Evaluation of Low Concentration Normal Saline Technique for Microfilaria Detection in Migrant Workers at PakTho Hospital, Ratchaburi Province

Kanpana Taokaew[1,2] and Duangnate Pipatsatitpong[1*]

[1]*Graduate Program in Medical Technology and Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University (Rangsit Campus), Pathum Thani Province, Thailand*
[2]*Division of Medical Technology, PakTho Hospital, Ratchaburi Province, Thailand*

Abstract

Elephantiasis in Thailand is caused by filarial nematodes; *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi* which are spreading world-wide including among migrant workers in Thailand. This study aimed to evaluate the use of the newly developed low concentration normal saline technique (LNSS technique) for detection of microfilaria in migrant workers at PakTho Hospital, Ratchaburi Province. A total of 1,967 blood samples collected from migrant workers at PakTho Hospital in 2016 were screened for microfilaria by thick smear, buffy coat capillary tube and LNSS technique. The results showed that 56 (2.8%) positive microfilaria cases were detected by LNSS technique but not by the thick smear and the buffy coat capillary tube methods. Comparison between LNSS technique and microfilaria confirmatory test showed that the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy were 100%, 100%, 100%, 100% and 100%, respectively. In conclusion, LNSS technique is easy, inexpensive and efficient for the microfilaria screening test. This technique should provide a suitable alternative method that can be applied to screen microfilaria in immigrant workers.

Keywords: Microfilaria, Low concentration normal saline technique, Migrant worker

***Corresponding author E-mail address:** duangnat@tu.ac.th, duangnate_pipat@hotmail.com

Received: May 1, 2018 Revised: June 18, 2018 Accepted: July 24, 2018

การประเมินผลวิธีการใช้น้ำเกลือความเข้มข้นต่ำในการตรวจเชื้อไมโครฟิลาเรีย ในแรงงานต่างด้าว โรงพยาบาลปากท่อ จังหวัดราชบุรี

กัลปนา เตาแก้ว[1,2] และ ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์[1*]

[1]โครงการบัณฑิตศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ และ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) จ.ปทุมธานี
[2]กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลปากท่อ อ.ปากท่อ จ.ราชบุรี

บทคัดย่อ

โรคเท้าช้างเกิดจากเชื้อไมโครฟิลาเรีย ได้แก่ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* ซึ่งพบการระบาดทั่วโลก รวมทั้งในกลุ่มแรงงานต่างด้าวในประเทศไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลวิธีการใช้น้ำเกลือความเข้มข้นต่ำ (LNSS technique) ในการตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าว รพ.ปากท่อ จ.ราชบุรี ประจำปี พ.ศ. 2559 โดยการตรวจคัดกรองการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าว 1,967 ราย ด้วยวิธี thick smear, buffy coat capillary tube และ LNSS technique ผลการศึกษาพบว่าวิธี LNSS technique สามารถตรวจพบเชื้อไมโครฟิลาเรียในตัวอย่าง 56 ราย (ร้อยละ 2.8) ขณะที่วิธี thick smear และ buffy coat capillary tube ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี LNSS technique กับวิธีการตรวจยืนยันการพบเชื้อไมโครฟิลาเรีย คำนวณค่าความไวได้ร้อยละ 100 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 100 ค่าทำนายผลลบร้อยละ 100 และความถูกต้อง ร้อยละ 100 สรุปว่าวิธี LNSS technique เป็นวิธีที่เหมาะสม คือ ใช้งานง่าย ราคาถูก และมีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรีย สามารถประยุกต์ใช้เป็นวิธีการตรวจคัดกรองเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าวได้

คำสำคัญ: ไมโครฟิลาเรีย วิธีการใช้น้ำเกลือความเข้มข้นต่ำ แรงงานอพยพ

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** duangnat@tu.ac.th, duangnate_pipat@hotmail.com
รับบทความ: 1 พฤษภาคม 2561 แก้ไขบทความ: 18 มิถุนายน 2561 รับตีพิมพ์บทความ: 24 กรกฎาคม 2561

