

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit1 (COX1) ของ *Strongyloides stercoralis* จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลวชิรพยาบาล

มุนีเราะห์ เจ๊ะมะ¹ วิษณุ เบาใจ² และ ดุจดาว ทรงธรรมวัฒน์^{3*}

¹บัณฑิตศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²หน่วยโลหิตวิทยาและจุลทรรศน์วิทยา โรงพยาบาลวชิรพยาบาล คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล

มหาวิทยาลัยนวมินทราชินา กรุงเทพมหานคร

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

พยาธิสตรองจิลอยด์ (*Strongyloides stercoralis*) เป็นพยาธิตัวกลมในลำไส้ที่มีผู้ติดเชื้อประมาณ 100 - 370 ล้านคนทั่วโลก ในคนที่มีการภูมิคุ้มกันต่ำการติดเชื้อพยาธิสตรองจิลอยด์จะมีการรุนแรง โดยพยาธิจะแพร่กระจายเข้าสู่อวัยวะทำให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ยีน mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันต่ำ แต่มีความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันสูง จึงสามารถนำยีนนี้มาใช้ระบุและจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COX1 ในการศึกษาประชากรที่แตกต่างกันของ *Strongyloides* สปีชีส์เดียวกันได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1 ของปรสิต *S. stercoralis* จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลวชิรพยาบาล คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราชินา เพื่อแบ่งกลุ่มของ *S. stercoralis* ตาม phylogenetic tree ของยีน COX1 แล้วนำมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลทางคลินิกและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วย เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นของความสัมพันธ์ระหว่างคลัสเตอร์ (clusters) กับข้อมูลผู้ป่วย คือ ภูมิลาเนาตามที่ตั้งไข้ อาการ จำนวนเม็ดเลือดขาว โดยใช้ข้อมูลของผู้ป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อ *Strongyloides* spp. จำนวน 25 ตัวอย่าง ผลการวิจัยพบว่าการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1 สามารถแบ่ง *S. stercoralis* ได้เป็น 20 คลัสเตอร์ โดยบางคลัสเตอร์มีค่า genetic pairwise distance เท่ากับ 0.000 คลัสเตอร์ 8 พบในผู้ป่วย HIV ซึ่งมีภาวะ disseminated strongyloidiasis คลัสเตอร์ 8 และ 14 พบทั้งในเพศชายและเพศหญิง โดยพบผู้ป่วยมากที่สุดในกรุงเทพมหานคร 11 ราย (ร้อยละ 44) จังหวัดราชบุรี 6 ราย (ร้อยละ 24) จังหวัดกาญจนบุรี 2 ราย (ร้อยละ 8) และจังหวัดอื่น 6 ราย (ร้อยละ 24) ตามลำดับ เป็นเพศชาย ร้อยละ 56 เพศหญิงร้อยละ 44 และมีอายุต่ำกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี ร้อยละ 52 อายุมากกว่า 60 ปี ร้อยละ 48 พบภาวะเม็ดเลือดขาวสูงร้อยละ 36 และภาวะฮีโมโกลินสูงในกระแสเลือดร้อยละ 52 โดยในกลุ่ม

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: sdjadow@hotmail.com

รับบทความ: 17 มีนาคม 2564

แก้ไขบทความ: 27 มิถุนายน 2564

รับตีพิมพ์บทความ: 28 กรกฎาคม 2564

ผู้ป่วยอายุต่ำกว่า 60 ปีมักพบร่วมกับอาการซิด ภาวะขาดน้ำและภาวะติดเชื้อเรื้อรัง ส่วนอาการในระบบทางเดินอาหารและผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำพบในกลุ่มที่อายุมากกว่า 60 ปี นอกจากนี้พบภาวะเม็ดเลือดขาวสูงและภาวะอีโอซิโนฟิลสูงในกระแสเลือด ซึ่งสอดคล้องกับผลตรวจวินิจฉัยว่ามีภาวะการติดเชื้อแบคทีเรียและการติดเชื้อปรสิต *S. stercoralis* ผลการวิจัยสรุปได้ว่า สามารถจำแนก *S. stercoralis* ได้ 20 คลัสเตอร์ การวิจัยนี้ให้ข้อมูลเบื้องต้นของความสัมพันธ์ระหว่างคลัสเตอร์ของ *S. stercoralis* กับแหล่งที่มาของเชื้อตามที่เราพบไว้ในทะเบียนประวัติผู้ป่วยและอาการทางคลินิก

คำสำคัญ: *Strongyloides stercoralis*, *COX1* gene, Phylogenetic tree, DNA sequencing

The Study of Nucleotide Sequences of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit1 (*COX1*) of *Strongyloides stercoralis* from Patients in Vajira Hospital

Muneeroh Chema¹, Wissanu Baojai², Dujdow Songthamwat^{3*}

¹Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani Province, Thailand

²Department of Hematology and Microscopy, Faculty of Medicine, Vajira Hospital Navamindradhiraj University, Bangkok, Thailand

³Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani Province, Thailand

Abstract

Strongyloides stercoralis (*S. stercoralis*) is an intestinal roundworm with an estimated 100 - 370 million people infected globally. The infection in immunocompromised patients is more severe due to septicemia caused by tissue and organ invasion by parasites. Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*COX1*) gene has a low degree difference in nucleotide sequences in the same species but high across different species. This phenomenon can be used to identify and classify living organisms. This study aimed to assess nucleotide sequences of *COX1* gene of *S. stercoralis* in patients from Vajira Hospital, Faculty of Medicine, Navamin-drathiraj University. Clustering of *S. stercoralis* by phylogenetic tree of *COX1* gene were analyzed in 25 samples of *S. stercoralis* positive stools in accordance with clinical data and laboratory results to obtain preliminary correlations of clusters, domicile, clinical symptoms and white blood cell count. The nucleotide sequences of *COX1* gene were divided into 20 clusters. The genetic pairwise distance of *S. stercoralis* in some clusters were 0.000. Cluster 8 was found in HIV patient with disseminated strongyloidiasis. Cluster 8 and 14 were found in both genders. Eleven cases (44%), 6 cases (24%), 2 cases (8%) and 6 cases (24%) were found in Bangkok, Ratchaburi, Kanchanaburi and other provinces, respectively. The patients were 56% male and 44% female. The ≤ 60 years and > 60 years age groups were 52% and 48%, respectively. Leukocytosis and eosinophilia were 36% and 52%, respectively. The patients in less than 60 years age group were frequent anemic, dehydrated and alcoholic. Gastrointestinal symptoms and

*Corresponding author E-mail address: sdujdow@hotmail.com

immunocompromised patients were found in the > 60 years age group. Leukocytosis and eosinophilia were consistent with bacterial infections and *S. stercoralis* infection. In conclusion, *S. stercoralis* isolates were divided into 20 clusters by phylogenetic tree of *COX1* gene sequences. The preliminary data of clusters of *S. stercoralis*, sources of the parasites, medical records and clinical manifestation have been reported.

Keywords: *Strongyloides stercoralis*, *COX1* gene, Phylogenetic tree, DNA sequencing

บทนำ

โรค strongyloidiasis ในคนเกิดจากปรสิต 3 ชนิด ได้แก่ *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides fuelleborni fuelleborni* และ *Strongyloides fuelleborni kelleyi* ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจาก *Strongyloides stercoralis* ในขณะที่ส่วนน้อยเกิดจาก *S. fuelleborni fuelleborni* และ *S. fuelleborni kelleyi* โดยมีรายงานการติดเชื้อ *S. fuelleborni fuelleborni* ในแอฟริกาและ *S. fuelleborni kelleyi* ในปาปัวนิวกินี⁽¹⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ *S. stercoralis* ในสุนัข แมว และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น⁽²⁾ ในขณะที่ *S. fuelleborni* สามารถติดเชื้อใน non-human primates ได้โดยเฉพาะในทวีปเอเชีย เช่น ลิงแสม⁽³⁾ มีรายงานการพบ *S. fuelleborni* ในคนที่สัมผัสกับลิงหางยาวในประเทศไทย⁽⁴⁾ พยาธิกลุ่มนี้สามารถอาศัยอยู่ในร่างกายคนได้นานเป็นปี ซึ่งเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชน⁽⁵⁾ และสามารถติดเชื้อได้ในคนทุกช่วงอายุ โดยปริมาณการติดเชื้อมากหรือน้อยขึ้นกับจำนวนครั้งและจำนวนพยาธิที่เข้าสู่ร่างกาย⁽⁶⁾ และภูมิคุ้มกันต้านในร่างกาย หากผู้ป่วยมีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำหรือภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือการพบร่วมกับภาวะขาดอาหาร เช่น เด็กที่ขาดอาหาร ผู้ใหญ่ที่ป่วยเป็นโรคเรื้อรัง เช่น มะเร็งเม็ดเลือด มะเร็งต่อมน้ำเหลือง โรค systemic lupus erythematosus และโรคเรื้อรัง

อุบัติการณ์การติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ทั่วโลกในปี พ.ศ. 2560 พบร้อยละ 8.1 หรือประมาณ 613.9 ล้านคน⁽⁷⁾ และในปี พ.ศ. 2564 Eslahi AV และคณะ รายงานความชุกของโรค strongyloidiasis ในประชากรทั่วโลกอยู่ที่ประมาณ 100 - 370 ล้านคน⁽⁸⁾ สำหรับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2561 Laoraksawong P และคณะ ได้ศึกษาความชุกของการติดเชื้อ *S. stercoralis* และ *Opisthorchis viverrini* ในชุมชน

ชนบททางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยจากตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด 602 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* คิดเป็นร้อยละ 23⁽⁹⁾ และในปี พ.ศ. 2563 Juthong S และคณะ ได้ศึกษาความชุกของการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ในผู้ป่วยโรค systemic lupus erythematosus (SLE) ในภาคใต้ของประเทศไทยพบว่าอยู่ที่ร้อยละ 15.6⁽¹⁰⁾

ข้อมูลระดับวิทยาของ *S. stercoralis* ส่วนใหญ่ได้จากการตรวจอุจจาระเพื่อตรวจหาปรสิตหลายชนิดและใช้การตรวจโดยวิธีมาตรฐาน เช่น direct simple smear, formalin-ether concentration, Kato smear ซึ่งวิธีเหล่านี้มีความไวต่ำสำหรับการตรวจหา *S. stercoralis* ทำให้ตรวจพบ *S. stercoralis* ได้น้อย โดยจากรายงานของ Jongwutiwes U และคณะ ในปี พ.ศ. 2557 มีการตรวจพบ *S. stercoralis* จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราชในช่วงปี พ.ศ. 2551 - 2553 ร้อยละ 2.47 โดยตรวจด้วยวิธี direct wet smear เป็นหลักเนื่องจากการเก็บข้อมูลจากการตรวจในงานประจำวันของโรงพยาบาล โดยมีบางตัวอย่างที่ตรวจด้วยวิธี formalin-ether concentration⁽¹¹⁾ และจากการศึกษาของ Buonfrate D และคณะ ในปี พ.ศ. 2558 ซึ่งได้ศึกษาการตรวจวินิจฉัย *S. stercoralis* ด้วยวิธีต่างๆ พบว่า การตรวจหาเชื้อ *S. stercoralis* ด้วยวิธี direct simple smear มีความไวต่ำที่สุด (ร้อยละ 21) เมื่อเทียบกับวิธี Koga agar plate culture (ร้อยละ 89)⁽¹²⁾ และจากการตรวจหาปรสิตในลำไส้โดยวิธี direct simple smear, formalin-ether concentration, Kato smear, Baermann method, coproculture และ real-time PCR ของ Meurs L และคณะ ในปี พ.ศ. 2560 สามารถตรวจพบ *S. stercoralis* ได้ร้อยละ 48 โดยได้ระบุวิธี formalin-ether concentration เหมาะสำหรับการตรวจหา hookworm, *Trichuris trichiura* และ *Ascaris lumbricoides*⁽¹³⁾ นอกจากนี้

