

การวิเคราะห์สายพันธุ์ของ *Blastocystis* ที่แยกได้จากนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาใน  
จังหวัดอ่างทองของประเทศไทย

Subtype Analysis of *Blastocystis* sp. Isolated from High School Students in  
Ang-Thong Province, Thailand

นิตยา ศรีไชยพล (Nittaya Srichaipon)\* วิวรพรรณ สรรประเสริฐ (Vivornpun Sanprasert)\*\*

สุรางค์ นุชประยูร (Surang Nuchprayoon)\*\*\*

บทคัดย่อ

*Blastocystis* sp. เป็นโปรโตซัวที่พบทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของทั้งมนุษย์และสัตว์ที่พบได้ทั่วโลก โดยในปัจจุบันมีรายงานพบ subtype 1-9 ในคน ซึ่งการกระจายของ subtype และความสัมพันธ์ของสายพันธุ์กับการก่อโรค ยังเป็นที่โต้แย้งกันในแต่ละประเทศ อย่างไรก็ตาม subtype ของ *Blastocystis* ในคนไทยยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การศึกษานี้เพื่อศึกษาความชุกของ *Blastocystis* subtype ในผู้ติดเชื้อคนไทย ได้ทำการเก็บอุจจาระจากนักเรียน 330 ราย สกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนยีน small-subunit ribosomal rDNA (SSU rDNA) ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) จากตัวอย่างอุจจาระ แล้วหา subtype ของ *Blastocystis* sp. ด้วยวิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ ยืนยันผลด้วย DNA sequencing analysis ผลการวิจัยนี้พบผู้ติดเชื้อ *Blastocystis* sp. จำนวน 85 ราย (25.76%) โดยพบ *Blastocystis* subtype 3 มากที่สุด (57.35%) ตามด้วย subtype 1 (33.82%) และ subtype 2 (8.82%)

ABSTRACT

*Blastocystis* is a common enteric protozoan of intestinal parasite in humans and animal worldwide. Until now, about subtype 1-9 have been reported in human. The distribution of the subtypes and the association between subtypes and the clinical symptoms remains controversial. In this study, we study the subtype distribution of *Blastocystis* sp. high school students in Ang Thong province, Thailand. The fecal samples were collected from 330 students. *Blastocystis* sp. infection were identified by simple smear, formalin ethyl-acetate concentration technic and Polymerase chain reaction (PCR) of small-subunit ribosomal DNA (SSU rDNA), subtypes of *Blastocystis* sp. were determined by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Eighty-five (25.76%) samples were positive for *Blastocystis* sp.. Subtype 3 was the most prevalent (57.35%), followed by subtype 1 (33.82%) and subtype 2 (8.82%).

คำสำคัญ: บลาสโตซิสติส สายพันธุ์ จังหวัดอ่างทอง

Key Words: *Blastocystis*, Subtype, Ang-Thong Province

\* นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\*\* อาจารย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\*\*\* ศาสตราจารย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทนำ

*Blastocystis* sp. เป็นโปรโตซัวที่ตรวจพบได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์พบได้ทั่วโลก แต่ข้อมูลเกี่ยวกับชีววิทยาของ *Blastocystis* sp. ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ชัดเจนทั้งทางด้านอนุกรมวิธาน วงจรชีวิต การติดเชื้อ และการรักษา นอกจากนี้ยังมีข้อมูลที่ขัดแย้งกันเกี่ยวกับการเกิดโรคของ *Blastocystis* sp. โดยในอดีตเชื่อว่าการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. จะก่อโรคเฉพาะในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องเท่านั้น (Garavelli et al., 1988; Narkewicz et al., 1989) ซึ่งต่อมา มีรายงานว่า *Blastocystis* sp. สามารถก่อโรคได้ในผู้ที่ภูมิคุ้มกันปกติร่วมกับการติดเชื้ออื่น การศึกษาทางระบาดวิทยาของ *Blastocystis* sp. พบอัตราการติดเชื้อ 1.5-20% ในประเทศพัฒนา และ 30-60% ในประเทศกำลังพัฒนา (Amin, 2006) สำหรับในประเทศไทยมีอัตราการติดเชื้อสูงถึง 10-45% (Saksirisampant et al., 2003; Leelayoova et al., 2008; Nuchprayoon et al., 2009)