1. บทนำ

โรคเท้าช้าง (lymphatic filariasis) เป็นปัญหาด้านสาธารณสุขของประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย โดยมีประชากรที่ได้รับผลกระทบจากโรคนี้ประมาณ 120 ล้านคน ในจำนวนนี้เป็นเพศชาย 15 ล้านคนที่พบพยาธิสภาพถุงน้ำอัณฑะโต และเพศหญิงพบต่อมน้ำเหลืองโตบริเวณขา ก่อให้เกิดความพิการจากโรคนี้[1] ซึ่งร้อยละ 90 มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Wuchereria bancrofti (W. bancrofti)* และอีกร้อยละ 10 เกิดจาก *Brugia malayi (B. malayi)* และ *Brugia timori (B. timori)*[1] โดยตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียอาศัยในต่อมน้ำเหลืองของผู้ติดเชื้อ ตัวเต็มวัยเพศเมียปล่อยตัวอ่อนที่เรียกว่าไมโครฟิลาเรียออกมาในกระแสเลือด โดยมียุงเป็นพาหะนำโรค ปัจจัยสำคัญของการติดต่อ คือ จำนวนของพาหะและจำนวนของเชื้อไมโครฟิลาเรียในเลือดของผู้ป่วย[1] ยุงในจีนัส *Culex, Anopheles* และ *Aedes* เป็นพาหะของ *W. bancrofti* และยุงในจีนัส *Mansonia* เป็นพาหะของ *B. malayi* ไมโครฟิลาเรียจะออกมาในกระแสเลือดสูงสุดในช่วงเวลาเที่ยงคืน และพบน้อยมากหรือไม่พบเลยในเวลากลางวัน ไมโครฟิลาเรียที่พบในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ *W. bancrofti* และ *B. malayi* โดยพบแหล่งโรคอยู่ในพื้นที่ติดชายแดนไทย-พม่า ทางภาคเหนือ จังหวัดแม่ฮ่องสอน ภาคตะวันตก จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และภาคใต้พบมากที่จังหวัดนราธิวาส ระนอง นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ปัตตานี และชายแดนไทย-มาเลเซีย[2] โดยโรคซ่อนเร้นในกลุ่มแรงงานอพยพที่เข้ามาทำงานในประเทศไทย

เนื่องจากเชื้อไมโครฟิลาเรียที่พบในประเทศไทยทั้ง 2 ชนิดเป็นแบบ nocturnal sub-periodicity ซึ่งโดยธรรมชาติจะออกมาในกระแสเลือดจำนวนมากในเวลากลางคืน ทำให้การเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อตรวจหาเชื้อนี้ต้องทำในเวลากลางคืนเป็นหลัก หากต้องมีการตรวจเลือดในช่วงเวลากลางวัน จึงมีการนำยา diethylcarbamazine citrate (DEC) มาใช้เพื่อกระตุ้นให้เชื้อไมโครฟิลาเรียเข้าสู่กระแสเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจพบเชื้อได้ง่าย ดังนั้นแรงงานต่างด้าวจะต้องได้รับยา DEC 100 มิลลิกรัมก่อนเจาะเลือดเป็นเวลา 30-45 นาที[3] เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจพบเชื้อไมโครฟิลาเรีย

