

เปรียบเทียบวิธีการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการตรวจนิวโมซิสติส จีโรเวคซี
จากสิ่งส่งตรวจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นาย ทวีศักดิ์ แซ่เตีย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF DNA EXTRACTION METHOD FOR DETECTION
OF *Pneumocystis jirovecii* FROM CLINICAL SAMPLES BY
POLYMERASE CHAIN REACTION

Mr. Taweesak Saetia

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Parasitology

Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เปรียบเทียบวิธีการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการตรวจวินิจฉัย ซิสติส จิโรเว็คซี จากสิ่งส่งตรวจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลี เมอเรส
โดย	นายทวิศักดิ์ แซ่เตี๋ย
สาขาวิชา	ปรสตีวิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สมชาย จงวุฒิวเศย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประเสริฐ สิทธีเจริญชัย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ธีรยุทธ จันทร์ชุม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สมชาย จงวุฒิวเศย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประเสริฐ สิทธีเจริญชัย)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภรณ์ รุ่งเรือง)

ทวีศักดิ์ แซ่เตีย : เปรียบเทียบวิธีการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการตรวจนิวโมซิสติส จิโรเวคซี จากสิ่งส่งตรวจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส. (COMPARISON OF DNA EXTRACTION METHOD FOR DETECTION OF *Pneumocystis jirovecii* FROM CLINICAL SAMPLES BY POLYMERASE CHAIN REACTION)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรพิพย์,

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ. นพ. ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ. นพ. ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย, 84 หน้า.

ปอดอักเสบจากการติดเชื้อนิวโมซิสติส จิโรเวคซีไอ ซึ่งเป็นเชื้อราหายโอกาสในกลุ่มแอสโคมายซีติส นับเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีมาก่อน แม้ว่านิวโมซิสติส นิวโมเนียสามารถวินิจฉัยได้จากการตรวจหาระยะโทรฟิค ฟอรัม หรือระยะซิสติก ฟอรัมในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจโดยวิธีการย้อมสี แต่ประสิทธิภาพในการวินิจฉัยดังกล่าวมีความผันแปรและขึ้นอยู่กับคุณภาพ และชนิดของตัวอย่าง จำนวนเชื้อที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจ ตลอดจนประสบการณ์ของผู้ตรวจ ในขณะที่การประยุกต์ใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส หรือพีซีอาร์ ทำให้ผลการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างต่างๆ มีความไวมากขึ้น อย่างไรก็ตามความไวในการตรวจวินิจฉัยของวิธีพีซีอาร์ที่แตกต่างกันมักขึ้นอยู่กับคุณลักษณะของไพรเมอร์ และจำนวนชุดของดีเอ็นเอเป้าหมาย นอกจากนี้ประสิทธิภาพของการเตรียมดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจ นับเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อประสิทธิภาพของพีซีอาร์ ในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีเตรียมดีเอ็นเอเพื่อการวินิจฉัยด้วยวิธีพีซีอาร์ด้วยชุดเตรียมดีเอ็นเอสำเร็จรูปเปรียบเทียบกับวิธีการต้ม ผู้วิจัยได้รวบรวมตัวอย่างจากผู้ป่วย 36 รายที่มีทั้งเสมหะ และน้ำล้างปอด ซึ่งประกอบด้วยผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี และมีค่าซีดี 4 น้อยกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร และผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มีอาการไข้ เหนื่อยหอบ และไอ ร่วมกับภาพรังสีปอดผิดปกติ โดยทุกตัวอย่างได้รับการตรวจหาเชื้อโดยการย้อมสียิมซ้า โทลูอิดีนบลู และอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (ไอเอฟเอ) จากชุดตรวจสำเร็จรูปนิวโมเซลล์ ผลการตรวจดังกล่าวพบเชื้อใน 8, 20 และ 31 ตัวอย่างจากเสมหะตามลำดับ ในขณะที่พบเชื้อจากน้ำล้างปอดจำนวน 32, 33 และ 35 ตัวอย่างตามลำดับ ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของการเตรียมดีเอ็นเอทั้ง 2 วิธี โดยใช้การตรวจโดยวิธีพีซีอาร์ การเตรียมดีเอ็นเอจากเสมหะ และน้ำล้างปอดจากชุดเตรียมดีเอ็นเอสำเร็จรูปให้ผลบวกของตัวอย่างมากกว่าวิธีการต้ม (36 และ 46 เปรียบเทียบกับ 24 และ 36 ตัวอย่างตามลำดับ) นอกจากนี้อัตราส่วนของผลบวกจากวิธีพีซีอาร์เมื่อใช้ดีเอ็นเอจากเสมหะ และน้ำล้างปอดที่เตรียมโดยวิธีการต้มต่อดีเอ็นเอที่เตรียมจากชุดเตรียมดีเอ็นเอสำเร็จรูปมีค่า 0.67 และ 1.0 ตามลำดับ ดังนั้นแม้ว่าผลิตภัณฑ์เอ็นเอที่เตรียมได้จากวิธีการต้มจะมีจำนวนน้อยกว่าที่เตรียมได้จากชุดเตรียมดีเอ็นเอสำเร็จรูป แต่วิธีการเตรียมดีเอ็นเอโดยวิธีการต้มน่าจะนำมาใช้ประโยชน์ในการประยุกต์ใช้สำหรับตัวอย่างน้ำล้างปอดด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป

ภาควิชา...ปรัลิตวิทยา.....

ลายมือชื่ออนิสิต.....

สาขาวิชา...ปรัลิตวิทยาทางการแพทย์.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา...2553.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5074775330 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORDS : Immunodeficiency virus, Polymerase chain reaction, *Pneumocystis jirovecii*

TAWEESAK SAETIA : COMPARISON OF DNA EXTRACTION FOR DETECTION OF *Pneumocystis jirovecii* FROM CLINICAL SAMPLES BY POLYMERASE CHAIN

REACTION METHOD. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. CHATURONG PUTAPORNTIP, THESIS

CO-ADVISOR : PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D, THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF.

PRASERT SITTHICHAREONCHAI, M.D, 84 pp.

Pneumonia caused by *Pneumocystis jirovecii*, an opportunistic ascomycetous fungal pathogen, is a leading cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients especially those with underlying HIV infections. Although PCP can be diagnosed by demonstration of trophic or cystic stages of the organisms in respiratory samples by staining methods, the diagnostic performance of these tests is variable and highly dependent on quality and type of the sample, the number of organisms in the tested material and the experience of the microscopist. Meanwhile, application of polymerase chain reaction (PCR) assays has resulted in a more sensitive detection of *P. jirovecii* in various respiratory samples. However, the diagnostic sensitivities of different PCR methods seem to depend on characteristic of primers and copy number of target DNA. Furthermore, the effective DNA extraction procedure from clinical samples is one of the crucial steps in PCR performance. In this study, a comparative assessment of the effectiveness of DNA extraction for diagnostic PCR using a commercial kit and a boiling method was performed. We collected 36 matched sputum and bronchoalveolar lavage (BAL) samples from HIV-infected patients with low CD4+ lymphocytes and non-HIV immunocompromised patients. All samples were examined for the presence of cystic or trophic stages of *P. jirovecii* by Giemsa stain, toluidine blue stain and immunofluorescence assay (IFA). *P. jirovecii* was detected in 8 (22.2%), 20 (55.6%) and 31 (86.1%) sputum samples stained with Giemsa, toluidine blue and IFA, respectively, whereas BAL fluids offered positive result in 32 (88.9%), 36 (91.7%) and 39 (97.2%) samples. The performance of both DNA extraction methods was assessed with PCR assays. DNA extracted from sputum and BAL with commercial kit gave more positive results than rapid boiling method (36 and 36 vs 24 and 36, respectively), The ratios of positive results from PCR using DNA from sputum and BAL extracted by rapid boiling method to those derived by commercial kit were 0.67 and 1.0, respectively. Taken together, despite a potential lower DNA yield from rapid boiling method in this study has suggested that this simple DNA extraction could be a practically useful procedure for BAL sample.

Department : Parasitology.....

Field of Study : Medical Parasitology.....

Academic Year : 2010.....

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature.....

Co-Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อเสนอแนะในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ในการศึกษาวิจัยและดูแลเอาใจใส่ต่อข้าพเจ้าเป็นอย่างดี ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ เสนอแนะเทคนิคและความคิดเห็นต่างๆ ในการศึกษาวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดียิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประเสริฐ สิทธีเจริญชัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อเสนอแนะต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ครบถ้วน รวมทั้งสนับสนุนให้ข้าพเจ้าได้นำความรู้ที่ได้ศึกษามาประยุกต์ใช้ในงานของข้าพเจ้าต่อไปในอนาคต ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ธีรยุทธ จันทชุม ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภรณ์ รุ่งเรือง ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินตามพร และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้เอื้อเฟื้อตัวอย่างเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งคำแนะนำที่เป็นประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ แพทย์หญิง ฌับพลิกา กองพลพรหม หน่วยโรคทางการหายใจและภาวะวิกฤตทางการหายใจ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อตัวอย่างผู้ป่วยโรคปอดอักเสบที่ใช้ในการศึกษานี้ รวมถึงข้อมูลผู้ป่วยที่จำเป็นในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคุณอุรัสยา พัฒนวงศ์ คุณรัตนตีพร โกสุวินทร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือต่างๆ ตลอดจนความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา พี่น้อง และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ คำปรึกษาและให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฏ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
ประวัติความเป็นมาของเชื้อ <i>Pneumocystis</i>	6
อนุกรมวิธานของเชื้อ <i>Pneumocystis</i>	11
รูปร่างลักษณะของเชื้อ <i>Pneumocystis</i>	11
วงจรชีวิตของเชื้อ <i>Pneumocystis</i>	12
การกระจายทางภูมิศาสตร์ และระบาดวิทยาของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i>	14
การติดต่อของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i>	18
การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i>	19
พยาธิกำเนิดและพยาธิสภาพ.....	19
อาการและลักษณะแสดงทางคลินิก.....	22
การรักษาโรค PCP.....	25
การดื้อต่อยาที่ใช้รักษาโรค PCP.....	28
การป้องกันโรค PCP.....	29
การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ.....	29
หลักการและวิธีปฏิบัติของการทดสอบที่ใช้การเตรียม DNA จากการต้ม.....	37

