การพัฒนาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay และวิธี Latex Particle Agglutination

นายก้องกริช ศรีบุรินทร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Development and Comparison of Efficacy of Diagnosis for Strongyloidiasis

by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Latex Particle Agglutination

Mr. Kongkrit Sriburin

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Parasitology
Department of Parasitology
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2016
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay และวิธี Latex Particle Agglutination
โดย	นายก้องกริช ศรีบุรินทร์
สาขาวิชา	ปรสิตวิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. วิวรพรรณ สรรประเสริฐ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง สุรางค์ นุชประยูร)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. วิวรพรรณ สรรประเสริฐ)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร. อาคม ใสงาม)

ก้องกริช ศรีบุรินทร์ : การพัฒนาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้ายด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay และวิธี Latex Particle Agglutination (Development and Comparison of Efficacy of Diagnosis for Strongyloidiasis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Latex Particle Agglutination) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. วิวรพรรณ สรรประเสริฐ, 54 หน้า.

Strongyloides stercoralis หรือพยาธิเส้นด้ายเป็นพยาธิตัวกลมที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็ก ติดต่อโดยการไชเข้าสู่ร่างกายผ่านทางผิวหนัง มีการระบาดในเขตที่มีฝนตกชุก โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อนแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงประเทศไทย ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่จะเป็นแบบเรื้อรังและไม่แสดงอาการ มักพบอาการแสดงในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อพยาธิจำนวนมาก การวินิจฉัยในปัจจุบันอาศัยการตรวจหาตัวอ่อนของพยาธิที่ออกมากับอุจจาระ แต่มีความไวต่ำ เนื่องจากจำนวนพยาธิที่ออกมากับอุจจาระมีจำนวนไม่มาก และมีจำนวนไม่แน่นอน การศึกษานี้วัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) และวิธี Latex Particle Agglutination เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อการติดเชื้อพยาธิเส้นด้ายโดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ และ NIE peptide แอนติเจน จากตัวอย่างซีรัมทั้งหมด 218 ตัวอย่าง พบว่าการตรวจด้วยวิธี ELISA โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ ตรวจหา anti-*S.stercoralis* IgG1antibody มีความไว 100% และมีความจำเพาะ 88.4% การตรวจหา anti-*S.stercoralis* IgG2 antibody มีความไว 100% และมีความจำเพาะ 85.3% การตรวจหา anti-*S.stercoralis* IgG3 antibody มีความ 100% และมีความจำเพาะ 58.4% และการตรวจหา anti-*S.stercoralis* IgG4 antibody มีความไว 100% และมีความจำเพาะ 93.0% ส่วนการตรวจด้วยวิธี Latex Particle Agglutination เพื่อตรวจหา anti-*S.stercoralis* antibody มีความไว 100% และมีความจำเพาะ 79.7% ใช้ NIE peptide แอนติเจน ตรวจหา anti-*S.stercoralis* IgG1antibody มีความไว 100% และมีความจำเพาะ 85.3% การตรวจหา anti-*S.stercoralis* IgG2 antibody มีความไว 97.7% และมีความจำเพาะ 67.4% การตรวจหา anti-*S.stercoralis* IgG3 antibody มีความ 100% และมีความจำเพาะ 66.9% และการตรวจหา anti-*S.stercoralis* IgG4 antibody มีความไว 94.3% และมีความจำเพาะ 83.8% ส่วนการตรวจด้วยวิธี Latex Particle Agglutination เพื่อตรวจหา anti-*S.stercoralis* antibody มีความไว 28.4% และมีความจำเพาะ 100% จากการศึกษานี้พบว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบทั้ง 2 วิธีมีความไวสูง 100% มีความไวในการวินิจฉัยสูงเท่ากัน แต่การตรวจหา anti-*S.stercoralis* IgG4 antibody ด้วยวิธี ELISA มีความจำเพาะสูงสุด (93.0%) ในขณะที่การใช้ NIE peptide antigen ตรวจโดยทั้ง 2 วิธี ไม่สามารถเพิ่มความไวและความจำเพาะได้ อย่างไรก็ตามการตรวจโดยวิธี Latex Particle Agglutination มีราคาถูก ใช้เวลาในการทดสอบน้อย ทำได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ สามารถนำไปใช้ในการศึกษาภาคสนาม และโรงพยาบาลขนาดเล็กได้ การศึกษาเพื่อพัฒนาหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะเพื่อนำมาใช้ตรวจโดยวิธี Latex particle agglutination จะมีประโยชน์ต่อไป

ภาควิชา ปรสิตวิทยา	ลายมือชื่อนิสิต ....
สาขาวิชา ปรสิตวิทยาทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....
ปีการศึกษา 2559	

5674006030 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY
KEYWORDS: STRONGYLOIDES STERCORALIS, ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, LATEX PARTICLE AGGLUTINATION

KONGKRIT SRIBURIN: Development and Comparison of Efficacy of Diagnosis for Strongyloidiasis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Latex Particle Agglutination. ADVISOR: VIVORNPUN SANPRASERT, Ph.D., 54 pp.

Strongyloides stercoralis or threadworm is an intestinal helminth commonly transmitted the host via penetrating through the epidermal skin. Most epidemics are recorded in tropical regions with specifically frequent heavy rain exposure particular in Southeast Asia countries including Thailand. Most victims harboring *S. stercoralis* have asymptomatic or chronic symptoms but symptoms expression with those whose carry the huge numbers of *S. stercoralis*. Low sensitivity of recently routine diagnoses seldom observed the larvae-contaminated in stool specimens due to a low or an uncertain number of the larvae. In this study, we aimed to develop and compare the efficiency of two immunodiagnostics techniques - Enzyme-Linked lmmunosorbent Assay (ELISA) and Latex Particle Agglutination test – in order to investigate antibody specific for *S. stercoralis* infection using crude antigen and NIE peptide. Of 218 serum samples, ELISA resulted in the sensitivity and specificity of anti-*S.stercoralis* among IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 as 100%:88.46%; 100%:85.38%; 100%:58.46%; and 100%:93.07%, respectively. Latex agglutination test resulted in 100% sensitivity and 72.72% specificity. And NIE peptide in the sensitivity and specificity of anti-*S.stercoralis* among IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 as 100%:85.38%; 97.72%:67.42%; 100%:66.9%; 94.3%:83.80%.The Latex agglutination test resulted in 28.4% sensitivity and 100%. In conclusion, our finding showed an equal sensitivity diagnosis of both techniques. Interestingly, IgG4 of ELISA using crude antigen had provided the best specificity results in strongyloidiasis diagnosis. However, latex particle agglutination test showed more convenient than ELISA in low cost, short time testing, simple performing without special techniques requirement and able to experiment in the field study.

Department: Parasitology
Field of Study: Medical Parasitology
Academic Year: 2016

Student's Signature ....
Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่านโดยเฉพาะ อาจารย์ ดร.วิวรพรรณ สรรประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือทุก ๆ ด้าน ทั้งในด้านทฤษฎีและปฏิบัติการตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง สุรางค์ นุชประยูร และ อาจารย์ ดร.อาคม ใสงาม ที่ให้คำชี้แนะและแนะนำเทคนิคต่างๆในการจัดทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

คุณผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่และเพื่อนนิสิตในหน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้างและโรคเขตร้อน (Lymphatic Filariasis and Tropical Medicine Research Unit) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลรวมไปวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณคุณพ่อสำเนียง ศรีบุรินทร์ และคุณแม่สุมาลี ศรีบุรินทร์ ที่ให้ความร่วมมือในการประสานงานการลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างในเขตอำเภอเชียงคาน จังหวัดเลย รวมไปถึงเจ้าหน้าที่สาธารณสุข โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลธาตุ และขอบคุณชาวบ้านทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการเข้าร่วมโครงการในครั้งนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้กับผู้วิจัยจนงานวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คุณค่าและประโยชน์ที่พึงได้รับจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ผู้วิจัยขอมอบให้ทุกท่านที่มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จของงานวิจัยครั้งนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ
กิตติกรรมประกาศ .... ฉ
สารบัญ .... ช
บทที่ 1 1
บทนำ 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
บทที่ 2 3
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 รูปร่างลักษณะของพยาธิ *S.stercoralis* 3
2.2 วงจรชีวิตของพยาธิ *S. stercoralis* 5
2.3 การติดต่อ 6
2.4 การก่อโรค 7
2.5 การวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. stercoralis* 8
2.5.1. วิธีตรวจอุจจาระเบื้องต้น (Stool Examination Technique) 8
2.5.2. เทคนิคการเพาะเลี้ยง (Culture Technique) 9
2.5.3 การตรวจวินิจฉัยทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา 10
2.5.4 การตรวจวินิจฉัยทางด้านอณูชีววิทยา 12
2.5.5 การศึกษาเกี่ยวข้องกับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. stercoralis* โดยใช้ NIE antigen 12
บทที่ 3 14
อุปกรณ์และวิธีดำเนินวิจัย 14

หน้า

3.1 ขนาดของกลุ่มประชากรตัวอย่าง (Sample size) 14
3.1.1 การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection) 14
3.1.1.1 เทคนิคการตรวจทางห้องปฏิบัติการและวิธีการทดลอง 15
3.1.1.1.2 การตรวจอุจจาระโดยตรง (Simple direct smear) 15
3.1.1.1.3 เทคนิคการเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองแบบฮาราดา-มอริ (Harada-mori filter paper culture) 16
3.1.1.1.4 เทคนิคเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (Agar plate culture) 16
3.1.1.1.5 เทคนิคการแยกเฉพาะตัวเชื้อ S. stercoralis ด้วยวิธีของ Baermann 16
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย 17
3.2.1. การเตรียมแอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ 17
3.2.2 การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ใช้หลักการ Indirect ELISA 18
3.2.3 การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Latex particle agglutination 19
3.2.4 การเตรียม NIE peptide antigen 20
3.2.5 ขั้นตอนการทำวิธี ELISA ใช้หลักการ Indirect ELISA 21
3.2.6 การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Latex particle agglutination 22
3.2.7 การวิเคราะห์ผล และสถิติ 23
บทที่ 4 25
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 25
4.1 ผลการศึกษาของการติดเชื้อปรสิตในลำไส้ 25
4.2 การรวบรวมตัวอย่างซีรัม เพื่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิเส้นด้าย โดยวิธี Indirect ELISA และวิธี Latex particle agglutination 28
4.3 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody ด้วย แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี Indirect ELISA 29

หน้า

4.4 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody ด้วย แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี Indirect ELISA 30

4.5 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody ด้วย แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี Indirect ELISA 31

4.6 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody ด้วย แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี Indirect ELISA 32

4.7 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* antibody ด้วย แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี latex particle agglutination 33

4.8 การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม 33

4.9 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody ด้วย NIE peptide antigen โดยวิธี Indirect ELISA 35

4.10 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody ด้วย NIE peptide antigen โดยวิธี Indirect ELISA 36

4.11 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody ด้วย NIE peptide antigen โดยวิธี Indirect ELISA 37

4.12 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody ด้วย NIE peptide antigen โดยวิธี Indirect ELISA 38

4.13 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* antibody ด้วยวิธี latex particle agglutination 39

4.14 การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม 39

4.15 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Indirect ELISA และ Latex particle agglutination ระหว่างการใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ และ NIE peptide 41

บทที่ 5 42

สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย 42

รายการอ้างอิง 47

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

เอกสารอ้างอิง 48

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 54

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตารางความไวและความจำเพาะของวิธีที่ตรวจในอุจจาระ 9

ตารางที่ 2 ความไวและความจำเพาะการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.......................... 13

ตารางที่ 3 ตารางวิเคราะห์ข้อมูล 2X2 24

ตารางที่ 4 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่ส่งตรวจการติดเชื้อปรสิตในลำไส้จำแนกตามเพศ และกลุ่มช่วงอายุ 25

ตารางที่ 5 ข้อมูลของผู้ติดเชื้อปรสิตในลำไส้จำแนกตามเพศ 26

ตารางที่ 6 การติดเชื้อปรสิตในลำไส้ในประชากรตำบลเชียงคาน ตำบลจอมศรี และตำบลธาตุในเขตพื้นที่อำเภอเชียงคาน จังหวัดเลย 26

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ด้วยเทคนิค Simple direct smear เทคนิค Harada-mori filter paper culture และเทคนิค Agar plate culture 27

ตารางที่ 8 รายละเอียดตัวอย่างซีรัมเพื่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิเส้นด้าย โดยวิธี Indirect ELISA และวิธี Latex particle agglutination 28

ตารางที่ 9 ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Indirect ELISA และวิธี latex particle agglutination โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ... 33

ตารางที่ 10 การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA และวิธี Latex particle agglutination (LA) โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ........................... 34

ตารางที่ 11 ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Indirect ELISA และวิธี latex particle agglutination โดยใช้ NIE peptide antigen............. 39

ตารางที่ 12 การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA และวิธี Latex particle agglutination (LA) โดยใช้ NIE peptide antigen 40

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Indirect ELISA และ Latex particle agglutination ระหว่างการใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ และ NIE peptide 41

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *S. stercoralis* ระยะ Rhabditiform larvae 4

รูปที่ 2 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *S. stercoralis* ระยะ Filariform larvae 4

รูปที่ 3 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *S. stercoralis* ระยะ Free-living female และ Freeliving male 4

รูปที่ 4 Life Cycle of *S.stercoralis* 6

รูปที่ 5 แผนที่ในการศึกษา 3 ตำบลในอำเภอเชียงคาน จังหวัดเลย 15

รูปที่ 6 ปฏิกิริยา latex particle agglutination... 20

รูปที่ 7 รูปแสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติความเป็นแอนติเจน... 21

รูปที่ 8 ปฏิกิริยา latex particle agglutination... 23

รูปที่ 9 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA 29

รูปที่ 10 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA 30

รูปที่ 11 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA 31

รูปที่ 12 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA 32

รูปที่ 13 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA 35

รูปที่ 14 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA 36

รูปที่ 15 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA 37

รูปที่ 16 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA 38

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สัญลักษณ์และคำย่อ

S. stercoralis	=	*Strongyloides stercoralis*
S. ratti	=	*Strongyloides ratti*
IgG	=	Immunoglobulin G
IgG1	=	Immunoglobulin G Subclass 1
IgG2	=	Immunoglobulin G Subclass 2
IgG3	=	Immunoglobulin G Subclass 3
IgG4	=	Immunoglobulin G Subclass 4
IgE	=	Immunoglobulin E
IgA	=	Immunoglobulin A
IgM	=	Immunoglobulin M
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FEC	=	Formalin-ether concentration
GPA	=	Gelatin particle agglutination
LPA	=	Latex particle agglutination

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

พยาธิเส้นด้าย (*Strongyloides stercoralis*) เป็นพยาธิตัวกลมที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็ก ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่จะเป็นแบบเรื้อรังและไม่แสดงอาการ หรือแสดงอาการในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อพยาธิจำนวนมาก โดยจะมีอาการก่อให้เกิดอาการปวดท้อง คลื่นไส้อาเจียน ท้องร่วง ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง สามารถพบภาวะเลือดออกในผนังลำไส้ ลำไส้ทะลุ และเสียชีวิตจากภาวะเสียสมดุลของอิเล็คโตรไลต์ (electrolyte)[1, 2] ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องและผู้ที่ได้รับยากลุ่ม สเตียรอยด์ (steroid) ในการรักษา จะส่งผลทำให้พยาธิมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นในลำไส้ ทำให้ตัวอ่อนพยาธิไชผ่านผนังลำไส้กระจายไปตามอวัยวะต่าง ๆ เช่น ปอด ไต และสมอง ก่อให้เกิดภาวะ hyperinfection ซึ่งจะมีอาการที่รุนแรงคือ มีอาการปวดท้องและท้องร่วงเป็นน้ำ หายใจลำบาก สมองอักเสบทำให้เสียชีวิตได้[2] ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. stercoralis* อาศัยการตรวจหาตัวอ่อนพยาธิที่ปะปนออกมากับอุจจาระโดยวิธีตรวจวัดโดยตรง (sample smear) และวิธีตรวจแบบเข้มข้น (concentration) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการตรวจด้วยวิธีนี้ยังมีข้อเสียในเรื่อง มีความไว (sensitivity) ต่ำในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการ แม้ว่าจะมีการพัฒนาการวินิจฉัยโดยการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (agar plate culture) เพื่อเพิ่มความไว ในการวินิจฉัย ซึ่งสามารถเพิ่มความไวได้ถึงร้อยละ 96 อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยโดยวิธีนี้พบข้อเสียคือใช้ระยะเวลานาน ทำให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาทันเวลา และอาจเสียชีวิตได้[1]

ในการวินิจฉัยด้านน้ำเหลืองวิทยาด้วยเทคนิคต่าง ๆ พบว่ามีความไวและความจำเพาะที่สูง แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องระยะเวลาและขั้นตอนที่ยุ่งยาก รวมไปถึงยังไม่มีชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิเส้นด้ายออกมาจำหน่ายให้กับห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย แต่ยังมีข้อจำกัดในการนำมาใช้งานจริงในห้องปฏิบัติการตามโรงพยาบาลขนาดเล็กซึ่งไม่มีเครื่องมือเพียงพอ และมีขั้นตอนมาก ใช้เวลาในการตรวจนาน ปัจจุบันมีผู้พัฒนานำเทคนิค Gelatin Particle Agglutination มาใช้ในการตรวจวินิจฉัย ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย อุปกรณ์เครื่องมือน้อย ติดสามารถดูปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า และใช้ระยะเวลาไม่นาน จากการศึกษา