Sedionoto B ในปี พ.ศ. 2562 ได้ตรวจหาพยาธิปากขอและ *S. stercoralis* ในเด็กนักเรียนในชนบททางภาคใต้ของประเทศไทย โดยใช้การตรวจ 2 วิธี ได้แก่ Kato Katz และ Koga agar plate culture พบความชุกของพยาธิ *S. stercoralis* ร้อยละ 2.7 และเมื่อเปรียบเทียบความไวในการตรวจพบว่าวิธี Koga agar plate culture มีความไวร้อยละ 100 ขณะที่วิธี Kato Katz มีความไวต่ำมาก (ร้อยละ 0) ซึ่งเป็นความชุกที่ต่ำกว่าความจริง เพราะวิธี Kato Katz ใช้ได้ดีสำหรับการตรวจหาพยาธิลำไส้ทั่วไป แต่มีความไวต่ำเมื่อนำมาใช้ตรวจหา *S. stercoralis*⁽¹⁴⁾

การตรวจเพื่อคัดกรองพยาธิ *S. stercoralis* ทำได้โดยการตรวจหาพยาธิตัวแก่ พยาธิตัวอ่อน ในสิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระ เสมหะ และน้ำในลำไส้เล็ก⁽¹⁵⁾ การเพาะเลี้ยงตัวอ่อน และการวินิจฉัยด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล โดยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) เช่น การตรวจหา *S. stercoralis* โดยใช้ internal transcribed sequence 2 (ITS2) เป็นยีนเป้าหมาย⁽¹⁶⁾ รวมทั้งการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้มาก เนื่องจากเป็นวิธีที่แสดงข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ เช่น การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA และ mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*COX1*)⁽¹⁷⁾

ยีน *COX1* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดมากกว่าในชนิดเดียวกันเพราะมีการแทรกเพิ่ม (insertion) และการตัดออก (deletion) ของนิวคลีโอไทด์น้อย⁽¹⁸⁾ จึงสามารถนำยีนนี้มาใช้เพื่อการระบุชนิดและจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ จากรายงานของ Wang LF และคณะ ในปี พ.ศ. 2560 ซึ่งได้ศึกษาการวินิจฉัย *S. stercoralis* ด้วยวิธีรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์โดยมียีน *COX1* และ 18 sRNA เป็นยีนเป้าหมาย⁽¹⁹⁾ ในปี พ.ศ. 2562

Tehrani MF และคณะ ได้รายงานว่ายีน *COX1* สามารถใช้แยกชนิดของ *S. stercoralis* จาก *Rhabditis* spp. ได้และสามารถแบ่ง *S. stercoralis* ออกเป็นกลุ่มย่อยได้โดยใช้ phylogenetic tree ของยีน *COX1*⁽²⁰⁾

ในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2560 Than-chomnang T ได้ศึกษา phylogenetic tree ของเชื้อ *S. stercoralis* และ *S. fuelleborni* ในคนที่สัมผัสกับดินแสมในประเทศไทย พบว่ายีน *COX1* สามารถแยกกลุ่มของเชื้อ *S. stercoralis* และ *S. fuelleborni* ได้ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequences) ที่พบใหม่ของ *S. stercoralis* คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เคยมีการรายงานของ *S. stercoralis* จากสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว⁽⁴⁾

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ของพยาธิ *S. stercoralis* จากผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลในประเทศไทย และความสัมพันธ์กับข้อมูลผู้ป่วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ของปรสิต *S. stercoralis* จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลวชิรพยาบาลที่ติดเชื้อปรสิต *S. stercoralis* และนำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree เพื่อแบ่งกลุ่มของ *S. stercoralis* และเปรียบเทียบข้อมูลทางคลินิกและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยในแต่ละกลุ่ม

วัสดุและวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

เก็บตัวอย่างอุจจาระ (ประมาณ 15 - 30 กรัม) จากผู้ป่วยที่ตรวจพบปรสิต *Strongyloides* spp. จำนวน 25 ตัวอย่าง ใส่ในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด นำมาเพาะเลี้ยงปรสิต *Strongyloides* spp. ด้วยวิธี Harada-Mori filter paper strip culture ซึ่งสามารถแยกตัวอ่อน (larvae) ของ *Strongyloides* ออกจาก

อุจจาระได้ โดยตัวอ่อนระยะแรปดิติฟอร์ม (rhabditi-form) จะเคลื่อนที่จากกระดากกรองลงสู่ด้านล่างที่อยู่ในบริเวณก้นหลอดและเมื่อตั้งทิ้งไว้ ตัวอ่อนระยะแรปดิติฟอร์มจะเปลี่ยนเป็นตัวอ่อนระยะฟิลาไรฟอร์ม (filariform) วิธีนี้สามารถลดสิ่งปนเปื้อนในอุจจาระที่อาจมีสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibitors) และลดจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับตัวปรสิต โดยการเก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาลศิริพยาบาล คณะแพทยศาสตร์ศิริพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช ได้รับการอนุมัติจริยธรรมการวิจัยในคนจาก คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (เลขที่ 057/2563) และคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช (เลขที่ COA 0562/63) โดยลงทะเบียนด้วยการกำหนดรหัสตัวเลขแทนผู้ป่วย และเก็บข้อมูลผลตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count; CBC) และข้อมูลจากเวชระเบียน ได้แก่ อายุ เพศ และข้อมูลที่เกี่ยวข้องอื่นๆ และผ่านการรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประเภทที่ 2 (รหัสโครงการ 008/2563)

2. การเพาะเชื้อ *Strongyloides* spp. จากอุจจาระด้วยวิธี Harada-Mori filter paper strip culture

ตัดกระดากกรองขนาด 13 x 120 มิลลิเมตร เขียนชื่อและหมายเลขลงบนกระดากกรองส่วนหลังด้านบน แล้วนำตัวอย่างอุจจาระป้ายลงตรงบริเวณกลางกระดาก นำกระดากกรองที่ป้ายอุจจาระแล้วใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 15 มิลลิตร ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 1 - 2 มิลลิตร ปิดฝาหลอด ทิ้งหลอดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เพาะเชื้อไว้ประมาณ 3 - 5 วัน จะได้ตัวอ่อนระยะฟิลาไรฟอร์มซึ่งเป็นระยะติดต่อสังเกตปริมาณน้ำทุกวันโดยไม่ปล่อยให้น้ำกลั่นแห้ง นำหลอดที่พบเชื้อ *Strongyloides* spp. ไปปั่นที่

ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 25 นาที ดูดน้ำกลั่นออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 0.5 มิลลิตร นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากตรวจพบปรสิตขั้นต่ำ 2 ตัวต่อ 10 พื้นที่ (fields) ได้เลนส์ออบเจกทีฟกำลังขยาย 40 เท่า (40X objective lens) ก็เก็บตะกอน โดยเติมสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตรประมาณ 1 - 2 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อสกัดดีเอ็นเอต่อไป

3. การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *S. stercoralis* ที่เพาะเลี้ยง

สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *S. stercoralis* ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ชุด E.Z.N.A Tissue DNA Kit (Omega, USA) ตามวิธีในคู่มือของชุดน้ำยา เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction: PCR)

ตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 3. ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านการตรวจยืนยันโดย Baojai W และ Songthamwat D⁽²¹⁾ แล้วว่าเป็น *S. stercoralis* โดยใช้ internal transcribed spacer (ITS) เป็นยีนเป้าหมายแต่ไม่ได้ทำเป็นส่วนหนึ่งในงานวิจัยนี้

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้ primers สำหรับยีน *COX1* ตามวิธีของ Laymanivong S และคณะ⁽²²⁾ โดยผลิตผลพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้จะมีขนาด 850 คู่เบส (bp) โดยมี forward primer คือ StrCoxAfrF 5'-GTG GTT TTG GTA ATT GAA TGG TT-3' และ reverse primer คือ StrCoxAfrR 5'-ACC AGT TAT ACC ACC TAT AGT AA-3'

การเตรียมน้ำยาสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใช้ชุดน้ำยา TopTaq master

mix kit (Qiagen, Germany) โดยใช้ TopTaq master mix (Qiagen, Germany) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร (ประกอบด้วยแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTP 200 ไมโครโมลาร์ และ TopTaq DNA polymerase 1.25 ยูนิต), DNA template 2 ไมโครลิตร, forward primer (10 พิกโตโมลต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, reverse primer (10 พิกโตโมลต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร,

CoralLoad concentrate 5 ไมโครลิตร และเติมน้ำปราศจากเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase-free water) จนได้ปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่อง T100 Thermal cycler (Biorad, England) และกรณีที่ต้องการนำผลผลิตพีซีอาร์มาตัดแถบดีเอ็นเอเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จะเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในปริมาตรทั้งหมด 100 ไมโครลิตร โดยใช้ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ (Table 1)

Table 1 PCR condition of *COX1* gene

Steps	Temperature	Time	Cycles
1. First denaturation	94 °C	5 minutes	1
2. Denaturation	94 °C	1 minute	30
3. Annealing	54 °C	3 minutes	
4. Extension	72 °C	2 minutes	
5. Final extension	72 °C	7 minutes	1

5. Agarose gel electrophoresis

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปแยกบนแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในสารละลายทริส-บอเรท-อีดีทีเอ (ทีบีอี) บัฟเฟอร์ เข้มข้นร้อยละ 0.5 พีเอช 8.3 จากนั้นย้อมด้วย เอทีเคียมโบรไมด์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วใช้ใบมีดตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการบนเจลและสกัดด้วยชุดน้ำยา QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีการสกัดของชุดน้ำยา

6. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* (DNA sequencing)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี dye terminator cycle sequencing ของบริษัท แอปพลิเคชันแอนซ์ประเทศไทย แล้วนำผลและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ของ *S. stercoralis* ใน GenBank database เข้าสู่โปรแกรม ClustalW ใน Bioedit program (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/.html>)

7. การสร้าง phylogenetic tree

สร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor-joining method (Tamura 3-parameter model) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net.bugs.php>) ที่ระดับความเชื่อมั่น 1,000 bootstraps

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาค้นคว้านี้ได้เก็บตัวอย่างข้อมูลเพศ อายุ ภูมิถิ่นอาศัย จำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ อาการและโรคอื่นที่พบในผู้ป่วย เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์และเปรียบเทียบความสัมพันธ์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics)