บทที่	หน้า
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	38
รูปแบบการวิจัย.....	38
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	38
ระเบียบวิธีวิจัย.....	39
ขนาดของตัวอย่าง (sample size).....	39
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	39
การเก็บตัวอย่างเสมหะและน้ำล้างปอด.....	42
การย้อมสี Giemsa.....	43
การย้อมสี Toluidine blue O.....	43
การย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay (IFA).....	43
การสกัด DNA จากเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วย innuSPEED Tissue Kit DNA.....	44
การสกัด DNA จากเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วยวิธีการต้ม.....	44
การเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	45
การตรวจผลผลิต PCR โดยวิธี gel electrophoresis.....	48
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	48
4. ผลการวิจัย.....	49
ลักษณะทั่วไป และข้อมูลทางคลินิกของประชากรตัวอย่าง.....	49
ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	50
ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ด้วยวิธี PCR.....	51
เปรียบเทียบความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการ PCR.....	56
เปรียบเทียบความไวของวิธีการเตรียม DNA โดยวิธีการต้ม.....	57
เปรียบเทียบวิธีการเตรียม DNA โดยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป และวิธีการเตรียม DNA โดยวิธีการต้ม.....	58
เปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธี PCR โดยการเตรียม DNA ด้วยวิธีการต้ม กับชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป.....	59
เปรียบเทียบการตรวจพบเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> โดยวิธีการย้อมสีกับวิธี PCR.....	61

บทที่	หน้า
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	62
รายการอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก.....	79
ภาคผนวก ก.....	80
ภาคผนวก ข.....	81
ภาคผนวก ค.....	82
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	84

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i>	11
2.	สรุปแนวทางในการใช้ยารักษาโรค PCP.....	27
3.	แสดง Primer ที่ใช้ในวิธี PCR.....	34
4.	แสดงการเปรียบเทียบ sensitivity และ specificity ของแต่ละวิธี PCR โดยใช้ตัวอย่าง BAL.....	35
5.	แสดงการเปรียบเทียบ sensitivity และ specificity ของแต่ละวิธี PCR โดยใช้ตัวอย่าง Sputum.....	36
6.	แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคปอดอักเสบ.....	50
7.	เปรียบเทียบความไวการตรวจเสมหะภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	51
8.	เปรียบเทียบความไวการตรวจน้ำล้างปอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	51
9.	แสดงผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ในตำแหน่งของยีน mt LSU rRNA โดยวิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปจากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด.....	53
10.	แสดงผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ในตำแหน่งของยีน DHFR โดยวิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปจากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด.....	55
11.	แสดงผลการเปรียบเทียบการตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> จากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด จำนวน 36 ตัวอย่าง ด้วย 2 โพรเมอรัที่ใช้ในวิธี PCR.....	57
12.	แสดงผลความไวในการตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> โดยวิธี PCR จากวิธีการเตรียม DNA ด้วยวิธีการต้ม 3 ช่วงเวลา จากตัวอย่างเสมหะจำนวน 10 ตัวอย่าง รายงานผลเป็นจำนวน และคำนวณเป็นร้อยละ.....	58
13.	แสดงผลความไวในการตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> โดยวิธี PCR จากวิธีการเตรียม DNA ด้วยวิธีการต้ม 3 ช่วงเวลา จากตัวอย่างน้ำล้างปอด จำนวน 10ตัวอย่าง รายงานผลเป็นจำนวน และคำนวณเป็นร้อยละ.....	58

ตารางที่		หน้า
14	แสดงผลบวกการตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ด้วย 2 วิธี PCR จากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด	59
15	แสดงผลความไว และความจำเพาะ ของการตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ในตำแหน่งของยีน mt LSU rRNA จากตัวอย่างเสมหะ	60
16	แสดงผลความไว และความจำเพาะของการตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ในตำแหน่งของยีน mt LSU rRNA จากตัวอย่างน้ำล้างปอด.....	60
17	แสดงผลการตรวจพบเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> โดยวิธีย้อมสี, IFA และ PCR จาก 2 วิธีการเตรียม DNA ด้วยไพรเมอร์ในตำแหน่งของยีน mt LSU rRNA จากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด	61

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. Chagas รวมซิสต์ของเชื้อ <i>Pneumocystis carinii</i> ที่พบเข้าเป็นส่วนหนึ่งของวงจรรชีวิตเชื้อ <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
2. สายวิวัฒนาการของ <i>Pneumocystis</i> จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 5.8S rRNA.....	10
3. แสดงแบบจำลองลักษณะและองค์ประกอบภายในของเชื้อ <i>Pneumocystis</i>	12
4. แสดงวงจรรชีวิตของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i>	13
5. แสดงการกระจายตัวของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> โดยอ้างอิงการติดเชื้อ HIV/AIDS.....	15
6. แสดงจังหวัดที่มีอัตราการป่วยโรค AIDS โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อยในประเทศไทยปี พ.ศ.2552.....	17
7. แสดงการยึดติดของระยะ cystic form และ trophic form กับเซลล์ถุงลมปอด pneumocyt type I ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	20
8. ภาพตัดขวางของปอดแสดงพยาธิสภาพเมื่อย้อมด้วยสี Hematoxylin-Eosin.....	21
9. ภาพตัดขวางของปอดแสดงพยาธิสภาพเมื่อย้อมด้วยสี Gomori methenamine silver.....	22
10. แสดงภาพถ่ายรังสีปอดในผู้ป่วยรายหนึ่งที่มีการติดเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ร่วมกับ chronic myelomonocytic leukemia.....	24
11. แสดงตำแหน่งที่มีการผ่าเหล่าของ gene DHPS ทำให้เชื้อดื้อต่อยา sulfamethoxazole.....	28
12. แสดงเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ระยะ Cystic form เมื่อย้อมด้วยสี Gomori methenamine silver.....	30
13. แสดงเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ระยะ Cystic form เมื่อย้อมด้วยสี Toluidine blue O.....	30
14. แสดงเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ระยะ Cystic form เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa..	31
15. แสดงเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ระยะ Trophic form เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa.....	31

ภาพที่	หน้า
16. แสดงเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ระยะ Cystic form เมื่อย้อมด้วยวิธี IFA.....	32
17. แสดงเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i> ระยะ Trophic form เมื่อย้อมด้วยวิธี IFA.....	32
18. แสดงผลผลิต PCR รอบแรกของตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วยไพรเมอร์ pAZ102H และ pAZ102E ในส่วนของยีน mt LSU rRNA ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i>	52
19. แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองของตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วยไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y ในส่วนของยีน mt LSU rRNA ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i>	52
20. แสดงผลผลิต PCR รอบแรกของตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วยไพรเมอร์ PJDHFRF0, R0 ในส่วนของยีน DHFR ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i>	54
21. แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองของตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วยไพรเมอร์ PJDHFRF1, R1 ในส่วนของยีน DHFR ของเชื้อ <i>Pneumocystis jirovecii</i>	54
22. แสดงแผนที่ของ DNA มาตรฐาน.....	81

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่	หน้า
1. แสดงโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรกในผู้ป่วยโรค AIDS ตั้งแต่ กันยายน 2527 - 31 กรกฎาคม 2553	18

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคปอดอักเสบจากเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* (*Pneumocystis pneumonia*, PCP) เป็นโรคปอดอักเสบอย่างหนึ่งที่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบได้บ่อย ก่อให้เกิดความเจ็บป่วยและการตายของประชากรโลก เป็นเชื้อที่พบเฉพาะในมนุษย์ ขณะที่สายพันธุ์อื่น ๆ ของเชื้อชนิดนี้เป็นปรสิตในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่าที่มีการศึกษาในปัจจุบัน เชื้อชนิดนี้พบได้ทั่วไปในปอดของคนปกติ แต่ทำให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ โดยพบบ่อยในผู้ป่วยโรคเอดส์ โรคมะเร็ง และผู้ป่วยที่เข้ายาที่ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันรวมทั้งเด็กแรกเกิดที่มีภาวะขาดสารอาหาร หรือคลอดก่อนกำหนด *Pneumocystis jirovecii* เป็นหนึ่งในเชื้อฉวยโอกาสที่มีความรุนแรงและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี (human immunodeficiency virus, HIV) ทั่วโลก ช่วงสิบปีแรกหลังจากมีการระบาดของเชื้อ HIV มีรายงานผู้ป่วยโรค PCP มากกว่า 100,000 รายในสหรัฐอเมริกา (CDC, 1989, Glatt et al., 1990) ซึ่งอุบัติการณ์ของการก่อโรคสัมพันธ์กับจำนวนของผู้ติดเชื้อ HIV และพบการเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคเอดส์ (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) (CDC, 1977)

เชื้อ *Pneumocystis* ได้รับความสนใจครั้งแรกในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 หลังจากถูกพบเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคปอดอักเสบของเนื้อปอด (interstitial pneumonia) ของทหารที่ขาดสารอาหารอย่างมากและทหารคลอดก่อนกำหนดในยุโรปตอนกลางและทางตะวันออก ก่อนทศวรรษ ค.ศ.1980 มีรายงานผู้ป่วย PCP ในสหรัฐอเมริกาไม่เกินหนึ่งร้อยรายต่อปี (CDC, 1989) ต่อมาหลังจากได้มีการระบาดของโรคเอดส์ พบอัตราการติดเชื้อ PCP สูงขึ้นมากในสหรัฐอเมริกา โดยเฉพาะผู้ใหญ่ที่เป็นเพศชายมีอัตราการเป็นโรค PCP สูงถึงร้อยละ 64 (CDC, 1986) ซึ่งในปี ค.ศ.1997 กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ให้คำแนะนำสำหรับผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่มีค่าลิมโฟซัยต์ชนิด CD4 น้อยกว่า 200 เซลล์ต่อลูกบาศก์ไมโครลิตร ต้องได้รับการให้ยาป้องกันโรค PCP ควบคู่ไปด้วย (CDC, 1997)