พบว่ามีความไว 87 และความจำเพาะ 74[3] ในการทดสอบปฏิกิริยากับ แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ ทางผู้วิจัยจึงสนใจเทคนิค Latex Particle Agglutination ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ใช้อุปกรณ์เครื่องมือน้อย สามารถดูปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า และใช้ระยะเวลาไม่นาน นอกจากนี้เทคนิคนี้มีการนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการอาทิ การติดเชื้อ Leptospirosis การติดเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* รวมถึงการตรวจ Rheumatoid factor เพื่อการวินิจฉัยโรค Rheumatoid arthritis เป็นต้น แต่ยังไม่มีการศึกษาและพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้ายมาก่อน

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้ายด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay และวิธี Latex Particle Agglutination เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* เพื่อพัฒนาความไวและความจำเพาะของการวินิจฉัยโรค และเป็นการพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยทางน้ำเหลืองวิทยาให้มีประสิทธิภาพสูง ราคาถูก ทำได้ง่าย และรวดเร็ว สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยาคลินิกได้ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

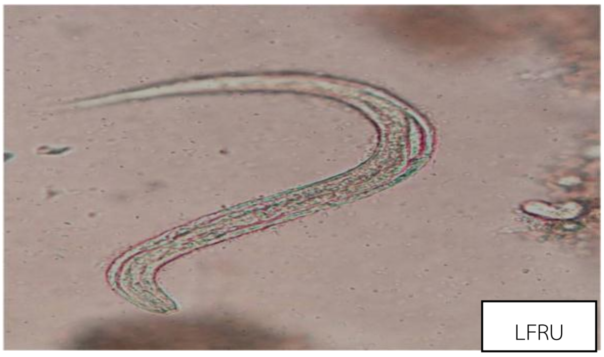
1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Latex Particle Agglutination โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้ายโดยการตรวจหา IgG subclasses ต่อแอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ ด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
3. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Latex Particle Agglutination กับวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้ายโดยการตรวจหา IgG subclasses ต่อ NIE peptide เปรียบเทียบกับการใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ ด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 รูปร่างลักษณะของพยาธิ *S.stercoralis*

พยาธิ *S. stercoralis* เป็นหนอนพยาธิที่พบได้ในคน ลิง และสุนัข พยาธิตัวเต็มวัยเพศเมียแบบปรสิต จะมีลักษณะตัวเรียวยาวคล้ายเส้นด้าย ยาวประมาณ 2.7 มม. หลอดอาหารมีความยาวยาว 2 ใน 5 ของลำตัว มีปลายหางแหลม มีมดลูกและรังไข่ 2 ชุด อยู่ทางด้านหัวและท้ายของลำตัว ตัวเมียสืบพันธุ์และออกไข่ด้วยวิธี mitotic parthenogenesis ซึ่งไข่มีลักษณะกลม รี คล้ายไข่ของพยาธิปากขอแต่มีขนาดเล็กกว่า เปลือกบางใส พยาธิตัวเมียจะออกในผนังลำไส้ซึ่งจะเจริญและฟักตัวเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 (rhabditoid larvae) เมื่อออกจากไข่ในช่องลำไส้เล็ก มีขนาดยาว 180-240 ไมโครเมตร กว้าง 14-15 ไมโครเมตร และเมื่อออกจากโฮสต์ปะปนมากับอุจจาระจะมีขนาดโตขึ้นยาว 325-380 ไมโครเมตร กว้าง 17-20 ไมโครเมตร ลงสู่พื้นดิน ตัวเต็มวัยแบบอิสระมีทั้งตัวผู้และตัวเมียเป็น rhabditoid type บางทีเรียก rhabditoid male และ rhabditoid female ตัวผู้มีขนาดยาว ไม่มี caudal alae มี spicules 1 คู่ หางแหลมและโค้งงอ ตัวเมียอ้วนป้อมมีขนาดยาว มีมดลูก 2 ชุด โดย vulva เปิดประมาณกลางลำตัวทางด้านท้องพยาธิตัวเมียที่ถูกผสมพันธุ์แล้วจะปล่อยไข่ที่มี Embryo ภายในออกมา ซึ่งจะเจริญเต็มที่ในเวลา 2-3 ชั่วโมง และฟักตัวออกมาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 มีช่องปากสั้น หลอดอาหารด้านหน้าลักษณะเป็นกระบอง ตอนกลางคอด และตอนท้ายเป็นกระเปาะกลางลำตัวด้านท้องมี genital primodium เป็นก้อนใหญ่เห็นได้ชัดเจน[4] (รูปที่1)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 1 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *S. stercoralis* ระยะ Rhabditiform larvae

LFRU (*Lymphatic Filariasis Research Unit*; *www.md.chula.ac.th/filariasiscu*)

รูปที่ 2 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *S. stercoralis* ระยะ Filariform larvae

LFRU (*Lymphatic Filariasis Research Unit*; *www.md.chula.ac.th/filariasiscu*)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 3 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *S. stercoralis* ระยะ Free-living female และ Freeliving male

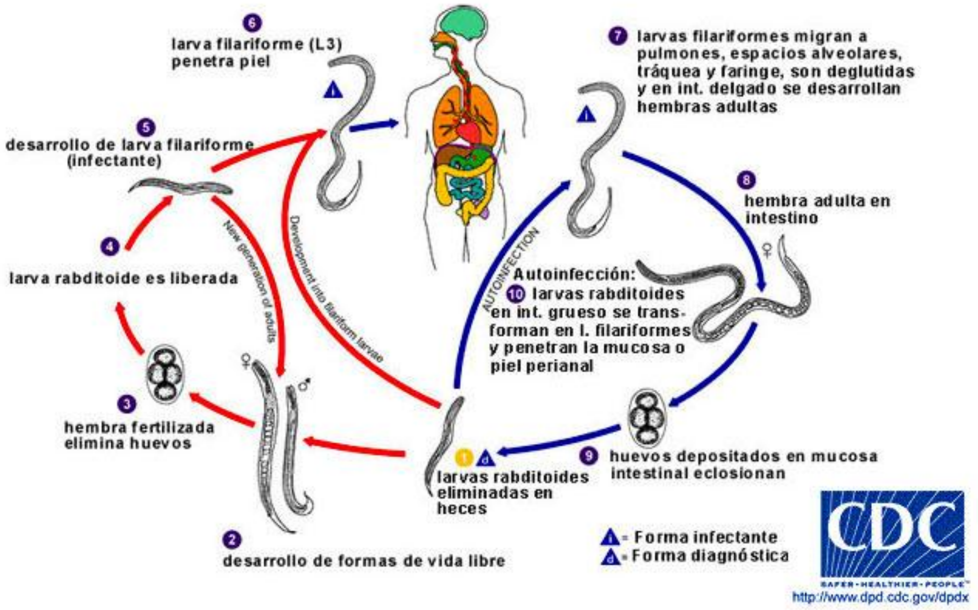
LFRU (*Lymphatic Filariasis Research Unit*; *www.md.chula.ac.th/filariasiscu*)

2.2 วงจรชีวิตของพยาธิ *S. stercoralis*

วงจรชีวิตของพยาธิ *S. stercoralis* มี 3 แบบได้แก่

1. แบบปรสิต (Parasitic cycle) ตัวอ่อนระยะที่ 1 (rhabditoid larvae) ที่ออกมาในอุจจาระลอกคราบเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ภายใน 2 ชั่วโมงและพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 (filariform larvae) ซึ่งเป็นระยะติดต่อใน 3 วัน พร้อมที่จะไชเข้าสู่โฮสต์ใหม่ต่อไป ตัวอ่อนระยะที่ 3 จะไม่กินอาหาร ตัวผอมเรียว หลอดอาหารยาว และปลายหางเป็นรอยแฉก (notched tail) (รูปที่2) เนื่องจาก cuticular alae ยื่นโผล่ออกไปเล็กน้อย ไม่มีปลอกหุ้ม มีชีวิตอยู่ในดินหรือในน้ำได้หลายวัน เมื่อคนสัมผัสกับตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่อยู่ในดิน ตัวอ่อนจะไชเข้าผิวหนังสู่ระบบน้ำเหลืองและกระแสโลหิต เข้าสู่ปอดไชทะลุถุงลมปอดเข้าหลอดลมฝอย คลานขึ้นหลอดลม คอหอย หลอดอาหาร และถูกกลืนลงไปสู่ลำไส้เล็ก แล้วลอกคราบเป็นตัวแก่ต่อไป (รูปที่ 4) ระยะก่อนเชื้อปรากฏ 23-28 วัน[4]
2. แบบอิสระ (free-living cycle) ตัวอ่อนระยะที่ 1 อาจเจริญในดินเป็นตัวอ่อนระยะต่าง ๆ และสุดท้ายเป็นพยาธิตัวแก่ดำรงชีพอิสระ(free-living adults) (รูปที่ 3) ตัวแก่มีทั้งตัวผู้และตัวเมียเป็น rhabditoid type บางทีเรียก rhabditoid male และ rhabditoid female ตัวผู้มีขนาดยาว ไม่มี caudal alae มี spicules 1 คู่ หางแหลมและโค้งงอ ตัวเมียอ้วนป้อมมีขนาดยาว มีมดลูก 2 ชุด โดย vulva เปิดประมาณกลางลำตัวทางด้านท้อง พยาธิตัวเมียที่ถูกผสมพันธุ์แล้วจะปล่อยไข่ที่มี Embryo ภายในออกมา ซึ่งจะเจริญเต็มที่ในเวลา 2-3 ชั่วโมง และฟักตัวออกมาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 มีช่องปากสั้น หลอดอาหารด้านหน้าลักษณะเป็นกระบอง ตอนกลางคอด และตอนท้ายเป็นกระเปาะกลางลำตัวด้านท้องมี genital primodium เป็นก้อนใหญ่เห็นได้ชัดเจน[4]
3. แบบติดเชื้อในตนเอง (Autoinfection) ตัวอ่อน filariform lavae สามารถไชผ่านผนังไส้เล็กส่วนปลาย และลำไส้ใหญ่ตอนต้นเข้าสู่กระแสเลือด ไปที่ปอดแล้วกลับไปเป็นแบบปรสิตที่ลำไส้เล็ก เรียกแบบนี้ว่า Internal autoinfection หรือมีกรณีที่ตัวอ่อน filariform lavar ผ่านลงมากับอุจจาระและเมื่อถึงบริเวณรอบทวารหนัก ก็ไช ผิวหนัง เข้า

สู่กระแสโลหิต ไปปอดและกลับมาที่ลำไส้เล็ก เจริญเป็นพยาธิตัวแก่ต่อไปเรียกแบบนี้ว่า External autoinfection[4] (รูปที่4)



รูปที่ 4 Life Cycle of *S.stercoralis*

(ที่มา https://sites.google.com/site/rokhphyathistrxngcilxyded/menu-1)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การติดต่อ

ระยะติดต่อ ได้แก่ ตัวอ่อนระยะที่ 3 filariform larvae สามารถติดต่อสู่คนได้หลายทาง

1. โดยการไชผ่านผิวหนัง เป็นวิธีการหลักที่ติดต่อเข้าสู่คน ดังนั้นผู้ที่มีพฤติกรรมหรืออาชีพสัมผัสดินชื้นแฉะ เช่นชาวนา ชาวสวน จึงมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิ
2. โดยการกินตัวอ่อนระยะติดต่อเข้าไปซึ่งปนเปื้อนไปกับอาหารหรือน้ำดื่ม ตัวอ่อนบางส่วนอาจถูกทำลายด้วยน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร พบว่าร้อยละ 50 ของตัวอ่อนจะตายภายใน 2-3 ชั่วโมง และตัวอ่อนทั้งหมดจะตายภายใน 5-7 ชั่วโมง
3. การติดเชื้อในตนเอง เนื่องจากพยาธิชนิดนี้สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในตัวเองได้ ดังนั้นผู้ป่วยที่เป็นพยาธินี้จะไม่หายขาดหากไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้อง โดยจะยังคงติดเชื้อไว้ได้นานเป็นเวลานานกว่า 35 ปี โดยไม่มีอาการ

2.4 การก่อโรค

โรคที่เกิดจากพยาธินี้เรียกว่าโรคพยาธิสตรองจิลอยด์ (Strongyloidiasis) ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่เป็นเรื้อรังโดยไม่มีอาการหรือมีอาการน้อย แต่ในรายที่มีพยาธิจำนวนมากอาจมีอาการต่าง ๆ ดังนี้

1. อาการทางผิวหนัง เกิดจากตัวอ่อนระยะติดต่อไช อาจทำให้เกิด อาการคันและมีผื่นแดงตรงบริเวณที่ถูกไช บางครั้งตัวพยาธิตัวอ่อนเดินทางไปที่ปอดไม่สำเร็จ จึงเดินทางอยู่บริเวณใต้ผิวหนัง ทำให้เกิด creeping eruption หรือ cutaneous larvae migrans (1)
2. อาการทางระบบหายใจ เป็นสาเหตุทำให้เลือดออก และมี cellular filtration ในถุงลมปอด และหลอดลมฝอย ในรายที่มีมากอาจมีอาการของปอดอักเสบ (pneumonitis) ได้ ทำนองเดียวกับที่เกิดจากตัวอ่อนของพยาธิตัวอ่อนของพยาธิไส้เดือนและพยาธิปากขอ
3. อาการของระบบทางเดินอาหาร มีได้ตั้งแต่ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วงจนกระทั่งการย่อยและการดูดซึมของอาหารผิดปกติ ถ้ามีพยาธิจำนวนมาก ผนังลำไส้อาจถูกไชจนเป็นรูพรุนคล้ายรังผึ้ง หรือทำให้เกิดเน่า หลุดออกเป็นแผลขนาดใหญ่ได้ ผู้ป่วยบางรายมีอาการรุนแรง เช่น เลือดออกในลำไส้ เจจูนัมทะลุ กระเพาะอาหารอักเสบ (emphysematous gastritis) ไส้ติ่งอักเสบ ท้องมานแบบอีโอซิโนฟิลิก และเสียสมดุลของอิเล็กโทรไลต์ ทำให้เสียชีวิตจากหัวใจวาย ผู้ป่วยที่มีสุขภาพอ่อนแอ เช่น ป่วยหนัก มีภาวะพร่องโภชนาการ เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวผู้ป่วยโรคไต และ systemic lupus erythrematosus ซึ่งจำเป็นต้องได้รับยาพวก สเตียรอยด์ เพื่อการรักษา จะทำให้มีการเพิ่มจำนวนของพยาธิในลำไส้ขึ้นมาก จนถึงระดับหนึ่ง L1 ที่ฟักออกมาในลำไส้จำนวนมากลอกคราบเป็น L3 ในลำไส้เล็กและไชผ่านผนังลำไส้เล็กส่วนปลายและลำไส้ใหญ่ส่วนต้น เข้าสู่ระบบน้ำเหลืองสู่กระแสโลหิตกระจายไปทั่วร่างกายส่วนใหญ่ไปที่ปอด เรียกภาวะนี้ว่า Disseminated strongyloidiasis หรือ hyperinfection syndrome หรือ severe complicated strongyloidiasis ก่ออาการรุนแรงได้ คือ มีอาการปวดท้องและท้องร่วงเป็นน้ำ หายใจลำบาก ไอเป็นเลือด และอ่อนเพลีย เมื่อตัวอ่อนไชผ่านเข้าไปในสมอง อาจก่อให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ หรือ ฝีในสมอง ทำให้ถึง

แก่ชีวิตได้ อัตราเสียชีวิตประมาณร้อยละ 70 มีรายงานผู้ป่วยที่มีภาวะพยาธิแพร่กระจายมากกว่า 300 รายทั่วโลก[4]

2.5 การวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. stercoralis*

การตรวจวินิจฉัยโรคในปัจจุบันเพื่อให้ได้รับการรักษา ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปนิยมใช้วิธีการตรวจหาตัวอ่อนในอุจจาระภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการตรวจการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* มีเทคนิคดังนี้

2.5.1. วิธีตรวจอุจจาระเบื้องต้น (Stool Examination Technique)

1. เทคนิคตรวจวัดโดยตรง (Direct stool smear examination) เป็นการหาตัวอ่อนของพยาธิ ที่ปะปนมากับอุจจาระ เป็นเทคนิคที่ง่ายและสะดวก แต่มีความไว (sensitivity) ต่ำ ขึ้นอยู่กับปริมาณของตัวอ่อนพยาธิที่ออกมาพร้อมกับอุจจาระในแต่ละครั้ง มีการศึกษาในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการพบว่าการตรวจด้วยเทคนิคนี้ 1 ครั้งมีความไวประมาณร้อยละ 34 ถึงร้อยละ 46[1, 5] และถ้าส่งตรวจ 3 ครั้งเป็นเวลาติดต่อกันพบมีความไวเพิ่มขึ้นเป็น 50 และจะเพิ่มขึ้นเป็น 100 ในการส่งตรวจติดต่อกัน 7ครั้ง[1] (ตารางที่ 1) ข้อเสียของเทคนิคนี้มีความไวต่ำเนื่องจากอุจจาระที่นำมาตรวจวิเคราะห์นั้นใช้ในปริมาณน้อยทำให้โอกาสในการตรวจพบตัวอ่อนพยาธิไม่มาก

2. เทคนิคตรวจวัดแบบเข้มข้นด้วยฟอร์มาลีนและอีเทอร์ (Formalin-ether concentration) เป็นเทคนิคที่ง่ายและใช้ปริมาณอุจจาระมาก จากการศึกษาในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการพบว่ามีความไวประมาณ 65[5, 6] (ตารางที่ 2) ในการส่งตรวจเพียงครั้งเดียว[5-7] ถึงแม้ว่าเทคนิคนี้จะมีความไวมากกว่าเทคนิคตรวจวัดโดยตรง แต่มีข้อเสียคือสารเคมีที่ใช้มีอันตรายต่อสุขภาพผู้ปฏิบัติงาน