อาการทางคลินิกของผู้ติดเชื้อ *Blastocystis* sp. มีความหลากหลายแตกต่างกันไป ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่ไม่มีอาการแสดงของโรค บางรายเกิดอาการทางระบบทางเดินอาหารโดยตรงเช่น ปวดท้อง ท้องเสีย ท้องผูก ท้องอืด คลื่นไส้ อาเจียน กระหายน้ำ นอนไม่หลับ เบื่ออาหาร น้ำหนักลด (Amin, 2006) และบางรายพบอาการในระบบอื่นที่ไม่จำเพาะกับอาการของระบบทางเดินอาหารเช่น อาการผื่นคัน ลมพิษ เป็นต้น (Gupta & Parsi, 2006) อย่างไรก็ตามสาเหตุการเกิดอาการทางคลินิกที่แตกต่างกันนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเกิดจากความแตกต่างของระยะ หรือสายพันธุ์ของโปรโตซัว หรือเกิดจากภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันของผู้ติดเชื้อ (Tan, 2008)

การศึกษาทางอนุชีววิทยาพบว่า *Blastocystis* sp. มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ (Yoshikawa et al., 1998; Noël et al., 2005) จนถึงขณะนี้ มี 13 subtype โดย subtype 1-9 พบในมนุษย์ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์ปีก (Noël et al., 2005; Santin et al., 2011) นอกจากนี้ยัง

พบว่า *Blastocystis* subtype 10 แยกได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ไม่ใช่มนุษย์ เช่น วัว แกะ กวาง (Stensvold et al., 2009) และ subtype 11-13 แยกได้จากช้าง ยีราฟ และ quokka ในสวนสัตว์ (Parker et al., 2010) ซึ่งแต่ละ subtype มีความสามารถในการติดเชื้อที่แตกต่างกัน บาง subtype สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งในมนุษย์และสัตว์ได้ บาง subtype ไม่ก่อโรคในมนุษย์ได้ และบาง subtype ก็มีโฮสต์จำเพาะ เช่น *Blastocystis* subtype 3 ที่ส่วนมากจำแนกได้จากมนุษย์ ไม่สามารถติดเชื้อในสัตว์ทดลองได้ (Hussein et al., 2008) เป็นต้น

ในปัจจุบันนี้มีข้อมูลความสัมพันธ์ของ subtype ของ *Blastocystis* sp. ยังไม่แน่ชัด มีรายงานพบ *Blastocystis* subtype 3 และ 4 อาจจะก่อโรคหรือไม่ก็ได้ (Hussein et al., 2008) ในขณะที่ subtype 2, 5, 6, 7 ไม่ทำให้เกิดโรค (Dogruman et al., 2008; Hussein et al., 2008) แต่มีรายงานพบว่า subtype 2 และ subtype 3 เป็นสาเหตุของลมพิษและท้องเสียได้เช่นกัน (Vogelberg et al., 2010; Katsarou-Katsari et al., 2008) จากการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าอาการของการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ในระบบทางเดินอาหารอาจเกิดจากความแตกต่างของ subtype ของ *Blastocystis* นอกจากนี้ความชุกและความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิกของ *Blastocystis* subtype ต่าง ยังมีความแตกต่างกันเป็นที่โต้แย้งกันในประเทศต่างๆ เช่นเดียวกับในประเทศไทยซึ่งมีรายงานความชุกของ *Blastocystis* subtype ต่างๆ ในแต่ละพื้นที่ต่างกันไป โดยมีรายงานการพบ *Blastocystis* subtype 1 สูงในเด็กหญิง ในสถานสงเคราะห์เด็กหญิงในจังหวัดกรุงเทพฯ (Thathaisong et al., 2013) และในเด็กนักเรียนในจังหวัดฉะเชิงเทรา (Leelayoova et al., 2008) แต่กลับพบ subtype 3 สูงในค่ายทหารจังหวัดชลบุรี (Surangsirat et al., 2010) และผู้ป่วยในโรงพยาบาลในจังหวัดขอนแก่น (Jantermtor et al., 2013) การศึกษาทางระบาดวิทยาโมเลกุลของการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ในคนไทยจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการประเมินสถานการณ์ที่แท้จริงของการติดเชื้อ *Blastocystis*