ในปัจจุบัน ได้มีการใช้ยาต้านไวรัสหลายขนานที่มีประสิทธิภาพสูง (Highly active retroviral therapy) ร่วมกับการให้ยาป้องกันเชื้อราตั้งแต่แรกเริ่ม (primary prophylaxis) ในกลุ่มผู้ป่วย AIDS ทำให้อุบัติการณ์การติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ลดลงอย่างมาก (Morris, 2008) แต่ยังคงเป็นปัญหาการติดเชื้อที่สำคัญของผู้ป่วย AIDS ในประเทศไทยเป็นอันดับสองรองจากวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) (Saritsiri et al., 2006, สำนักระบาดวิทยา, 2553) ในกลุ่มโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรก ในทางตรงกันข้ามพบว่าข้อมูล

อุบัติการณ์ของผู้ป่วยที่เป็นโรค PCP ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องจากโรคอื่น กลับมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น (Enomoto et al, 2010, Kovacs et al., 1984, Mansharamani et al., 2000) โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันและยากดภูมิคุ้มกันต่างๆ

PCP ในผู้ป่วยเด็กอาจมีอาการรวดเร็วหรือค่อยเป็นค่อยไป แต่สุดท้ายจะมีอาการรุนแรงและถ้าไม่ได้รับการรักษาจะเสียชีวิตเกือบทั้งหมด จากการศึกษาการให้ยาป้องกัน PCP ในทารกทุกรายที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื้อ HIV ในประเทศไทย เริ่มตั้งแต่อายุ 1 ถึง 6 เดือน แม้ว่าจะยังวินิจฉัยไม่ได้ว่าทารกติดเชื้อ HIV หรือไม่ แต่ถ้าทารกยังแข็งแรงดีให้หยุดยาป้องกัน PCP ได้เมื่ออายุ 6 เดือน และติดตามการรักษาต่อ เพราะทารกที่ยังดูแข็งแรงดีแต่เป็น PCP มักอายุต่ำกว่า 6 เดือนทั้งสิ้น ถ้าทารกมีอาการของการติดเชื้อ HIV ปรากฏขึ้นมาภายหลังอายุ 6 เดือน จึงค่อยเริ่มยาใหม่ พบว่าวิธีนี้ได้ผลดี เพราะให้ยาระยะสั้นเพียงประมาณ 5 เดือน ทารกทนยาได้ดีและมีแนวโน้มในการช่วยลดอุบัติการณ์ปอดอักเสบโดยสาเหตุต่างๆ และเสียชีวิตก่อนอายุ 6 เดือน ได้โดยไม่พบว่ามีทารกที่ติดเชื้อ HIV มีอันตรายจากการหยุดยาที่ 6 เดือน และร้อยละ 95 ของทารกที่ไม่ติดเชื้อ HIV ได้รับการหยุดยาที่ 6 เดือน พบว่าวิธีให้ยาแบบนี้ช่วยลดปัญหา PCP ได้อย่างชัดเจนในโรงพยาบาลศิริราช ดังนั้นการให้ยาป้องกัน PCP แก่ทารกทุกคนที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื้อเอชไอวีในช่วงอายุ 1 ถึง 6 เดือน (จากนั้นให้ยาต่อเฉพาะทารกที่มีอาการสงสัยว่าติดเชื้อ HIV เท่านั้น) นับเป็นวิธีหนึ่งที่แนะนำให้ใช้ในประเทศไทย ไม่แนะนำให้ยาป้องกัน PCP ก่อนอายุ 1 เดือน เพราะอุบัติการณ์ของโรคในทารกแรกเกิดอาการน้อย และยา Co-trimoxazole ซึ่งเป็นยาหลักอาจเกิดผลอันไม่พึงประสงค์ในทารกแรกเกิดได้ (เชิดเกียรติ : ออนไลน์)

อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญประการหนึ่งคือการรักษา และป้องกันการติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* คือการดื้อยา (drug resistance) ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ซึ่งเกิดจากการผ่าเหล่าของยีน dihydropteroate synthase (DHPS) ทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มซัลฟา sulfamethoxazole (SMX), sulfadoxine (SD), และ dapsone (D) ส่วนการผ่าเหล่าของยีน dihydrofolate reductase (DHFR) ทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่ม diaminopyrimidines trimethoprim (TMP) และกลุ่ม pyrimethamine (PM) ทำให้การรักษาโรค PCP ด้วยยา trimethoprim และ sulfamethoxazole (TMP-SMX) มีข้อจำกัดทางยา คือ co-trimoxazole หรือ Bactrim^(R) เป็นชื่อทางการค้า ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาเป็นลำดับแรกแต่กลับล้มเหลวในผู้ป่วยบางราย (Nahimana et al., 2004, Meneau et al., 2004)

การตรวจวินิจฉัยโรค PCP ในทางคลินิกนั้น แพทย์จะทำการวินิจฉัยโดยดูจากอาการแสดงของผู้ป่วยรวมกับการซักประวัติ ลักษณะอาการแสดงของโรคเช่น เหนื่อยง่าย หายใจลำบาก มีไข้ต่ำๆ ไอแห้งๆ ไม่มีเสมหะ ร่วมกับภาพถ่ายรังสี X-ray ทรวงอก จะมีลักษณะคล้ายหมอกหรือควันกระจายเข้าไปในปอด การฟังเสียงของปอดอาจไม่พบความผิดปกติ การตรวจเลือด ในกรณีที่ค่า

เม็ดเลือดขาว CD4 น้อยกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร พบว่ามีความเสี่ยงในการเกิดโรคโดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HIV และอาจพบเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil เพิ่มขึ้น หากมีการติดเชื้อไม่มากการตรวจร่างกายจะไม่พบอาการผิดปกติใด ๆ

การวินิจฉัยปอดติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ทางห้องปฏิบัติการจากสิ่งส่งตรวจในระบบทางเดินหายใจเช่น เสมหะ หรือน้ำล้างปอด นับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการพิสูจน์ทราบว่าผู้ป่วยที่มีอาการทางปอดเป็นโรค PCP หรือไม่เพื่อกำหนดแนวทางในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย ลดความเสี่ยงต่อการแพ้ยา ลดปัญหาเชื้อดื้อยา และลดภาวะแทรกซ้อนจากการให้ยาหลายขนานเป็นเวลานานโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีอาการหนักหรือเด็กที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื้อ HIV

สิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยได้แก่ ชิ้นเนื้อปอด (biopsy) น้ำล้างปอด (bronchoalveolar lavage, BAL) และเสมหะ (sputum) การส่งชิ้นเนื้อปอดแม้ว่าจะมีความจำเพาะสูง (specificity) แต่ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากเป็นวิธีที่ก่อให้เกิดการเจ็บปวดและอาจเกิดภาวะแทรกซ้อนแก่ผู้ป่วยสูง ดังนั้น BAL จึงเป็นสิ่งส่งตรวจที่ดีที่สุดในการตรวจหาเชื้อ เพราะเป็นวิธีที่ก่อให้เกิดการเจ็บปวดน้อย มีปริมาณเชื้อมาก แต่การเก็บสิ่งส่งตรวจ BAL ทำได้ไม่ถนัดเมื่อเทียบกับวิธีการเก็บสิ่งส่งตรวจเสมหะ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายกว่า และไม่ก่อให้เกิดการเจ็บปวดต่อผู้ป่วย ถึงแม้ว่าจะมีเชื้อปนออกมาในเสมหะน้อยกว่า BAL ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ในสิ่งส่งตรวจเพื่อเพิ่มความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) มากขึ้น

เนื่องจากเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ไม่สามารถเพาะเชื้อได้ภายนอกในร่างกายของสิ่งมีชีวิต การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดยวิธีการย้อมสี Giemsa เป็นวิธีที่ดีในการตรวจหา PCP เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายน้อย สามารถตรวจพบได้ทั้งระยะ cystic form และ trophic form แต่มี sensitivity และ specificity ต่ำกว่าวิธีย้อมสีอื่น ๆ สำหรับวิธีการย้อมสี Toluidine blue O และ Gomori methenamine silver (GMS) มี specificity สูงกว่าวิธีการย้อมสี Giemsa แต่ตรวจพบได้เพียงระยะ cystic form เท่านั้น ไม่สามารถตรวจพบระยะ trophic form อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีข้อจำกัดความไวในการตรวจพบ DNA ของเชื้อในกรณีที่เชื้อมีปริมาณน้อยมาก คุณภาพของสไลด์ที่ย้อมตลอดจนการเตรียมสไลด์ย้อมที่ดีนอกจากนี้ยังต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจวินิจฉัยซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในกรณีที่เชื้อไม่ปรากฏระยะ cystic form ทำให้เกิดผลลบเทียมได้ (ไม่พบเชื้อ)

การวินิจฉัยในเวลาต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจโดยใช้ monoclonal antibody เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* (Kovacs et al., 1988, Linder et al., 1986) ซึ่งพบว่ามีความ sensitivity และ specificity สูงกว่าวิธีย้อมสี 3 วิธีข้างต้น แต่วิธีการตรวจโดยใช้ monoclonal

antibody อาจมีผลบวกเทียมได้จากเชื้อราชนิดอื่น และขั้นตอนในการตรวจวินิจฉัยที่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายสูงรวมถึงมีช่วงอายุในการใช้งานจำกัด (Koch et al., 1990)

ในปัจจุบันพบว่า วิธีการทางด้านชีวโมเลกุลโดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) เฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction, PCR) เพื่อการวินิจฉัย มีความไวในการตรวจสูงที่สุดนับตั้งแต่ได้มีการนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค PCP เป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1990 (Wakefield et al., 1990) หลังจากนั้นได้มีการศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคโดยวิธี PCR จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ นอกจากเสมหะและน้ำล้างปอด เช่น น้ำบ้วนปาก (Fischer et al., 2001, Helweg et al., 1998, Tamburrini et al., 1997) และเลือด (Lipschik et al., 1992., Rabodonirina et al., 1999) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยในแต่ละวิธี (Eisen et al., 1994, Flori et al., 2004, Torres et al., 2000) รวมถึงการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของยีนเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธี PCR (Lu et al., 1995, Robberts et al., 2007)

จากทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นการวินิจฉัยปอดติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ทางห้องปฏิบัติการมีประสิทธิผลในการตรวจพบเชื้อแตกต่างกันไปในแต่ละวิธี และตามแต่ละการศึกษา ซึ่งวิธีที่ดีที่สุดในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* คือวิธี PCR จากหลายๆการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าวิธี PCR มีความไวในการตรวจพบเชื้อสูงสุด ส่วนความจำเพาะต่อเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการ PCR ดังนั้นวิธี PCR นับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการวินิจฉัยปอดติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจพบ DNA ของเชื้อเพิ่มสูงสุด ลดการเกิดผลลบปลอมซึ่งมีผลต่อการรักษา และเป็นแหล่งรังโรคต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีการติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ร่วมกับจุลชีพอื่น (Khawcharoenporn et al., 2006) สำหรับค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ทั้งวิธีการย้อมสี, IFA และวิธี PCR ในปัจจุบันวิธีการย้อมสีมีค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* น้อยที่สุด แต่ผลความไวในการตรวจพบเชื้อก็น้อยกว่าวิธีการอื่นๆด้วย สำหรับวิธี IFA แม้ว่าจะมีความไวสูงขึ้นมากกว่าวิธีการย้อมสี แต่ก็มีราคาของ monoclonal antibody ที่สูงมากทำให้ค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยสูงกว่าวิธีการอื่นๆ ซึ่งวิธี PCR แม้มีความไวในการตรวจสูงที่สุด แต่วิธีนี้มีการให้บริการในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ในสถานบริการทางการแพทย์น้อยกว่าทุกวิธีการที่กล่าวมา โดยในด้านค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR ยังมีราคาสูงอยู่มาก โดยเฉพาะการเตรียม DNA จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจโดยใช้ชุดเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป (commercial DNA extraction kit) มีหลายขั้นตอน ใช้เวลานาน และมีราคาสูง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาโดยวิธีการต้มแยก DNA ออกจากตัวอย่างในจุลชีพอื่นเช่นเชื้อรา และแบคทีเรีย (Koch et al., 1990) พบว่า

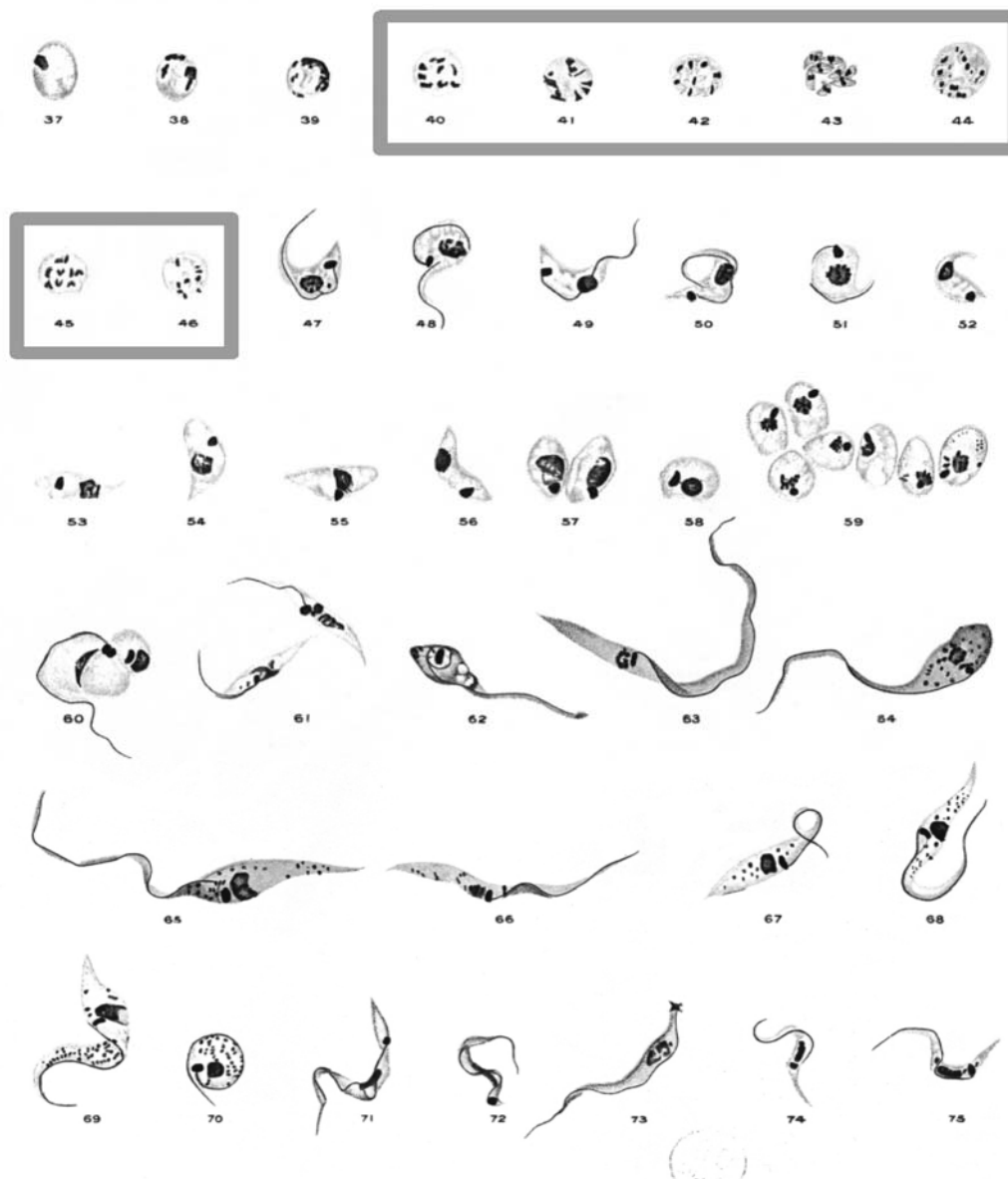
ให้ผลการเตรียม DNA ที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็น DNA ต้นแบบสำหรับการทำ PCR แต่สำหรับเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ยังไม่มีการศึกษาใดเลยที่นำวิธีการต้มมาใช้เตรียม DNA โดยตรง ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อศึกษาวิธีการเตรียม DNA จากการต้ม ซึ่งเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่า และใช้เวลาไม่นาน สามารถทำได้ง่าย โดยทำการเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป และเปรียบเทียบกับผลการย้อมสี เพื่อผลการศึกษาที่ได้จะนำมาเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วยวิธี PCR เพื่อการควบคุมป้องกัน การรักษา และควบคุมโรคต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of the related literatures)

ประวัติความเป็นมาของเชื้อ *Pneumocystis*

เชื้อ *Pneumocystis* พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1909 โดย Carlos Chagas (Chagas, 1909a) จากการศึกษาการติดเชื้อ *Trypanosoma cruzi* ของคนงาน (ทำรางรถไฟในรัฐ Minas Gerais) ประเทศบราซิล โดยสังเกตพบซิสต์ระยะ 8 สปอร์ (eight-spore cyst) ในปอดหนู guinea pig ที่ได้รับการฉีด (inoculate) เชื้อจากเลือดผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Trypanosoma cruzi* ซึ่ง Chagas เรียกซิสต์นี้ว่า schizogonicas (Chagas, 1909b) และรวมเข้าเป็นส่วนหนึ่งของวงจรชีวิตของเชื้อ *Trypanosoma cruzi* (รูปที่ 1) และได้ตั้งเป็น Genus ใหม่ของเชื้อ *Trypanosoma cruzi* ที่มีซิสต์นี้ว่า *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909c) นอกจากนี้ยังพบซิสต์ดังกล่าวนี้เป็นครั้งแรกในปอดคนจากการ autopsy ผู้ป่วยชาวอเมริกันที่เสียชีวิตจากโรค trypanosomiasis (Chagas, 1911) ต่อมาในปี ค.ศ. 1910 Antonio Carini จากสถาบันวิจัย Pasteur institute ในกรุงเซา เปาโล ประเทศบราซิล ได้พบซิสต์ในปอดหนู rat ที่ติดเชื้อ *Trypanosoma lewisi* แต่สงสัยว่าอาจเป็นเชื้อชนิดอื่น จึงได้ส่งตัวอย่างชิ้นเนื้อปอดหนูและสไลด์ชิ้นเนื้อไปตรวจเพิ่มเติม ที่สถาบันวิจัย Pasteur institute ในกรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส (Carini, 1910) หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1912 Delanoë และ Delanoë ซึ่งเป็นนักศึกษาของ Charles Louis Alphonse Laveran ในสถาบันวิจัย Pasteur institute ได้ทำการสำรวจหนู rat จากท่อน้ำทิ้งในกรุงปารีส ที่ไม่ได้ติดเชื้อ *Trypanosome* โดยได้สังเกตพบซิสต์ในปอดหนู และได้ตรวจสอบผลการศึกษารวมทั้งตัวอย่างที่ส่งมาของ Antonio Carini ทำให้พวกเขาประหลาดใจกับซิสต์ที่พบโดยพบว่า cyst มีลักษณะเหมือนกันแต่ไม่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Trypanosome* ทำให้เข้าใจว่าเป็นเชื้อชนิดใหม่ที่มีความสัมพันธ์กับโปรโตซัวในกลุ่ม coccidians และให้ชื่อว่า *Pneumocystis carinii* โดย “Pneumo” สัมพันธ์กับปอดส่วน “cystis” เนื่องจากลักษณะของเชื้อ และ “carinii” เพื่อให้เกียรติแก่ Dr. Antonio Carini (Delanoë and Delanoë, 1912)



รูปที่ 1 Chagas รวมซิสต์ของเชื้อ *Pneumocystis carinii* ที่พบเข้าเป็นส่วนหนึ่งของวงจรชีวิตเชื้อ *Trypanosoma cruzi* โดยที่ระยะซิสต์อยู่ในลำดับที่ 40-46 (Chagas, 1909b)

ก่อนสงครามโลกครั้งที่ 2 ราวปี 1938 Ammich (Ammich, 1938) และ Benecke (Benecke, 1938) นายแพทย์ชาวเยอรมันรายงานการเกิด interstitial plasma cell pneumonitis โดยไม่ทราบสาเหตุในเด็กทารกที่ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอ ต่อมาพบความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ *Pneumocystis* กับการเกิดโรคในปี ค.ศ. 1942 โดย Van der Meer และ Brug ได้พบเชื้อ *Pneumocystis carinii* ในชิ้นเนื้อปอดของเด็กที่เสียชีวิตจาก plasma cell pneumonitis (Van der Meer and Brug, 1942) ต่อมาในปี ค.ศ. 1951 นักพยาธิวิทยาชาวเชคโกสโลวาเกีย Josef Vanek จากมหาวิทยาลัย Karls กรุงปราก ประเทศเชคโกสโลวาเกีย ได้แสดงผลการศึกษาชิ้นเนื้อปอดของ