3. เทคนิคแบบเบอร์แมนน์ (Baermann concentration) เทคนิคนี้จะใช้อุจจาระปริมาณที่มากกว่า 2 เทคนิคที่กล่าวมา เป็นเทคนิคที่ง่ายและค่าใช้จ่ายไม่แพง และมีประสิทธิภาพความไวร้อยละ 87[1] สูงกว่าเทคนิคตรวจวัดโดยตรงและเทคนิคตรวจวัดแบบเข้มข้น ด้วยฟอร์มาลีนและอีเทอร์ถึง 4 เท่า แต่มีข้อเสียคือใช้เวลานาน และไม่มีใช้ในห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล

2.5.2. เทคนิคการเพาะเลี้ยง (Culture Technique)

1. เทคนิคเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (Agar plate culture) เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง จากการศึกษาในผู้ป่วยที่แสดงอาการพบว่ามีความไว 96[1, 6] (ตารางที่ 1) จึงนิยมใช้เป็นเทคนิคนี้เป็นเทคนิคมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ในห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล[1] แต่มีข้อเสียคือเทคนิคนี้จะต้องใช้ระยะเวลาในการทดสอบ 3-7 วัน มีราคาแพง และมีความเสี่ยงติดเชื้อพยาธิในเจ้าหน้าที่ที่ปฏิบัติงาน นอกจากนี้มีรายงานว่าในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการที่ทดสอบด้วยเทคนิคนี้มีความไวเพียง 60[7]

2. เทคนิคเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองแบบฮาราดา-มอริ (Harada-mori filter paper culture)[8] เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ราคาไม่แพง และมีความไว 87%[1] (ตารางที่ 1) สูงกว่าเทคนิคตรวจวัดโดยตรง แต่พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำว่าเทคนิคเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง และใช้ระยะเวลานานกว่าจึงไม่เป็นที่นิยมมาทำเป็นขั้นตอนมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ

นอกจากตัวอ่อนที่ปะปนมากับอุจจาระแล้วยังสามารถพบตัวอ่อนพยาธิได้ในสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ อาทิเช่น เสมหะ, น้ำล้างปอด, น้ำจากลำไส้เล็ก, ชิ้นเนื้อตัวอย่างจากผิวผนังลำไส้, ของเหลวจากปากมดลูก และน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่ติดเชื้อขั้นรุนแรง ในการตรวจหาตัวอ่อนเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ในตัวอย่างอุจจาระ สามารถทำได้ด้วยเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้น แต่ยังมีข้อเสียในเรื่องของความไวต่ำ และใช้ระยะเวลานาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ตารางความไวและความจำเพาะของวิธีที่ตรวจในอุจจาระ

วิธี	ความไว %	ความจำเพาะ %	อ้างอิง
Stool examination	1 ครั้ง 34-46 % 3 ครั้ง 50% 7 ครั้ง 100%	100	(1, 5)
FEC and Baermann	65 %	100	(1, 5-7, 9)
Harada-mori	87 %	100	(1, 5, 8)
Agar plate culture (Standard method)	60-96 %	100	(1, 5, 7, 9)

2.5.3 การตรวจวินิจฉัยทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา

การวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* โดยอาศัยการตรวจหาแอนติบอดี มีวิธีที่ใช้ตรวจดังนี้

1. Immunofluorescence antiboby (IFA) เทคนิคนี้จะใช้การตรวจหาแอนติบอดีใน Serum ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* โดยจะใช้โครงสร้างของตัวเชื้อพยาธิเป็นแอนติเจนมาทำการทดสอบปฏิกิริยากับแอนติบอดีในผู้ป่วย จากนั้นติดตามปฏิกิริยาโดยใช้ Fluorescein Conjugated Anti-human Immunoglobulin ทำให้สามารถตรวจหาแอนติบอดีได้จากการเรืองแสง Fluorescence ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence จากการศึกษาตรวจหา IgG ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* พบว่ามีความไว 87% ความจำเพาะ 90%[10] ในการศึกษาปฏิกิริยาของระดับแอนติบอดี ระดับแอนติบอดีที่ 1:20 ให้ความไว 97.4% ความจำเพาะ 97.9% และเมื่อลดระดับแอนติบอดีลงพบว่าความไวของปฏิกิริยาลดลงแต่ความจำเพาะของปฏิกิริยามากขึ้น[11] จากรายงานพบว่าเทคนิค IFA นี้ไม่สามารถตรวจหาแอนติบอดีได้ในผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีที่ต่ำ นอกจากนี้ยังพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross-Reaction) กับผู้ป่วยติดเชื้อหนอนพยาธิชนิดอื่น เทคนิคนี้ยังพบข้อเสีย เนื่องจากมีรายงานว่าระดับแอนติบอดีของคนปกติที่มีภูมิลำเนาในที่ต่าง ๆ มีระดับที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นจะต้องมี cut off titer ที่แตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น เครื่องมือที่ใช้ก็มีราคาแพง และต้องใช้ผู้ชำนาญในการอ่านผลปฏิกิริยา[10, 11]

2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจหาแอนติบอดีในตัวอย่างหลายชนิดเช่น ในซีรัม น้ำลาย น้ำไขสันหลัง และน้ำนมได้ ในการศึกษาพบว่าเทคนิค ELISA สามารถตรวจหาชนิดของแอนติบอดีต่อการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* อาทิเช่น จากการศึกษาตรวจหา IgE แอนติบอดี ในซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ที่แสดงอาการพบว่ามีความไว 80% ความจำเพาะ 96 %[12] และในการศึกษาตรวจหา IgE แอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการพบว่ามีความไว 7 .7 %[13] ในการศึกษา IgA ในตัวอย่างน้ำลายของผู้ป่วยติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* พบว่า มีความไว 76 % และความจำเพาะ 88.9 %[14] ข้อเสียพบ IgA ในปริมาณน้อยในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการจึงไม่เหมาะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ การศึกษา IgG ในซีรัมผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* พบว่ามีความไว 73-97 % ความจำเพาะ 78-96 %[15, 16] ต่อมาได้มีผู้ศึกษาและพัฒนาจนพบว่า NIE (31kDa) Recombinant เป็นแอนติเจนที่มีความจำเพาะสูง จากการศึกษาพบว่าในการตรวจหา Ig G ในซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีความไว 84-97% และความจำเพาะ 95-100%[17, 18]

และสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ติดเชื้อฟิลาเรีย อย่างไรก็ตาม NIE Recombinant ยังอยู่ในการศึกษาและพัฒนาเพื่อให้มีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ได้จริงในอนาคต

3. Immunoblodting (IB) เป็นเทคนิคที่ประยุกต์หลักการของ 2 เทคนิคมาใช้โดยแอนติเจน หรือ Recombinant Protein จะอยู่ใน SDS-PAGE gel จากนั้นนำมาถ่ายลงบนแผ่น Nitrocellulose membrane แล้วนำมาทำปฏิกิริยาหาแอนติบอดีด้วยเทคนิค ELISA จากการศึกษาตรวจหา IgG ในซีรัมผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* พบมีความไวและความจำเพาะ 96%[19] ในการศึกษาพบว่ามีโปรตีนจำเพาะต่อพยาธิ *S. stercoralis* ที่ทำการศึกษาได้แก่ โปรตีนที่โมเลกุล 41kDa, 31kDa และ 28kDa อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเทคนิค IB จะมีความไวและความจำเพาะที่สูงแต่มีข้อเสียในขั้นตอนการเตรียมแอนติเจนที่ยุ่งยากซับซ้อน มีราคาแพง

4. Luciferase Immunoprecipitation System (LIPS) เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ตรวจหา IgG ในซีรัมผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* โดยใช้ NIE Recombinant เป็นแอนติเจน จากการศึกษาพบว่ามีความไว 91-100%[17, 18] และความจำเพาะ 97-100% อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเทคนิค LIPS จะมีความไวและความจำเพาะที่สูงแต่เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในด้านการศึกษาวิจัย ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญ มีราคาแพง ไม่เหมาะนำมาใช้ในการทดสอบในห้องปฏิบัติการทางปรสิตวิทยา

5. Gelatin particle agglutination (GPA) เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีของการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* โดยจะทำการเคลือบแอนติเจนไว้บนเม็ด gelatin นำมาทดสอบปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมเกิดการเกาะกลุ่มขึ้น เป็นเทคนิคที่ง่ายในการทดสอบปฏิกิริยา และมีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก สามารถอ่านผลปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า จากการศึกษาพบว่า มีความไว 87% และความจำเพาะ 74%[3] ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่น่าสนใจในการพัฒนามาใช้ในห้องปฏิบัติการในการตรวจคัดกรองการติดเชื้อพยาธิเส้นด้ายเบื้องต้น ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค Gelatin particle agglutination และเทคนิค ELISA ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ด้วยตัวอย่างซีรัมของกลุ่มตัวอย่างชาวบ้านในเขตภาคอีสานตอนบนจำนวน 499 ตัวอย่าง โดยใช้ Crude antigen จากการศึกษาพบว่าเทคนิค GPAT มีความไวและความจำเพาะ 81% และ 74% เทคนิค ELISA มีความไวและความจำเพาะ 73% และ 86% ในการศึกษานี้พบว่าประสิทธิภาพของเทคนิค GPAT และ ELISA มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. stercoralis* เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน[3]

2.5.4 การตรวจวินิจฉัยทางด้านอณูชีววิทยา

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคทางด้วยชีววิทยามาช่วยในการวินิจฉัย โดยอาศัยหลักการเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลอง เรียกว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) สำหรับในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ด้วยเทคนิค PCR เป็นเทคนิคการตรวจหายีนเป้าหมายได้แก่ ยีน 18S rRNA และ 28S RNA ของเชื้อพยาธิเส้นด้าย จากการศึกษาพบว่ายีน 18S rRNA เป็นยีนเป้าหมายที่มีความจำเพาะต่อพยาธิ *S. stercoralis*[9] มีการศึกษาในตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการทดสอบด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจำนวน 16 ตัวอย่างนำมาทำการทดสอบด้วยเทคนิค PCR ให้ผลเป็นบวกสอดคล้องกัน และเมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบในการทดสอบด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลเป็นบวก 5 ในตัวอย่าง และให้ผลเป็นลบ 25 ตัวอย่าง[20] แต่มีการศึกษาในตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยที่พบจำนวนตัวอ่อนพยาธิน้อยกว่า 5 ตัวต่อ 1 สไลด์ นำมาทำการทดสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าให้ผลเป็นลบ[21] จากการศึกษา เทคนิคทางชีววิทยายังพบความไวต่ำในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการ เนื่องด้วยปริมาณอุจจาระที่ใช้ในการทดสอบ ปริมาณน้อยกว่าวิธีของ Baermann และเทคนิคเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ทำให้โอกาสที่จะตรวจพบดีเอ็นเอ ที่จำเพาะต่อตัวเชื้อลดน้อยลง อีกทั้งขึ้นอยู่กับความรุนแรงในการติดเชื้อ ซึ่งในผู้ป่วยที่ไม่ปรากฏอาการและมีปริมาณเชื้อออกมาน้อยไม่สม่ำเสมอ จึงมีโอกาสเป็นไปได้ยากที่จะตรวจพบถึงแม้ว่าเทคนิคทางชีววิทยาจะมีความไวและความจำเพาะที่สูง[20, 21]

2.5.5 การศึกษาเกี่ยวข้องกับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. stercoralis* โดยใช้ NIE antigen

Marco Sequi et al., 2013 ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีวินิจฉัยทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา 5 วิธี ในการติดเชื้อ *S. stercoralis* โดยทำการศึกษา 399 ตัวอย่างนำมาทดสอบด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ วิธี ELISA ที่ใช้ NIE เป็นแอนติเจน วิธี LIPS ที่ใช้ NIE เป็นแอนติเจน วิธี IFAT ที่ใช้ตัวเชื้อ *S. stercoralis* เป็นแอนติเจน และชุดตรวจสำเร็จรูป IVD ELISA ที่ใช้ crude *S. ratti* เป็นแอนติเจน และ Bordier ELISA ที่ใช้ crude *S. stercoralis* เป็นแอนติเจน จากการศึกษาพบว่าวิธี NIE ELISA มีความไวและความจำเพาะ 75.4% และ 94.8% วิธี NIE LIPS มีความไวและความจำเพาะ 85.1% และ 100% วิธี IFAT มีความไวและความจำเพาะ 93.9% และ 92.2% และชุดตรวจสำเร็จรูป IVD ELISA พบว่ามีความไวและความจำเพาะ 91.2% และ 99.1% ชุดตรวจสำเร็จรูป Bordier ELISA มีความไวและความจำเพาะ 89.5% และ 98.3% ในการศึกษาพบว่าทั้ง 5 วิธีมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวินิจฉัย แต่พบปัญหาในการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับตัวอย่างที่ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่น ๆ ที่สำคัญในแหล่งระบาดเดียวกันเช่น

เชื้อฟิลาเรีย จากการศึกษาพบว่า NIE แอนติเจนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในตัวอย่างที่ติดเชื้อฟิลาเรีย

ตารางที่ 2 ความไวและความจำเพาะการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

วิธี	ชนิดแอนติเจน	ตัวอย่าง	ชนิดแอนติบอดี	ความไว	ความจำเพาะ	อ้างอิง
IFA	CA S.st L3	Serum	IgG	48-97	90-100	(1, 3, 5, 13, 15-18, 22)
ELISA	CA S.st L3	Serum	IgG	73-97	78-99.5	
	31kDa S. st	Serum	IgG	84-97	95-100	
	CA S.rt L3	Serum	IgG1	77.5	98.4	
	CA S.rt L3	Serum	IgG4	50-76.9	86.7-92.7	
	31kDa S. st	Serum	IgG4	45	100	
	CA S.ve L3	Serum	IgA	76-80	86.7-88.9	
	CA S.st L3	Serum	IgE	7.7-80	96.7-100	
IB	26kDa S. st	Serum	IgG	78	-	
	33kDa S. st	Serum	IgG	73.9	-	
	21kDa S. st	Serum	IgG	39.1	-	
LIPS	31kDa S. st	Serum	IgG	91-97	100	
	31kDa S. st	Serum	IgG4	87	100	
Dipstrip	CA S.st L3	Serum	IgG	91	97	
GPAT	CA S.st L3	Serum	IgG	81-91	74-83	

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินวิจัย

3.1 ขนาดของกลุ่มประชากรตัวอย่าง (Sample size)

การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่าง

จากสูตร ที่มีความเชื่อมั่นที่ 95%

กำหนด α = 0.05

β = 0.10

$Z_{\alpha} = Z_{0.05/2}$ = 1.96 (two tail)

$Z_{\beta} = Z_{0.10}$ = 1.28

สูตร $n/group = 2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \sigma^2/(X_1 - X_2)^2$

X_1 ค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 1

X_2 ค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 2

$\sigma^2 = 50$

$n/group = 2(1.96+1.28)^2 (50) / (85-84)^2$

n = 88 ตัวอย่าง

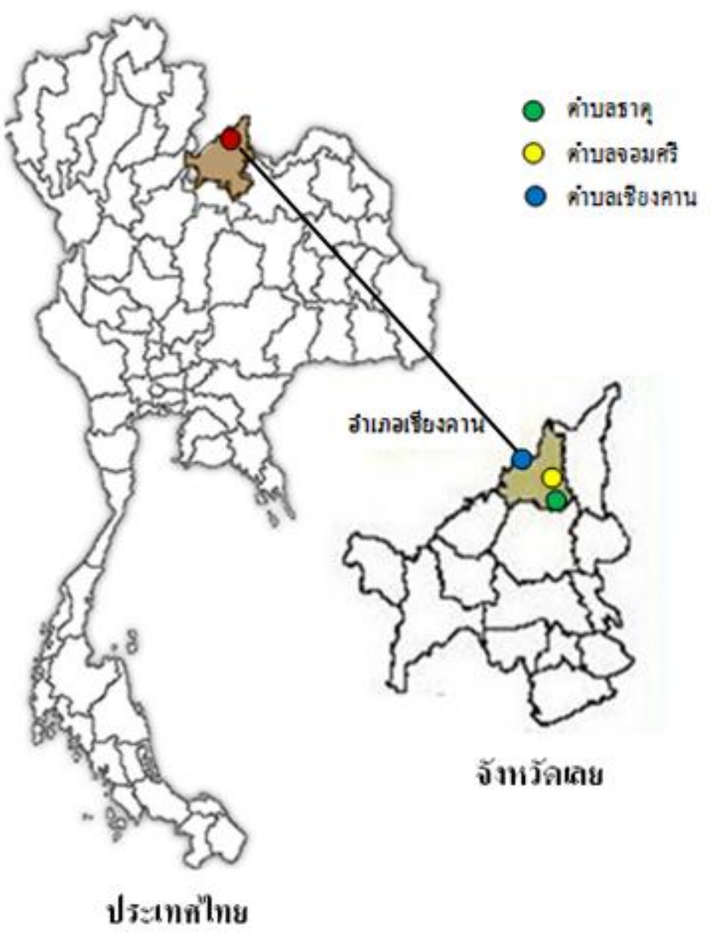
ดังนั้นในการวิจัยนี้ต้องใช้ตัวอย่างกลุ่มละ 88 ตัวอย่าง

กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ

- กลุ่มประชากรที่ติดเชื้อ *S. stercoralis* ที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ
- กลุ่มประชากรที่ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่น ๆ
- กลุ่มประชากรที่สุขภาพดี ไม่เคยมีประวัติการติดเชื้อปรสิต