ปัจจุบันจำนวนแรงงานอพยพในประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น และผู้ป่วยส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการและหากไม่มีการตรวจคัดกรองและการรักษาที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ อาจเป็นสาเหตุทำให้อุบัติการณ์ของโรคนี้สูงขึ้น จังหวัดราชบุรี มีแรงงานต่างด้าวที่ขึ้นทะเบียนและมาตรวจคัดกรองโรคประจำปีมากกว่า 24,000 คน ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ในจังหวัดราชบุรีใช้วิธี buffy coat capillary tube ในการตรวจคัดกรองเชื้อไมโครฟิลาเรีย เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และราคาถูก แต่วิธีนี้มีความไวต่ำ จึงมีโอกาสสูงที่จะเกิดความผิดพลาดในการตรวจคัดกรองได้ ส่วนวิธีที่มีความไวสูงกว่าก็มีวิธี Knott's technique เพราะใช้เลือดปริมาตรมากกว่า แต่มีข้อด้อยคือต้องใช้ฟอร์มาลีนซึ่งไอระเหยเป็นพิษต่อระบบหายใจ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้คิดค้นวิธีใหม่ คือ low concentration normal saline (LNSS technique) เพื่อนำมาใช้ตรวจคัดกรองหาเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าว จังหวัดราชบุรี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธี LNSS technique โดยเปรียบเทียบกับวิธี thick smear และวิธี buffy coat capillary tube

2. วัสดุและวิธีการ

2.1 รูปแบบงานวิจัยและตัวอย่างที่ศึกษา: งานวิจัยนี้เป็นแบบภาพตัดขวาง (cross-sectional study

design) โดยศึกษาในแรงงานต่างด้าว ที่มาขึ้นทะเบียนตรวจคัดกรองโรคติดต่อประจำปี พ.ศ. 2559 ก่อนเจาะเลือด 30-45 นาที แรงงานต่างด้าวต้องรับประทานยา DEC 100 มิลลิกรัม และเจาะเก็บเลือดใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง (EDTA blood) งานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจคัดกรองโรคในแรงงานต่างด้าว จากห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลปากท่อ จังหวัดราชบุรี 1,967 ราย (พม่า 1,855 ราย เขมร 67 ราย ลาว 44 ราย และอินเดีย 1 ราย) งานวิจัยนี้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ของโรงพยาบาลปากท่อ และจากคณะอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 3 สาขาวิทยาศาสตร์ รหัสโครงการที่ 025/2559

2.2 การตรวจคัดกรองไมโครฟิลาเรีย: งานวิจัยนี้ใช้ 3 วิธี ในการตรวจคัดกรองไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าว ได้แก่

2.2.1 thick smear[4] ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดเลือด 60 ไมโครลิตร หยดบนสไลด์ที่สะอาดปราศจากไขมัน ใช้ไม้แท่งเล็ก ๆ เกลี่ยเลือดเป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ปล่อยสไลด์ให้แห้ง แล้วจึงนำสไลด์ไปย้อมสี Wright-Giemsa stain จากนั้นนำสไลด์มาตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรีย โดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10x 40x และ 100x

2.2.2 buffy coat capillary tube[5] ใช้ micro hematocrit tube ดูดเลือดในสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ประมาณ 3/4 ของหลอด แล้วอุดด้วยดินน้ำมันที่ปลายด้านหนึ่ง นำ micro hematocrit tube ไปปั่น ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำบริเวณ buffy coat มาดูการเคลื่อนไหวของเชื้อไมโครฟิลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 10x

2.2.3 low concentration normal saline technique (LNSS technique): ปิเปตตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็ง EDTA 1 มิลลิลิตร ใส่ใน conical tube เติมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.5% NSS ลงไปจนครบ 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วน เลือด 1 มิลลิลิตรต่อ 0.5% NSS 9 มิลลิลิตร) ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม เขย่าให้เข้ากันโดยการคว่ำ-หงายสลับไปมา และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงบางส่วนแตก จากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา ดูดส่วนใสทิ้งจนเหลือส่วนของเลือดที่ตกตะกอนประมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดขึ้น-ลง ผสมตะกอนเลือดให้เข้ากัน เทตะกอนเลือดใส่สไลด์ 3-4 แผ่น หรือจนตะกอนเลือดหมด (Fig. 1) นำสไลด์มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 10x และ 40x หากพบการเคลื่อนไหวของไมโครฟิลาเรียบนสไลด์ (Fig. 2) นำสไลด์นั้นมาตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควันและย้อมด้วยสี Wright-Giemsa stain (Fig. 3) แล้วนำสไลด์ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 10x 40x และ 100x เพื่อแยกชนิดของเชื้อไมโครฟิลาเรียต่อไป

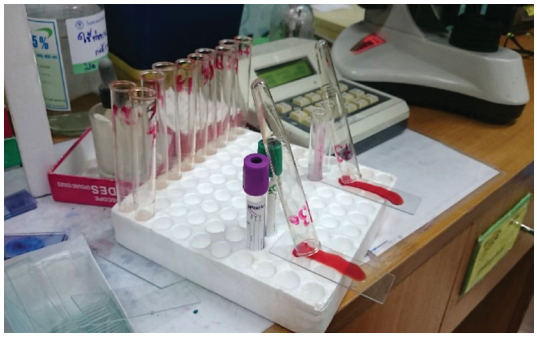

Fig. 1 LNSS technique: 1 mL sediment poured on glass slide

Fig. 2 LNSS technique: Microfilaria in sediment

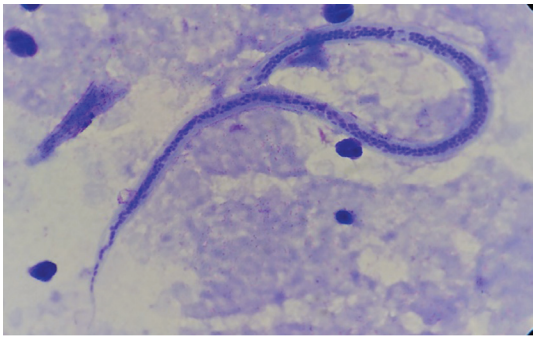

Fig. 3 LNSS technique: Microfilaria stained with Wright-Giemsa stain

2.3 การตรวจยืนยันไมโครฟิลาเรีย: ส่งตัวอย่างสไลด์ที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียไปตรวจยืนยันที่สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล:

2.4.1 Diagnostic performance: คำนวณร้อยละของค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ ค่าความถูกต้องของวิธี LNSS technique เปรียบเทียบกับวิธี thick smear, buffy coat capillary tube และการตรวจยืนยันจากสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

2.4.2 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียกับ เพศ ช่วงอายุ และเชื้อชาติของแรงงานต่างด้าวด้วยสถิติ Chi-square test หรือ Fisher's exact test

ผลการศึกษา

1. ผลตรวจคัดกรองการติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย

เมื่อวิเคราะห์หาเชื้อไมโครฟิลาเรียในเลือดทั้งหมด 1,967 ตัวอย่าง ด้วย 3 วิธี คือ thick smear, buffy coat capillary tube และ LNSS technique พบการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าวที่เข้ารับการตรวจคัดกรองโรค ณ รพ.ปากท่อ จ.ราชบุรี 56 ราย (ร้อยละ 2.8) ด้วยวิธี LNSS technique เมื่อย้อมสไลด์แล้ว สามารถระบุชนิดเชื้อไมโครฟิลาเรียที่พบเป็นชนิด *W. bancrofti* ในขณะที่วิธี thick smear และ buffy coat capillary tube ไม่พบเชื้อ (Table 1) เมื่อส่งสไลด์ที่ตรวจพบเชื้อไมโครฟิลาเรียไปยังสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรคเพื่อยืนยันผลอีกครั้ง การรายงานผลยืนยันปรากฏว่าเป็นไมโครฟิลาเรียทั้งหมด

2. การประเมินประสิทธิภาพวิธี low concentration normal saline technique

เมื่อเปรียบเทียบวิธี LNSS technique กับวิธี thick film smear, buffy coat capillary tube และผลการตรวจยืนยันพบเชื้อไมโครฟิลาเรีย คำนวณค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) และค่าความถูกต้อง (accuracy) แต่เนื่องจากวิธี thick smear และ buffy coat capillary tube ตรวจไม่พบเชื้อไมโครฟิลาเรีย จึงไม่สามารถคำนวณค่า sensitivity (NA) ได้ ส่วนค่า specificity (ร้อยละ 97.2) positive predictive value (ร้อยละ 0) negative predictive value (ร้อยละ 100) accuracy

(ร้อยละ 97.2) แสดงใน Table 2 ส่วนวิธี LNSS technique เปรียบเทียบกับการตรวจยืนยันการพบเชื้อไมโครฟิลาเรียจากสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข สามารถคำนวณ sensitivity (ร้อยละ 100) specificity (ร้อยละ 100) positive predictive value (ร้อยละ 100) negative predictive value (ร้อยละ 100) และ accuracy (ร้อยละ 100)

		Microfilaria confirmtory test	
		Found (N)	Not found (N)
LNSS	Found (N)	56	0
	Not found (N)	0	1,911

Sensitivity = TP/(TP+FN) x 100
= 56/(56+0) x 100 = 100%
Specificity = TN/(TN+FP) x 100
= 1,911/(1,911+0) x 100 =100%
PPV = TP/(TP+FP) x 100
= 56/(56+0) x 100 = 100%
NPV = TN/(TN+FN) x 100
= 1,911/(1,911+0) x 100 = 100%
Accuracy = (TP+TN)/(TP+FP+TN+FN) x 100
= (56+1,911)/1,967 x 100 = 100%

Table 1 Number of microfilaria found by three methods

Methods	Found		Not found		Total
	N	(%)	N	(%)	
Thick film smear	0	(0.0)	1,967	(100.0)	1,967
Buffy coat capillary tube	0	(0.0)	1,967	(100.0)	1,967
Low concentration normal saline (LNSS)	56	(2.8)	1,911	(97.2)	1,967

Table 2 Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy of LNSS technique compared with thick smear, buffy coat capillary tube and confirmatory results

LNSS	Diagnostic performance	Thick smear	Buffy coat capillary tube	Microfilaria found (confirmed results)
	Sensitivity (%)	NA	NA	100.0
	Specificity (%)	97.2	97.2	100.0
	Positive predictive value (%)	0.0	0.0	100.0
	Negative predictive value (%)	100	100	100.0
	Accuracy (%)	97.2	97.2	100.0

3. คุณลักษณะของแรงงานต่างด้าวที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อ

จากตัวอย่างทั้งสิ้น 1,967 ราย เป็นเพศชาย 1,170 ราย และเพศหญิง 797 ราย เมื่อแยกผลบวกตามเพศ พบว่าเพศชายติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย 30 ราย (ร้อยละ 2.6) ส่วนเพศหญิงติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย 26 ราย (ร้อยละ 3.3) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย พบว่าเพศไม่มีความสัมพันธ์ในการติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.361) เมื่อแยกผลการติดเชื้อตามช่วงอายุ พบว่าทุกช่วงอายุมีโอกาสติดเชื้อเท่า ๆ กัน ดังนั้นช่วงอายุไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย (p=0.760) และเมื่อวิเคราะห์การติดเชื้อแยกตามสัญชาติ พบว่าสัญชาติไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย (p=0.587) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (Table 3)

Table 3 Association of microfilaria infection by sex, age groups and race

Characteristics	Total		Positive		Negative		*p* value
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
Sex							
Male	1,170	(59.7)	30	(2.6)	1,140	(97.4)	0.361
Female	797	(40.3)	26	(3.3)	771	(96.7)	
Age group (years)							
≤ 20	234	(11.9)	6	(2.6)	228	(97.4)	
21-30	832	(42.3)	22	(2.6)	810	(97.4)	
31-40	593	(30.1)	17	(2.9)	576	(97.1)	0.760
41-50	256	(13.0)	8	(3.1)	248	(96.9)	
≥ 51	52	(2.7)	3	(5.8)	49	(94.2)	
Race							
Myanmar	1,855	(94.3)	52	(2.8)	1,803	(997.2)	
Laos	44	(2.2)	1	(2.3)	43	(97.7)	0.587[a]
Cambodia	67	(3.4)	3	(4.5)	64	(95.5)	
India	1	(0.1)	0	(0.0)	1	(100.0)	

Note: α=0.05 a=Fisher's exact test

วิจารณ์

1. การประเมินประสิทธิภาพวิธี low concentration normal saline technique

การตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น วิธี thick film/thin film, wet mount preparation, buffy coat capillary tube, Knott's technique/modified Knott's technique, immunochromatographic test (ICT) และวิธีการตรวจทางอณูชีววิทยา เช่น polymerase chain reaction (PCR)[4-10] เป็นต้น ปัจจุบันห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ในจังหวัดราชบุรีนิยมใช้วิธี wet mount preparation, buffy coat capillary tube และ thick smear ในการตรวจคัดกรองโรคเท้าช้าง (lymphatic filariasis) ในแรงงานต่างด้าว เนื่องจากทำง่ายและราคาถูก แต่เนื่องจากมีความไวต่ำ[4] ทำให้โอกาสในการตรวจพบเชื้อน้อยลง แต่มีโรงพยาบาลหลายแห่งที่ใช้วิธี Knott's technique หรือ modified Knott's technique วิธีนี้มีความไวมากกว่าวิธี wet mount preparation, buffy coat capillary tube และ thick smear[4, 11-13] เพราะใช้ปริมาตรเลือดมากกว่า จึงเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อได้มากกว่าวิธีอื่น ๆ ที่กล่าวข้างต้น จากงานวิจัยในปี พ.ศ. 2516 ของ Partono, F และคณะ[4] ได้ตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียในเลือด โดยวิธี thick smear, Knott's technique และ membrane filtration พบว่าวิธี Knott's technique และวิธี membrane filtration ตรวจพบเชื้อไมโครฟิลาเรียในผู้ป่วยที่แสดงอาการทางคลินิกได้มากกว่าวิธี thick smear เนื่องจากวิธี Knott's technique และวิธี membrane filtration ใช้ตัวอย่างเลือด 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาตรมากกว่าที่ใช้ในวิธี thick smear ต่อมาในปี พ.ศ. 2543 Melrose, W.D.[13] และคณะได้ปรับปรุงวิธี Knott's technique โดยใช้ 2% Triton X100 แทน 2% formalin และเมื่อปั่นเลือดจนได้ตะกอนแล้ว จึงเติมสี methylene blue เรียกวิธีนี้ว่า modified Knott's technique ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อไมโครฟิลาเรียได้ง่าย ไม่ต้องนำตัวอย่างมาย้อมสี และสามารถเก็บตัวอย่างได้นานถึงสามเดือน

ผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะพัฒนาวิธีตรวจคัดกรองเชื้อไมโครฟิลาเรีย โดยปรับปรุงจากวิธี Knott's technique เช่นกัน โดยใช้ 0.5% NSS แทน formalin โดยได้ทดลองปรับความเข้มข้นน้ำเกลือตั้งแต่ 0.5%-0.85% พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5% NSS มีเม็ดเลือดแดงแตกบางส่วน แต่ยังหลงเหลือเม็ดเลือดแดงอยู่บ้าง ง่ายต่อการดูการเคลื่อนไหวของเชื้อไมโครฟิลาเรีย ในปี พ.ศ. 2555 จึงได้ทดลองนำวิธี LNSS technique นี้มาตรวจคัดกรองเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าวควบคู่กับวิธี buffy coat capillary tube ผลการทดลองพบว่าวิธี LNSS technique สามารถตรวจพบเชื้อไมโครฟิลาเรีย ร้อยละ 0.9 ในขณะที่วิธี buffy coat capillary tube ไม่สามารถตรวจพบเชื้อเลย ต่อมาในปี พ.ศ. 2556-2558 ได้นำวิธี LNSS technique มาตรวจคัดกรองเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าว พบการติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย ร้อยละ 0.7 1.4 และ 0.5 ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ ต้องการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี LNSS technique เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน thick smear และ buffy coat capillary tube ซึ่งเป็นวิธีที่ รพ.ปากท่อใช้ตรวจคัดกรองอยู่แล้ว จากผลการสำรวจการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าว ประจำปี พ.ศ. 2559 ณ รพ.ปากท่อ จ.ราชบุรี จำนวน 1,967 ราย พบว่าวิธี LNSS technique สามารถตรวจพบการติดเชื้อ 56 ราย (ร้อยละ 2.8) วิธี LNSS technique ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ สามารถตรวจพบเชื้อไมโครฟิลาเรียได้ดีกว่า thick smear และ buffy coat capillary tube เนื่องจากใช้เลือดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในขณะที่วิธี thick smear และ buffy coat capillary tube ใช้เลือดปริมาตร 60 ไมโครลิตร ทำให้เพิ่มโอกาส

ในการตรวจพบเชื้อไมโครฟิลาเรีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marcos R และคณะ[11] ที่ตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียในสุนัขด้วยวิธี buffy coat smear และ Knott's technique พบว่าวิธี Knott's technique ให้ผลบวกมากกว่าวิธี buffy coat smear และงานวิจัยของ Pankla R และคณะ[12] ที่ตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าวสัญชาติพม่า อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก โดยใช้วิธี wet mount preparation และ modified Knott's technique จากตัวอย่าง 400 ราย พบว่าวิธี modified Knott's technique ให้ผลบวก 40 ราย แต่วิธี wet mount preparation เป็นผลลบทั้งหมด ซึ่งวิธี Knott's technique และ modified Knott's technique สามารถตรวจพบการติดเชื้อได้มากกว่า เนื่องจากใช้ปริมาตรเลือด 1 มิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มโอกาสการพบเชื้อ 1 ตัว ต่อ เลือด 1 มิลลิลิตร ด้วยเหตุผลเดียวกันนี้ วิธี LNSS technique ซึ่งปรับปรุงมาจากวิธี Knott's technique โดยใช้ 0.5% NSS แทน formalin จึงเพิ่มโอกาสการตรวจพบเชื้อไมโครฟิลาเรียได้มากกว่าวิธี thick smear และ buffy coat capillary tube ซึ่งข้อดีของวิธี LNSS technique นี้ เชื้อยังมีชีวิต มีการเคลื่อนไหว ทำให้ง่ายต่อการตรวจวิเคราะห์ และเมื่อพบเชื้อแล้วยังสามารถนำสไลด์มาย้อมสี Wright-Giemsa stain เพื่อแยกชนิดของเชื้อไมโครฟิลาเรียได้ นอกจากนี้ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ก็เป็นสารเคมีพื้นฐานที่หาได้ง่าย ไม่เป็นพิษ สามารถเตรียมสารละลายตามความเข้มข้นที่ต้องการได้ง่าย ราคาถูก ปัจจุบันแม้ประเทศไทยได้ควบคุมโรคและประกาศเป็นประเทศปลอดโรคเท้าช้างแล้ว แต่ด้วยการควบคุมโรคในแรงงานต่างด้าวเป็นเรื่องยาก เนื่องด้วยจำนวนเชื้อที่ออกมาในกระแสเลือดต่ำ อาจทำให้วิธี thick smear และ buffy coat capillary tube เกิดผลลบปลอม ผู้วิจัยจึงขอนำเสนอวิธี LNSS technique นี้ ให้เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการตรวจคัดกรองเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าว