เด็กจำนวน 60 รายที่ติดเชื้อ *Pneumocystis carinii* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคปอดอักเสบ (Vanek, 1951) ต่อมาในปี ค.ศ. 1952 และ ค.ศ. 1953 Otto Jirovec และ Josef Vanek ได้รายงานความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Pneumocystis carinii* ในปอดของเด็กที่เป็นโรค interstitial plasma cell pneumonitis (Jirovec, 1952, Vanek et al., 1953) และในปี ค.ศ. 1958 มีรายงานการศึกษาการใช้ยารักษา *Pneumocystis carinii* pneumonia เป็นครั้งแรกโดย Ivady และ Paldy (Ivady and Paldy, 1958) ได้รายงานผลการศึกษาการตอบสนองของต่อยา cationic diamidine compound, pentamidine isethionate ซึ่งก่อนหน้านี้ใช้สำหรับรักษาโรค African trypanosomiasis โดยที่ตัวยาดังกล่าวนี้เป็นยามาตรฐานในการรักษาโรค *Pneumocystis carinii* pneumonia จนกระทั่งถูกแทนที่ด้วยยาที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นและมีผลข้างเคียงน้อยกว่าซึ่งประกอบด้วยสองตัวยาร่วมกันคือ Trimethoprim-Sulfamethoxazole (TMP-SMZ) ในทศวรรษที่ ค.ศ. 1970 โดย Hughes และคณะ จากเมือง Memphis มลรัฐ Tennessee ประเทศสหรัฐอเมริกา (Hughes et al., 1974) หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1976 จากการศึกษาของ Frenkel เกี่ยวกับ phenotype ของ *Pneumocystis* spp. พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่พบในคนและในหนู โดยเชื้อ *Pneumocystis carinii* นั้น มีความจำเพาะต่อหนู rat และพบว่าเชื้อที่ก่อโรคในคนนั้นมีความแตกต่างจากเชื้อที่พบในหนู จึงมีการจำแนกเชื้อ *Pneumocystis* ที่ก่อโรคในคนเป็นสายพันธุ์ใหม่ให้ชื่อว่า *Pneumocystis jiroveci* โดยให้เกียรติแก่ Dr. Otto Jirovec (Frenkel, 1976) แต่ไม่เป็นที่ยอมรับในเวลานั้น หลังจากนั้นมาได้มีการศึกษาเรื่องความจำเพาะต่อโฮสต์ โดยเปรียบเทียบการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA มีความแตกต่างกันในเชื้อ *Pneumocystis* (Denis et al., 2000, Liu et al., 1992, Shah et al., 1996, Sinclair et al., 1991, Wakefield, 1998) ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

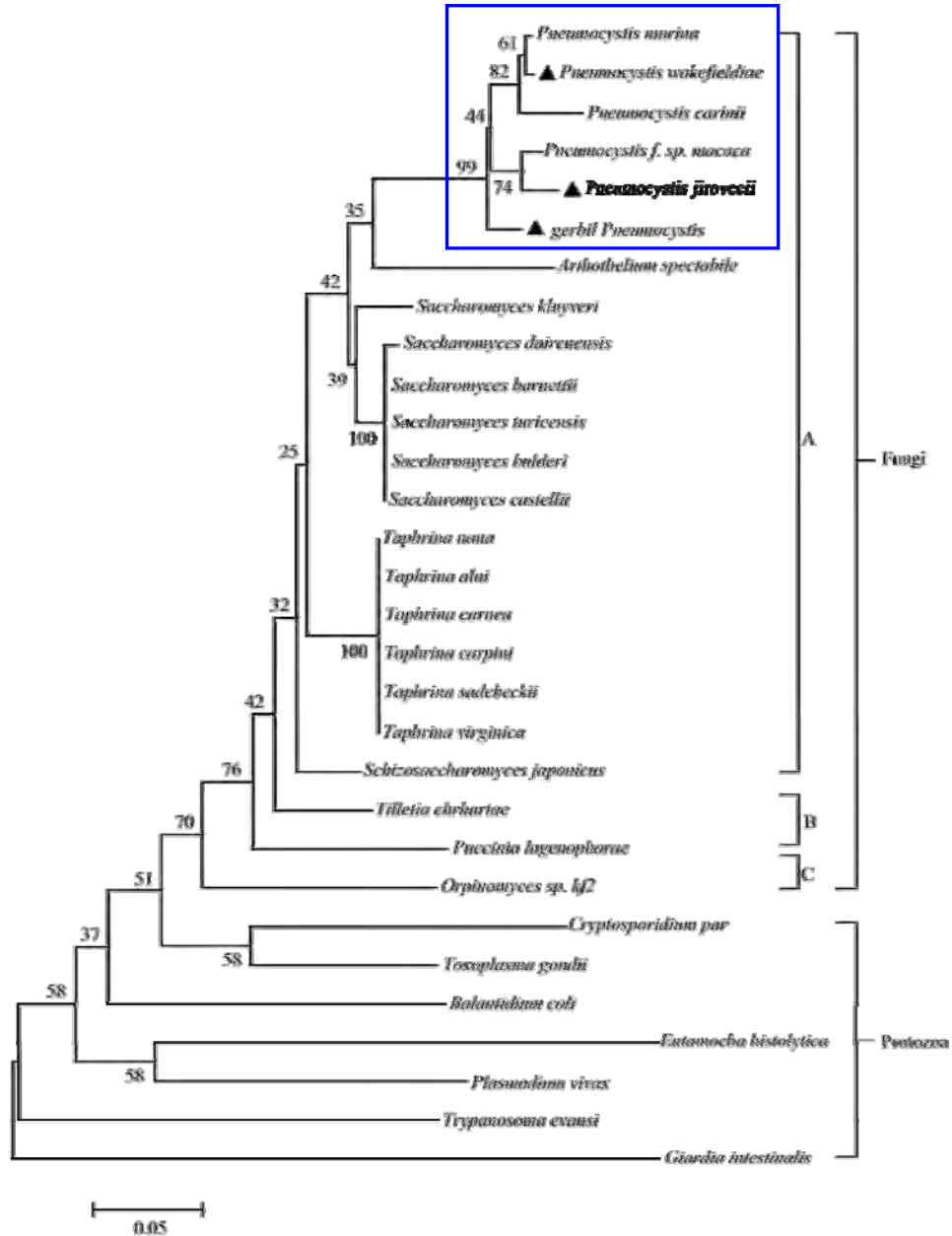
ตั้งแต่มีการค้นพบจุลชีพ *Pneumocystis* เป็นต้นมาจนกระทั่งปลายทศวรรษที่ ค.ศ. 1980 เชื้อ *Pneumocystis* ถูกจัดเป็นเชื้อโปรโตซัวเนื่องจากมีลักษณะหลายประการที่เข้าได้กับกลุ่มโปรโตซัวโดยมีรูปร่างภายนอก (morphology) ของเชื้อคล้ายโปรโตซัวเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง, มีการขาดหายไปของสาร ergosterol ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (สาร ergosterol เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของเชื้อรา) และตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาที่รักษาเชื้อโปรโตซัว แต่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยารักษาเชื้อรา โดยมีการศึกษาการใช้ยารักษาเชื้อรา amphotericin B และ ketoconazole แต่ไม่สามารถรักษาโรค PCP ได้ (Hughes et al., 1989)

ในปี ค.ศ. 1988 Edman และคณะได้ศึกษาลำดับเบสใน ribosomal RNA ของ *Pneumocystis carinii* พบว่ามีความสัมพันธ์กับเชื้อราแต่ไม่มีความสัมพันธ์กับโปรโตซัว (Edman et al., 1988) ต่อมา Stringer และคณะได้แสดงความสัมพันธ์ถึงลำดับเบสใน 18S rRNA ระหว่าง *Pneumocystis* กับลำดับเบสของเชื้อราอื่นๆ เช่น *Candida albicans*, *Neurospora crassa* และ *Cryptococcus neoformans* เปรียบเทียบกับ *Saccharomyces cerevisiae* (Stringer et al., 1989) ซึ่งภายหลังพบว่าผลการวิเคราะห์ลำดับเบส 5.8S rRNA gene แสดงสายวิวัฒนาการของ จุลชีพ *Pneumocystis* มีความสัมพันธ์กับเชื้อราในกลุ่ม Ascomycota (รูปที่ 2)

จากการวิเคราะห์ลำดับ DNA พบว่า *Pneumocystis carinii* จัดอยู่ใน Kingdom Fungi โดยพบว่าลำดับของ 16S rRNA gene ของ *Pneumocystis carinii* มีความคล้ายคลึงกับยีสต์ นอกจากนี้ mitochondrial DNA ยังมีความคล้ายคลึงกับ DNA ของเชื้อรา และพบว่าผลการวิเคราะห์ลำดับ β -tubulin gene (Edlind et al., 1991, Edman et al., 1988, Edlind et al., 1992, Dyer et al., 1992) ได้ให้ผลการสนับสนุนการจัดกลุ่มดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่า gene ที่สร้าง เอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR) และ thymidylate synthase (TS) อยู่ในคนละ โครโมโซมซึ่งต่างจากโปรโตซัวโดยทั่วไปที่จะอยู่ติดกันและเป็น bifunctional protein (Edman et al., 1989a, Edman et al., 1989b)

ในการวิเคราะห์ major surface glycoprotein (MSG) ของ *Pneumocystis carinii* พบว่า gene ที่สร้างโปรตีนดังกล่าวมีความหลากหลายในรูปแบบของ gene (genetic diversity) ในการ ติดเชื้อ อาจพบเชื้อมาจากต่างสายพันธุ์ร่วมกันได้ในหนู ทั้งนี้สายพันธุ์ของเชื้อมีความสัมพันธ์กับ species ของโฮสต์อย่างชัดเจน แม้เชื้อ *Pneumocystis* จะพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด แต่พบการก่อโรคในมนุษย์เพียงชนิดเดียว การวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสในโมเลกุล 18S rRNA gene เชื้อ *Pneumocystis* ในคนและในหนูมีความต่างกันร้อยละ 5 (Stringer et al., 2001) สรุปได้ว่าเชื้อ *Pneumocystis* สายพันธุ์ที่ติดเชื้อในคนเป็น *Pneumocystis jirovecii* และมีการกำหนดชื่อของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ตามระบบการตั้งชื่อ Vienna code ICBN (International Code of Botanical Nomenclature) เป็น *Pneumocystis jirovecii* (McNeill et al., 2006, Redhead et al., 2006)