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection)

ทำการสำรวจการติดเชื้อปรสิตในลำไส้ของกลุ่มประชากรตำบลเชียงคาน ตำบลจอมศรี และตำบลธาตุในเขตพื้นที่อำเภอเชียงคาน จังหวัดเลย อายุระหว่าง 18 – 80 ปี จำนวน 650 คน นำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคตรวจวัดโดยตรง เทคนิคการเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองแบบ Harada-mori และเทคนิคเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง



รูปที่ 5 แผนที่ในการศึกษา 3 ตำบลในอำเภอเชียงคาน จังหวัดเลย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.1.1.1 เทคนิคการตรวจทางห้องปฏิบัติการและวิธีการทดลอง

3.1.1.1.2 การตรวจอุจจาระโดยตรง (Simple direct smear)

วิธีทำ

หยดน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ลงบนกระจก slide 1 หยด จากนั้นใช้ไม้เขี่ยอุจจาระหลายๆ จุดให้ติดปลายไม้ แล้วนำมากวนให้เข้ากันกับน้ำเกลือที่หยดไว้ ปิดด้วย coverslip แล้วมาไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การรายงานและการแปลผล

Found : พบปรสิตในลำไส้

Not Found : ไม่พบปรสิตในลำไส้

3.1.1.1.3 เทคนิคการเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองแบบฮาราดา-มอริ (Harada-mori filter paper culture)

วิธีทำ

ตักอุจจาระ 1-5 กรัม ป้ายลงบนกระดาษกรองและนำไปใส่ลงในถุงพลาสติก เติมน้ำลงไปเพื่อให้ชุมและให้มีน้ำอยู่ที่ก้นถุงให้ปลายกระดาษกรองแช่อยู่ในน้ำ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-7 วัน นำน้ำก้นถุงมาดูใต้กล้องจุลทรรศน์

การรายงานและการแปลผล

Positive : พบเชื้อพยาธิเชื้อ *S. stercoralis*

Negative : ไม่พบเชื้อพยาธิเชื้อ *S. stercoralis*

3.1.1.1.4 เทคนิคเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (Agar plate culture)

วิธีทำ

ตักอุจจาระประมาณ 3-5 กรัม ลงบน Nutrient agar plate แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นำมาดูตัวอ่อนพยาธิและรอยไชของพยาธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในวันที่ 1 และดูไปทุกวันจนครบ 7 วัน

การรายงานและการแปลผล

Positive : พบเชื้อพยาธิเชื้อ *S. stercoralis*

Negative : ไม่พบเชื้อพยาธิเชื้อ *S. stercoralis*

3.1.1.1.5 เทคนิคการแยกเฉพาะตัวเชื้อ *S. stercoralis* ด้วยวิธีของ Baermann

วิธีทำ

นำ Agar plate ที่ positive คว้านใส่ผ้ากรอง หรือเทน้ำจากถุงพลาสติกใส่ผ้ากรอง นำไปวางลงในกรวยแก้วที่มีน้ำ โดยที่ปลายกรวยแก้วจะท่อยาวและหนีบรัดไว้ให้น้ำในกรวยแก้วไหลออกมา จากนั้นทิ้งไว้ 1-2 วัน ทำการเปิดที่หนีบให้น้ำในท่อไหลออกมา นำน้ำที่ได้ไปปั่นให้ตกตะกอนที่

ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที 5 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนข้างบนทิ้งเหลือตะกอนไว้ นำไปล้างด้วย 0.85% NaCl หลาย ๆ ครั้ง เพื่อเก็บไว้สกัดแอนติเจนต่อไป

หลังจากประชากรที่เข้ารับการตรวจทราบผลตรวจทางห้องปฏิบัติการและพบว่าอยู่ในกลุ่มเป้าหมาย ผู้วิจัยได้ทำการประสานติดต่อไปยังคนไข้ เพื่อขอให้เข้าร่วมเป็นอาสาสมัครโดยความสมัครใจ และให้อาสาสมัครกรอกข้อมูลลงในเอกสารใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย ซึ่งและรับการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดโดยนักเทคนิคการแพทย์ที่มีใบประกอบวิชาชีพ โดยโครงการนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดที่เส้นเลือดดำที่บริเวณข้อพับแขน ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำมาปั่นแยกเฉพาะซีรัมเก็บที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนคือ

1. การเตรียมแอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ
2. การเตรียม NIE peptide antigen
3. การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA
4. การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Latex particle agglutination

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.1. การเตรียมแอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ

การเตรียมแอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบจากเชื้อ *S. stercoralis* ในระยะ filariform larvae

1. นำอุจจาระของคนไข้ที่ติดเชื้อมาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค Agar plate culture ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 วัน จากนั้นนำมาแยกเฉพาะตัวเชื้อด้วยวิธีของ Baermann
2. นำไปล้างด้วย 0.85% NaCl หลาย ๆ ครั้ง
3. เมื่อได้จำนวนที่เหมาะสมให้เติม phosphate buffered saline (PBS) ที่มีส่วนผสมของ protease inhibitors เพื่อยับยั้ง protease

4. ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูง (Sonication) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 x g ต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. ดูดส่วนที่ด้านบนออกมาเพื่อนำไปเตรียมเป็นแอนติเจน และนำไปวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีน และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ใช้หลักการ Indirect ELISA

1. นำ micro plate ไปเคลือบด้วย แอนติเจน *S. stercoralis* ชนิดสกัดอย่างหยาบ ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายอยู่ใน carbonate buffer (pH9.6) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
2. ล้าง unbound แอนติเจน ออกด้วย PBS ที่มีส่วนผสมของ 0.05% Tween (PBST) 3 นาที 3 ครั้ง
3. เติม 3% skim milk ที่ละลายอยู่ใน PBST 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง
4. จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 นาที 3 ครั้ง
5. เติมตัวอย่างซีรัม (ที่ dilution 1:100 ใน 3% Skim milk ใน PBST) ลงใน plate นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
6. จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
7. เติม horseradish peroxidase anti-human immunoglobulin G (anti-IgG1 anti-IgG2 anti-IgG3 anti-IgG4) ที่ dilution 1:1000 ใน 3% Skim milk ใน PBST ในแต่ละหลุม นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1ชั่วโมง
8. จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
9. เติม Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที
10. หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
11. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วย microplate reader

ทำการแปรผลวิเคราะห์การตรวจหา anti-*S. stercoralis* antibody ของวิธี ELISA โดยใช้ unpaired t-test ในการวิเคราะห์ค่า OD และในการหาค่า cut off ใช้ค่า mean + 3 SD ของค่า

OD ของกลุ่มประชากรที่สุขภาพดี เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หา sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive (NPV), และค่า accuracy ของวิธี ELISA

3.2.3 การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Latex particle agglutination

1. นำ 10% latex particle ขนาด 0.8 ไมโครเมตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นล้างด้วย 0.1 M Borate buffer pH 8.5 อีก 4 ครั้งที่ความเร็ว 4,500 x g ดูดส่วนใสทิ้ง
2. ผสมแอนติเจน *S. stercoralis* ชนิดสกัดอย่างหยาบ ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ 0.1 M Borate buffer pH 8.5 แล้วนำไปใส่ลงใน latex particle พร้อมทั้งเขย่าให้เข้ากัน โดยเขย่าทิ้งไว้ 16-20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
3. นำไปปั่นให้ตกตะกอนดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 0.1 M Borate buffer pH 8.5 ที่มีส่วนผสมของ BSA ใน อัตราส่วน 0.33 มิลลิกรัมต่อ 0.1 M Borate buffer 1 มิลลิลิตร เขย่าจนครบ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
4. เมื่อได้เวลานำไปปั่นแล้วดูดส่วนใสทิ้ง แล้วนำไปปั่นล้างด้วย PBS pH 7.2 ที่มีส่วนผสมของ BSA ในอัตราส่วน 5 มิลลิกรัมต่อ PBS 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายดูดส่วนใสทิ้งไป
5. ขั้นตอนสุดท้ายนำตะกอน latex ที่ได้ไปปรับเป็น 1% ในสารละลาย PBS pH 7.2 ที่มีส่วนผสมของ BSA ในอัตราส่วน 5 มิลลิกรัมต่อ PBS 1 มิลลิลิตร พร้อมเติม 5% glycerol นำไปทดสอบปฏิกิริยาโดยใช้ตัวอย่างซีรัม 20 ไมโครลิตร นำไปหยดลงบนแผ่นพลาสติกพื้นดำ จากนั้นหยด 1% latex particle ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในอัตราส่วน 1:1 แล้ว ใช้หลอดไม้พายเขี่ยผสมให้เข้ากัน นำไปวางบนเครื่องเขย่าจับเวลา 20 นาที

การรายงานผลและการแปลผล

Positive : เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (agglutination)(รูปที่ 6)

Negative : ไม่เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (non-agglutination)(รูปที่ 6)

หลังจาก 20 นาทีรายงานเป็นผลลบ(Negative) และหากเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มภายหลัง 20 นาที ถือว่าเป็นผลบวกปลอม

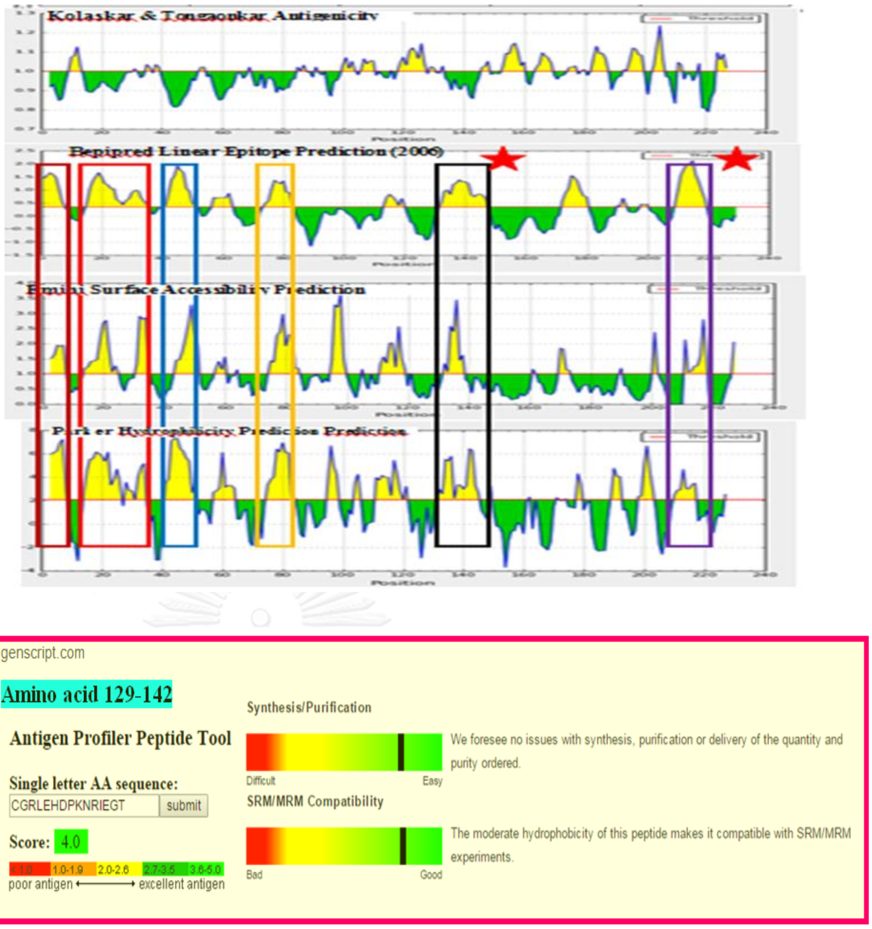
ทำการแปรผลวิเคราะห์การตรวจหา anti-*S. stercoralis* antibody ของวิธี Latex particle agglutination และวิเคราะห์หา sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive (NPV), และค่า accuracy

Positive **Negative**

รูปที่ 6 ปฏิกิริยา latex particle agglutination

3.2.4 การเตรียม NIE peptide antigen

สำหรับ NIE peptide antigen ได้รับการอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยโรคเท้าช้างและโรคเขตร้อน (Lymphatic filariasis and tropical medicine research unit) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยการวิเคราะห์ความเป็นแอนติเจนในโปรแกรมวิเคราะห์ ซึ่งจากการวิเคราะห์โปรแกรมทั้ง 3 โปรแกรม โดยนำลำดับ amino acid ของโปรตีน NIE มาทำการวิเคราะห์ความเป็นแอนติเจน ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้ ความเป็นแอนติเจน ความเป็น (Antigenicity) Surface accessibility และความเป็น Hydrophilicity (รูปที่ 7) จากการวิเคราะห์ผลที่ได้พบว่า ลำดับ amino acid ของโปรตีน NIE ที่ 129-142 มีคุณสมบัติครบทั้ง 3 คุณสมบัติ และสามารถสังเคราะห์ได้ง่าย



รูปที่ 7 รูปแสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติความเป็นแอนติเจน

ที่มา http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl

CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2.5 ขั้นตอนการทำวิธี ELISA ใช้หลักการ Indirect ELISA

1. นำ micro plate ไปเคลือบด้วย NIE peptide แอนติเจน ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายอยู่ใน carbonate buffer (pH9.6) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
2. ล้าง unbound แอนติเจน ออกด้วย PBS ที่มีส่วนผสมของ 0.05% Tween (PBST) 3 นาที 3 ครั้ง
3. เติม 3% skim milk ที่ละลายอยู่ใน PBST 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง

4. จากนั้นล้างแต่ละหลุม 3 นาที 3 ครั้ง ด้วย PBST
5. เติมตัวอย่างซีรัม (ที่ dilution 1:100 ใน 3% Skim milk ใน PBST) ลงใน plate นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
6. จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
7. เติม horseradish peroxidase anti-human immunoglobulin G (anti-IgG1 anti-IgG2 anti-IgG3 anti-IgG4) ที่ dilution 1:1000 ใน 3% Skim milk ใน PBST ในแต่ละหลุม นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1ชั่วโมง
8. จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
9. เติม Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที
10. หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
11. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วย microplate reader

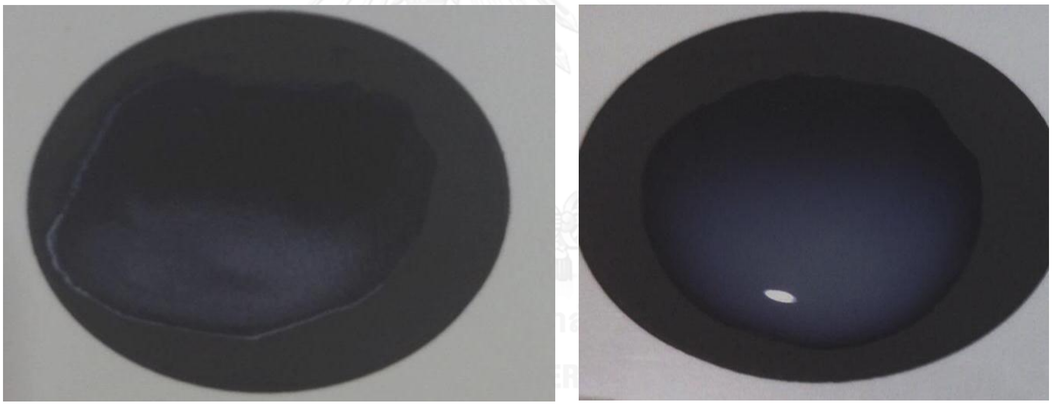
ทำการแปรผลวิเคราะห์การตรวจหา anti-*S. stercoralis* antibody ของวิธี ELISA โดยใช้ unpaired t-test ในการวิเคราะห์ค่า OD และในการหาค่า cut off ใช้ค่า mean + 3 SD ของค่า OD ของกลุ่มประชากรที่สุขภาพดี เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หา sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive (NPV), และค่า accuracy ของวิธี ELISA

3.2.6 การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Latex particle agglutination

1. นำ 10% latex particle ขนาด 0.8 ไมโครเมตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นล้างด้วย 0.1 M Borate buffer pH 8.5 อีก 4 ครั้งที่ความเร็ว 4,500 x g ดูดส่วนใสทิ้ง
2. ผสม NIE peptide แอนติเจนความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ 0.1 M Borate buffer pH 8.5 แล้วนำไปใส่ลงใน latex particle พร้อมทั้งเขย่าให้เข้ากัน โดยเขย่าทิ้งไว้ 16-20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
3. นำไปปั่นให้ตกตะกอนดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 0.1 M Borate buffer pH 8.5 ที่มีส่วนผสมของ BSA ใน อัตราส่วน 0.33 มิลลิกรัมต่อ 0.1 M Borate buffer 1 มิลลิลิตร เขย่าจนครบ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
4. เมื่อได้เวลานำไปปั่นแล้วดูดส่วนใสทิ้ง แล้วนำไปปั่นล้างด้วย PBS pH 7.2 ที่มีส่วนผสมของ BSA ในอัตราส่วน 5 มิลลิกรัมต่อ PBS 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายดูดส่วนใสทิ้งไป

5. ขั้นตอนสุดท้ายนำตะกอน latex ที่ได้ไปปรับเป็น 1% ในสารละลาย PBS pH 7.2 ที่มีส่วนผสมของ BSA ในอัตราส่วน 5 มิลลิกรัมต่อ PBS 1 มิลลิลิตร พร้อมเติม 5% glycerol นำไปทดสอบปฏิกิริยาโดยใช้ตัวอย่างซีรัม 20 ไมโครลิตร นำไปหยดลงบนแผ่นพลาสติกพื้นดำ จากนั้นหยด 1% latex particle ปริมาตร 20 ไมโครลิตรในอัตราส่วน 1:1 แล้ว ใช้หลอดไม้พายเขี่ยผสมให้เข้ากัน นำไปวางบนเครื่องเขย่าจับเวลา 20 นาที หากเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (agglutination) ขึ้น (รูปที่ 8) รายงานเป็นผลบวก (Positive) หากไม่เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (non-agglutination) หลังจาก 20 นาที รายงานเป็นผลลบ(Negative) และหากเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มภายหลัง 20 นาที ถือว่าเป็นผลบวกปลอม

ทำการแปรผลวิเคราะห์การตรวจหา anti-*S. stercoralis* antibody ของวิธี Latex particle agglutination และวิเคราะห์หา sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive (NPV), และค่า accuracy



Positive **Negative**

รูปที่ 8 ปฏิกิริยา latex particle agglutination

3.2.7 การวิเคราะห์ผล และสถิติ

3.2.7.1 รายงานร้อยละของความชุกในการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา

ซึ่งความชุกคำนวณได้จาก

$$\text{ความชุกของการติดเชื้อ (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนประชากรที่ตรวจพบพยาธิ}}{\text{จำนวนประชากรทั้งหมดที่ได้รับการตรวจ}} \times 100$$

3.2.7.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจพยาธิ *S. stercoralis* ด้วยเทคนิค Simple direct smear เทคนิค Harada-mori filter paper culture และเทคนิค Agar plate culture โดยคำนวณได้จาก

$$\text{ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจ (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนประชากรที่ตรวจพบพยาธิแต่ละเทคนิค}}{\text{จำนวนประชากรทั้งหมดที่ได้รับการตรวจทั้ง 3 เทคนิค}} \text{X100}$$

3.2.7.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง (OD) ของปฏิกิริยาของวิธี ELISA ในการตรวจหา anti- *S. stercoralis IgG antibody* ด้วยสถิติ unpaired t-test โดยโปรแกรม SPSS version 17 ที่ความเชื่อมั่นที่ 95% หรือ $p < 0.05$

3.2.7.4 การวิเคราะห์หา sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive (NPV), และค่า accuracy จะสามารถคำนวณค่าต่างๆ ไดจากสูตรต่อไปนี้จากตาราง 2 x 2 (ตารางที่ 3)

Sensitivity = A / A + C

Specificity = D / B + D

Accuracy = [A + D] / [A + B + C + D]

Positive Predictive value = A / A + B

Negative Predictive value = D / C + D

Prevalence = [A + C] / [A + B + C + D]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 3 ตารางวิเคราะห์ข้อมูล 2X2

<table>
<tr><td></td><td></td><td colspan="2">การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีมาตรฐาน</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>เป็นโรค</td><td>ไม่เป็นโรค</td></tr>
<tr><td rowspan="2">ผลการตรวจที่ต้องการทดสอบ</td><td>ผลบวก</td><td>A
True positive</td><td>B
False positive</td></tr>
<tr><td>ผลลบ</td><td>C
False negative</td><td>D
True positive</td></tr>
</table>

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาของการติดเชื้อปรสิตในลำไส้

จากการตรวจปรสิตในลำไส้ในประชากรตำบลเชียงคาน ตำบลจอมศรี และตำบลธาตุในเขตพื้นที่อำเภอเชียงคาน จังหวัดเลย ทำการตรวจปรสิตในลำไส้ จำนวน 650 คน เป็นประชากรตำบลเชียงคาน 87 คน ประชากรตำบลจอมศรี 122 คน และประชากรตำบลธาตุ 441 คน จำแนกตามเพศแบ่งเป็นเพศชาย 295 (45.38%) เพศหญิงร้อยละ 355 (54.61%) จำแนกเป็นกลุ่มอายุแบ่งเป็นช่วยอายุน้อยกว่า 20 ปี ร้อยละ 1.38 (12/650) ช่วงอายุ 20 – 29 ปีร้อยละ 17.84 (116/650) ช่วงอายุ 30-39 ปีร้อยละ 35.84 (233/650) ช่วงอายุ 40-49 ปีร้อยละ 27.84 (181/650) ช่วงอายุ 50-59 ปีร้อยละ 3.07 (20/650) ช่วงอายุ 60 ปีขึ้นไปร้อยละ 13.53 (88/650) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่ส่งตรวจการติดเชื้อปรสิตในลำไส้จำแนกตามเพศ และกลุ่มช่วงอายุ

	ข้อมูลทั่วไป	จำนวนคน	ร้อยละ
เพศ	ชาย	295	45.38
	หญิง	355	54.61
	รวม	**650**	**100.00**
ช่วงอายุ	น้อยกว่า 20 ปี	12	1.84
	20-29 ปี	116	17.84
	30-39 ปี	233	35.84
	40-49 ปี	181	27.84
	50-59 ปี	20	3.07
	60 ปีขึ้นไป	88	13.53
	รวม	**650**	**100.00**

จากการตรวจปรสิตในลำไส้พบว่ามีการติดเชื้อปรสิตในลำไส้ ร้อยละ 23.69 (154/650) จำแนกแบ่งเป็นการติดเชื้อปรสิตในลำไส้เพศชายร้อยละ15.69 (102/650) เพศหญิงร้อยละ 8 (52/650) (ตารางที่ 5) ตรวจพบการติดเชื้อโปรโตซัว ร้อยละ 8.46 (55/650) ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ร้อยละ 13.84 (90/650) ติดเชื้อพยาธิ *Opisthorchis viverrini* ร้อยละ 0.15 (1/650) ติดเชื้อ *Taenia spp.*ร้อยละ0.61 (4/650) ติดเชื้อ Minute intestinal fluke ร้อยละ 0.61 (4/650)

โดยพบการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ร่วมกับโปรโตซัวในลำไส้ ร้อยละ 0.92 (6/650) และตรวจพบโปรโตซัวมากกว่า 1 ชนิด ร้อยละ 0.77 (5/650) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ข้อมูลของผู้ติดเชื้อปรสิตในลำไส้จำแนกตามเพศ

เพศ	ผลบวก	ผลลบ	จำนวนประชากร
ชาย	102	193	295
หญิง	52	303	355
รวม	**154**	**496**	**560**

ตารางที่ 6 การติดเชื้อปรสิตในลำไส้ในประชากรตำบลเชียงคาน ตำบลจอมศรี และตำบลธาตุในเขตพื้นที่อำเภอเชียงคาน จังหวัดเลย

ชนิดของปรสิต	จำนวน	ร้อยละ
กลุ่มโปรโตซัว	**55**	**8.46**
Blastocystis hominis	28	4.3
Endolimax nana	24	3.69
Giardia lamblia	1	0.15
Iodamoeba butschlis	2	0.30
กลุ่มหนอนพยาธิ	**99**	**15.23**
S. stercoralis	90	13.84
Opisthorchis viverrini	1	0.15
Minute intestinal fluke	4	0.61
Taenia spp	4	0.61
กลุ่มหนอนพยาธิ ร่วมกับ กลุ่มโปรโตซัว	**6**	**0.92**
S. stercoralis และ *Blastocystis hominis*	3	0.46
S. stercoralis และ *Endolimax nana*	3	0.46
ติดเชื้อโปรโตซัวมากกว่า 1 ชนิด	**5**	**0.77**
Blastocystis hominis และ *Endolimax nana*	5	0.77

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การตรวจหาการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ด้วยเทคนิค Simple direct smear เทคนิค Harada-mori filter paper culture และเทคนิค Agar plate culture โดยมีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 650 ราย ตรวจพบการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ด้วยเทคนิค Simple direct smear จำนวน 6 ราย ตรวจพบการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองแบบฮาราดา-มอริ จำนวน 24 ราย และตรวจพบการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ด้วยเทคนิค Agar plate culture 90 ราย มีจำนวนประชากรที่ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* จำนวนทั้งสิ้น 90 ราย เมื่อนำทั้ง 3 วิธีมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจหารการติดเชื้อ *S. stercoralis* พบว่าเทคนิค Simple direct smear มีความไวร้อยละ 6.6 (6/90) เทคนิคการ Harada-mori filter paper culture มีความไวร้อยละ 26.66 (24/90) และเทคนิค Agar plate culture มีประสิทธิภาพร้อยละ 100 (90/90) (ตารางที่ 7) เทคนิค Agar plate culture ให้ความไวมากกว่า เทคนิค Harada-mori filter paper culture 3 เท่า และมากกว่าเทคนิค Simple direct smear 16 เท่า อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทดสอบด้วยวิธี Formalin-ether concentration เนื่องด้วยอุปสรรคในเรื่องสถานที่และวัสดุอุปกรณ์ในการทดสอบ จึงทำให้ข้อมูลที่นำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแต่ละวิธียังไม่สมบูรณ์เพียงพอสำหรับการสรุปผลในครั้งนี้

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ด้วยเทคนิค Simple direct smear เทคนิค Harada-mori filter paper culture และเทคนิค Agar plate culture

พยาธิ	**จำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจทั้ง 3 วิธี**	**จำนวนที่ตรวจพบการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ด้วยวิธี**		
		Simple direct smear	Harada-mori filter paper culture	Agar plate culture
S. stercoralis	650	6	24	90
ความไวในการตรวจการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis*		**6.6**	**26.66**	**100**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การรวบรวมตัวอย่างซีรัม เพื่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิเส้นด้าย โดยวิธี Indirect ELISA และวิธี Latex particle agglutination

จากผลการตรวจวินิจฉัยพบผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้ายจำนวน 90 ราย มีอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการและยินยอมให้เจาะเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 88 ราย และได้เจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากคนปกติที่ตรวจไม่พบปรสิตจำนวน 88 ราย สำหรับผู้ป่วยโรคพยาธิอื่นพบเพียง 10 ราย จึงได้ขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัมจาก *Lymphatic Filariasis Research Unit* จำนวน 32 ราย (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 รายละเอียดตัวอย่างซีรัมเพื่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิเส้นด้าย โดยวิธี Indirect ELISA และวิธี Latex particle agglutination

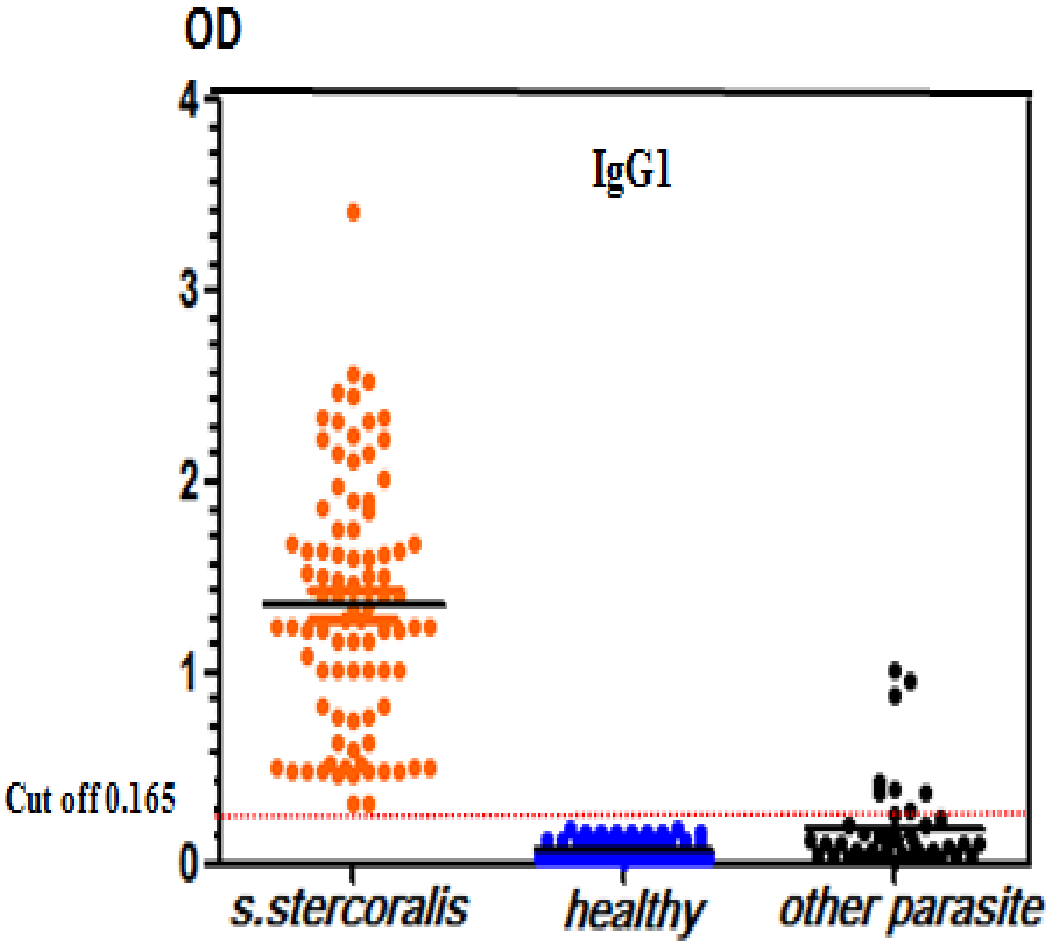
การวินิจฉัย	**จำนวนตัวอย่าง**
S. stercoralis	88
เชื้อปรสิตชนิดอื่นๆ	42
*คนปกติ*ที่ตรวจไม่พบเชื้อปรสิต	88
รวม	**218**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.3 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody ด้วย แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี Indirect ELISA

จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody พบว่าระดับแอนติบอดีในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย (mean OD=1.465) สูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดี (mean OD=0.690) และผู้ติดเชื้อปรสิตอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (mean OD = 0.191)(P< 0.001) (รูปที่ 9)

จากจำนวนตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย 88 ราย ให้ผลบวกทั้งหมด (sensitivity 100%) ในขณะที่ตัวอย่างของผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นให้ผลบวก 14 ราย จากจำนวนตัวอย่าง 42 ราย และไม่พบผลบวกในคนปกติ (specificity 88.46%) สำหรับค่า NPV และค่า PPV ของการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody มีค่า 100 และ 85.43 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

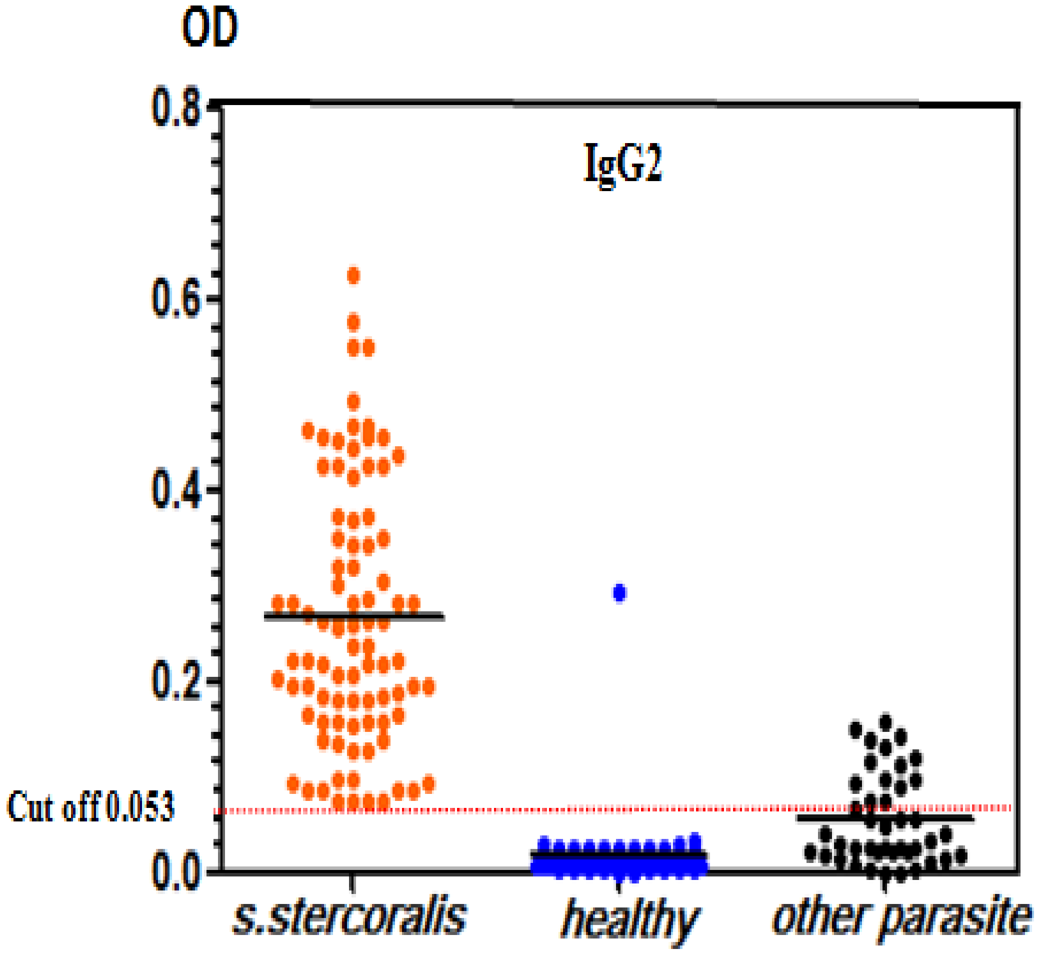


รูปที่ 9 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA

4.4 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody ด้วย แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี Indirect ELISA

จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody พบว่าระดับแอนติบอดีในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย (mean OD = 0.283) สูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดี (mean OD = 0.022) และผู้ติดเชื้อปรสิตอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (mean OD = 0.055) (P< 0.001) (รูปที่ 10)

จากจำนวนตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย 88 ราย ให้ผลบวกทั้งหมด (sensitivity 100%) ในขณะที่ตัวอย่างของผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นให้ผลบวก 18 ราย จากจำนวนตัวอย่าง 42 ราย พบผลบวกในคนปกติ 1 รายจากจำนวนคนปกติ 88 ราย (specificity 85.38%) สำหรับค่า NPV และค่า PPV ของการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody มีค่า 100 และ 82.24 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

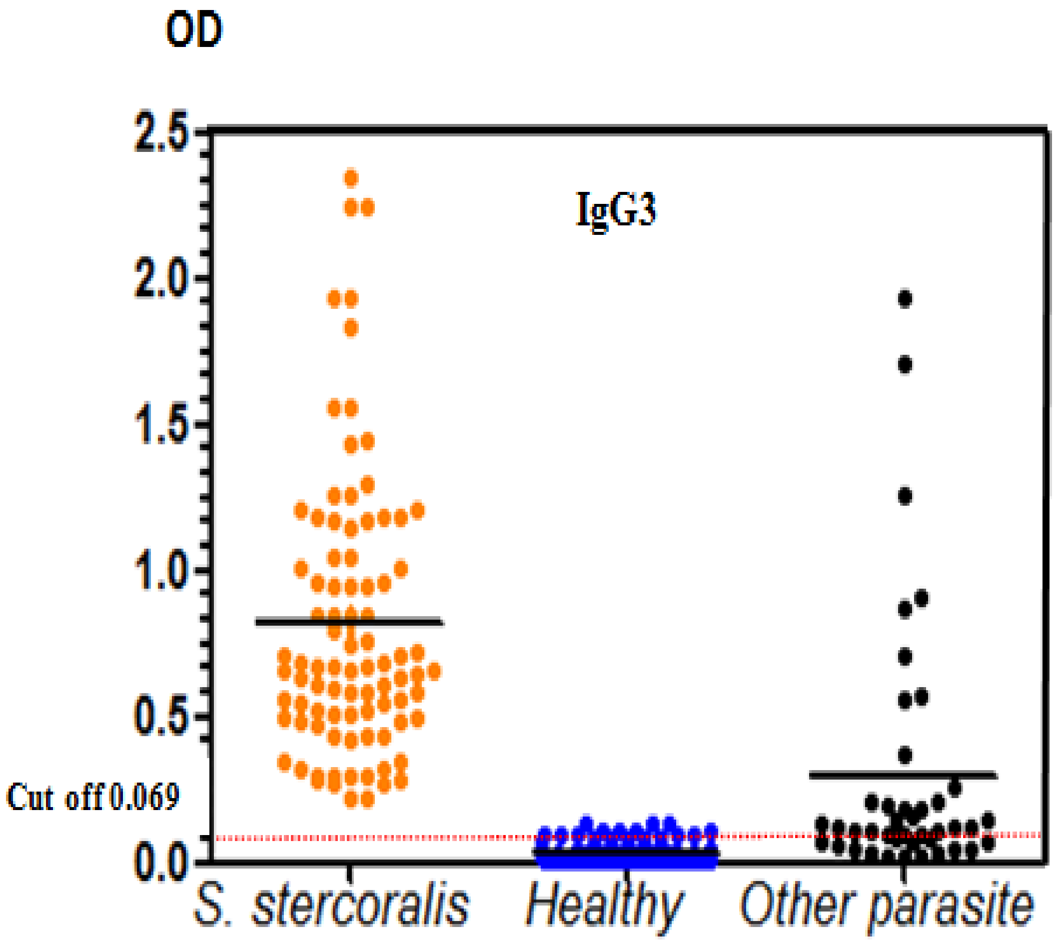


รูปที่ 10 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA

4.5 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody ด้วย แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบโดยวิธี Indirect ELISA

จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody พบว่าระดับแอนติบอดีในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย (mean OD = 0.841) สูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดี (mean OD = 0.032) และผู้ติดเชื้อปรสิตอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (mean OD = 0.040) (P< 0.001) (รูปที่ 11)

จากจำนวนตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย 88 ราย ให้ผลบวกทั้งหมด (sensitivity 100%) ในขณะที่ตัวอย่างของผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นให้ผลบวก 32 รายจากจำนวนตัวอย่าง 42 ราย พบผลบวกในคนปกติ 22 รายจากจำนวนคนปกติ 88 ราย (specificity 58.46%) สำหรับค่า NPV และค่า PPV ของการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody มีค่า 100 และ 61.97 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

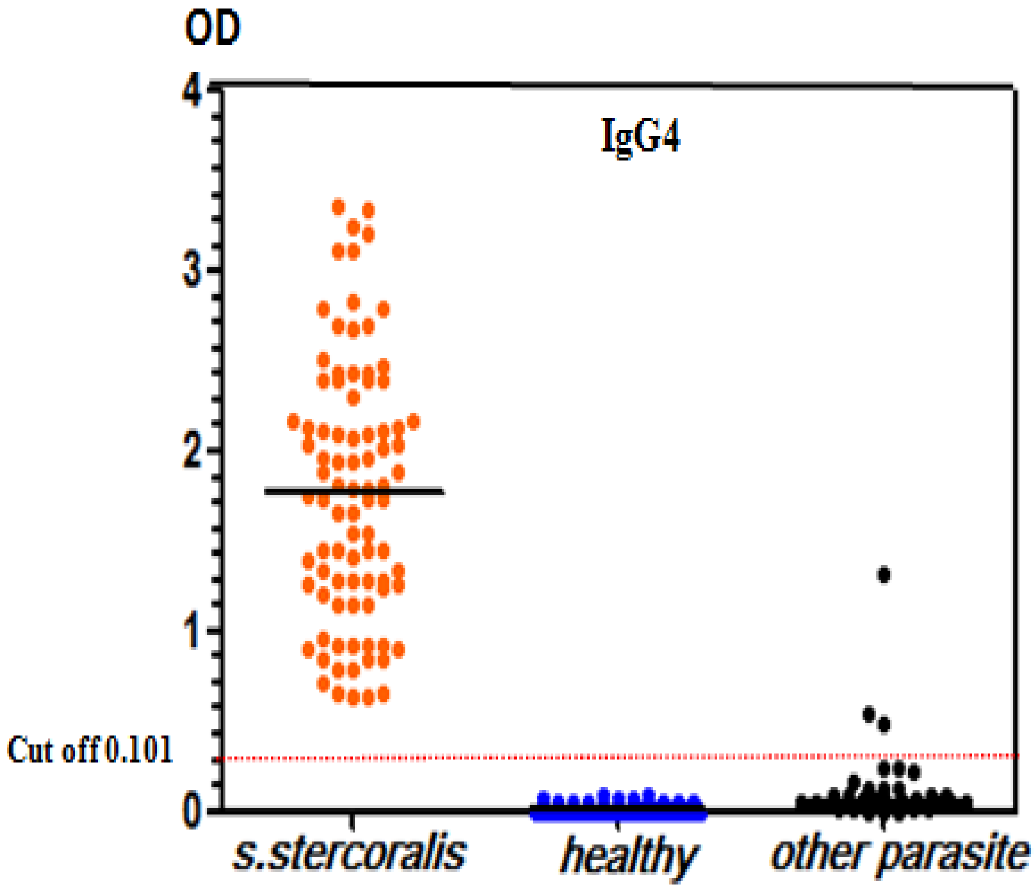


รูปที่ 11 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA

4.6 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody ด้วย แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี Indirect ELISA

จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody พบว่าระดับแอนติบอดีในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย (mean OD = 1.831) สูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดี (mean OD = 0.023) และผู้ติดเชื้อปรสิตอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (mean OD = 0.119) (P< 0.001) (รูปที่ 12)

จากจำนวนตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย 88 ราย ให้ผลบวกทั้งหมด (sensitivity 100%) ในขณะที่ตัวอย่างของผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นให้ผลบวก 10 ราย จากจำนวนตัวอย่าง 42 ราย และไม่พบผลบวกในคนปกติ (specificity 93.07%) สำหรับค่า NPV และค่า PPV ของการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody มีค่า 100 และ 90.72 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)



รูปที่ 12 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA

4.7 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* antibody ด้วย แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี latex particle agglutination

จากจำนวนตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย 88 ราย ให้ผลบวกทั้งหมด (sensitivity 100%) ในขณะที่ตัวอย่างของผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นให้ผลบวก 21 ราย จากจำนวนตัวอย่าง 42 ราย พบผลบวกในคนปกติ 6 รายจากจำนวนคนปกติ 88 ราย (specificity 79.72%) สำหรับค่า NPV และค่า PPV ของการตรวจหา anti-*S. stercoralis* antibody มีค่า 100 และ 90.52 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Indirect ELISA และวิธี latex particle agglutination โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ

Parameter	วิธี Indirect ELISA				วิธี Latex particle agglutination (%)
	IgG1 (%)	IgG2 (%)	IgG3 (%)	IgG4 (%)	
Sensitivity	100	100	100	100	100
Specificity	88.46	85.38	58.46	**93.07**	79.72
Accuracy	93.10	91.28	75.22	**95.87**	87.61
PPV	85.43	82.24	61.97	**90.72**	76.52
NPV	100	100	100	100	100

4.8 การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม

การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพยาธิเส้นด้ายด้วยวิธี latex particle agglutination โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับปรสิตชนิดอื่น ๆ ได้ถึง 50% โดยพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับปรสิตทั้ง 9 ชนิดที่ได้ทำการทดสอบ (ตารางที่ 10) สำหรับการตรวจหา anti- *S. stercoralis* IgG subclass antibody ด้วยวิธี ELISA พบว่าสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้ โดยการตรวจหา IgG4 antibody พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มน้อยที่สุด (23.8%)(ตารางที่ 10) โดยพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับปรสิตเพียง 5 ชนิด ได้แก่ *Taenia spp.* (8.3%), *T. trichiura* (66.66%), *E. vermicularis* (100%), *A. lumbricoides* (100%), และ

Filaria (75%) ในขณะที่ การตรวจหา IgG1 antibody พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม 33.33% โดยพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับปรสิต 6 ชนิด ได้แก่ *Taenia spp*. (25%), *E. vermicularis* (50%), *A. lumbricoides* (100%), Minute intestinal fluke (100%), *E. histolytica* (66.66%) และ Filaria (75%) (ตารางที่ 10) และการตรวจหา IgG2 antibody พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม 42.85% โดยพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับปรสิต 6 ชนิด ได้แก่ *Taenia spp.* (58.33%), *A. lumbricoides* (50%), Minute intestinal fluke (50%), *O. viverrini* (62.5%), *E. histolytica* (66.66) และ Filaria (50%) (ตารางที่ 8) อย่างไรก็ตาม การตรวจหา IgG3 antibody ยังคงพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มสูงที่สุด (76.19%) และสูงกว่าการตรวจโดยวิธี latex particle agglutination โดยพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับปรสิต ทั้ง 9 ชนิดที่ทำการทดสอบ และพบว่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม 100% กับเชื้อปรสิต 5 ชนิดได้แต่ *A. lumbricoides, E. vermicularis, E. histolytica,* Minute intestinal fluke, และ Filaria (ตารางที่ 10)

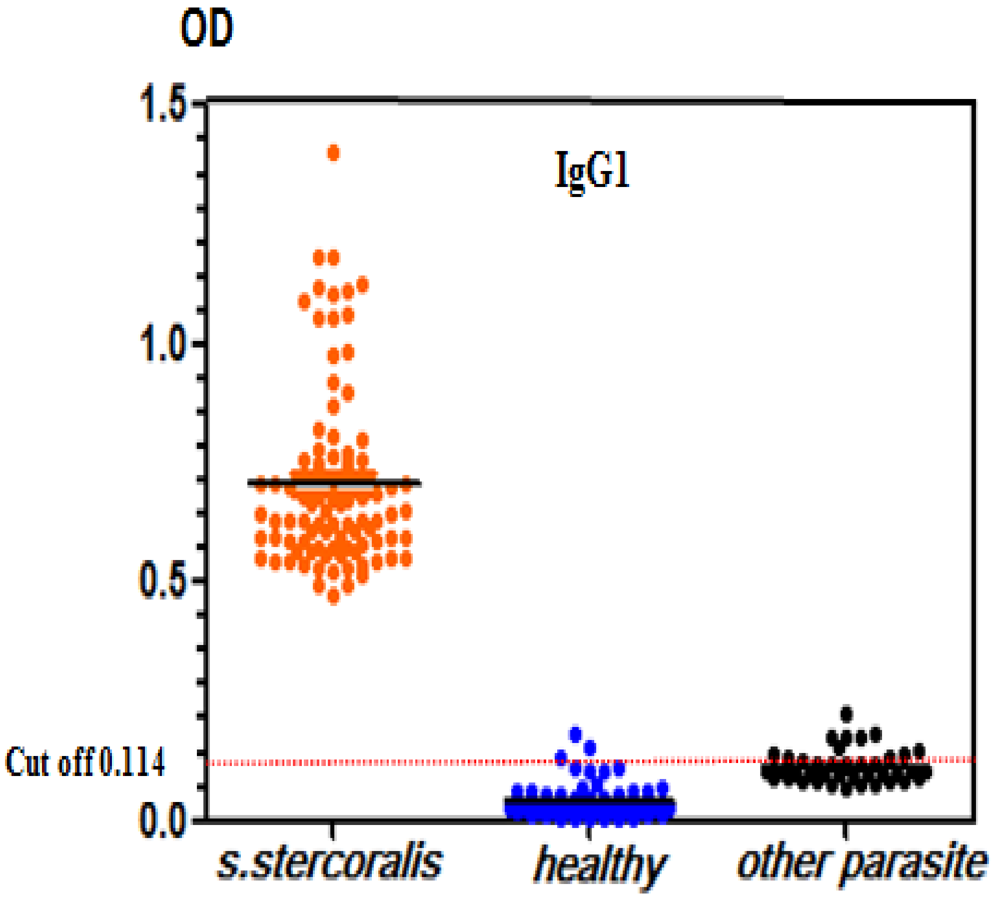
ตารางที่ 10 การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA และวิธี Latex particle agglutination (LA) โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ

เชื้อปรสิต	**จำนวน**	**วิธี Indirect ELISA**				**วิธี Latex particle agglutination (%)**
		IgG1 (%)	**IgG2 (%)**	**IgG3 (%)**	**IgG4 (%)**	
Trichuris trichiura	3	0 (0)	0 (0)	2 (66.66)	2 (66.66)	2 (66.66)
Enterobius vermicularis	2	1 (50)	0 (0)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
Ascaris lumbricoides	2	2 (100)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
Hookworm	6	0 (0)	0 (0)	5 (83.33)	0 (0)	2 (33.33)
Filaria	4	4 (100)	2 (50)	4 (100)	3 (75)	2 (50)
Minute intestinal fluke	2	2 (100)	1 (50)	2 (100)	0 (0)	2 (100)
Opisthorchis viverrini	8	0 (0)	5 (62.5)	3 (37.5)	0 (0)	2 (25)
Taenia spp.	12	3 (25)	7 (58.33)	9 (75)	1 (8.3)	4 (33.33)
Entamoeba histolytica	3	2 (66.66)	2 (66.66)	3 (100)	0 (0)	3 (100)
รวม	42	14 (33.33)	18 (42.85)	32 (76.19)	10 (23.80)	21 (50)

4.9 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody ด้วย NIE peptide antigen โดยวิธี Indirect ELISA

จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody พบว่าระดับแอนติบอดีในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย (mean OD=0.708) สูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดี (mean OD=0.038) และผู้ติดเชื้อปรสิตอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (mean OD = 0.114)(P< 0.001) (รูปที่ 13)

จากจำนวนตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย 88 ราย ให้ผลบวกทั้งหมด (sensitivity 100%) ในขณะที่ตัวอย่างของผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นให้ผลบวก 14 ราย จากจำนวนตัวอย่าง 42 ราย พบผลบวกในคนปกติ 3 รายจากจำนวนคนปกติ 88 ราย (specificity 85.38%) สำหรับค่า NPV และค่า PPV ของการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody มีค่า 100 และ 82.24 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

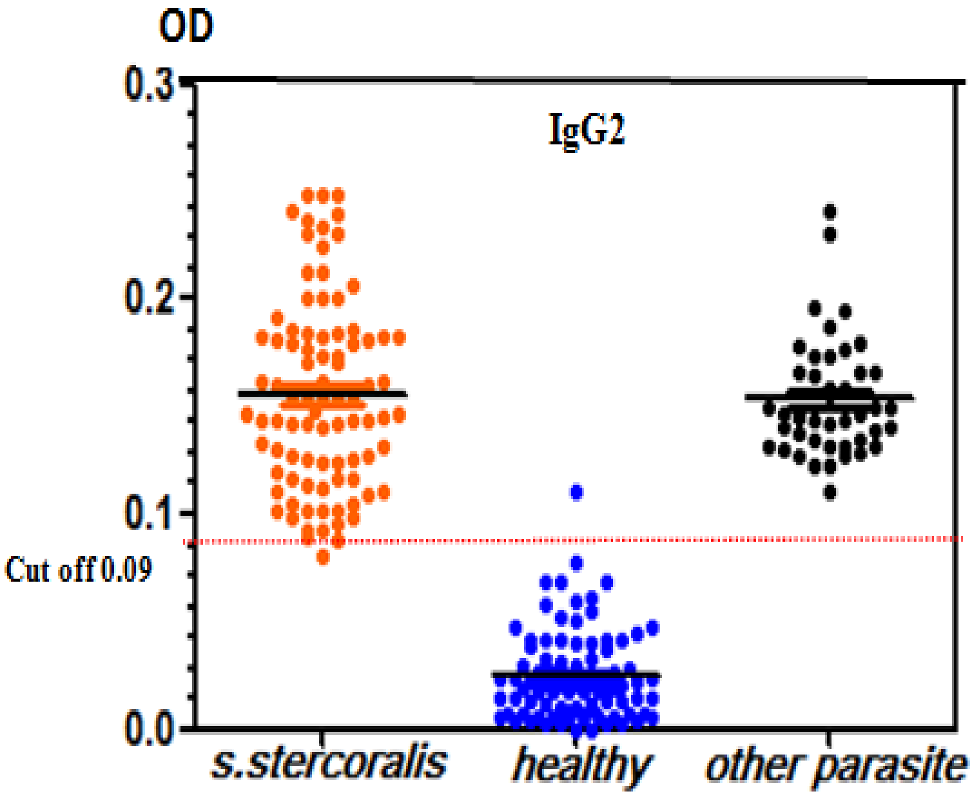


รูปที่ 13 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG1 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA

4.10 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody ด้วย NIE peptide antigen โดยวิธี Indirect ELISA

จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody พบว่าระดับแอนติบอดีในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย (mean OD = 0.155) สูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดี (mean OD = 0.030) และผู้ติดเชื้อปรสิตอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (mean OD = 0.153) (P< 0.001) (รูปที่ 14)

จากจำนวนตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย 88 ราย ให้ผลบวก 86ราย (sensitivity 97.27%) ในขณะที่ตัวอย่างของผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นให้ผลบวกทั้งหมดจำนวนตัวอย่าง 42 รายพบผลบวกในคนปกติ 1 รายจากจำนวนคนปกติ 88 ราย (specificity 67.42%) สำหรับค่า NPV และค่า PPV ของการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody มีค่า 100 และ 66.66 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

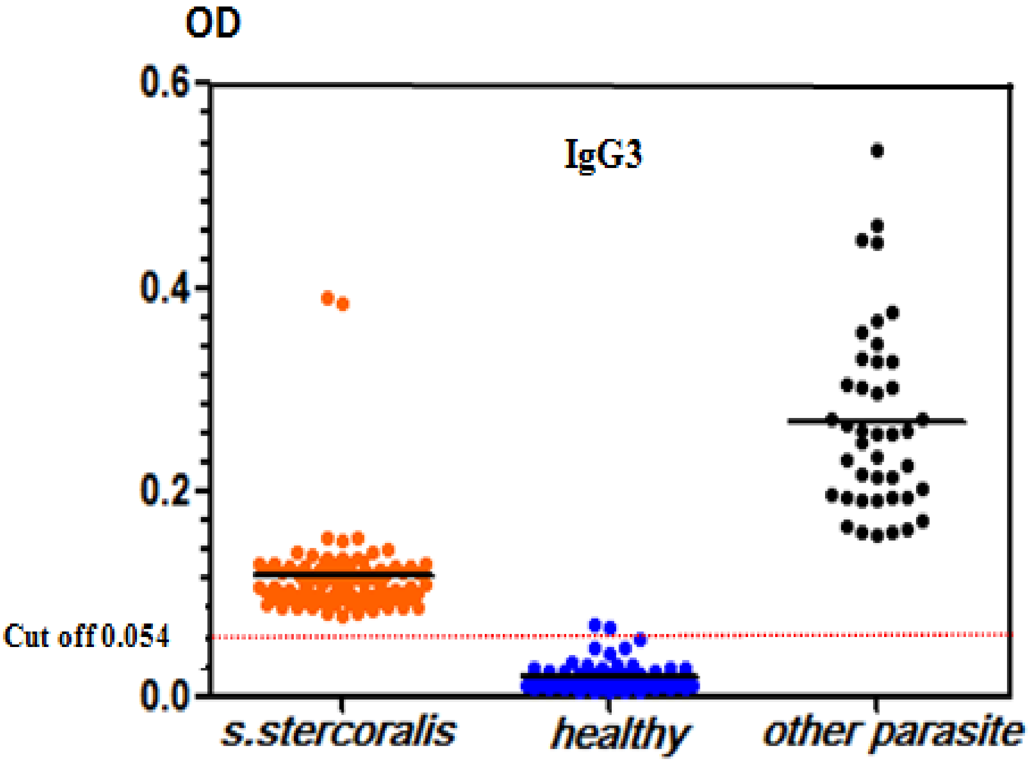


รูปที่ 14 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG2 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA

4.11 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody ด้วย NIE peptide antigen โดยวิธี Indirect ELISA

จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody พบว่าระดับแอนติบอดีในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย (mean OD = 0.117) สูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดี (mean OD = 0.017) แต่พบว่าระดับแอนติบอดีต่ำกว่าผู้ติดเชื้อปรสิตอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (mean OD = 0.269) (P< 0.001) (รูปที่ 15)

จากจำนวนตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย 88 ราย ให้ผลบวกทั้งหมด (sensitivity 100%) ในขณะที่ตัวอย่างของผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นให้ผลบวกทั้งหมดจำนวนตัวอย่าง 42 รายพบผลบวกในคนปกติ 1 รายจากจำนวนคนปกติ 88 ราย (specificity 66.90%) สำหรับค่า NPV และค่า PPV ของการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody มีค่า 100 และ 67.17 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

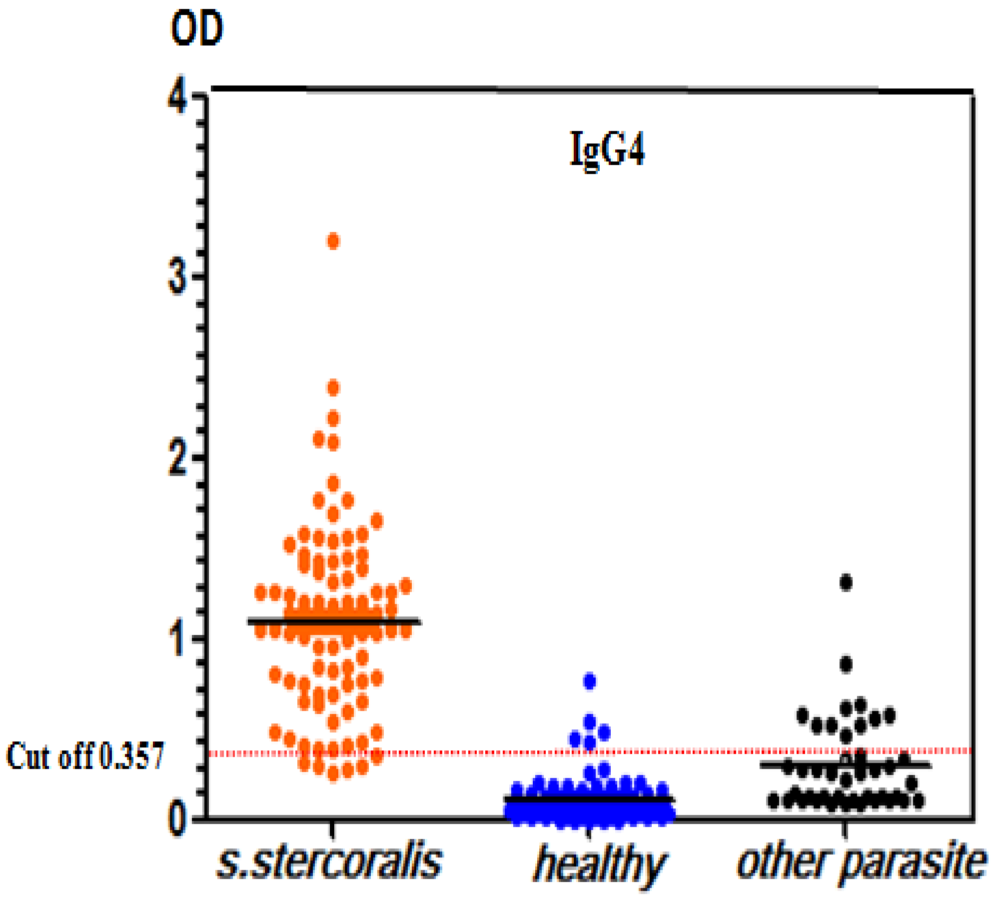


รูปที่ 15 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG3 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA

4.12 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody ด้วย NIE peptide antigen โดยวิธี Indirect ELISA

จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody พบว่าระดับแอนติบอดีในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย (mean OD = 1.099) สูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดี (mean OD = 0.119) และผู้ติดเชื้อปรสิตอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (mean OD = 0.302) (P< 0.001) (รูปที่ 16)

จากจำนวนตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย 88 ราย ให้ผลบวก 83ราย (sensitivity 94.3%) ในขณะที่ตัวอย่างของผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นให้ผลบวก 10 ราย จากจำนวนตัวอย่าง 42 ราย พบผลบวกในคนปกติ 10 รายจากจำนวนคนปกติ 88 ราย (specificity 83.8%) สำหรับค่า NPV และค่า PPV ของการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody มีค่า 95.61 และ 79.8 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)



รูปที่ 16 ค่า optical density จากการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody ในผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ และในผู้ที่มีสุขภาพดี โดยวิธี Indirect ELISA

4.13 การตรวจหา anti-*S. stercoralis* antibody ด้วยวิธี latex particle agglutination

จากจำนวนตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิเส้นด้าย 88 ราย ให้ผลบวกให้ผลบวก 25 ราย (sensitivity 28.4%) ในส่วนของตัวอย่างของผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นให้ผลลบทั้งหมด และไม่พบผลบวกในคนปกติ (specificity 100%) สำหรับค่า NPV และค่า PPV ของการตรวจหา anti-*S. stercoralis* antibody มีค่า 67.35 และ 100 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Indirect ELISA และวิธี latex particle agglutination โดยใช้ NIE peptide antigen

Parameter	วิธี Indirect ELISA				วิธี Latex particle agglutination (%)
	IgG1 (%)	IgG2 (%)	IgG3 (%)	IgG4 (%)	
Sensitivity	100	97.72	100	94.30	28.40
Specificity	**85.38**	67.42	66.90	83.80	100
Accuracy	**91.28**	80.20	80.27	80.07	71.10
PPV	**82.24**	66.66	67.17	79.80	100
NPV	100	100	100	95.61	67.35

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.14 การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม

การตรวจหา anti- *S. stercoralis* IgG subclass antibody ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ NIE peptide antigen พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้ โดยการตรวจหา IgG4 antibody พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มน้อยที่สุด (23.80%) (ตารางที่12) โดยพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับปรสิตเพียง 4 ชนิด ได้แก่ *Taenia spp.* (33.33%), *T. trichiura* (33.33%), Minute intestinal fluke (50%), และ *O. viverrini* (50%) ในขณะที่ การตรวจหา IgG1 antibody พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม 33.33% โดยพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับปรสิต 8 ชนิด ได้แก่ *Taenia spp.* (41.66%), *E. vermicularis* (50%), *A. lumbricoides* (100%), Minute intestinal fluke (50%), *E. histolytica* (33.33%), *O. viverrini* (62.5%), *T. trichiura* (33.33%) และ Filaria (50%) (ตารางที่ 12) ในการตรวจหา IgG2 antibody และการตรวจหา IgG3 antibody พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มสูง

ที่สุด (100%) (ตารางที่ 12) และสูงกว่าการตรวจโดยวิธี latex particle agglutination ที่พบว่าไม่มีปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA และวิธี Latex particle agglutination (LA) โดยใช้ NIE peptide antigen

เชื้อปรสิต	**จำนวน**	**วิธี Indirect ELISA**				**วิธี Latex particle agglutination (%)**
		IgG1 (%)	**IgG2 (%)**	**IgG3 (%)**	**IgG4 (%)**	
Trichuris trichiura	3	1 (33.33)	3 (100)	3 (100)	1 (33.33)	0 (0)
Enterobius vermicularis	2	1 (50)	2 (100)	2 (100)	0 (0)	0 (0)
Ascaris lumbricoides	2	2 (100)	2 (100)	2 (100)	0 (0)	0 (0)
Hookworm	6	0 (0)	6 (100)	6 (100)	0 (0)	0 (0)
Filaria	4	2 (50)	4 (100)	4 (100)	0 (0)	0 (0)
Minute intestinal fluke	2	1 (50)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	0 (0)
Opisthorchis viverrini	8	5 (62.50)	8 (100)	8 (100)	4 (50)	0 (0)
Taenia spp.	12	5 (41.66)	12 (100)	12 (100)	4 (33.33)	0 (0)
Entamoeba histolytica	3	1 (33.33)	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)
รวม	42	14 (33.33)	42 (100)	42 (100)	10 (23.80)	0 (0)

4.15 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Indirect ELISA และ Latex particle agglutination ระหว่างการใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ และ NIE peptide

วิธี Latex particle agglutination แม้ว่าการใช้ NIE peptide จะสามารถลดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับปรสิตชนิดใดเลย และไม่พบผลบวกในคนปกติ (Specificity 100%) แต่มีความไวในการวินิจฉัยต่ำเพียง 28.4% เมื่อเทียบกับการใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบที่มีความไว 100% ในวิธี Indirect ELISA ถึงแม้ว่าการใช้ NIE peptide จะสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับหนอนพยาธิฟิลาเรียได้ แต่พบว่าเกิดผลบวกในคนปกติจำนวนมากกว่าการใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพพบว่า การตรวจหา IgG4 ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ มีประสิทธิภาพสูงสุดทั้งในด้านความไวและความจำเพาะ (100% และ 93% ตามลำดับ) และไม่พบผลบวกในคนปกติ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย ด้วยวิธี Indirect ELISA และ Latex particle agglutination ระหว่างการใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ และ NIE peptide

กลุ่มประชากร	จำนวนตัวอย่าง	Indirect ELISA								Latex particle agglutination	
		IgG1 (%)		IgG2 (%)		IgG3 (%)		IgG4 (%)			
		Crude Ag	NIE peptide	Crude Ag	NIE peptide	Crude Ag	NIE peptide	Crude Ag	NIE peptide	Crude Ag	NIE peptide
S.stercoralis	88	88(100)	88 (100)	88 (100)	86 (97.7)	88 (100)	88 (100)	88 (100)	83 (94.3)	88 (100)	25 (28.4)
คนปกติ	88	0 (0)	3 (2.6)	1 (1.13)	1 (1.13)	22 (25)	1 (1.13)	0 (0)	10 (11.3)	6 (6.81)	0 (0)
T. trichiura	3	0 (0)	1 (33.3)	0 (0)	3 (100)	2 (66.6)	3 (100)	2 (66.6)	1 (33.3)	2 (66.6)	0 (0)
E. vermicularis	2	1(50)	1 (50)	0 (0)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
A. lumbricoides	2	2 (100)	2 (100)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
Hookworm	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	5 (83.3)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (33.3)	0 (0)
Filaria	4	4 (100	2 (50)	2 (50)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	3 (75)	0 (0)	2 (50)	0 (0)
Minute intestinal fluke	2	2 (100)	1 (50)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	0 (0)	1 (50)	2 (100)	0 (0)
O. viverrini	8	0 (0)	5 (62.5)	5 (62.5)	8 (100)	3 (37.5)	8 (100)	0 (0)	4 (50)	2 (25)	0 (0)
Taenia spp.	12	3 (25)	5 (41.6)	7 (58.3)	12 (100)	9 (75)	12 (100)	1 (8.3)	4 (33.3)	4 (33.3)	0 (0)
E. histolytica	3	0 (0)	1 (33.3)	0 (0)	3 (100)	3 (100)	3 (100	0 (0)	0 (0)	3 (100)	0 (0)

บทที่ 5
สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการตรวจการติดเชื้อพยาธิเส้นด้าย ด้วยเทคนิค Agar plate culture มีความไว 100% ซึ่งสูงกว่าเทคนิค Harada-mori และเทคนิค Simple direct smear ที่มีความไว 26.66% และ 6.6% ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าเทคนิค Agar plate culture มีความไวสูงว่า 2 เทคนิคดังกล่าว โดยเฉพาะเทคนิค Simple direct smear ที่พบว่ามีความไวที่ต่ำในการส่งตรวจเพียงครั้งเดียว และความไวจะเพิ่มขึ้นเป็น 100% ในการส่งตรวจติดต่อกัน 7 ครั้ง[1] ในส่วนของเทคนิค Harada-mori ถึงแม้จะมีความไวที่สูงกว่า Simple direct smear แต่ยังไม่สูงเทียบเท่ากับเทคนิค Agar plate culture ทั้งที่เป็นการเพิ่มจำนวนเหมือนกัน แต่ในเทคนิค Harada-mori จะเป็นการเพิ่มจำนวนในอุจจาระบนกระดาษกรองจึงไม่มีสารอาหารที่เพียงพอในการดำรงชีพของตัวหนอนพยาธิ ต่างกับเทคนิค Agar plate culture ที่มีสารอาหารเหมาะแก่การดำรงชีพของหนอนพยาธิ[1] ดังนั้นเทคนิค Agar plate culture จึงเป็นเทคนิคมาตรฐาน (Standard method) ในการวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิเส้นด้าย ในสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการ

ในการศึกษานี้เป็นการพัฒนาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้ายด้วยวิธี Indirect ELISA และวิธี Latex particle agglutination เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิเส้นด้ายในตัวอย่างซีรัม ผลจากการศึกษาที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการเลือกวิธีที่มีประสิทธิภาพต่อไป

ในการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG subclass antibody ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบจากเชื้อ *S. stercoralis* ระยะที่ 3 มีความไว 100% สำหรับทุก Subclassซึ่งสูงกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้แอนติเจนจากเชื้อ *S. ratti* ระยะที่ 3 ซึ่งมีความไว 77.5% สำหรับตรวจหา IgG1 antibody และมีความไว 50% สำหรับการตรวจหา IgG4 antibody[23] และสูงกว่า anti-*S. stercoralis* IgG antibody ที่มีความไว 73-97.2%[23]