subtype ต่างๆในคนไทย เพื่อประโยชน์ในการวางแผนการรักษาและควบคุมโรคต่อไป

### วัตถุประสงค์การวิจัย

พัฒนาวิธีวินิจฉัยแยก subtype ของ *Blastocystis* sp. โดยใช้อุจจาระสด และศึกษาความชุกของ *Blastocystis* subtype ต่างๆ ในผู้ติดเชื้อคนไทย

### วิธีการวิจัย

#### 1. ประชากรและตัวอย่างอุจจาระที่ใช้ในการศึกษา

โครงการนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจาก คณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์จาก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การศึกษาครั้งนี้เก็บตัวอย่างอุจจาระจากนักเรียนมัธยมศึกษาในจังหวัดอ่างทอง ที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการ ซึ่งมีอายุ 12-22 ปี จำนวน 330 รายเพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ *Blastocystis* sp. ด้วยวิธี Simple smear วิธี formalin ethyl-acetate concentration และ วิธี PCR

#### 2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอทำจากตัวอย่างอุจจาระ 200 มก. โดยใช้ชุดสกัดของ Favor Prep stool DNA Isolation Mini kit (FavorGen Biotech Corporation, Taiwan) แล้วเก็บดีเอ็นเอไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อใช้ในการทดสอบครั้งต่อไป

#### 3. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

เพิ่มจำนวน small subunit ribosomal DNA gene (SSU rDNA) ของ *Blastocystis* sp. โดยใช้ universal primer ที่สามารถ เพิ่มจำนวน SSU rDNA ของ *Blastocystis* ได้ทุก subtype (Santín, 2011) ในปฏิกิริยา PCR ที่มีปริมาตรสุทธิ 50  $\mu\text{l}$  ซึ่งประกอบด้วย 1x PCR buffer, 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2mM dNTP, 1U *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA), 40 $\mu\text{g/ml}$  BSA , 0.4 $\mu\text{M}$  ของ primer F และ R และตัวอย่างดีเอ็นเอ 200

ng โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 35 รอบตาม thermal profile ดังนี้ denaturation  $95^{\circ}\text{C}$  30 วินาที annealing  $50^{\circ}\text{C}$  30 วินาที extension  $72^{\circ}\text{C}$  30 วินาที โดยใช้ pre-heating denaturation ที่อุณหภูมิ  $95^{\circ}\text{C}$  4 นาที และ complete extension  $72^{\circ}\text{C}$  5 นาที จากนั้นตรวจสอบ PCR product ขนาด 480 bp โดยใช้ 1% agarose gel กับ 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA) เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้อมด้วย ethidium bromide อ่านผลภายใต้แสง UV (BioLabs, USA)

#### 4. การแยก subtype ด้วยวิธี RFLP

ศึกษาความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอของ SSU rDNA ระหว่าง *Blastocystis* subtype 1-3 โดยการตัด PCR product ขั้นที่ 1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *AseI* เพื่อแยก subtype 3 ออกจาก subtype 1 และ 2 แล้วใช้เอนไซม์ *BsrGI* แยก subtype 1 และ 2 ออกจากกัน ขั้นที่ 2 ชิ้นส่วนของ PCR product ที่ถูกตัดด้วย restriction enzyme ถูกนำมาแยกขนาดด้วย 10% acrylamide gel เปรียบเทียบกับ low molecular weight marker (New England BioLabs, Canada) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ย้อมด้วย ethidium bromide อ่านผลภายใต้แสง UV (BioLabs, USA)

#### 5. DNA sequencing และ Phylogenetic analysis

การยืนยันผลการแยก subtype ด้วยวิธี RFLP ทำโดยนำ PCR product ที่ได้มา purify ด้วย ExoSAP-IT clean-up (Affymetrix, UK) แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับ DNA sequencing (First base, Malaysia) จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย Phylogenetic analysis (BioEdit software)