แม้ว่า *Pneumocystis jirovecii* มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับยีสต์ในกลุ่ม Ascomycota แต่การเจริญเติบโตและวงชีวิตของเชื้อมีความแตกต่างจากยีสต์อย่างชัดเจน



รูปที่ 2 สายวิวัฒนาการของ *Pneumocystis* จากกราวีเคาะห์ลำดับเบสของยีน 5.8S rRNA. โดยที่ A: Ascomycota, B: Basidiomycota และ C: Chytridiomycota เป็นเชื้อรา ซึ่งวัดระยะห่างระหว่างสายวิวัฒนาการ (p-distance) ด้วยโปรแกรม MEGA version 3 (ดัดแปลงจาก Li et al., 2008)

อนุกรมวิธานของเชื้อ *Pneumocystis*

เชื้อใน genus *Pneumocystis* เป็นสิ่งมีชีวิตแบบฟังเซลล์ที่ไม่ลูกกลมเข้าเซลล์ของโฮสต์ สามารถจัดหมวดหมู่ในอนุกรมวิธานของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ได้ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* (ดัดแปลงจาก Cushion et al., 2010)

Level	Taxa
Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Taphrinomycotina
Order	Pneumocystidales
Class	Pneumocystidomycetes
Family	Pneumocystidaceae
Genus	<i>Pneumocystis</i>
Species	<i>jirovecii</i>

ในปัจจุบันพบว่ามียีสต์สายพันธุ์ของเชื้อ *Pneumocystis* ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และได้ตั้งชื่อที่ถูกต้องแล้วอีก 4 สายพันธุ์คือ

<i>Pneumocystis carinii</i>	สายพันธุ์ที่พบในหนู rat (Delanoë, 1912)
<i>Pneumocystis wakefieldiae</i>	สายพันธุ์ที่พบในหนู rat (Cushion et al., 2004, Cushion et al., 2005)
<i>Pneumocystis murina</i>	สายพันธุ์ที่พบในหนู mouse (Keely et al., 2004)
<i>Pneumocystis oryctolagi</i>	สายพันธุ์ที่พบในกระต่าย (Dei-Cas et al., 2006)

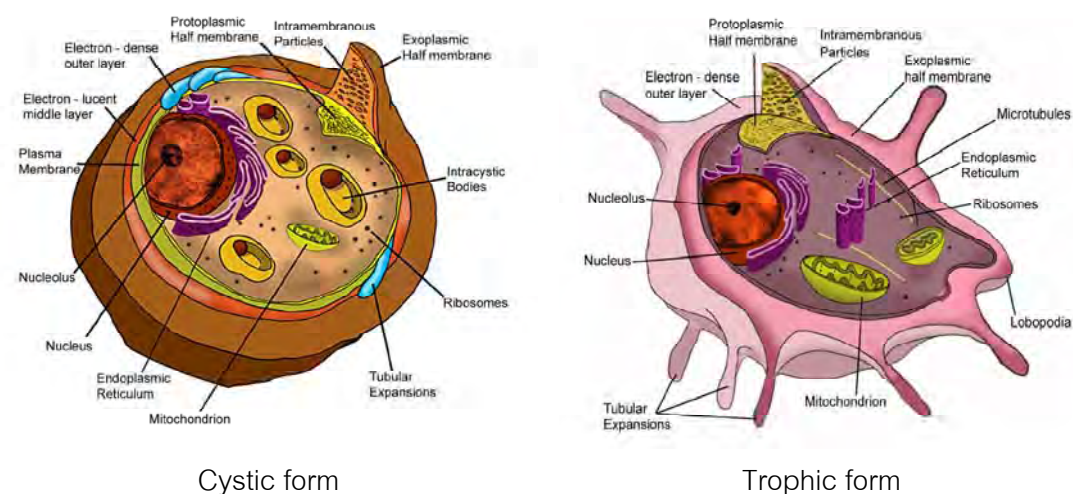
รูปร่างลักษณะของเชื้อ *Pneumocystis*

Pneumocystis เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในถุงลมปอดของสิ่งมีชีวิตที่จำเพาะแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ไม่สามารถติดเชื้อข้ามสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันได้ การศึกษาภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ามี 3 รูปแบบที่สำคัญคือ

cystic form (sporangium) คือระยะที่เชื้อมีรูปร่างกลมหรือกลมรี มีผนังหนา ขนาดประมาณ 5-8 ไมโครเมตร ภายในประกอบด้วย daughter form (spores หรือ endospores หรือเดิมเรียกว่า intracystic body) โดยมีจำนวนได้มากถึง 8 spores ต่อมาจะเกิดกระบวนการ excystation โดยที่แต่ละ spores จะเจริญไปเป็น trophic form (รูปที่ 3)

trophic form (trophozoite) คือระยะที่เชื้อมีรูปร่างไม่แน่นอนแต่เป็นระยะที่มีปริมาณมากที่สุดในปอด มีขนาด 1-4 ไมโครเมตร ผนังบางมี nucleus เดียวเพิ่มจำนวนโดยวิธี binary fission หรือ endodyogeny ระยะนี้จะพบ filopodia ซึ่งเป็น multiple tubular expansion มักพบในบริเวณที่อยู่ใกล้ชิดกับเซลล์ของโฮสต์ (รูปที่ 3)

precyst เป็นระยะที่พบได้น้อยส่วนใหญ่พบในขณะที่มีการแบ่งเซลล์โดย trophic form เปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงรี ผนังเซลล์หนาตัวขึ้นภายในจะพบโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเส้น เรียกว่า synaptonemal complex ซึ่งในระยะ trophic form ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นระยะ precyst มี DNA เป็น diploid



รูปที่ 3 แสดงแบบจำลองลักษณะและองค์ประกอบภายในของเชื้อ *Pneumocystis* (*Pneumocystis carinii*) ระยะ cystic form และระยะ trophic form (de Souza, และ Benchimol, 2005)

วงจรชีวิตของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii*

แม้ว่าวงจรชีวิตจะยังไม่ทราบชัดเจนเนื่องจากเชื้อ *Pneumocystis* ไม่สามารถเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายของโฮสต์ (Aliouat et al., 1996, Cushion et al., 2000, Lee et al., 1993, Sloan et al., 1993) และไม่ต้องการพาหะในการเจริญเติบโตนอกปอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมทั้งทุกระยะของการเจริญเติบโตพบได้ภายในปอด บางครั้งอาจพบได้นอกปอดบ้างในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำที่มีอาการรุนแรง โดยเชื้ออาจกระจายไปทางระบบเลือดหรือระบบน้ำเหลืองสู่อวัยวะอื่นๆ (Ng et al., 1997, Anuradha and Sinha, 2007)

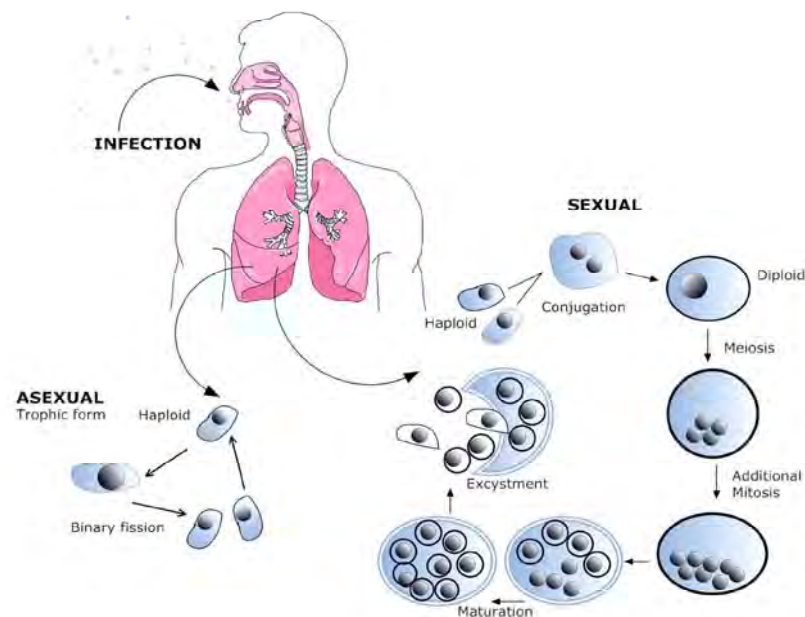
วงจรชีวิตของเชื้อได้มาจากการสังเกตระยะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pneumocystis carinii* ในหนู ซึ่งในวงจรชีวิตของเชื้อมีทั้งการสืบพันธุ์แบบอาศัย

เพศและแบบไม่อาศัยเพศ พบได้ทั้งระยะ trophic form, sporocytes (precyst) และ mature cyst สำหรับระยะ trophic form เป็นระยะที่มีจำนวนมากที่สุดประมาณ 90-95 เปอร์เซ็นต์ (Aliouat-Denis et al., 2009)

หลังจากการติดเชื้อโดยการหายใจเอาระยะ cystic form ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* เข้าสู่ร่างกาย (inhalation) cystic form จะเข้าแนบติดกับเซลล์ pneumocyte type I ในถุงลมปอด (alveolar sac) จากนั้นแต่ละ spore ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว (haploid) จะเกิดกระบวนการ excystation โดยที่แต่ละ spores จะเจริญไปเป็น trophic form ซึ่งมีทั้งการเจริญแบบอาศัยเพศ (sexual stage) และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual stage) (รูปที่ 4)

การเจริญแบบอาศัยเพศโดยเริ่มจาก trophic form (haploid) เกิดการรวมตัวกัน (conjugate) เป็น thin-walled round early sporocyte (Matsumoto and Yoshida, 1984, Peters et al., 2001) ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมสองชุด (diploid) ในกระบวนการ meiosis จากนั้นเกิดการจำลองตัวในกระบวนการ meiotic จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการได้ eight spores ซึ่งในระหว่างกระบวนการ ผนังของ sporocyte มีความหนาเพิ่มมากขึ้นเป็น thick-walled late sporocyte (mature cyst) โดยที่แต่ละ spore ใน mature cyst จะออกจาก cyst ไปยึดติดกับ pneumocyte type I ต่อไป