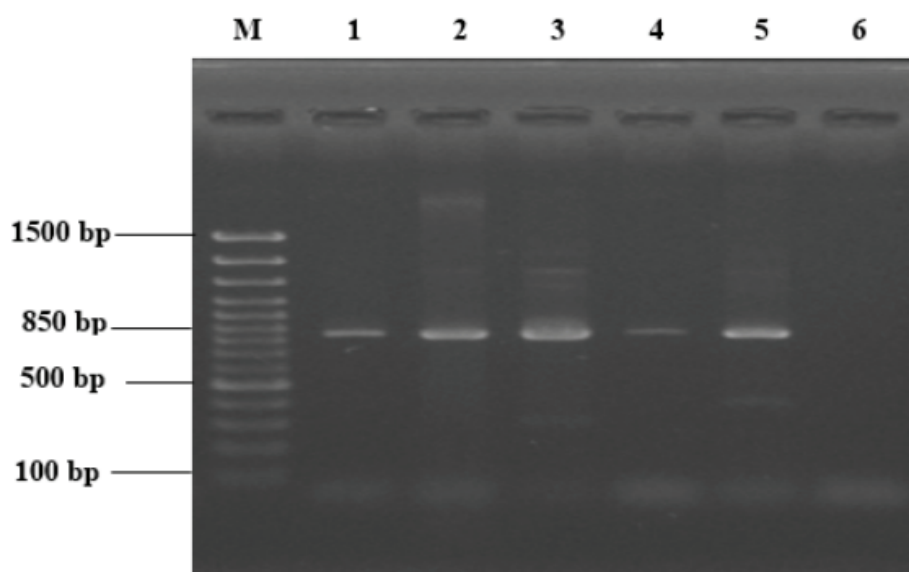


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) products based on *COX1* gene from *Strongyloides stercoralis*. Lane M is 100 bp DNA ladder. Lane 1, 2, 3, 4 are *S. stercoralis* DNA. Lane 5 and lane 6 are positive control and negative control, respectively.

ผลการวิจัย

ผลของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมี *COX1* เป็นยีนเป้าหมาย เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ ไปแยกด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าได้ผลิตผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 850 คู่เบส (bp) (Fig. 1) โดยแถบ M คือ DNA ladder ขนาด 100 คู่เบส แถบที่ 1, 2, 3

และ 4 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *S. stercoralis* แถบที่ 5 คือ แถบควบคุมบวก (positive control) และแถบทที่ 6 คือ แถบควบคุมลบ (negative control) โดยจะเห็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 850 คู่เบส ที่แถบ 1, 2, 3, 4 และแถบทที่ 5

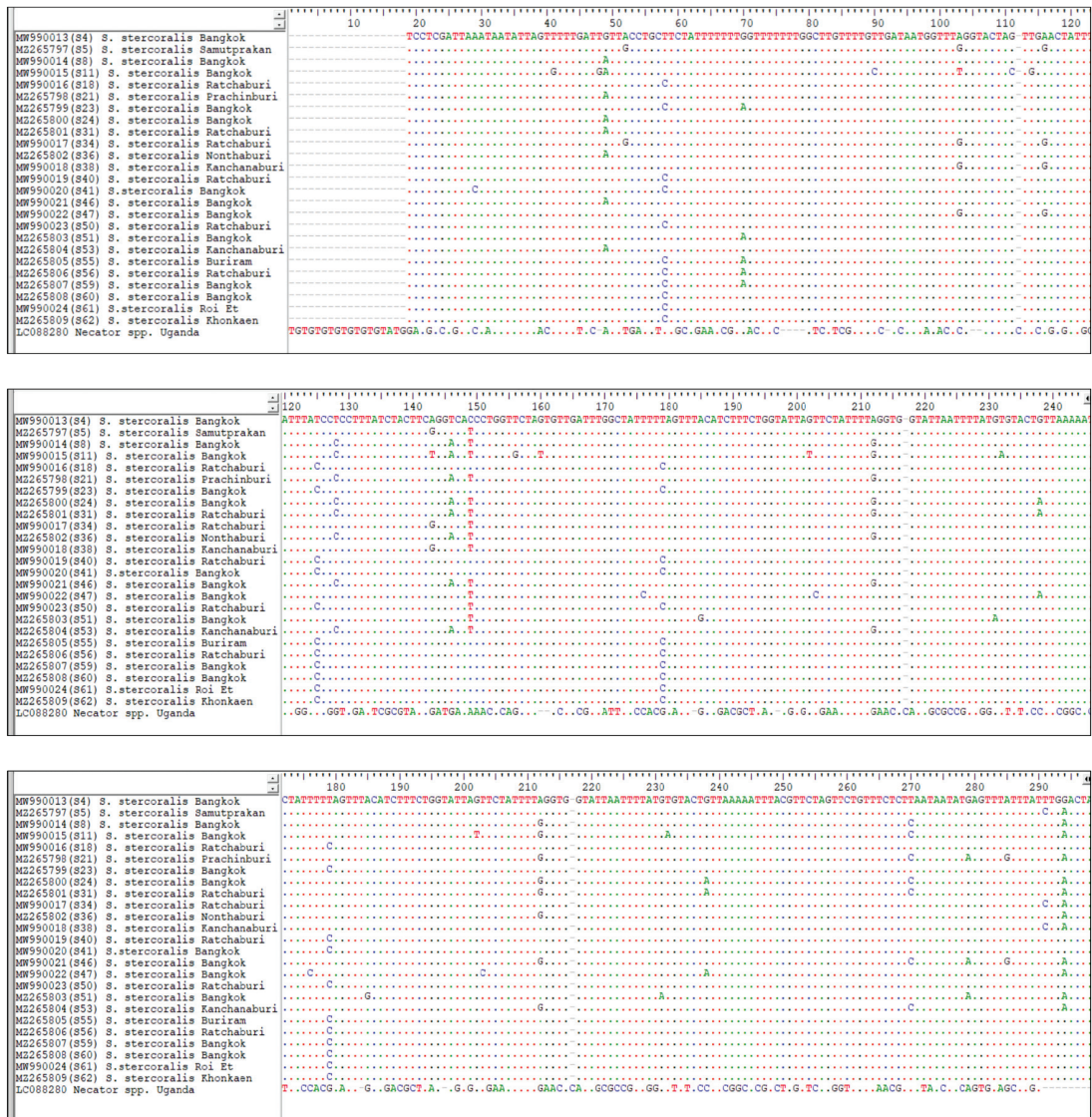


Fig. 2 Multiple sequences alignment results of *S. stercoralis* COX1 gene by Bioedit program (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html>). Conserved nucleotides sequences are shown as a dot. Genbank accession number of *S. stercoralis* isolates are MW990013(S4) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265797(S5) *S. stercoralis* (Samut Prakan), MW990014(S8) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990015 (S11) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990016 (S18) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265798 (S21) *S. stercoralis* (Prachinburi), MZ265799 (S23) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265800 (S24) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265801 (S31) *S. stercoralis* (Ratchaburi), *S. stercoralis* (Ratchaburi), MW990017 (S34) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265802 (S36) *S. stercoralis* (Nonthaburi), MW990018 (S38) *S. stercoralis* (Kanchanaburi), MW990019 (S40) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MW990020 (S41) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990021 (S46) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990022 (S47) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990023 (S50) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265803 (S51) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265804 (S53) *S. stercoralis* (Kanchanaburi), MZ265805 (S55) *S. stercoralis* (Buriram), MZ265806 (S56) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265807 (S59) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265808 (S60) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990024 (S61) *S. stercoralis* (Roi Et) and MZ265809 (S62) *S. stercoralis* (Khonkaen). *Necator* spp. is used as an outgroup (LC088280).

ผลการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1 ของ *S. stercoralis* ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง (Fig. 2) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *S. stercoralis* ของแต่ละไอโซเลทมีความ

ใกล้เคียงกันและเมื่อนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี neighbor-joining method (Tamura 3-parameter model) และใช้ *Necator* spp. (accession no. LC088280) เป็น outgroup จะได้ผลดังนี้ (Fig. 3)

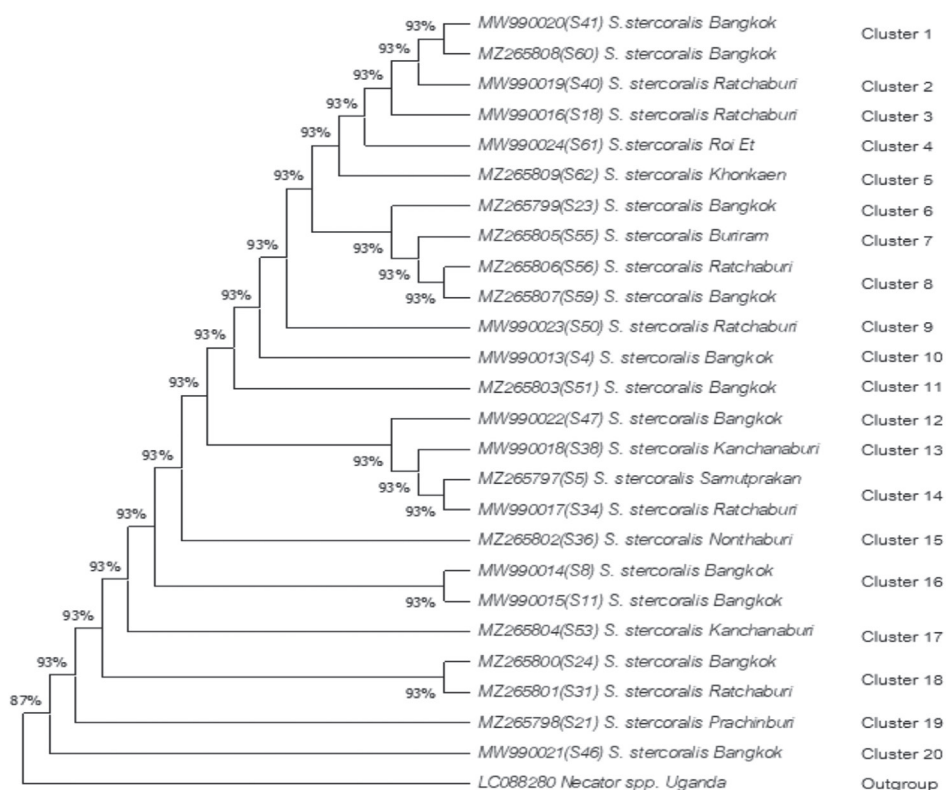


Fig. 3 Phylogenetic tree of COX1 gene sequences of *S. stercoralis* constructed by using neighbor-joining method (Tamura 3-parameter model) (MEGA software version 6.0). Genbank accession number of *S. stercoralis* isolates are MW990013 (S4) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265797 (S5) *S. stercoralis* (Samut Prakan), MW990014 (S8) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990015 (S11) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990016 (S18) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265798 (S21) *S. stercoralis* (Prachinburi), MZ265799 (S23) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265800 (S24) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265801 (S31) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MW990017 (S34) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265802 (S36) *S. stercoralis* (Nonthaburi), MW990018 (S38) *S. stercoralis* (Kanchanaburi), MW990019 (S40) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MW990020 (S41) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990021 (S46) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990022 (S47) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990023 (S50) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265803 (S51) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265804 (S53) *S. stercoralis* (Kanchanaburi), MZ265805 (S55) *S. stercoralis* (Buriram), MZ265806 (S56) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265807 (S59) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265808 (S60) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990024 (S61) *S. stercoralis* (Roi Et) and MZ265809 (S62) *S. stercoralis* (Khonkaen). *Necator* spp. is used as an outgroup (LC088280).

Table 2 Clusters, Genbank accession numbers of *Strongyloides stercoralis* COX1 sequences and domicile of *Strongyloides stercoralis* in this study.

Isolates number	Clusters	GenBank accession number	Domicile (Province)
S4	10	MW990013	Bangkok
S5	14	MZ265797	Samut Prakan
S8	16	MW990014	Bangkok
S11	16	MW990015	Bangkok
S18	3	MW990016	Ratchaburi
S21	19	MZ265798	Prachinburi
S23	6	MZ265799	Bangkok
S24	18	MZ265800	Bangkok
S31	18	MZ265801	Ratchaburi
S34	14	MW990017	Ratchaburi
S36	15	MZ265802	Nonthaburi
S38	13	MW990018	Kanchanaburi
S40	2	MW990019	Ratchaburi
S41	1	MW990020	Bangkok
S46	20	MW990021	Bangkok
S47	12	MW990022	Bangkok
S50	9	MW990023	Ratchaburi
S51	11	MZ265803	Bangkok
S53	17	MZ265804	Kanchanaburi
S55	7	MZ265805	Buriram
S56	8	MZ265806	Ratchaburi
S59	8	MZ265807	Bangkok
S60	1	MZ265808	Bangkok
S61	4	MW990024	Roi Et
S62	5	MZ265809	Khonkaen

การสร้าง phylogenetic tree เพื่อแบ่งกลุ่มของ *S. stercoralis* สามารถแบ่งได้ทั้งหมด 20 คลัสเตอร์ โดย คลัสเตอร์ 1 พบตัวอย่างหมายเลข MW990020 (S41) และ MZ265808 (S60) คลัสเตอร์ 2 พบตัวอย่างหมายเลข MW990019 (S40) คลัสเตอร์ 3 พบตัวอย่างหมายเลข MW990016 (S18) คลัสเตอร์ 4 พบตัวอย่างหมายเลข MW990024 (S61) คลัสเตอร์ 5 พบตัวอย่างหมายเลข MZ265809 (S62) คลัสเตอร์ 6 พบตัวอย่างหมายเลข MZ265799 (S23) คลัสเตอร์ 7 พบตัวอย่างหมายเลข MZ265805 (S55) คลัสเตอร์ 8 พบตัวอย่างหมายเลข MZ265806 (S56) และ MZ265807 (S59) คลัสเตอร์ 9 พบตัวอย่างหมายเลข MW990023 (S50) คลัสเตอร์ 10 พบตัวอย่างหมายเลข MW990013 (S4) คลัสเตอร์ 11 พบตัวอย่างหมายเลข MZ265803 (S51) คลัสเตอร์ 12 พบตัวอย่างหมายเลข MW990022 (S47) คลัสเตอร์ 13 พบตัวอย่างหมายเลข MW990018 (S38) คลัสเตอร์ 14 พบตัวอย่างหมายเลข MZ265797 (S5) และ MW990017 (S34) คลัสเตอร์ 15 พบตัวอย่างหมายเลข MZ265802 (S36) คลัสเตอร์ 16 พบตัวอย่างหมายเลข MW990014 (S8) และ MW990015 (S11) คลัสเตอร์ 17 พบตัวอย่างหมายเลข MZ265804 (S53) คลัสเตอร์ 18 พบตัวอย่างหมายเลข MZ265800 (S24) และ MZ265801 (S31) คลัสเตอร์ 19 พบตัวอย่างหมายเลข MZ265798 (S21) และ คลัสเตอร์ 20 พบตัวอย่างหมายเลข MW990021 (S46) (Fig. 3 และ Table 2)

การศึกษาเปรียบเทียบ phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1 ในงานวิจัยนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1 ของ *S. stercoralis* ใน GenBank จำนวน 18 sequences (accession no. KY081225.1, KY081226.1, KY081227.1, KY081228.1, KY081229.1, KY081230.1, KY081231.1, KY081232.1, KY081234.1, KY081235.1, KY081236.1, KY081237.1, KY081238.1, KY081239.1, KY081240.1, KY081241.1, KY081242.1, MT479214.1, MT479191.1, KY081233.1, LC317043.1, KT381719.1, LC085513.1, LC085509.1, AB677957.1, AB526292.1, AB526290.1 และ AB526283.1) และ *S. fuelleborni* ใน GenBank จำนวน 11 sequences (accession no. MT479214.1, MT479191.1, KY081233.1, LC317043.1, KT381719.1, LC085513.1, LC085509.1, AB677957.1, AB526292.1, AB526290.1 และ AB526283.1) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของ *S. stercoralis* ได้ทั้งหมด 41 คลัสเตอร์ (Fig. 4) โดยพบว่าตัวอย่างจากผู้ป่วยในการวิจัยนี้คือ MW990022 (S47) ตัวอย่างของผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาในกรุงเทพมหานคร กับ KY081234.1 จังหวัดอุดรธานี (คลัสเตอร์ 14) และ MW990021 (S46) ตัวอย่างของผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาในกรุงเทพมหานครกับ KY081242.1 จังหวัดอุดรธานี (คลัสเตอร์ 18) อยู่ในคลัสเตอร์เดียวกัน

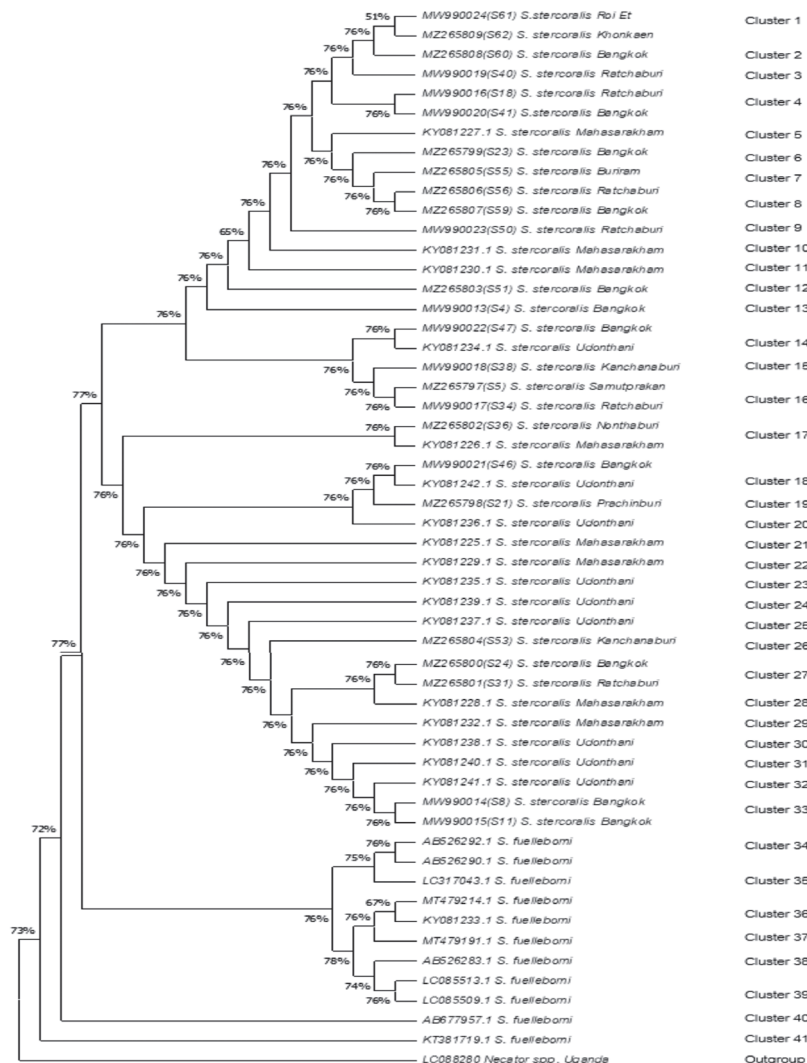


Fig. 4 Phylogenetic tree of COX1 gene sequences of *S. stercoralis* in this study (Genbank accession number of *S. stercoralis* isolates are MW990013 (S4) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265797 (S5) *S. stercoralis* (Samut Prakan), MW990014 (S8) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990015 (S11) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990016 (S18) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265798 (S21) *S. stercoralis* (Prachinburi), MZ265799 (S23) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265800 (S24) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265801 (S31) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MW990017 (S34) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265802 (S36) *S. stercoralis* (Nonthaburi), MW990018 (S38) *S. stercoralis* (Kanchanaburi), MW990019 (S40) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MW990020 (S41) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990021 (S46) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990022 (S47) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990023 (S50) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265803 (S51) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265804 (S53) *S. stercoralis* (Kanchanaburi), MZ265805 (S55) *S. stercoralis* (Buriram), MZ265806 (S56) *S. stercoralis* (Ratchaburi), MZ265807 (S59) *S. stercoralis* (Bangkok), MZ265808 (S60) *S. stercoralis* (Bangkok), MW990024 (S61) *S. stercoralis* (Roi Et) and MZ265809 (S62) *S. stercoralis* (Khonkaen), respectively and *S. stercoralis* (GenBank accession number KY081225.1, KY081226.1, KY081227.1, KY081228.1, KY081229.1, KY081230.1, KY081231.1, KY081232.1, KY081234.1, KY081235.1, KY081236.1, KY081237.1, KY081238.1, KY081239.1, KY081240.1, KY081241.1 and KY081242.1) and *S. fuelleborni* sequences (GenBank accession number MT479214.1, MT479191.1, KY081233.1, LC317043.1, KT381719.1, LC085513.1, LC085509.1, AB677957.1, AB526292.1, AB526290.1 and AB526283.1) in the GenBank database constructed by using neighbor-joining method (Tamura 3-parameter) analysis (MEGA software version 6.0). *Necator* spp. is used as an outgroup (LC088280).

จากการคำนวณ pairwise genetic distance ของยีน *COX1* ของ *S. stercoralis* ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง พบว่าบางตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกันแม้จะมาจากพื้นที่ต่างกัน เช่น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหมายเลข MZ265800 (S24) และ MZ265801 (S31) ความต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.000 หรือ หมายเลข MZ265806 (S56) และ MZ265807 (S59) ความต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.000 เช่นกัน โดยพบว่าทั้ง

MZ265800 (S24) กับ MZ265801 (S31) และ MZ265806 (S56) กับ MZ265807 (S59) จัดอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกัน สอดคล้องกับการรายงานของ Pakdee W และคณะ ที่ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Strongyloides* สปีชีส์ต่างๆ โดยใช้ ยีน 18S rDNA ระบุลำดับนิวคลีโอไทด์มีความใกล้เคียงในบางสายพันธุ์ โดยมีค่า pairwise genetic distance เท่ากับ 0.000 เช่นกัน⁽²³⁾ (Table 3)

Table 3 Pairwise genetic distance estimated from *COX1* sequences under the p-distance model.

2. MW990013 (S4) *S. stercoralis* (Bangkok) 3. MZ265797 (S5) *S. stercoralis* (Samut Prakan)
4. MW990014 (S8) *S. stercoralis* (Bangkok) 5. MW990015 (S11) *S. stercoralis* (Bangkok)
6. MW990016 (S18) *S. stercoralis* (Ratchaburi) 7. MZ265798 (S21) *S. stercoralis* (Prachinburi)
8. MZ265799 (S23) *S. stercoralis* (Bangkok) 9. MZ265800 (S24) *S. stercoralis* (Bangkok)
10. MZ265801 (S31) *S. stercoralis* (Ratchaburi) 11. MW990017 (S34) *S. stercoralis* (Ratchaburi)
12. MZ265802 (S36) *S. stercoralis* (Nonthaburi) 13. MW990018 (S38) *S. stercoralis* (Kanchanaburi)
14. MW990019 (S40) *S. stercoralis* (Ratchaburi) 15. MW990020 (S41) *S. stercoralis* (Bangkok)
16. MW990021 (S46) *S. stercoralis* (Bangkok) 17. MW990022 (S47) *S. stercoralis* (Bangkok) 18. MW990023 (S50) *S. stercoralis* (Ratchaburi) 19. MZ265803 (S51) *S. stercoralis* (Bangkok) 20. MZ265804 (S53) *S. stercoralis* (Kanchanaburi) 21. MZ265805 (S55) *S. stercoralis* (Buriram) 22. MZ265806 (S56) *S. stercoralis* (Ratchaburi) 23. MZ265807 (S59) *S. stercoralis* (Bangkok) 24. MZ265808 (S60) *S. stercoralis* (Bangkok) 25. MW990024 (S61) *S. stercoralis* Roi Et 26. MZ265809 (S62) *S. stercoralis* (Khonkaen).

1	MW990013	MZ265797	MW990014	MW990015	MW990016	MZ265798	MZ265799	MZ265800	MZ265801	MW990017	MZ265802	MW990018	MW990019	MW990020	MW990021	MW990022	MW990023	MZ265803	MZ265804	MZ265805	MZ265806	MZ265807	MZ265808	MW990024	MZ265809
2	MW990013(S4) <i>S. stercoralis</i> Bangkok	-																							
3	MZ265797(S5) <i>S. stercoralis</i> Samutprakan	0.025	-																						
4	MW990014(S8) <i>S. stercoralis</i> Bangkok	0.025	0.036	-																					
5	MW990015(S11) <i>S. stercoralis</i> Bangkok	0.065	0.068	0.040	-																				
6	MW990016(S18) <i>S. stercoralis</i> Ratchaburi	0.011	0.036	0.036	0.076	-																			
7	MZ265798(S21) <i>S. stercoralis</i> Prachinburi	0.032	0.043	0.007	0.047	0.043	-																		
8	MZ265799(S23) <i>S. stercoralis</i> Bangkok	0.014	0.040	0.040	0.079	0.004	0.047	-																	
9	MZ265800(S24) <i>S. stercoralis</i> Bangkok	0.029	0.040	0.004	0.043	0.040	0.011	0.043	-																
10	MZ265801(S31) <i>S. stercoralis</i> Ratchaburi	0.029	0.040	0.004	0.043	0.040	0.011	0.043	0.000	-															
11	MW990017(S34) <i>S. stercoralis</i> Ratchaburi	0.025	0.000	0.036	0.068	0.036	0.043	0.040	0.040	0.040	-														
12	MZ265802(S36) <i>S. stercoralis</i> Nonthaburi	0.022	0.032	0.004	0.043	0.032	0.011	0.036	0.007	0.007	0.032	-													
13	MW990018(S38) <i>S. stercoralis</i> Kanchanaburi	0.022	0.004	0.032	0.065	0.032	0.040	0.036	0.036	0.004	0.029	-													
14	MW990019(S40) <i>S. stercoralis</i> Ratchaburi	0.011	0.036	0.036	0.076	0.000	0.043	0.004	0.040	0.040	0.036	0.032	0.032	-											
15	MW990020(S41) <i>S. stercoralis</i> Bangkok	0.014	0.040	0.040	0.079	0.004	0.047	0.007	0.043	0.043	0.040	0.036	0.036	0.004	-										
16	MW990021(S46) <i>S. stercoralis</i> Bangkok	0.032	0.043	0.007	0.047	0.043	0.000	0.047	0.011	0.011	0.043	0.011	0.040	0.043	0.047	-									
17	MW990022(S47) <i>S. stercoralis</i> Bangkok	0.025	0.022	0.036	0.072	0.036	0.043	0.040	0.032	0.032	0.022	0.032	0.018	0.036	0.040	0.043	-								
18	MW990023(S50) <i>S. stercoralis</i> Ratchaburi	0.014	0.032	0.032	0.072	0.004	0.040	0.007	0.036	0.036	0.032	0.029	0.029	0.004	0.007	0.040	0.032	-							
19	MZ265803(S51) <i>S. stercoralis</i> Bangkok	0.022	0.032	0.032	0.072	0.032	0.032	0.029	0.036	0.036	0.032	0.029	0.029	0.032	0.036	0.032	0.032	0.029	-						
20	MZ265804(S53) <i>S. stercoralis</i> Kanchanaburi	0.025	0.036	0.000	0.040	0.036	0.007	0.040	0.004	0.004	0.036	0.004	0.032	0.036	0.040	0.007	0.036	0.032	0.032	-					
21	MZ265805(S55) <i>S. stercoralis</i> Buriram	0.014	0.040	0.040	0.079	0.004	0.047	0.000	0.043	0.043	0.040	0.036	0.036	0.004	0.007	0.047	0.040	0.007	0.029	0.040	-				
22	MZ265806(S56) <i>S. stercoralis</i> Ratchaburi	0.014	0.040	0.040	0.079	0.004	0.047	0.000	0.043	0.043	0.040	0.036	0.036	0.004	0.007	0.047	0.040	0.007	0.029	0.040	0.000	-			
23	MZ265807(S59) <i>S. stercoralis</i> Bangkok	0.014	0.040	0.040	0.079	0.004	0.047	0.000	0.043	0.043	0.040	0.036	0.036	0.004	0.007	0.047	0.040	0.007	0.029	0.040	0.000	0.000	-		
24	MZ265808(S60) <i>S. stercoralis</i> Bangkok	0.011	0.036	0.036	0.076	0.000	0.043	0.004	0.040	0.040	0.036	0.032	0.032	0.000	0.004	0.043	0.036	0.004	0.032	0.036	0.004	0.004	0.004	-	
25	MW990024(S61) <i>S. stercoralis</i> Roi Et	0.011	0.036	0.036	0.076	0.000	0.043	0.004	0.040	0.040	0.036	0.032	0.032	0.000	0.004	0.043	0.036	0.004	0.032	0.036	0.004	0.004	0.000	-	
26	MZ265809(S62) <i>S. stercoralis</i> Khonkaen	0.011	0.036	0.036	0.076	0.000	0.043	0.004	0.040	0.040	0.036	0.032	0.032	0.000	0.004	0.043	0.036	0.004	0.032	0.036	0.004	0.004	0.000	0.000	-

ผลการศึกษาการติดเชื้อ *S. stercoralis* ในผู้ป่วยจำแนกตามเพศ (Fig. 5) พบว่าคลัสเตอร์ที่พบทั้งในเพศชายและเพศหญิง ได้แก่ คลัสเตอร์ 8 และ 14 โดย 2 คลัสเตอร์นี้ยังพบทั้งในกลุ่มที่อายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี และมากกว่า 60 ปี (Fig. 6) โดยในเพศชายพบจำนวน 10 คลัสเตอร์ ได้แก่ คลัสเตอร์ 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 15, 17 และ 18 ขณะที่เพศหญิงพบจำนวน 8 คลัสเตอร์ ได้แก่ คลัสเตอร์ 3, 6, 10, 12, 13, 16, 19 และ 20 เมื่อเปรียบเทียบกับโรคหรืออาการของผู้ป่วยที่พบร่วมกับการติดเชื้อ *S. stercoralis* พบว่าในกลุ่มอายุที่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ

60 ปี พบมีอาการซีด (anemia) ในคลัสเตอร์ 12 และ 13 ส่วนกลุ่มอายุที่มากกว่า 60 ปีในคลัสเตอร์ 20 พบอาการกระเพาะและลำไส้อักเสบ (gastrointestinal symptoms) และมีคลัสเตอร์ที่พบในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ (immunocompromised patients) ได้แก่ คลัสเตอร์ 5, 14, 17 นอกจากนี้ยังพบกลุ่มอาการที่มีภาวะขาดน้ำ (dehydration) ภาวะติดสุราเรื้อรัง (alcoholism) และมีอาการทางระบบทางเดินหายใจ (pulmonary symptoms) ได้แก่ คลัสเตอร์ 6, 12, 16 และ 18 โดยจะพบทั้งในกลุ่มที่อายุน้อยกว่าและมากกว่า 60 ปี (Fig. 7)

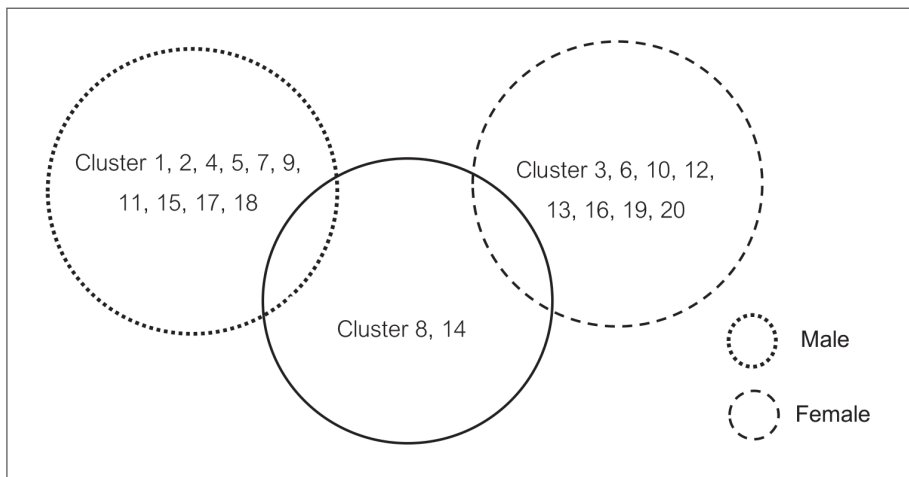


Fig. 5 *Strongyloides stercoralis* infection in patients classified by gender

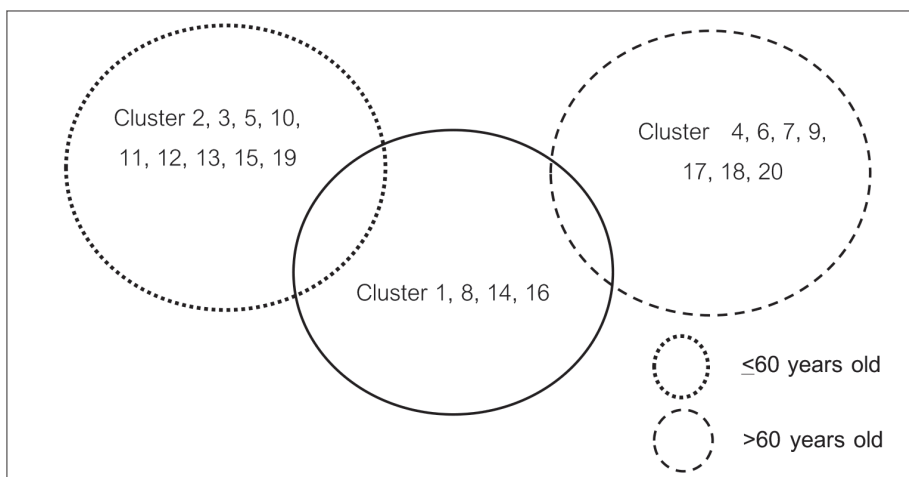


Fig. 6 *Strongyloides stercoralis* infection in patients classified by age

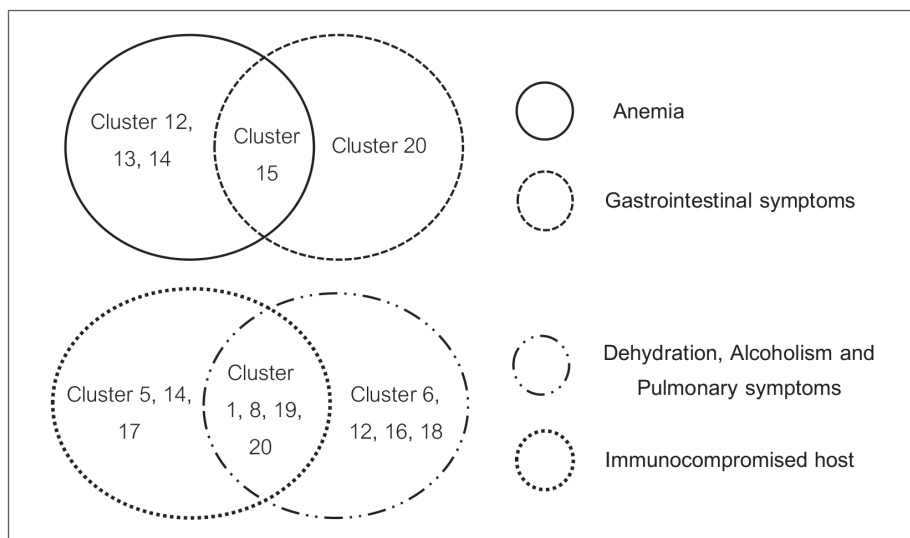


Fig. 7 Diseases or symptoms found in *Strongyloides stercoralis* infected patients

ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 25 ตัวอย่าง จำแนกได้ 20 คลัสเตอร์ พบว่าคลัสเตอร์ 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 15, 17 และ 18 พบในเพศชาย 14 คน คลัสเตอร์ 3, 6, 10, 12, 13, 16, 19 และ 20 พบในเพศหญิง 11 คน และคลัสเตอร์ 8 และ 14 พบทั้งในเพศชายและเพศหญิง (Table 4) โดยเป็นเพศชายร้อยละ 56 และเพศหญิงร้อยละ 44 ช่วงอายุที่ศึกษาแยกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มอายุที่ต่ำกว่าหรือ

เท่ากับ 60 ปี พบในคลัสเตอร์ 2, 3, 5, 10, 11, 12, 13, 15 และ 19 จำนวน 13 คน กลุ่มที่อายุมากกว่า 60 ปี พบในคลัสเตอร์ 4, 6, 7, 9, 17, 18 และ 20 จำนวน 12 คน และคลัสเตอร์ 1, 8, 14 และ 16 พบทั้งในกลุ่มอายุต่ำกว่าหรือเท่ากับ 60 ปีและมากกว่า 60 ปี โดยกลุ่มอายุที่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี คิดเป็นร้อยละ 52 และกลุ่มที่อายุมากกว่า 60 ปี คิดเป็นร้อยละ 48 (Table 5)

Table 4 Classification of *Strongyloides stercoralis* infection by gender

Patients infected with <i>S. stercoralis</i> (gender)	Total number (person)	Clusters
Male	12	1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 18
Female	9	3, 6, 10, 12, 13, 16, 19, 20
Both	4	8, 14

Table 5 Classification of *Strongyloides stercoralis* infection by age

Patients infected with <i>S. stercoralis</i> (age)	Total number (person)	Clusters
≤60 years old	9	2, 3, 5, 10, 11, 12, 13, 15, 19
>60 years old	8	4, 6, 7, 9, 17, 18, 20
Both	8	1, 8, 14, 16

Table 6 Classification of *Strongyloides stercoralis* infection by domicile (clusters)

Patients infected with <i>S. stercoralis</i> (domicile)	Clusters
Bangkok	1, 6, 8, 10, 11, 12, 16, 18, 20
Ratchaburi	2, 3, 8, 9, 14, 18
Kanchanaburi	13, 17
Samut Prakan	14
Buriram	7
Roi Et	4
Prachinburi	19
Khonkaen	5
Nonthaburi	15

Table 7 Classification of *Strongyloides stercoralis* infection by domicile (isolates number)

Patients infected with <i>S. stercoralis</i> (domicile)	Isolates number
Bangkok	4, 8, 11, 23, 24, 41, 46, 47, 51, 59, 60
Ratchaburi	18, 31, 34, 40, 50, 56
Kanchanaburi	38, 53
Samut Prakan	5
Buriram	55
Roi Et	61
Prachinburi	21
Khonkaen	62
Nonthaburi	36

ภูมิลาเนาที่พบการติดเชื้อ *S. stercoralis* มากที่สุดอยู่ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร 11 ราย ได้แก่ หมายเลข 4, 8, 11, 23, 24, 41, 46, 47, 51, 59 และ 60 ซึ่งพบในคลัสเตอร์ 1, 6, 8, 10, 11, 12, 16, 18 และ 20 รองลงมาคือจังหวัดราชบุรี 6 ราย ได้แก่ หมายเลข 18, 31, 34, 40, 50 และ 56 ซึ่งพบในคลัสเตอร์ 2, 3, 8, 9, 14 และ 18 จังหวัดกาญจนบุรี 2 ราย ได้แก่ หมายเลข 38 และ 53 ซึ่งพบในคลัสเตอร์ 13 และ 17 ส่วนจังหวัดสมุทรปราการ บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด นนทบุรี ปราจีนบุรี และขอนแก่น พบจังหวัดละ

1 ราย ได้แก่ หมายเลข 5, 55, 61, 36, 21 และ 62 ตามลำดับ โดยจังหวัดสมุทรปราการพบในคลัสเตอร์ 14 จังหวัดบุรีรัมย์พบในคลัสเตอร์ 7 จังหวัดร้อยเอ็ดพบในคลัสเตอร์ 4 จังหวัดนนทบุรีพบในคลัสเตอร์ 15 จังหวัดปราจีนบุรีพบในคลัสเตอร์ 19 และจังหวัดขอนแก่นพบในคลัสเตอร์ 5 (Table 5) โดยเมื่อคิดเป็นร้อยละพบในกรุงเทพมหานครร้อยละ 44 จังหวัดราชบุรีร้อยละ 24 จังหวัดกาญจนบุรีร้อยละ 8 ส่วนจังหวัดอื่น คือสมุทรปราการ บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด นนทบุรี ปราจีนบุรี และขอนแก่น ร้อยละ 4 เท่ากัน (Fig. 8)

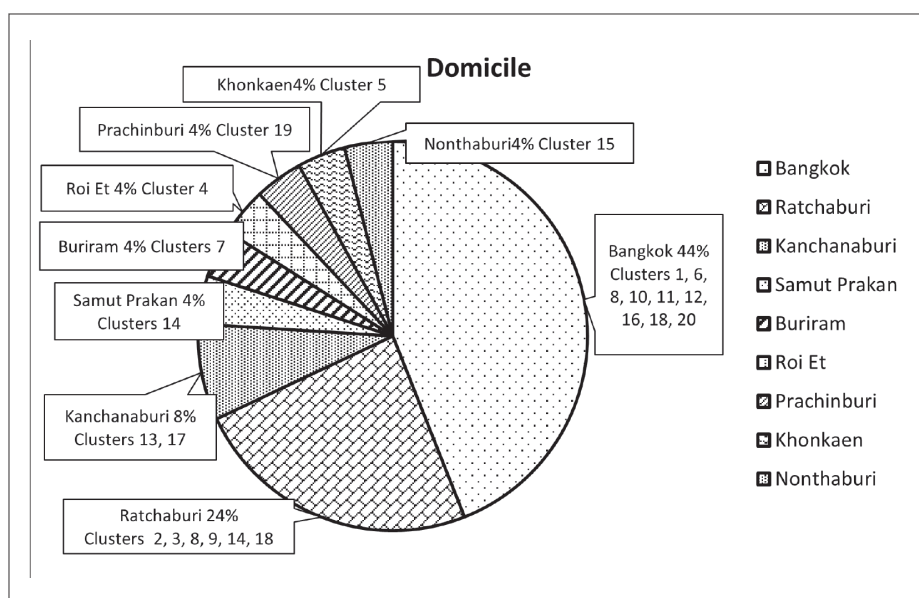


Fig. 8 Classification of *Strongyloides stercoralis* infection in patients by domicile

จำนวนเม็ดเลือดขาวที่พบในการศึกษาครั้งนี้ คิดเป็นค่าเฉลี่ย $10.28 \pm 8.25 \times 10^3$ เซลล์ต่อไมโครลิตร โดยผู้ป่วยที่มีเม็ดเลือดขาวน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร คิดเป็นร้อยละ 64 ได้แก่ คลัสเตอร์ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 14, 15, 16 และ 19 และผู้ป่วยที่มีเม็ดเลือดขาวมากกว่า

10,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร คิดเป็นร้อยละ 36 ได้แก่ คลัสเตอร์ 8, 10, 11, 12, 17, 18 และ 20 (Fig. 9) ส่วนจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด อีโอซิโนฟิลคิดเป็นค่าเฉลี่ย $1.17 \pm 0.57 \times 10^3$ เซลล์ต่อไมโครลิตร โดยผู้ป่วยที่มีค่า absolute eosinophil count น้อยกว่าหรือเท่ากับ 500 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรคิดเป็น

ร้อยละ 48 ได้แก่ คลัสเตอร์ 4, 6, 7, 9, 10, 15, 16 และ 19 และผู้ป่วยที่มีค่า absolute eosinophil count มากกว่า 500 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรคิดเป็น

ร้อยละ 52 ได้แก่ คลัสเตอร์ 1, 2, 5, 8, 11, 12, 13, 14, 17, 18 และ 20 ตามลำดับ (Fig. 10)

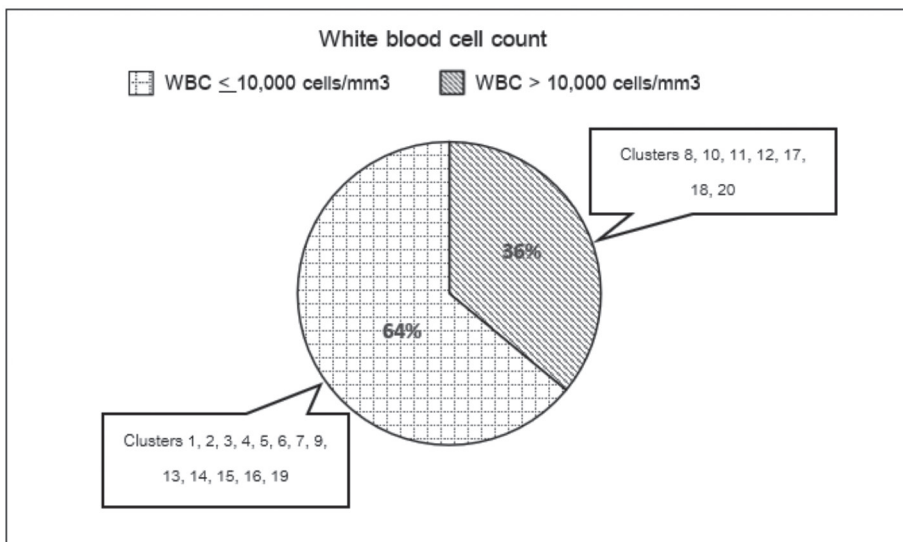


Fig. 9 Classification of *Strongyloides stercoralis* infection in patients by white blood cell count

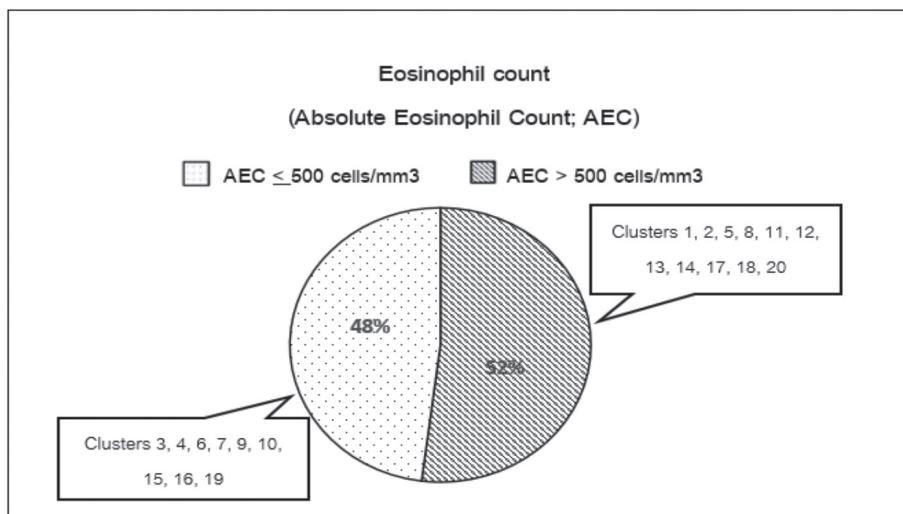


Fig. 10 Classification of *Strongyloides stercoralis* infection in patients by absolute eosinophil count

วิจารณ์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ของเชื้อ *S. stercoralis* สามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่มของเชื้อ *Strongyloides* spp. ได้ดี โดยจากงานวิจัยของ Aupalee K และคณะ ในปี พ.ศ. 2563⁽²⁴⁾ ได้จัดกลุ่มของ *S. stercoralis* ที่เก็บตัวอย่างจากภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทย โดยใช้ยีน 18S rDNA, SSU (small ribosomal subunit rDNA) และ *COX1* ผลการแบ่งกลุ่มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* สามารถแบ่ง *S. stercoralis* ได้เป็น 12 แฮพโลไทป์ (haplotypes) ส่วนงานวิจัยครั้งนี้เป็นการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ของเชื้อ *S. stercoralis* จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลวชิรพยาบาลและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแบ่งกลุ่มของ *S. stercoralis* ตาม phylogenetic tree ที่ได้กับข้อมูลทางคลินิกและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วย ซึ่งพบว่าเมื่อแบ่งกลุ่มตาม phylogenetic tree ของยีน *COX1* สามารถแบ่ง *S. stercoralis* ได้เป็น 20 คลัสเตอร์ โดยในการสกัดดีเอ็นเอของ *S. stercoralis* ได้นำ *S. stercoralis* ไปเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Harada-Mori filter paper strip culture ก่อน เพื่อลดสิ่งปนเปื้อนในอุจจาระซึ่งอาจมีสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์อยู่ และลดปริมาณแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมากับตัวปรสิต ผลการวิจัยยังพบว่าพยาธิในคลัสเตอร์เดียวกันบางคลัสเตอร์มีความใกล้เคียงกันทางด้านพันธุกรรมโดยมีค่า pairwise genetic distance เท่ากับ 0.000 และพยาธิจากต่างพื้นที่กันส่วนใหญ่จะมีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Spotin A และคณะ ในปี พ.ศ. 2562 ซึ่งได้วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic differentiation) ของเชื้อ *S. stercoralis* จากแต่ละบริเวณของโลก โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* จากงานวิจัยต่าง ๆ ที่มีการตีพิมพ์ และพบว่า *S. stercoralis* จาก

ประเทศญี่ปุ่นกับประเทศไทย *S. stercoralis* จากประเทศญี่ปุ่นกับสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวและ *S. stercoralis* จากประเทศญี่ปุ่นกับประเทศเมียนมาร์ มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมในระดับสูงซึ่งอาจมีสาเหตุจากสภาพภูมิอากาศ ความชื้น อุณหภูมิของดินในบริเวณนั้นที่ต่างกัน⁽²⁵⁾ และจากงานวิจัยของ Thanchomnang T และคณะ ในปี พ.ศ. 2560⁽⁴⁾ ที่ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* และ 18S rDNA ในเชื้อ *S. stercoralis* สามารถแบ่ง *S. stercoralis* ได้เป็น 4 คลัสเตอร์ ซึ่งอาจเกิดจากสภาพภูมิศาสตร์และลักษณะทางพันธุกรรมของโฮสต์ที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ บางคลัสเตอร์พบได้มากกว่าหนึ่งจังหวัด ได้แก่ คลัสเตอร์ 8 พบในจังหวัดราชบุรีและกรุงเทพมหานคร คลัสเตอร์ 14 พบในจังหวัดสมุทรปราการและจังหวัดราชบุรี และคลัสเตอร์ 18 พบในกรุงเทพมหานครและจังหวัดราชบุรี และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ในการศึกษาไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ที่มีรายงานในประเทศไทยที่อยู่ใน GenBank แล้วพบว่า *S. stercoralis* จากงานวิจัยนี้ที่อยู่ในคลัสเตอร์เดียวกันกับ *S. stercoralis* ที่มีรายงานในประเทศไทยที่อยู่ใน GenBank คือ MW990022 (S47) คลัสเตอร์ 14 จากกรุงเทพมหานคร ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ที่ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ของเชื้อ *S. stercoralis* KY081234.1 (จากงานวิจัยอื่น) จากจังหวัดอุดรธานี และ MW990021 (S46) คลัสเตอร์ 18 ซึ่งมาจากกรุงเทพมหานครก็พบมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ที่ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ของเชื้อ *S. stercoralis* KY081242.10 (จากงานวิจัยอื่น) จากจังหวัดอุดรธานี โดยมีร้อยละความเหมือน (%identity) เท่ากับร้อยละ 76 นอกจากนี้ตัวอย่าง MZ265800

(S24) กับ MZ265801 (S31) และ MZ265806 (S56) กับ MZ265807 (S59) ก็มีความต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (pairwise nucleotide difference) เท่ากับ 0.000 โดยอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกัน แสดงว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกันถึงแม้จะมาจากพื้นที่ต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากการอพยพย้ายถิ่นฐานของประชากร ทำให้มีการกระจายของปรสิตจากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่งได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ming DK และคณะ ในปี พ.ศ. 2562 ซึ่งได้ตรวจหาการติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ในกลุ่มผู้อพยพและผู้เดินทางกลับมาจากประเทศอื่นที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลโรคเขตร้อนของกรุงลอนดอน ประเทศอังกฤษ โดยพบผู้ติดเชื้อพยาธิ *S. stercoralis* ทั้งหมด 413 คน⁽²⁶⁾ และในปี พ.ศ. 2563 Aupalee K และคณะ⁽²⁴⁾ ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1*, *18S rDNA*, *SSU* ของ *S. stercoralis* ในภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทย ซึ่งผลการวิจัยสามารถแบ่งกลุ่ม *S. stercoralis* ตาม phylogenetic tree ของยีน *COX1* ได้เป็น 12 แสพโพลไทป์ โดยมี 5 แสพโพลไทป์ใน 12 แสพโพลไทป์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน และผลของ nuclear whole genome sequencing แสดงให้เห็นว่า *S. stercoralis* ในประเทศไทยอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *S. stercoralis* ของประเทศอื่นในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศกัมพูชาและประเทศเมียนมาร์ ซึ่งทั้งสองประเทศมีบริเวณพรมแดนติดกับประเทศไทย การอพยพย้ายถิ่นฐานของประชากรจึงอาจทำให้มีการกระจายของปรสิตระหว่างประเทศได้ อนึ่งงานวิจัยนี้มีข้อจำกัดในการเก็บข้อมูลที่อยู่ของผู้ป่วย โดยจะเป็นที่อยู่ของผู้ป่วยแจ้งไว้ในเวชระเบียนของโรงพยาบาล ซึ่งอาจไม่ตรงตามที่อยู่ในปัจจุบันของผู้ป่วยบางราย เนื่องจากการวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างอุจจาระที่ตรวจพบเชื้อ *Strongyloides* spp. ที่เหลือจากงานประจำวัน จึงไม่ได้สัมภาษณ์ผู้ป่วยโดยตรง

ปกติเมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อ *S. stercoralis* ก็จะมีการตามบริเวณที่ปรสิตเข้าไปในร่างกาย จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า คลัสเตอร์ 12, 13 และ 14 พบร่วมกับภาวะซีด ในผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 60 ปี ส่วนคลัสเตอร์ 2, 6, 7, 9 และ 10 พบร่วมกับโรคแทรกซ้อน เช่น โรคตับแข็ง โรคกระเพาะ และโรคหอบหืด คลัสเตอร์ 5, 14 และ 17 พบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ ซึ่งพบได้ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่าและมากกว่า 60 ปี และคลัสเตอร์ 8 พบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำที่ติดเชื้อ HIV ซึ่งมีความเสี่ยงทำให้เกิดความรุนแรงของโรค สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าผู้ป่วยเรื้อรัง ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยเอดส์สามารถเสียชีวิตได้เนื่องจากการติดเชื้อรุนแรง พยาธิจะแพร่กระจายเข้าอวัยวะต่างๆ ทำให้มีอัตราการเสียชีวิตสูง⁽²⁷⁾ และยังมีคลัสเตอร์ 20 ที่พบร่วมกับภาวะกระเพาะและลำไส้อักเสบ และคลัสเตอร์ 6, 12, 16 และ 18 ที่พบการติดเชื้อร่วมกับภาวะขาดน้ำ การติดเชื้อราเรื้อรัง และอาการทางระบบทางเดินหายใจ โดยคลัสเตอร์ 6 พบในผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ซึ่งเกิดจากตัวพยาธินำเชื้อแบคทีเรียในลำไส้เข้าสู่กระแสเลือด

ผลการวิจัยครั้งนี้ พบภาวะเม็ดเลือดขาวสูง (leukocytosis) ร้อยละ 36 และภาวะอีโอซิโนฟิลสูง (eosinophilia) ร้อยละ 52 ซึ่งมีค่าอีโอซิโนฟิล สอดคล้องกับรายงานลักษณะอาการทางคลินิกและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยติดเชื้อพยาธิ สตรองจีลอยด์ (strongyloidiasis) ในภาคใต้ของประเทศไทยได้หวนโดย Tsai HC และคณะ ในปี พ.ศ. 2545 ซึ่งพบว่าผลตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (CBC) ผู้ป่วยมีภาวะอีโอซิโนฟิลสูงร้อยละ 44⁽²⁸⁾ จากผลตรวจทางห้องปฏิบัติการในงานวิจัยนี้พบภาวะเม็ดเลือดขาวสูงในคลัสเตอร์ 8, 10, 11, 12, 17, 18 และ 20 และพบภาวะอีโอซิโนฟิลสูงในคลัสเตอร์ 1, 2, 5,

8, 11, 12, 13, 14, 17, 18 และ 20 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Yamanashi H และคณะ ในปี พ.ศ. 2559⁽²⁹⁾ ที่ระบุว่าภาวะอีโอซิโนฟิลสูงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การติดเชื้อ *S. stercoralis* ในผู้ป่วยได้ แม้จะไม่แสดงอาการของโรคก็ตาม และจากงานวิจัยของ Filkins LM และคณะ ในปี พ.ศ. 2560⁽³⁰⁾ ซึ่งได้ศึกษาการติดเชื้อ *S. stercoralis* ในถุงน้ำดีในผู้ป่วยชายอายุ 50 ปี พบว่ามีภาวะเม็ดเลือดขาวสูง โดยมีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงถึง 16.2×10^3 เซลล์ต่อไมโครลิตร ในงานวิจัยนี้พบว่าภาวะเม็ดเลือดขาวสูงและอีโอซิโนฟิลสูงและการติดเชื้อของ *S. stercoralis* ในร่างกายเป็นเวลานาน อาจนำไปสู่ความรุนแรงมากขึ้น เช่น ผู้ป่วยในคลัสเตอร์ 8 ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำเนื่องจากติดเชื้อ HIV มีพยาธิจำนวนมากจึงแพร่กระจายเข้าสู่อวัยวะภายในร่างกาย เช่น ปอด หัวใจ รวมทั้งสมองและไขสันหลัง ซึ่งเรียกภาวะนี้ว่า disseminated strongyloidiasis⁽²⁹⁾ ส่วนผู้ป่วยในคลัสเตอร์ 1 และ 15 พบอาการช็อค คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และปวดอวัยวะสืบ ซึ่งผู้ป่วยที่พบภาวะเหล่านี้มักมีอัตราการตายค่อนข้างสูง⁽⁵⁾ ดังนั้นคลัสเตอร์อาจมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค เช่น คลัสเตอร์ 8 ที่พบในผู้ป่วย HIV อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้จำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นและเก็บจากหลายบริเวณของประเทศไทย

สรุป

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคลัสเตอร์ของพยาธิ *S. stercoralis* ในผู้ป่วยในโรงพยาบาลที่แบ่งกลุ่มตาม phylogenetic tree ของยีน COX1 กับข้อมูลของผู้ป่วยและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการสามารถนำมาเป็นข้อมูลเบื้องต้นทางระบาดวิทยาระดับชีวโมเลกุล โดยข้อมูลที่ได้จะเป็นต้นแบบในการตรวจติดตามการระบาดของพยาธิ *S. stercoralis* ว่ามีการ

ระบาดจากแหล่งใดไปยังที่ใด เพราะปัจจุบันมีการอพยพย้ายถิ่นฐานกันมากขึ้น ทำให้ประชากรที่ย้ายถิ่นฐานอาจนำพยาธิจากพื้นที่หนึ่งไปสู่พื้นที่อื่นได้ แต่เพื่อให้ได้ข้อมูลของพยาธิ *S. stercoralis* ในประเทศไทยที่ครอบคลุม ควรมีการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากพื้นที่อื่นในประเทศไทย การวิจัยครั้งนี้ยังพบสายพันธุ์ของ *S. stercoralis* ที่มีความแตกต่างจากที่มีรายงานก่อนหน้านี้ในประเทศไทย เนื่องจากสภาพภูมิศาสตร์ ภูมิอากาศ สิ่งแวดล้อม ความสามารถในการก่อโรคของพยาธิ *S. stercoralis* ในคนรวมทั้งลักษณะทางพันธุกรรมของโฮสต์ที่ต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการงานจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลวชิรพยาบาล คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราชิตราชนา ที่ช่วยเก็บตัวอย่างส่งตรวจและคำแนะนำในการเก็บส่งตรวจสำหรับนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในการเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Nutman TB. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology* 2017; 144: 263-73.
2. Barratt JLN, Sapp SGH. Machine learning-based analyses support the existence of species complexes for *Strongyloides fuelleborni* and *Strongyloides stercoralis*. *Parasitology* 2020; 147: 1184-95.

3. Ashford RW, Barnish G. *Strongyloides fuelleborni* and similar parasites in animals and man. In: Grove DI, editor. Strongyloidiasis a major roundworm infection of man. London, Taylor and Francis; 1989. p. 271-86.
4. Thanchomnang T, Intapan PM, Sanpool O, *et al*; First molecular identification and genetic diversity of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides fuelleborni* in human communities having contact with long-tailed macaques in Thailand. *Parasitol Res* 2017; 116: 1917-23.
5. Wanpinyocheep S. Skin-penetration parasites are dangerous organisms around you. *Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal* 2015; 1: 82-93
6. Taepongsorat L, Nithikathkul C, Homchampa P, *et al*. Prevalence of parasitic infection in Sum Sung sub-district, Khon Kaen Province, Thailand. *SNRU Journal of Science and Technology* 2016; 8: 211-5.
7. Buonfrate D, Bisanzio D, Giorli G, *et al*. The global prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection. *Pathogens* 2020; 9: 468.
8. Eslahi AV, Badri M, Nahavandi KH, *et al*. Prevalence of strongyloidiasis in the general population of the world: a systematic review and meta-analysis. *Pathog Glob Health* 2021; 1: 7-20.
9. Laoraksawong P, Sanpool O, Rodpai R, *et al*. Current high prevalences of *Strongyloides stercoralis* and *Opisthorchis viverrini* infections in rural communities in northeast Thailand and associated risk factors. *BMC Public Health* 2018; 18: 940.
10. Juthong S, Geater AF, Dekumyoy P, *et al*. Prevalence and risk factors of strongyloidiasis in patients with systemic lupus erythematosus in Southern Thailand. *SAGE journal* 2020; 29: 539-46.
11. Jongwutiwes U, Waywa D, Silpasakorn S., *et al*. Prevalence and risk factors of acquiring *Strongyloides stercoralis* infection among patients attending a tertiary hospital in Thailand. *Pathog Glob Health* 2014; 108: 137-140.
12. Buonfrate D, Formenti F, Perandin F, *et al*. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21: 543-52.
13. Meurs L, Polderman AM, Vinkeles Melchers NVS, *et al*. Diagnosing poly-parasitism in a high-prevalence setting in Beira, Mozambique: detection of intestinal parasites in fecal samples by microscopy and real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 23: 1-18.
14. Sedionoto B, Wasessombat S, Punsawad C, Anamnart W, editor. Diagnosis and prevalence of hookworm and *Strongyloides stercoralis* infections among school-children in rural southern Thailand. *International Conference on 4th Industrial Revolution and Its Impacts*; 2019 Mar 27-30; Walailak University, Thailand.
15. Nurittin Ardiç. An overview of *Strongyloides stercoralis* and its infections. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43: 169-77.

16. Ghasemikhah R, Tabatabaiefar MA, Shariatzadeh SA, *et al.* A PCR-based molecular detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool samples from Tabriz City, Iran. *Sci Pharm* 2017; 85: 17.
17. Zhou S, Harbecke D, Streit A. From the feces to the genome: a guideline for the isolation and preservation of *Strongyloides stercoralis* in the field for genetic and genomic analysis of individual worms. *Parasites & vector* 2019; 496.
18. Feng X, Norose K, Li K, Hikosaka K. Utility of the cytochrome c oxidase subunit I gene for the diagnosis of toxoplasmosis using PCR. *J Microbiol Methods* 2017; 141: 82.
19. Wang LF, Xu L, Luo SQ, *et al.* Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* by morphological characteristics combine with molecular biological methods. *Parasitol Res* 2017; 116: 1159-63.
20. Tehrani MF, Sharifdini M, Zahabiun F, *et al.* Molecular characterization of human isolates of *Strongyloides stercoralis* and *Rhabditis* spp. based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1). *BMC Infect Dis* 2019; 19: 776.
21. Baojai W, Songthamwat D. Study of genetic diversity of *Strongyloides stercoralis* for confirmation of parasite origins and correlation with patient's data. *J Med Tech Assoc Thailand* 2019; 47: 7092-109.
22. Laymanivong S, Hangvanthong B, Insisiengmay B, *et al.* First molecular identification and report of genetic diversity of *Strongyloides stercoralis*, a current major soil-transmitted helminth in humans from Lao People's Democratic Republic. *Parasitol Res* 2016; 115: 2973-80.
23. Pakdee W, Thaenkham U, Dekumyoy P, *et al.* Genetic differentiation of *Strongyloides stercoralis* from two different climate zones revealed by 18S ribosomal DNA sequence comparison. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012; 43: 1333-8.
24. Aupalee K, Wijit A, Singphai K., *et al.* Genomic studies on *Strongyloides stercoralis* in northern and western Thailand. *Parasites & vector* 2020; 13: 250.
25. Spotina A, Mahami-Oskoueic M, Namid S. Assessment of the global paradigms of genetic variability in *Strongyloides stercoralis* infrapopulations determined by mitochondrial DNA sequences. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2019; 67.
26. Ming DK, Armstrong M, Lowe P., *et al.* clinical and diagnostic features of 413 patients treated for imported Strongyloidiasis at the Hospital for tropical diseases, London *Am J Trop Med Hyg* 2019; 101: 428-31.
27. Pogam AL, Lopinto J, Pecriaux A, *et al.* *Strongyloides stercoralis* disseminated infection in an HIV-infected adult. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 5: 11-4.

28. Tsai HC, Lee SS, Liu YC, *et al.* Clinical manifestations of strongyloidiasis in southern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2002; 35: 29-36.
29. Yamanashi H, Kanbara S, Murase K, *et al.* Eosinophilia, a marker of asymptomatic *Strongyloides stercoralis* infection, in a young patient with extrapulmonary tuberculosis. BMJ Case Rep 2018; 37: 201-9.
30. Filkins LM, Gaston DC, Mathison B, *et al.* Biliary *Strongyloides stercoralis* with cholecystitis and extensive portal vein thrombosis. Open Forum Infect Dis 2017; 4: 217.