## ผลการวิจัย

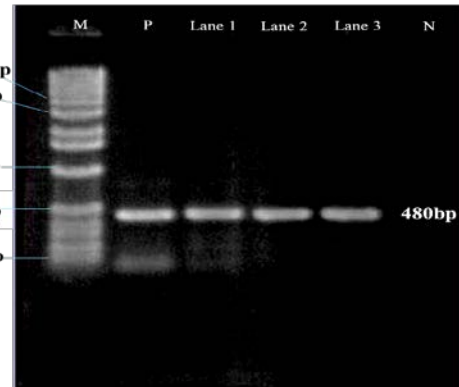
### การเปรียบเทียบความไวในการตรวจวินิจฉัย

จากตัวอย่างอุจจาระจากเด็กทั้งหมด 330 ตัวอย่าง เป็นนักเรียนชาย 179 ราย (54.24%) นักเรียนหญิงจำนวน 151 ราย (45.76%) อายุระหว่าง 12-22 ปี เมื่อตรวจอุจจาระด้วยวิธี simple smear พบ *Blastocystis* sp. จำนวน 9 ราย (2.73%) เป็นนักเรียนชาย 4 ราย (1.21%) นักเรียนหญิง 5 ราย (1.52%) เมื่อตรวจด้วยวิธี formalin ethyl-acetate concentration พบ *Blastocystis* sp. จำนวน 19 ราย (5.76%) เป็นนักเรียนชาย 12 ราย (3.64%) นักเรียนหญิง 7 ราย (2.12%) และเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR ตรวจพบ *Blastocystis* sp. 68 ราย (20.61%) เป็นนักเรียนชาย 33 ราย (10.0%) นักเรียนหญิง 35 ราย (10.61%) (ตารางที่ 1) โดยรวมพบผู้ติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ทั้งสิ้นจำนวน 85 ราย (25.76%) และมีถึง 58 ราย (68.24 %) ที่ตรวจไม่พบด้วยวิธี simple smear และ วิธี formalin ethyl-acetate concentration (รูปที่ 2)

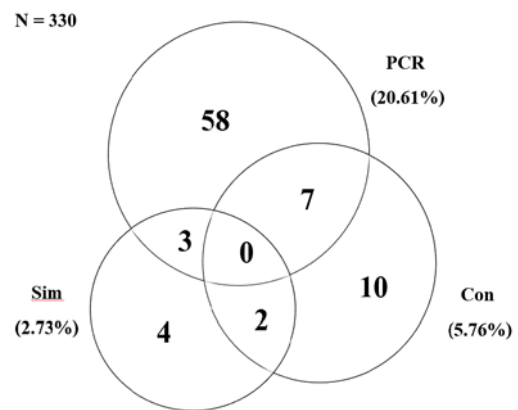
### ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบความไวในการวินิจฉัย

การติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ด้วยวิธี simple smear (sim) วิธี formalin ethyl-acetate concentration (con) และวิธี PCR

| เพศ  | จำนวน       | ผลการวินิจฉัยเชื้อ <i>Blastocystis</i> sp. |           |            | รวม        |
|------|-------------|--------------------------------------------|-----------|------------|------------|
|      |             | sim                                        | con       | PCR        |            |
| ชาย  | 179(54.24%) | 4(1.21%)                                   | 12(3.64%) | 33(10.0%)  | 43(13.03%) |
| หญิง | 151(45.76%) | 5(1.52%)                                   | 7(2.12%)  | 35(10.61%) | 42(12.73%) |
| รวม  | 330(100%)   | 9(2.73%)                                   | 19(5.76%) | 68(20.61%) | 85(25.76%) |



**รูปที่ 1** ผลการตรวจหา SSU rDNA ของ *Blastocystis* sp. ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR), Lane M : 1 kb DNA ladder; Lane 1- 3 คือเอ็นเอ จากตัวอย่างจากนักเรียน; P : Positive control; N : Negative control

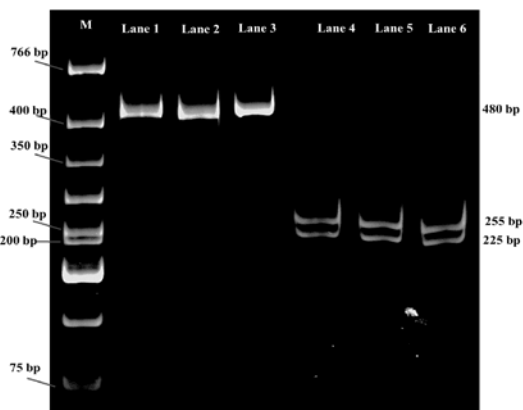


**รูปที่ 2** Venn diagram แสดงจำนวนผู้ตรวจพบเชื้อ *Blastocystis* sp. โดยวิธี simple smear (Sim) วิธี formalin ethyl-acetate concentration technique (Con) และ วิธี PCR, N คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

### การพัฒนาวิธีการแยก subtype ของ *Blastocystis* โดยวิธี PCR-RFLP

นำ PCR product (รูปที่ 1) ที่ได้มาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AseI* จะสามารถแยก subtype 3 ออกจาก subtype 1 หรือ 2 ได้ โดย subtype ที่ 1 และ 2 จะไม่ถูกตัดด้วย *AseI* แต่ subtype ที่ 3 จะถูกตัดได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 255 และ 225 bp (รูปที่ 3) และในขั้นที่ 2

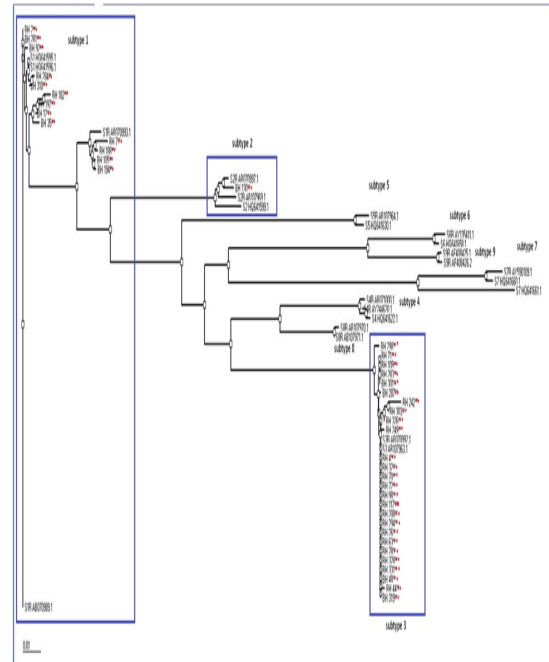
ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsrGI* ตัด จะสามารถแยก subtype 1 และ 2 ได้โดย subtype ที่ 2 จะไม่ถูกตัดด้วย *BsrGI* ส่วน subtype ที่ 1 จะถูกตัดได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 65 และ 415 bp (รูปที่ 4) หลังจากแยก subtype ด้วยวิธี PCR-RFLP แล้วขึ้นย่นผลโดยนำ DNA sequence มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Phylogenetic tree เพื่อดูความสัมพันธ์ ซึ่งพบว่าสอดคล้องกับผลที่ได้จากการแยก subtype ด้วยวิธี PCR-RFLP (รูปที่ 5)



**รูปที่ 3** ผลการตัดด้วยเอนไซม์ *AseI* เพื่อแยก subtype 1 หรือ 2 ออกจาก subtype 3; Lane M : low molecular weight marker Lane 1-3 สำหรับ subtype 1 หรือ 2 ; Lane 4-6 สำหรับ subtype 3



**รูปที่ 4** ผลการตัดด้วยเอนไซม์ *BsrGI* เพื่อแยก subtype 1 ออกจาก subtype 2; Lane M : low molecular weight marker Lane 1-3 สำหรับ subtype 1 ; Lane 4-6 สำหรับ subtype 2



**รูปที่ 5** การวิเคราะห์ด้วย Neighbor-joining tree เพื่อแยกกลุ่ม subtype ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน

#### การกระจายของ *Blastocystis* subtype 1-3 ในเด็กนักเรียนในจังหวัดอ่างทอง

จากการใช้วิธี RFLP แยก subtype ของ *Blastocystis* จากเด็กนักเรียนทั้ง 68 ราย พบว่า เป็น subtype 1 23 คน (33.83%) subtype 2 6 คน (8.82%) subtype 3 39 คน (57.35%) (ตารางที่ 2) ซึ่งการติดเชื้อ *Blastocystis* subtype ไม่มีความแตกต่างกันในเพศชายและเพศหญิง

**ตารางที่ 2** ผลการแยก subtype ของเชื้อ *Blastocystis* ด้วยวิธี PCR-RFLP

| subtype    | ชาย            | หญิง           | รวม             |
|------------|----------------|----------------|-----------------|
| 1          | 12(17.65%)     | 11(16.18%)     | 23(33.83%)      |
| 2          | 4(5.88%)       | 2(2.94%)       | 6(8.82%)        |
| 3          | 18(26.47%)     | 21(30.88%)     | 39(57.35%)      |
| <b>รวม</b> | <b>34(50%)</b> | <b>34(50%)</b> | <b>68(100%)</b> |

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการเปรียบเทียบความไวในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ในตัวอย่างอุจจาระทั้ง 330 รายพบว่าวิธี simple smear ให้ผลบวกเพียง 2.73% ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี formalin ethyl-acetate concentration สามารถเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัยได้มากกว่า 2 เท่า โดยให้ผลบวกถึง 5.76% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาต่างๆ ซึ่งพบว่า การตรวจด้วยวิธีเข้มข้นให้ความไวในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ได้มากกว่า simple smear ถึง 3 เท่า (Nuchprayoon et al., 2009) ทั้งนี้เนื่องจากวิธี simple smear เป็นการป้ายอุจจาระปริมาณน้อยลงบนสไลด์ ซึ่งหากมีจำนวนเชื้อน้อยอาจทำให้ป้ายไม่โดนเชื้อ ส่วนวิธี formalin ethyl-acetate concentration เป็นเทคนิคที่ใช้ปริมาณอุจจาระมากขึ้น เพื่อเพิ่มความไวในการวินิจฉัยเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี simple smear แต่ก็ยังมีข้อจำกัดสำหรับการวินิจฉัยเชื้อโปรโตซัว เนื่องจากเป็นวิธีที่จะต้องปั่นให้เชื้อตกตะกอนดังนั้นเชื้อโปรโตซัวบางระยะที่มีผนังเซลล์บางก็จะแตกได้ง่าย สำหรับวิธี PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง ให้ผลบวกถึง 20.61% ซึ่งให้ความไวในการวินิจฉัยสูงกว่าวิธี simple smear ถึง 10 เท่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Roberts (2011) ที่พบว่าวิธี PCR ให้ความไวในการวินิจฉัยได้ดีขึ้น 2 เท่า แต่อย่างไรก็ตามบางการศึกษาพบว่าวิธี PCR จากตัวอย่างอุจจาระมีความไวในการพบเชื้อเท่ากับวิธี Direct microscopy โดย Santos (2013) กล่าวว่า primer มีที่ใส่อาจอยู่ในช่วงที่มีความหลากหลายของแต่ละ subtype นอกจากนี้จากการศึกษานี้พบว่าผู้ติดเชื้อถึง 85% ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี simple smear และวิธี formalin ethyl-acetate concentration แสดงให้เห็นว่าวิธี simple smear และวิธี formalin ethyl-acetate concentration ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป อาจไม่เพียงพอกับการศึกษาเพื่อประเมินสถานการณ์ที่แท้จริงของการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. ได้

ถึงแม้ว่าวิธี PCR มีความไวกว่าทั้งสองวิธีที่กล่าวมาแต่ยังพบว่ายังมีบางตัวอย่างที่ตรวจพบในวิธี simple smear และวิธี formalin ethyl-acetate concentration แต่ไม่สามารถพบ *Blastocystis* sp. ในวิธี PCR ได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากรูปร่างบางระยะของเชื้อมีผลต่อการทำ PCR โดยการศึกษาของ Kuk (2012) พบว่า *Giardia* ระยะ trophozoites ให้ผล PCR ลบ แต่กลับพบว่าให้ผลบวกในตัวอย่างที่พบระยะ cyst หรืออีกสาเหตุอาจเกิดจากในอุจจาระมี inhibitor ที่เป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ (Abbaszadegan et al., 2007) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการวินิจฉัยด้วยวิธีทางปรสิตวิทยาอาจมีความไวไม่เพียงพอสำหรับการวินิจฉัยโรค

จากการศึกษานี้พบว่าในคนไทยมีการติดเชื้อ *Blastocystis* sp. สูง 25.76% ซึ่งมีรายงานพบการติดเชื้อสูงถึง 10-45% (Saksirisampant et al., 2003; Leelayoova et al., 2008; Nuchprayoon et al., 2009) โดยเมื่อศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ด้วยวิธี PCR-RFLP สามารถแยกสายพันธุ์ *Blastocystis* ได้ 3 subtype คือ subtype 1, 2 และ 3 โดยพบ subtype 3 มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jantermtor (2013) และ Surangsriat (2010) แต่ขัดแย้งกับผลการศึกษาของ Leelayoova (2008) และ Thathaisong (2013) ที่ทำการศึกษาในจังหวัดฉะเชิงเทราและภาคกลางพบ *Blastocystis* subtype 1 (77.9%) มากที่สุด ปัจจุบันมีการศึกษาพบ subtype ของ *Blastocystis* ในไทย 5 subtype คือ subtype 1, 2, 3, 6 และ 7 (Leelayoova et al., 2008; Surangsriat et al., 2010; Thathaisong et al., 2013; Jantermtor et al., 2013) ผลการศึกษานี้ไม่พบ subtype ที่ต่างไปจากรายงานอื่นๆ ซึ่ง Alfellani (2013) ได้ศึกษาและรวบรวมข้อมูล subtype ของ *Blastocystis* ทั่วโลกพบว่าคนติดเชื้อ *Blastocystis* subtype 1-4 สูงถึง 90% โดยพบ subtype 3 มากที่สุด อย่างไรก็ตามความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อ *Blastocystis* ในประเทศไทยยังมีข้อมูลที่ไม่ชัดเจนในแต่ละภาค ดังนั้น



หากมีการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้นอาจเป็นข้อมูลเพื่อนำไปศึกษาความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิกต่อไป

#### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณไปยังคณะครู-อาจารย์  
โรงเรียนมัธยมในจังหวัดอ่างทอง ที่ให้ความร่วมมือและ  
สนับสนุนในการเก็บตัวอย่างครั้งนี้ และขอขอบคุณ คุณ  
อุทัยทิพย์ บุญเกษม คุณรุ่งฟ้า บุญเสริม และ คุณสิริพร  
ศรีรุ่งเรือง ที่ช่วยเรื่องเทคนิคการตรวจวินิจฉัยใน  
ห้องปฏิบัติการ และที่สำคัญที่สุดคือ การได้รับเงิน  
สนับสนุนการวิจัยจาก ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะ  
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (RA56/002)

#### เอกสารอ้างอิง

Amin, OM. 2006. Epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. Research Journal of Parasitology. 1: 1-10.

Abbaszadegan, MR., Velayati, A., Tavasoli, A., and Dadkhah, E. 2007. Rapid DNA Extraction Protocol from Stool, Suitable for Molecular Genetic Diagnosis of Colon Cancer. Iranian Biomedical Journal. 11(3): 203-208.

Alfellani, MA., Stensvold, CR., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, ESU., Fagbenro-Beyioku, AF., and Clark, CG. 2013. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Trop. 126: 11-18.

Dogruman-Al, F., Dagci, H., Yoshikawa, H., Kurt, O., and Demirel, M. 2008. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res 103: 685-689.

Garavelli, PL., Orsi, P., and Scaglione, L. 1988. *Blastocystis hominis* infection during AIDS. Lancet. 2(8624):1364.

Gupta, R., and Parsi, K. 2006. Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis*. Australas J Dermatol 47: 117-119.

Hussein, EM., Hussein, AM., Eida, MM., and Atwa, MM. 2008. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. Parasitology Research. 102: 853-860.

Jantermtor, S., Pinlaor, P., Sawadpanich, K., Pinlaor, S., Sangka, A., Wilailuckana, C., Wongsena, W., and Yoshikawa, H. 2013. Subtype identification of *Blastocystis* spp. Isolated from patients in a major hospital in northeastern Thailand. Parasitol Res. 112(4):1781-6.

Katsarou-Katsari, A., Vassalos, CM., Tzanetou, K., Spanakos, G., Papadopoulou, C., and Vakalis, N. 2008. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. Acta Dermato-Venereologica 88: 80-81.

Kuk, S., Yazar, S., and Cetinkaya, U. 2012. Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz. 107(8): 965-968.

Leelayoova, S., Siripattanapong, S., Thathaisong, U., Naaglor, T., Taamasri, P., Piyaraj, P., and Mungthin, M. 2008. Drinking water: A possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 79: 401-406.

Narkewicz, MR., Janoff, EN., Sokol, RJ., and Levin, MJ. 1989. *Blastocystis hominis* gastroenteritis in a hemophiliac with acquired immune deficiency syndrome. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 8: 125-128.

- Noël, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, VP., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, LC., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, ML., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L., and Viscogliosi, E. 2005. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: Implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 348-355.
- Nuchprayoon, S., Sanprasert, V., Kaewzaithim, S., and Saksirisampant, W. 2009. Screening for intestinal parasitic infections among Myanmar migrant workers in Thai food industry: a high-risk transmission. *J Immigr Minor Health*. 11: 115-121.
- Parkar, U., Traub, RJ., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I., Geurden, T., Steele J, Drake, B., and Thompson, RCA. 2010. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology*. 169: 8-17.
- Saksirisampant, W., Nuchprayoon, S., Wiwanitkit, V., Yenthakam, S., and Ampavasiri, A. 2003. Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani province. *J Med Assoc Thai* 2: 263-270.
- Santin, M., Gomez-Munoz, MT., Solano-Aguilar, G., and Fayer, R. 2011. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res*. 109: 205-212.
- Santos, HJ., and Rivera, WL. 2013. Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp. in human stool samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 6(10):780-784.
- Roberts, T., Barratt, J., Harkness, J., Ellis, J., and Stark, D. 2011. Comparison of Microscopy, Culture, and Conventional Polymerase Chain Reaction for Detection of *Blastocystis* sp. in Clinical Stool Samples. *Am J Trop Med Hyg*. 84(2): 308-312.
- Stensvold, CR., Alfellani, MA., Nørskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, EL., Maddox, C., Nielsen, HV., and Clark, CG. 2009. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International Journal for Parasitology*. 39: 473-479.
- Surangsritat, S., Thamrongwittawatpong, L., Piyaniran, W., Naaglor, T., Khoprasert, C., Taamasri, P., Mungthin, M and Leelayoova, S. 2010. Assessment of the association between *Blastocystis* infection and irritable bowel syndrome. *J Med Assoc Thai*. 6: 119-124.
- Tan, KSW. 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*. 21: 639-665.
- Thathaisong, U., Siripattanapipong, S., Mungthin, M., Pipatsatitpong, D., Tan-ariya, P., Naaglor, T., and Leelayoova, S. 2013. Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the Home for Girls, Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 88(2): 352-8.
- Vogelberg, C., Stensvold, CR., Monecke, S., Ditzen, A., Stopsack, K., Heinrich-Gräfe, U., and Pöhlmann, C. 2010. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitology International*. 59(3): 469-471.



Yoshikawa, H., Nagano, I., Wu, Z., Yap, EH., Singh,  
M., and Takahashi, Y. 1998. Genomic  
polymorphism among *Blastocystis hominis* strains  
and development of subtype-specific diagnostic  
primers. Mol Cell Probes. 12: 153-159.