การเจริญแบบไม่อาศัยเพศโดยเริ่มจาก trophic form (haploid) มีการเจริญเติบโตขยายขนาดขึ้น จากนั้นเกิดกระบวนการแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสอง (binary fission) แล้วเจริญเติบโตวนซ้ำในกระบวนการเดิมได้จำนวนเพิ่มขึ้นแบบเรขาคณิต (2^n)



รูปที่ 4 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* (Beck, และ Cushion, 2009)

การกระจายทางภูมิศาสตร์ และระบาดวิทยาของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii*

เชื้อ *Pneumocystis* สามารถพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด มีการแพร่กระจายอยู่ในทุกภูมิภาคทั่วโลกยกเว้นในเขตขั้วโลกใต้ (Antarctica) (Morris et al., 2004) โดยสถานการณ์ของการเกิดโรค PCP มีความสัมพันธ์กับการระบาดของ การติดเชื้อ HIV และการเกิดโรค AIDS เป็นอย่างมาก อัตราการติดเชื้อโดยส่วนใหญ่มักไม่มีอาการ การติดเชื้อที่มีอาการอาจพบในเด็กที่คลอดก่อนกำหนด หรือเด็กที่ขาดอาหาร สำหรับอุบัติการณ์ของโรคพบมากที่สุด ในผู้ป่วยโรค AIDS เชื่อว่าราวร้อยละ 80 ของผู้ป่วยดังกล่าวจะมีอาการของโรคนี้ นอกจากนี้ยังพบปรากฏการณ์การแพร่กระจายของโรค PCP อย่างรุนแรงในหลายภูมิภาคของโลก (Chave et al., 1991, Cheung et al., 1994, Dutz, 1970, Hennequin, 1995, Ruebush et al., 1978, Singer et al., 1975, Thomas et al., 1966)

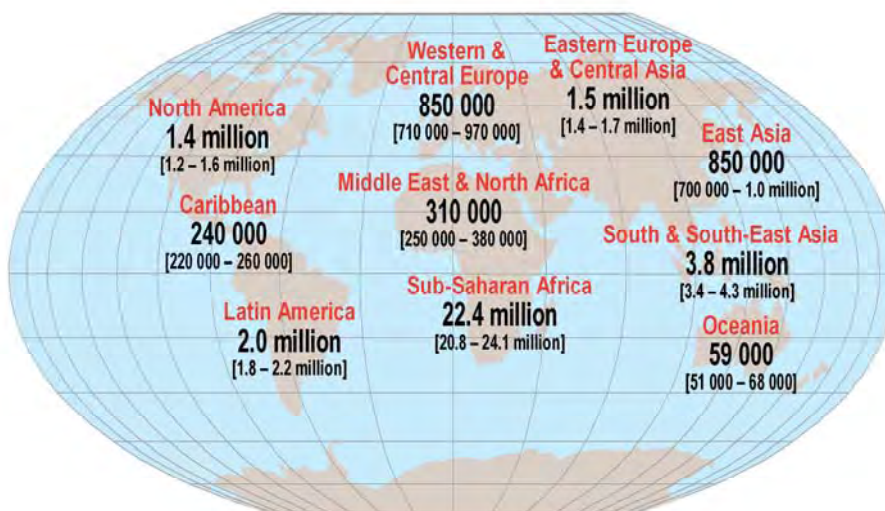
การรายงานสถานการณ์ AIDS ทั่วโลกล่าสุดในปี ค.ศ. 2009 (www.unaids.org/unaid/ (English original, December 2009) นับตั้งแต่มีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส HIV (UNAIDS/WHO) คาดว่ามีผู้ที่ติดเชื้อ HIV แล้วประมาณ 60 ล้านคน และมีผู้ที่เสียชีวิตจากสาเหตุการติดเชื้อ HIV อีกประมาณ 25 ล้านคน โดยเฉพาะใน พ.ศ.2551 มีผู้ติดเชื้อ HIV ทั่วโลกประมาณ 33.4 ล้านคน (31.1-35.8 ล้านคน) เป็นผู้ใหญ่ประมาณ 31.3 ล้านคน (29.2-33.7 ล้านคน) มีผู้หญิงที่ติดเชื้อ ประมาณ 15.7 ล้านคน (14.2-17.2 ล้านคน) เป็นเด็กที่อายุต่ำกว่า 15 ปี ประมาณ 2.1 ล้านคน (1.2-2.9 ล้านคน) และเป็นผู้ที่เสียชีวิตจากโรค AIDS ประมาณ 2.0 ล้านคน (1.7-2.4 ล้านคน) ซึ่งคาดว่าจะมีผู้ติดเชื้อรายใหม่เพิ่มขึ้น ประมาณ 2.7 ล้านคน (2.4-3.0 ล้านคน) ทั่วโลก โดยคาดว่าจะมีเด็กวัยรุ่นที่อายุ 15-24 ปี มีการติดเชื้อร้อยละ 40 ในขณะที่ผู้หญิงมีการติดเชื้อถึงร้อยละ 48 ซึ่งพบว่าประเทศในแถบทางตอนใต้ของทวีปแอฟริกา เป็นพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากการติดเชื้อไวรัส HIV มากที่สุดประมาณร้อยละ 67 ของผู้ติดเชื้อทั่วโลก มีเด็กที่ติดเชื้อรายใหม่ประมาณ ร้อยละ 91 และมีเด็กกำพร้ามากกว่า 14 ล้านคน รองลงมาอยู่ในประเทศในแถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประมาณ 3.8 ล้านคน ส่วนใหญ่ประเทศที่มีการติดเชื้อสูง ร้อยละ 97 อยู่ในประเทศที่มีรายได้ต่ำหรือยากจนและอยู่ในกลุ่มประเทศที่มีรายได้ปานกลาง (รูปที่ 5) ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดโรค PCP

โดยประเทศอุตสาหกรรม (ในทวีปอเมริกาเหนือ, ยุโรป และ เอเชียตะวันออก) นับตั้งแต่เริ่มมีการใช้ยาต้านไวรัส HAART เป็นต้นมาความชุกของการเกิดโรค PCP ลดลงเป็นอย่างมาก แต่อย่างไรก็ตามโรค PCP ก็ยังคงเป็นปัญหาสำคัญของโรคฉวยโอกาสที่พบได้บ่อยในผู้ติดเชื้อ HIV และโรค AIDS โดยมีอัตราการเกิดโรค PCP ร้อยละ 9 ถึงร้อยละ 10 (Dore et al., 2002, Ives et al., 2001, Kelley et al., 2009, Krentz et al., 2003, McNaghten et al., 1999, Morris et al.,

2004) สำหรับผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรค PCP มากขึ้น (Neff et al., 2009)



Adults and children estimated to be living with HIV, 2008



Total: 33.4 million (31.1 – 35.8 million)

December 2009

รูปที่ 5 แสดงการกระจายตัวของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดยอ้างอิงการติดเชื้อ HIV/AIDS (UNAIDS, 2009)

สำหรับทวีปแอฟริกา นับตั้งแต่มีการระบาดของเชื้อ HIV โรค PCP พบได้น้อยในผู้ใหญ่ในประเทศในแถบทางตอนใต้ของทวีปแอฟริกา อาจเป็นเพราะความสามารถในการก่อโรคของสายพันธุ์ของเชื้อ *Pneumocystis* หรือพันธุกรรมของชาวแอฟริกันมีความต้านทานต่อเชื้อ *Pneumocystis* แต่ไม่เหมือนกันในเด็กแอฟริกันที่ติดเชื้อ HIV ซึ่งมีอัตราการเกิดโรค PCP สูงมาก นับตั้งแต่ทศวรรษที่ ค.ศ. 1980 ถึงทศวรรษที่ ค.ศ. 1990 เด็กแอฟริกันที่ติดเชื้อ HIV มีอัตราการเกิดโรค PCP สูงกว่าผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อ HIV โดยผลการชันสูตรศพผู้ติดเชื้อ HIV ในหลายๆส่วนของทวีปแอฟริการะหว่างปี ค.ศ. 1992 ถึง ค.ศ. 2000 แสดงให้เห็นถึงอัตราการเกิดโรค PCP ร้อยละ 16 ถึง ร้อยละ 29 (Morris et al., 2004) จากการศึกษาล่าสุดของผู้ป่วยเด็กเนื่องจากปอดอักเสบทั้งที่ติด

เชื้อ HIV และไม่ติดเชื้อ HIV ที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาลในแถบทางตอนใต้ของทวีปแอฟริกา พบว่ามีจำนวนถึงร้อยละ 21 ที่เป็นโรค PCP จากร้อยละ 77 ที่ติดเชื้อ HIV (Morrow et al., 2010)

