2/62 : การหาความชุกและการกระจายสายพันธุ์ของเชื้อblasโตซิสติสในผู้ป่วยเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ณ อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ประเทศไทย

ผู้วิจัยหลัก : นายนพพล โพธิ์พฤกษ์

หน่วยงาน : คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสถาบัน ชุตที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้พิจารณา โดยใช้หลัก ของ Belmont Report 1979, Declaration of Helsinki 2013, Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOM) 2016, มาตรฐานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน (มคจ.) 2556, นโยบายแห่งชาติและแนวทางปฏิบัติการวิจัยในมนุษย์ 2558 อนุมัติให้ดำเนินการศึกษาวิจัย เรื่องดังกล่าวได้

ลงนาม.....
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ปริดา ทักคนประดิษฐ์)
ประธาน

ลงนาม.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)
กรรมการและเลขานุการ

วันที่รับรอง : 25 กันยายน 2562

วันหมดอายุ : 24 กันยายน 2563

เอกสารที่คณะกรรมการรับรอง

- 1) โครงการวิจัย
- 2) เอกสารข้อมูลสำหรับผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยและหนังสือแสดงความยินยอมของผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย
- 3) ผู้วิจัย
- 4) แบบสอบถาม

เงื่อนไข

1. ข้าพเจ้ารับทราบว่าเป็นการผิดจริยธรรม หากดำเนินการเก็บข้อมูลการวิจัยก่อนได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย
2. หากใบรับรองโครงการวิจัยหมดอายุ การดำเนินการวิจัยต้องยุติ เมื่อต้องการต่ออายุต้องขออนุมัติใหม่ล่วงหน้าไม่ต่ำกว่า 1 เดือน พร้อมส่งรายงานความก้าวหน้าการวิจัย
3. ต้องดำเนินการวิจัยตามที่ระบุไว้ในโครงการวิจัยอย่างเคร่งครัด
4. ใช้เอกสารข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย ใบยินยอมของกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย และเอกสารเชิญเข้าร่วมวิจัย (ถ้ามี) เฉพาะที่ประทับตราคณะกรรมการเท่านั้น
5. หากเกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ร้ายแรงในสถานที่เก็บข้อมูลที่ขออนุมัติจากคณะกรรมการ ต้องรายงานคณะกรรมการภายใน 5 วันทำการ
6. หากมีการเปลี่ยนแปลงการดำเนินการวิจัย ให้ส่งคณะกรรมการพิจารณารับรองก่อนดำเนินการ
7. โครงการวิจัยไม่เกิน 1 ปี ส่งแบบรายงานสิ้นสุดโครงการวิจัย (AF 02-14) และบทคัดย่อผลการวิจัยภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยเสร็จสิ้น สำหรับโครงการวิจัยที่เป็นวิทยานิพนธ์ให้ส่งบทคัดย่อผลการวิจัย ภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยเสร็จสิ้น

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นพพล โปธิ์พฤกษ์
วัน เดือน ปี เกิด	2 พฤศจิกายน 2527
สถานที่เกิด	จังหวัดอุทัยธานี
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุล ชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	335/1 หมู่ 5 ตำบลหนองฉาง อำเภอหนองฉาง จังหวัดอุทัยธานี



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY