บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

Cryptosporidium เป็นโปรโตซัวประเภทฉวยโอกาส ทำให้เกิดโรค cryptosporidiosis ส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในผู้ป่วย HIV ซึ่งทำให้ผู้ป่วยเหล่านี้มีอาการท้องเสีย ถ่ายเหลวเป็นน้ำ และในบางครั้งมีมูกปนมากับอุจจาระ ระยะเวลาของการเกิดโรคในกลุ่มผู้ป่วยดังกล่าวมักเรื้อรังเป็นเดือน หรืออาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต จากการศึกษาถึงการระบาดของโรค *Cryptosporidium* ในผู้ป่วยโรค AIDS พบว่าส่วนใหญ่การระบาดเกิดขึ้นในกลุ่มของประเทศกำลังพัฒนามากกว่ากลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว จากการสำรวจในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา 48 ประเทศ พบการติดเชื้อประมาณร้อยละ 7.9 และในกลุ่มประเทศพัฒนาแล้ว 56 ประเทศพบการติดเชื้อประมาณร้อยละ 4.9 จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าปัจจัยที่มีการติดเชื้อในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาเกี่ยวข้องกับการมีสุขาภิบาลที่ไม่ดี มีการปนเปื้อนของเชื้อในระบบการส่งน้ำ การอยู่ในชุมชนแออัดต่างๆ หรือเป็นการติดเชื้อจากสัตว์สู่คน เป็นต้น (Current and Garcia, 1991) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำสำรวจจากการตรวจอุจจาระของผู้ป่วยที่มารับบริการ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 ถึงปี ค.ศ. 2000 จำนวนผู้ป่วยที่มารับบริการประมาณ 1040 ราย พบการติดเชื้อ *Cryptosporidium* 110 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.5 ในจำนวนนี้พบว่าเป็นผู้ใหญ่ร้อยละ 8.65 ในเด็กร้อยละ1.92 ส่วนใหญ่พบว่าผู้ป่วยเหล่านี้มีการติดเชื้อ HIV และมีอาการท้องเสีย ถ่ายเหลวเป็นน้ำ อีกทั้งยังพบว่าผู้ป่วยทุกรายมีน้ำหนักลด และมีภาวะของการขาดสารอาหาร สอดคล้องกับการศึกษาของ Molasart และคณะ (1995) ซึ่งศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HIV พบการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในผู้ใหญ่ร้อยละ 7.9 และในเด็กร้อยละ 19

ในการศึกษานี้ได้นำปัจจัยด้านประชากรที่เป็นข้อมูลทั่วไป และประวัติการป่วยจากประชากรตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับการเกิดโรคพบว่า อัตราการตรวจพบเชื้อ *Cryptosporidium* พบในกลุ่มผู้ป่วย HIV เพศชายมากกว่าเพศหญิงในอัตราส่วนเท่ากับ 3.28 ต่อ 1 ซึ่งปัจจัยเสี่ยงของการได้รับเชื้อ HIV พบการติดเชื้อในเพศชายมากกว่าเพศหญิงเนื่องจากเพศชายมีพฤติกรรมในการมีเพศสัมพันธ์กับหญิงบริการที่ติดเชื้อ ในขณะที่เพศหญิงมักได้รับเชื้อจากสามี สำหรับผู้ป่วยในการศึกษานี้ที่น่าจะได้รับเชื้อจากการใช้เข็มฉีดยาที่ไม่สะอาดพบน้อยกว่ากลุ่มอื่นมากกว่าผู้ที่ฉีดยาเข้าเส้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pedersen และคณะ (1996) และเมื่อพิจารณาถึงกลุ่มอายุของผู้ป่วยพบว่าอัตราการติดเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุ 21-40 ปี เนื่องจากอยู่ในช่วงวัยทำงานและอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ ซึ่งมีการมารับการตรวจรักษามากกว่าในเด็ก แต่อายุไม่มีความสัมพันธ์กับการป่วยเป็นโรค cryptosporidiosis คล้ายกับการศึกษาของ

Casemore (1990a) ที่พบว่าอายุมีความสัมพันธ์กับการป่วยเป็นโรค cryptosporidiosis ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของ oocyst จากการกิน ซึ่งพบมากในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี เนื่องจากเป็นการสำรวจในสถานรับเลี้ยงเด็กรวมทั้งในโรงเรียน ดังนั้นจึงทำให้พบอัตราการติดเชื้อในเด็กมากกว่าในผู้ใหญ่

โดยทั่วไปการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยที่มีปริมาณของ CD4+lymphocyte มีค่าต่ำกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร สำหรับผู้ป่วยที่ทำการศึกษามีค่าของ CD4+lymphocyte ต่ำกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร (Blanshard et al., 1992) ทุกรายและยังพบว่าผู้ป่วยเหล่านี้ส่วนใหญ่มีการติดเชื้อของ pulmonary tuberculosis และมีแนวโน้มของการติดเชื้ออื่นร่วมด้วย อาการสำคัญที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์คือ มีอาการของการท้องเสีย ถ่ายเหลวเป็นน้ำ ซึ่งในบางครั้งมีลักษณะของมูกปนออกมากับอุจจาระ สามารถพบอาการดังกล่าวในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ทุกรายที่ทำการศึกษา นอกจากนี้ยังพบอาการอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้แก่ การเป็นไข้ ไอ อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน และมีอาการของการปวดท้อง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Dupont และคณะ (1995) ดังนั้นการติดเชื้อของ *Cryptosporidium* ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องมักมีอาการรุนแรงมากกว่าในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติ อีกทั้งยังพบว่าการติดเชื้อดังกล่าวไม่ได้มีการติดเชื้อเฉพาะภายในลำไส้เท่านั้น ยังสามารถพบการติดเชื้อภายนอกลำไส้ได้ถ้ามีการติดเชื้ออย่างรุนแรงซึ่งทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตจากการติดเชื้อดังกล่าวได้

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* นั้นโดยการตรวจหา oocyst ในอุจจาระเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และไม่เป็นการรบกวนผู้ป่วยเหมือนการตัดชิ้นเนื้อลำไส้ ซึ่งจากการตัดชิ้นเนื้อเยื่อบุลำไส้อาจตรวจไม่พบระยะต่างๆ ของเชื้อ แต่ในทางตรงข้ามสามารถพบ oocyst ในอุจจาระซึ่งอาจเป็นเพราะการตัดชิ้นเนื้อเยื่อไม่ตรงกับตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ เพราะว่าการติดเชื้อของ *Cryptosporidium* สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพภายนอกลำไส้ได้ เช่น ที่กระเพาะอาหาร ตับ เป็นต้น (Baskirville, 1991) อีกทั้งค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยมีราคาสูง และใช้เวลาตรวจนานกว่าการตรวจหา oocyst ในอุจจาระจากการย้อมสีพิเศษชนิดต่างๆ ที่มีการศึกษาของ Jongwutiwes และคณะ (1988) พบว่าการย้อมด้วยวิธี modified Kinyoun acid fast ให้การติดสีของ oocyst แยกออกจาก yeast และพื้นหลังได้อย่างชัดเจน สามารถดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายวัตถุ 40 เท่า อีกทั้งสามารถมองเห็นลักษณะของ sporozoites ได้อย่างชัดเจน วิธีนี้มีความสะดวก รวดเร็ว แม่นยำ และใช้เวลาในการย้อมไม่นานรวมไปถึงค่าใช้จ่ายก็ไม่มากนัก (Jongwrtiwes et al., 1988)

สำหรับการตรวจหา oocyst โดยการใช้ monoclonal antibodies ที่จำเพาะวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายที่สูงและเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่ขาดทักษะการย้อมสี และการตรวจจากเชื้อ (Rusnak et al., 1989) ในสิ่งแวดล้อมมากกว่าที่จะใช้ในการศึกษาในคน จากการศึกษาในครั้งนี้

พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ oocyst โดยวิธี sedimentation และวิธี flotation เป็นวิธีที่ประหยัดและมีความไวมากที่สุดแต่จากการศึกษาทั้งสองวิธีนี้ พบว่าวิธี sedimentation ไม่เหมาะสมกับการศึกษาในครั้งนี้เนื่องจากปริมาณของกากอุจจาระ และสิ่งเจือปนอื่นๆ ซึ่งมีผลสำหรับในการเตรียม DNA ที่จะใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้วิธี Sheather sucrose flotation เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ oocyst (Kim et al., 1992)

การศึกษาครั้งนี้พบว่าการตรวจวินิจฉัย oocyst จากอุจจาระผู้ป่วยโดยวิธี modified Kinyoun acid fast สอดคล้องกับการศึกษาของ Jongwutiwes และ คณะ (1988) ซึ่งสามารถเห็นลักษณะรูปร่างของ oocyst และแยกความแตกต่างของขนาด oocyst ที่ตรวจพบได้ ดังนั้นจึงได้ตรวจวัดขนาดของ oocyst ในแต่ละตัวอย่าง จำนวน 30 oocyst ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ขนาด oocyst พบว่า ขนาดของ oocyst สามารถแยกความแตกต่างได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 (CR1) ความยาว (4.6 $\pm$ 0.65) ความกว้าง (4.07 $\pm$ 0.57) กลุ่มที่ 2 (CR3 CR5 CR6 CR7 CR8 CR10 CR13 CR17 CR18 CR20 CR21 CR22 CR23 CR26 CR27 CR29 CR30 CR31 CR32 CR34 CR36 CR45 CR46 CR50 CR51 CR52 CR53 และCR55) ความยาว (5.38 $\pm$ 0.49) ความกว้าง (4.69 $\pm$ 0.39) และในกลุ่มที่ 3 (CR19) ความยาว (8.43 $\pm$ 0.44) ความกว้าง (6.25 $\pm$ 0.42) จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าในกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P<0.01$

สำหรับการแยก species ของเชื้อ *Cryptosporidium* นอกจากอาศัยขนาดของ oocyst แล้ว ความจำเพาะต่อโฮสต์ของเชื้อแต่ละ species และบริเวณที่มีการติดเชื้อในโฮสต์ นั้นมีข้อจำกัดหลายอย่างด้วยกัน คือ ปัญหาจากการเลือกสัตว์ทดลองให้เหมาะกับ species ของเชื้อที่ทำการศึกษา ซึ่งในสัตว์บางชนิดพบการติดเชื้อได้หลาย species นอกจากนี้ระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์และอายุล้วนมีผลต่อความสามารถในการรับเชื้อในสัตว์ต่างๆ ได้ ดังนั้นการศึกษาดังกล่าวจึงจำกัดเฉพาะบางห้องปฏิบัติการเท่านั้น (Fayer et at., 2000)

ในการศึกษานี้ได้นำเอาเทคนิคทางอณูชีววิทยา มาใช้ในการวิเคราะห์ species ของเชื้อ *Cryptosporidium* โดยวิธี PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ SSU rRNA gene (Xiao L et al, 1999) เนื่องจากเป็น gene ที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสสูง และมีความแตกต่างของลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ดังนั้น gene นี้สามารถนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ เพื่อใช้ในการจำแนก species ของเชื้อ *Cryptosporidium* (Margan et al., 1997)

จากการวิเคราะห์ผลการเรียงลำดับเบสในส่วนของ SSU rRNA เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับเบสใน GenBank สามารถแยกความแตกต่างได้ 4 กลุ่มโดยที่ในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ตัวอย่าง CR1 ตรงกับ *C. felis* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ตัวอย่าง CR3 CR5 CR6 CR7 CR8 CR10 CR13

CR17 CR18 CR20 CR21 CR22 CR23 CR26 CR27 CR29 CR30 CR31 CR32 CR34 CR36 CR45 CR46 CR50 CR51 CR52 CR53 และ CR55 ตรงกับ *C. parvum* human genotype กลุ่มที่ 3 ได้แก่ตัวอย่าง CR8 CR19 และCR21 ตรงกับ *C. meleagridis* และกลุ่มที่ 4 ตัวอย่าง CR19 ตรงกับ *C. muris* เป็นที่น่าสังเกตว่าในการศึกษานี้พบการติดเชื้อของ *C. parvum* ชนิด human genotype เท่านั้น โดยไม่พบ *C. parvum* bovine genotype และ *C. parvum* dog genotype เลย และการติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดขึ้นในผู้ใหญ่มากกว่าในเด็ก ส่วนในเด็กพบการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ซึ่งเป็น species อื่นๆ ที่มีโฮสต์ตามธรรมชาติที่เป็นสัตว์ปีก หนู และงู จึงอาจเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อในเด็กนั้นเป็นการติดเชื้อจากสัตว์สู่คน เนื่องจากเด็กน่าจะมีโอกาสคลุกคลีกับสัตว์มากกว่าผู้ใหญ่ และในการรักษาสุขภาพอนามัยที่ไม่ดี รวมทั้งอาจมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย

จากการวิธีวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการทราบแหล่งที่มาของการติดเชื้อ และสามารถนำมาอธิบายระบาดวิทยาของเชื้อแต่ละชนิดได้ ข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นแนวทางอันสำคัญในการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคต่อไปในอนาคต