ในด้านความจำเพาะพบว่าการตรวจหา IgG4 antibody มีความจำเพาะสูงสุด 90% สูงกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบจากเชื้อ *S. ratti* 86.7% รองลงมาคือ IgG1 antibody พบว่ามีความจำเพาะ 84.84% ซึ่งต่ำกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้ *S. ratti* ระยะที่ 3 เป็นแอนติเจนที่มีความจำเพาะ 98.4 % ซึ่ง *S. ratti* ที่นำมาศึกษานั้นเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคในมนุษย์

และกลุ่มตัวอย่างผู้ติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นที่นำมาศึกษาเป็นผู้ติดเชื้อปรสิตที่ก่อโรคในมนุษย์ อาจเป็นไปได้ที่ทำให้เกิดผลลบปลอมขึ้น ทำให้มีค่าความจำเพาะสูงขึ้น ในส่วนผลการตรวจหา IgG2 และ IgG3 antibody ถึงแม้จะพบว่ามีความไวที่สูง แต่มีความจำเพาะที่ต่ำ และที่สำคัญพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มจำนวนมาก และในการศึกษาด้าน IgG subclass จะเห็นได้ว่า IgG subclass ที่มีความสำคัญในเรื่องความจำเพาะสูงในการติดเชื้อหนอนพยาธิคือ IgG1 และ IgG4 ซึ่ง IgG subclass ทั้ง 2 นี้มีความจำเพาะกับแอนติเจนที่มีส่วนประกอบของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรท ซึ่งพบได้ในตัวหนอนพยาธิเส้นด้าย ส่วน IgG2 antibody จะจำเพาะกับแอนติเจนที่เป็น Polysaccharide ซึ่งพบได้ในกลุ่มแบคทีเรีย และ IgG3 antibody จะจำเพาะกับแอนติเจนในกลุ่มไวรัส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้จากระดับแอนติบอดีของ IgG2 และ IgG3 antibody ที่ต่ำกว่า IgG1 และ IgG4 antibody

การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับผู้ติดเชื้อในกลุ่มปรสิตชนิดอื่นๆ การศึกษานี้ยังพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับหนอนพยาธิฟิลาเรียมากที่สุด โดยพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในการตรวจทุก Subclass (50-100%) เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการตรวจหา IgG โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับหนอนพยาธิฟิลาเรียได้มาก[13]

สำหรับการศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้ายด้วยวิธี Latex particle agglutination พบมีความไวที่สูง 100% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Gelatin particle agglutination ที่มีความไว 87% และวิธี Latex particle agglutination มีความจำเพาะ 79.7% สูงกว่าวิธี Gelatin particle agglutination ที่มีความจำเพาะ 74 % อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการทดสอบปฏิกิริยาพบว่าวิธี Latex particle agglutination ใช้เวลาอ่านผลปฏิกิริยาน้อยกว่าคือ ภายใน 20 นาที ต่างกับวิธี Gelatin particle agglutination ที่ใช้เวลาอ่านผลปฏิกิริยาที่ 2 ชั่วโมง และในการอ่านผลปฏิกิริยาในวิธี Latex particle agglutination มีปฏิกิริยาที่ชัดเจนอ่านผลด้วยตาเปล่าได้ และยังใช้แอนติเจนในปริมาณที่น้อยกว่าวิธี Gelatin particle agglutination เนื่องด้วย particle ที่มีขนาดเล็กจะมีปริมาณพื้นที่ผิวที่มากกว่า particle ที่มีขนาดใหญ่ในอัตราส่วนปริมาตรเท่ากัน

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody ด้วยวิธี Indirect ELISA และการตรวจหา anti-*S. stercoralis* antibody ด้วยวิธี Latex particle agglutination พบว่าการตรวจหา anti-*S. stercoralis* IgG4 antibody มีความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยสูง (100% และ 90.9% ตามลำดับ) แต่มีข้อจำกัดที่ไม่เหมาะในการนำไปใช้ในโรงพยาบาลขนาดเล็ก เนื่องจากมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก มีราคาแพง ต้องมีเครื่องมือเฉพาะ และอาศัยผู้มี

ประสบการณ์ในการทำการวิเคราะห์ สำหรับวิธี Latex particle agglutination แม้จะมีความจำเพาะที่ต่ำกว่าวิธี Indirect ELISA แต่ก็พบว่ามีความไวที่เท่ากัน (100%) และเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ให้การวินิจฉัยที่รวดเร็ว มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก แต่มีความจำเพาะที่ต่ำ (79.2%) อาจต้องใช้การตรวจอาการทางคลินิกโดยแพทย์ และ/หรือ การตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ร่วมด้วย

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้นำ NIE peptide antigen มาใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดี (ซึ่ง NIE peptide ได้พัฒนามาจากโปรตีน NIE antigen) ผลจากการศึกษาพบว่า anti-IgG subclass antibody ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่ามีความไว 100% ในการตรวจหา IgG1 และ IgG3 antibody และในการตรวจหา IgG2 และ IgG4 antibody มีความไว 97.72% และ 94.3% ตามลำดับ เมื่อนำไปเปรียบเทียบการการศึกษาด้วย NIE antigen ที่ผ่านมาพบว่าในการตรวจหา IgG4 ต่อ peptide มีความไวที่สูงกว่าการตรวจหา IgG4 ต่อ NIE antigen ที่มีความไวเพียง 45%[(18)]

ในด้านความจำเพาะพบว่าในการตรวจหา IgG1 antibody โดยใช้ NIE peptide antigen มีความจำเพาะสูงสุด (85.3%) แต่ยังคงต่ำกว่าความจำเพาะในการตรวจหา IgG antibody โดยใช้ NIE antigen ซึ่งมีความจำเพาะ 95-100%[(18)] เช่นเดียวกับการตรวจหา IgG4 antibody ต่อ NIE peptide ถึงแม้ความไวจะสูงกว่า แต่ด้านความจำเพาะ (83.3%) ที่ต่ำกว่าการใช้ NIE antigen ที่มีความจำเพาะ 100%[(18)] ในส่วนของ IgG2 และ IgG3 antibody ถึงแม้ความไวจะสูง แต่พบว่ามีความจำเพาะที่ต่ำ พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับปรสิตทุกชนิดที่ทดสอบ (100%)(ตารางที่ 10)

จากการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มจากการใช้ NIE peptide ในการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี Indirect ELISA พบว่า IgG1 สามารถลดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในผู้ป่วยที่ติดเชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรียและพยาธิใบไม้ในลำไส้ (ตารางที่ 13) และ IgG4 Subclass สามารถลดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับพยาธิเข็มหมุด พยาธิไส้เดือน และพยาธิฟิลาเรีย แต่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับปรสิตเพียง 4 ชนิด ที่สำคัญสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของปรสิตที่ติดต่อผ่านดิน ซึ่งมีวงโคจรที่คล้ายกับหนอนพยาธิเส้นด้ายและพบมากในประเทศไทยได้อีกด้วย(ตารางที่ 13) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดยรายงานว่า NIE antigen สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มผู้ติดเชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรีย และหนอนพยาธิปากขอได้

สำหรับการตรวจด้วยวิธี Latex particle agglutination พบว่ามีความไวต่ำเพียง 28.4 % แต่พบมีความจำเพาะสูงถึง 100%

เมื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างแอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบ และ NIE peptide antigen โดยวิธี Indirect ELSA พบว่าในการใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบในการตรวจหา IgG1 antibody พบว่ามีความไวสูงเท่ากับ NIE peptide antigen (100%) แต่ในด้านความจำเพาะ NIE peptide antigen มีความจำเพาะที่สูงกว่า (85.38%) ส่วนแอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบมีความจำเพาะ 84.84% ในการตรวจหา IgG4 antibody พบว่าแอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบมีความไวและความจำเพาะสูงกว่า (100% และ 90.90% ตามลำดับ) NIE peptide antigen (94.3% และ 83.8% ตามลำดับ)

อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ถึงแม้ว่าการใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบจะมีความไวและความจำเพาะสูงสุด แต่ในการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มพบว่า NIE peptide antigen สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาได้มากกว่า โดยเฉพาะกลุ่มผู้ติดเชื้อหนอนพยาธิฟิราเรีย โดยเฉพาะ IgG4 antibody โดย NIE peptide antigen ที่ลดการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกลุ่มผู้ติดเชื้อหนอนพยาธิฟิราเรียได้ 100%

ในด้านราคาต้นทุนพบว่าในวิธี ELISA จะต้องใช้เครื่องอ่านผลปฏิกิริยาซึ่งมีราคาสูงหลักแสนจนถึงหลักล้านจึงมีข้อจำกัดในเรื่องงบประมาณในการจัดซื้อของโรงพยาบาลขนาดเล็กที่มีคนไข้มาใช้บริการจำนวนน้อย แต่เมื่อนำมาคิดต้นทุนในการทำปฏิกิริยา 1 ปฏิกิริยาจะใช้ต้นทุนของแอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบราคา 1.03 บาทต่อ 1ปฏิกิริยา และราคาต้นทุน 2.40 บาทต่อ 1 ปฏิกิริยาในการใช้ NIE peptide antigen สำหรับวิธี latex particle agglutination ในการใช้แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบราคา 15 บาทต่อ 1 ปฏิกิริยา และราคาต้นทุน 15.96 บาทต่อ 1 ปฏิกิริยาในการใช้ NIE peptide antigen แต่ทั้งนี้นั้นวิธี latex particle agglutination ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษในการอ่านปฏิกิริยา สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่าได้ทันที จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจในโรงพยาบาลขนาดเล็กได้

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้ายมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อให้แพทย์สามารถรักษาได้ทันและหายขาด โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องและผู้ที่จะรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ ดังนั้น การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถทำได้ง่าย และให้ผลการตรวจที่รวดเร็วจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องนำมาใช้แทนวิธีที่ใช้ในปัจจุบันที่ใช้ระยะเวลาในการทดสอบหลายวัน และมีความเสี่ยงติดเชื้อพยาธิในเจ้าหน้าที่ที่ปฏิบัติงาน จากการศึกษานี้พบว่าการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิเส้นด้าย โดยการตรวจ ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้แอนติเจนชนิดสกัด

อย่างหยาบ ในการตรวจหา IgG4 ให้ความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยสูงสุด แต่ยังมีข้อจำกัดที่ไม่เหมาะสมกับโรงพยาบาลขนาดเล็ก เนื่องจากมีขั้นตอนยุ่งยาก ต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ในการทดสอบ สำหรับการวินิจฉัยด้วยวิธี latex particle agglutination แม้จะให้ความไวและจำเพาะต่ำกว่าวิธี ELISA แต่เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย ให้ผลการวินิจฉัยที่รวดเร็ว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการคัดเลือกชนิดแอนติเจน ที่นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย ดังนั้นการพัฒนาคัดเลือกชนิดแอนติเจน ที่จำเพาะ (specific antigen) ของเชื้อพยาธิเส้นด้าย โดยอาศัยเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุลจะสามารถเพิ่มความจำเพาะและประสิทธิภาพของการวินิจฉัยได้ต่อไป ซึ่งจะเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลขนาดเล็กทดแทนเทคนิค Simple direct smear และเทคนิค Agar plate culture ในอนาคตต่อไป อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ตรวจภาคสนามได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เอกสารอ้างอิง

1. Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of Strongyloides stercoralis infection. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2001;33(7):1040-7.

2. Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, et al. Strongyloidiasis--the most neglected of the neglected tropical diseases? Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2009;103(10):967-72.

3. Sithithaworn J, Sithithaworn P, Janrungsopa T, Suvatanadecha K, Ando K, Haswell-Elkins MR. Comparative assessment of the gelatin particle agglutination test and an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. Journal of clinical microbiology. 2005;43(7):3278-82.

4. มรกต น. ปรสิตวิทยาทางการแพทย์. หนอนพยาธิ. 327. เชียงใหม่ : ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์2554.

5. Requena-Mendez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Munoz J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. PLoS neglected tropical diseases. 2013;7(1):e2002.

6. Anamnart W, Intapan PM, Maleewong W. Modified formalin-ether concentration technique for diagnosis of human strongyloidiasis. The Korean journal of parasitology. 2013;51(6):743-5.

7. Arakaki T, Iwanaga M, Kinjo F, Saito A, Asato R, Ikeshiro T. Efficacy of agar-plate culture in detection of Strongyloides stercoralis infection. The Journal of parasitology. 1990;76(3):425-8.

8. HARADA YM, O. A New Method for culturing Hook Worm. Yonago Acta Medica 1955;1:177-9.

9. Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. Acta tropica. 2014;135:33-43.

10. Koosha S, Fesharaki M, Rokni MB. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

human strongyloidiasis. Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology. 2004;23(6):214-6.

11. Boscolo M, Gobbo M, Mantovani W, Degani M, Anselmi M, Monteiro GB, et al. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. Clinical and vaccine immunology : CVI. 2007;14(2):129-33.

12. Ines Ede J, Silva ML, Souza JN, Teixeira MC, Soares NM. The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of Strongyloides stercoralis infection. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2013;76(1):31-5.

13. Norsyahida A, Riazi M, Sadjjadi SM, Muhammad Hafiznur Y, Low HC, Zeehaida M, et al. Laboratory detection of strongyloidiasis: IgG-, IgG4 - and IgE-ELISAs and cross-reactivity with lymphatic filariasis. Parasite immunology. 2013;35(5-6):174-9.

14. Goncalves AL, Rocha CA, Gonzaga HT, Goncalves-Pires Mdo R, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females, and eggs of Strongyloides venezuelensis in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2012;72(1):79-84.

15. Matsumoto M, Sasaki Y, Yasuda K, Takai T, Muramatsu M, Yoshimoto T, et al. IgG and IgE collaboratively accelerate expulsion of Strongyloides venezuelensis in a primary infection. Infection and immunity. 2013;81(7):2518-27.

16. Bon B, Houze S, Talabani H, Magne D, Belkadi G, Develoux M, et al. Evaluation of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. Journal of clinical microbiology. 2010;48(5):1716-9.

17. Ravi V, Ramachandran S, Thompson RW, Andersen JF, Neva FA. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from Strongyloides stercoralis L3-stage larvae. Molecular and biochemical parasitology. 2002;125(1-2):73-81.

18. Ramanathan R, Burbelo PD, Groot S, Iadarola MJ, Neva FA, Nutman TB. A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of Strongyloides stercoralis infection. The Journal of infectious diseases. 2008;198(3):444-51.

19. Sudre AP, Siqueira RC, Barreto MG, Peralta RH, Macedo HW, Peralta JM. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. Parasitology research. 2007;101(4):1117-23.

20. Moghaddassani H, Mirhendi H, Hosseini M, Rokni M, Mowlavi G, Kia E. Molecular Diagnosis of Strongyloides stercoralis Infection by PCR Detection of Specific DNA in Human Stool Samples. Iranian journal of parasitology. 2011;6(2):23-30.

21. Sultana Y, Jeoffreys N, Watts MR, Gilbert GL, Lee R. Real-time polymerase chain reaction for detection of Strongyloides stercoralis in stool. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2013;88(6):1048-51.

22. niamnuy N. The Study of Efficacy and Stability of Gelatin Particle Agglutination Test for Strongyloides stercoralis Diagnosis. J Med Tech Assoc Thailand. 2012.

23. Rodrigues RM, de Oliveira MC, Sopelete MC, Silva DA, Campos DM, Taketomi EA, et al. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using Strongyloides ratti saline extract as heterologous antigen. Parasitology research. 2007;101(5):1209-14.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. วิธีทำอาหารวุ้นกึ่งแข็ง (Agar plate culture)

วัสดุอุปกรณ์

1. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
2. Nutrient agar

วิธีทำ

1. ชั่ง Nutrient agar 23 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
2. นำไป autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
3. จากนั้นนำ Nutrient agar เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความหนา 4 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว แล้วนำเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส

1. วิธีการเตรียม Carbonate Buffer

วัสดุอุปกรณ์

1. Na_2CO_3
2. $NaHCO_3$

วิธีทำ

1. ชั่งสาร Na_2CO_3 ปริมาตร 3.03 กรัม และสาร $NaHCO_3$ ปริมาตร 6 กรัม
2. นำสารมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
3. ปรับค่า pH ให้ได้ pH 9.6 แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. วิธีการเตรียม PBS Buffer

วัสดุอุปกรณ์

1. NaHPO4
2. KCl
3. K3PO4
4. NaCl

วิธีทำ

1. ชั่งสาร	$NaHPO_4$	1.16	กรัม
	KCl	0.1	กรัม
.	K_3PO_4	0.1	กรัม

NaCl	0.4	กรัม

2. นำสารมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

3. ปรับค่า pH ให้ได้ pH 7.4 แล้วเก็บอุณหภูมิห้อง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ	นายก้องกริช ศรีบุรินทร์
วัน เดือน ปีเกิด	30 กันยายน 2530
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลเลย
ที่อยู่ปัจจุบัน	358/1 ถนนเลย-เชียงคาน บ้านธาตุ ตำบลธาตุ อำเภอเชียงคาน จังหวัดเลย 42110
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ. 2544 จากโรงเรียนธาตุพิทยาคม จังหวัดเลย สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ. 2548 จากโรงเรียนเลยพิทยาคม จังหวัดเลย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี พ.ศ. 2552 จากคณะเทคนิคการแพทย์ สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
ปัจจุบัน	นิสิตปริญญาโท ภาควิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University