สรุป

ปัจจุบันโรงพยาบาลส่วนใหญ่ในจังหวัดราชบุรีตรวจคัดกรองการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าวด้วยวิธี buffy coat capillary tube, wet mount preparation และ thick smear เพราะเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว แต่มีความไวต่ำ โดยเฉพาะในรายที่มีจำนวนเชื้อออกมาในกระแสเลือดน้อย อาจทำให้เกิดผลลบปลอมได้ จึงมีโรงพยาบาลหลายแห่งที่เริ่มใช้วิธี Knott's technique ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ปริมาตรเลือดมากขึ้น เพิ่มโอกาสการพบเชื้อมากขึ้น ทางผู้วิจัยได้พัฒนาวิธี LNSS technique ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ราคาถูก ตรวจดูเชื้อได้ง่าย และไม่เสี่ยงต่อการสูดดมสารเคมีที่เป็นพิษ LNSS technique นี้สามารถใช้เป็นตัวเลือกที่ดีอีกวิธีหนึ่งในการตรวจคัดกรองผู้ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในแรงงานต่างด้าว

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยทั่วไปสำหรับนักศึกษาบัณฑิตศึกษา เงินกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2559 และคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลปากท่อ นพ. ทวีศักดิ์ เกียรติสกุลเดชา และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ที่สนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Lymphatic filariasis [Internet]. 2018 [accessed May; cited 2018 Mar 14]. Available from: http://www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology/en/

2. Bhumiratana A, Intarapuk A, Koyadun S, Maneekan P, Sorosjinda-Nunthawarasilp P. Current Bancroftian Filariasis Elimination on Thailand-Myanmar Border: Public Health Challenges toward Postgenomic MDA Evaluation. ISRNTropical Medicine 2013; vol: 2013 Article ID 857935, 1-13.
3. Chumnumwat S. Why and how to take diethylcabamazepine and albendazole before collecting blood for examination of filaria and should you need to repeat the drugs/medicine if you forgot to take the blood sample [Internet]. Faculty of Pharmacy Mahidol University; 2010 [cited 2016 Jan 17]. Available from: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/dic/qa_full.php?id=2045
4. Partono F, Cross JH, Purnomo, Demijati S. Evaluation of thick smear, Knott and membrane filtration methods for demonstrating microfilariae in blood. Trop Geogr Med 1973; 25: 286-9.
5. Wang LC. Evaluation of quantitative buffy coat analysis in the detection of canine *Dirofilaria immitis* infection: a model to determine its effectiveness in the diagnosis of human filariasis. Parasitol Res 1998; 84: 246-8.
6. Bhumiratana A, Koyadun S, Suvannadabba S, *et al*. Field trial of the ICT filariasis for diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infections in an endemic population of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999; 30: 562-8.
7. Phantana S, Sensathein S, Songtrus J, Klagrathoke S, Phongnin K. ICT filariasis test: a new screening test for Bancroftian filariasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999; 30: 47-51.
8. Melrose W, Rahmah N. Use of Brugia Rapid dipstick and ICT test to map distribution of lymphatic filariasis in the Democratic Republic of Timor-Leste. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006; 37: 22-5.
9. Plichart C, Lemoine A. Monitoring and evaluation of lymphatic filariasis interventions: an improved PCR-based pool screening method for high throughput *Wuchereria bancrofti* detection using dried blood spots. Parasites & Vectors 2013; 6: 110.
10. Rahmah N, Nurulhasanah O, Norhayati S, Zulkarnain I, Norizan M. Comparison of conventional versus real-time PCR detection of *Brugia malayi* DNA from dried blood spots from school children in a low endemic area. Tropical biomedicine 2010; 27: 54-9.

11. Marcos R, Pereira C, Santos M, *et al.* Buffy coat smear or Knott's test: which to choose for canine microfilaria screening in field studies?. Vet Clin Pathol 2016; 45: 201-5.
12. Pankla R, Jeekeeree W, Khaoplab J, Laypak S, Chophel K, Panomket P. Detection of microfilaria in Myanmar immigrant workers by modified Knott's concentration technique. J Med Tech Phy Ther 2013; 25: 43-9.
13. Melrose WD, Turner PF, Pisters P, Turner B. An improved Knott's concentration test for the detection of microfilariae. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94: 176.