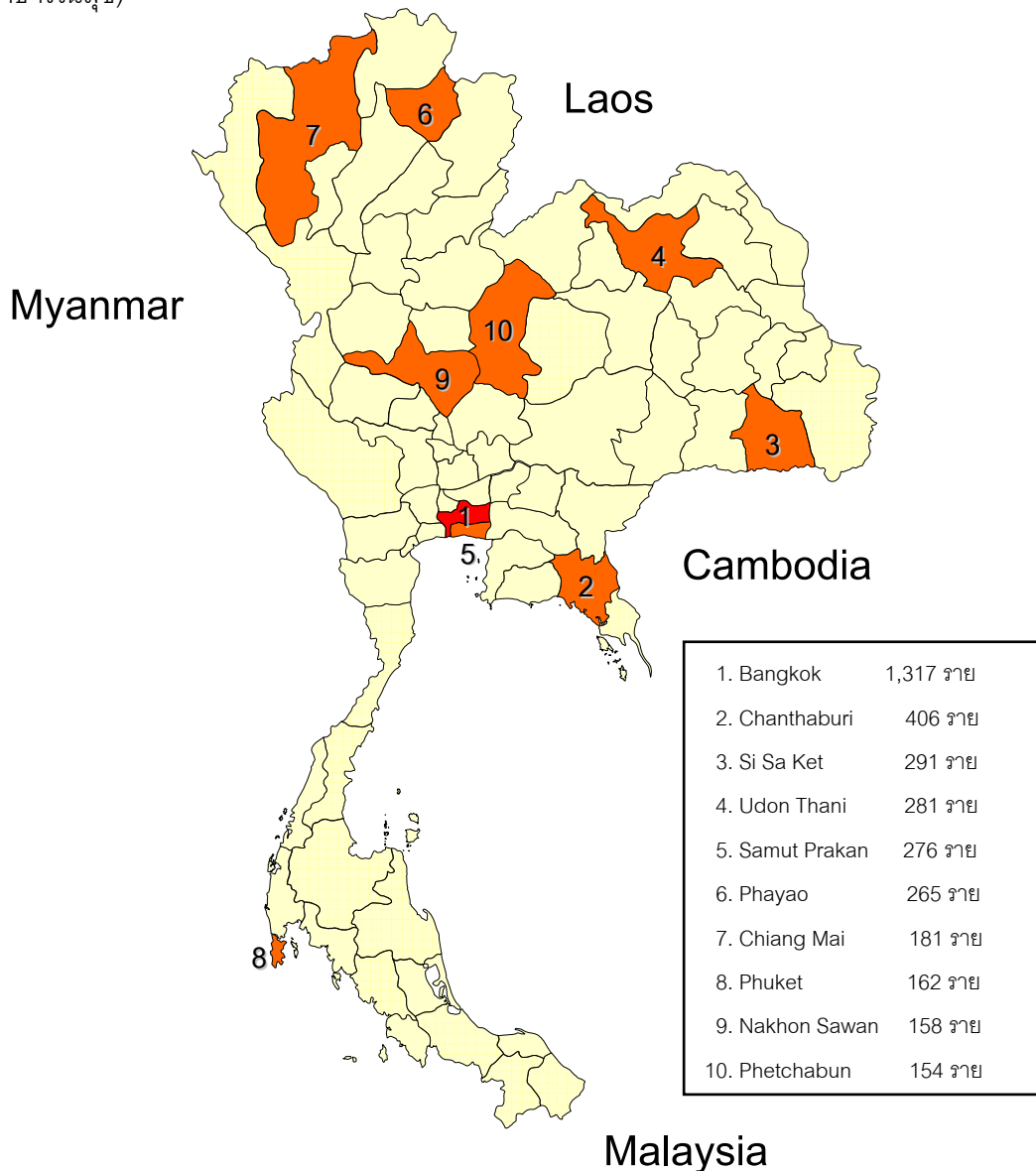
ในทวีปอเมริกากลาง และอเมริกาใต้ โรค PCP พบได้บ่อยเป็นอันดับสองของโรคฉวยโอกาสในผู้ติดเชื้อ HIV ที่ร้อยละ 22 จากการสำรวจในประเทศบราซิลระหว่างปี ค.ศ. 2001 ถึง ค.ศ. 2004 (Soares et al., 2008) ในประเทศอาเจนตินา โรค PCP ที่พบในโรงพยาบาลมีอัตราการเกิดโรคร้อยละ 6 ถึงร้อยละ 9 ในผู้ป่วย AIDS ระหว่างปี ค.ศ. 1995 ถึง ค.ศ. 2002 (Perez et al., 2005) แต่ในผู้ป่วยเด็ก และทารกที่ติดเชื้อ HIV จำนวน 132 ราย พบโรค PCP สูงถึงร้อยละ 35 ซึ่งมากเป็นอันดับสองของเชื้อฉวยโอกาสที่พบในผู้ติดเชื้อ HIV (Fallo et al., 2002)

ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อย่างเช่นประเทศไทยได้มีรายงานการพบโรค PCP ทั้งในเด็ก และในผู้ใหญ่โดยมีความชุกของการเกิดโรคที่ร้อยละ 27 ถึงร้อยละ 40 ในผู้ติดเชื้อ HIV ที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาล (Lumbiganon et al., 2000, Wannamethee et al., 1998) จำนวนผู้ป่วยด้วยโรค PCP มากขึ้นในประเทศไทยในระหว่างปี ค.ศ. 1992 ถึง ค.ศ. 2003 จากที่น้อยกว่า 100 รายต่อปี กลายเป็นมากกว่า 6,000 รายต่อปี (Sritangratanakul et al., 2004) จากการศึกษาดูตามผู้ป่วย AIDS ในประเทศไทย พบว่าราวร้อยละ 20 ของผู้ป่วย AIDS ล้มป่วยด้วยโรค PCP ในระหว่างปี ค.ศ. 1994 ถึง ค.ศ. 1998 (Chariyalertsak et al., 2001) ในประเทศมาเลเซีย โรค PCP พบมากเป็นอันดับสองรองจากวัณโรคในผู้ป่วย AIDS จากผู้ติดเชื้อ HIV และโรค AIDS 419 รายในโรงพยาบาล Kuala Lumpur ระหว่างปี ค.ศ. 1994 ถึง ค.ศ. 2001 (Nissapatorn et al., 2003)

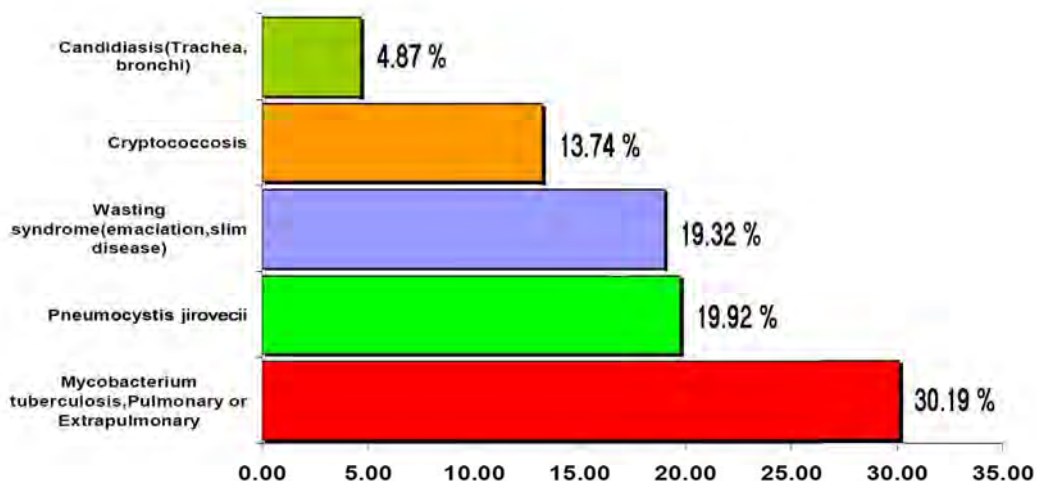
สถานการณ์ของโรค PCP อ้างอิงกับผู้ป่วยโรค AIDS ในประเทศไทย โดยพบผู้ป่วยจากการติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ โดยเฉพาะจังหวัดกรุงเทพมหานครซึ่งเป็นจังหวัดที่มีอัตราการติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* สูงสุด (รูปที่ 6) ในปี พ.ศ. 2552 สำนักระบาดวิทยาได้รับรายงานผู้ป่วยโรค AIDS 14,644 ราย เป็นผู้ที่เริ่มป่วยในปี พ.ศ. 2552 จำนวน 5,964 ราย (ร้อยละ 40.73) อัตราป่วย 9.40 ต่อประชากรแสนคน เป็นเพศชาย 3,688 ราย และเพศหญิง 2,276 ราย อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 1.6 : 1 เสียชีวิต 545 ราย ภาคกลางมีอัตราป่วยสูงสุดร้อยละ 14.96 ต่อประชากรแสนคน รองลงมาคือภาคเหนือร้อยละ 9.22 ภาคใต้ร้อยละ 6.47 และภาคตะวันออกเฉียงเหนือร้อยละ 5.16 ตามลำดับ การคาดประมาณผู้ติดเชื้อ HIV และผู้ป่วย AIDS ในประเทศไทยโดยคณะผู้เชี่ยวชาญ Thai Working Group และทีม A 2 (The Asian Epidemic Model (AEM) Projection for HIV/AIDS in Thailand: 2005-2025) ได้คาดประมาณตัวเลขผู้ติดเชื้อ HIV และผู้ป่วย AIDS ในปี พ.ศ. 2553 คาดว่าจะมีผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อ HIV สะสมประมาณ 1,138,020 ราย เป็นผู้ใหญ่ที่เสียชีวิตจากโรค AIDS ประมาณ 641,633 ราย

เป็นผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อและผู้ป่วย AIDS ที่ยังมีชีวิตอยู่ ประมาณ 499,324 ราย และคาดว่าจะมีผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อ HIV รายใหม่ 10,853 ราย

โรคติดเชื้อฉวยโอกาส ที่พบบ่อย 5 อันดับแรก คือ *Mycobacterium tuberculosis* ร้อยละ 30.19 รองลงมา คือโรคปอดบวมจากเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ร้อยละ 19.92 Wasting syndrome ร้อยละ 19.32 Cryptococcosis ร้อยละ 13.74 และ Candidiasis ของหลอดอาหารหรือหลอดลมร้อยละ 4.87 (แผนภูมิที่ 1) (สำนักกระบวนวิชา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)



รูปที่ 6 แสดงจังหวัดที่มีอัตราการป่วยโรค AIDS โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อยในประเทศไทยปี พ.ศ. 2552 ได้แก่ 1) กรุงเทพมหานคร 2) จันทบุรี 3) ศรีสะเกษ 4) อุตรธานี 5) สมุทรปราการ 6) พะเยา 7) เชียงใหม่ 8) ภูเก็ต 9) นครสวรรค์ และ 10) เพชรบูรณ์ (สำนักกระบวนวิชา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข) (ดัดแปลงจาก พวงทิพย์ รัตนะรัต, และสุวดี ดีวงษ์, 2552)



แหล่งข้อมูล: สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

แผนภูมิที่ 1 แสดงโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบบ่อยมากที่สุด 5 อันดับแรกในผู้ป่วยโรค AIDS ตั้งแต่ กันยายน 2527 - 31 กรกฎาคม 2553 โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ *Mycobacterium tuberculosis*, pulmonary หรือ extrapulmonary 110,797 ราย (ร้อยละ 30.19) รองลงมา คือ โรคปอดบวมจากเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* 73,094 ราย (ร้อยละ 19.92), Wasting syndrome (emaciation, slim disease) 70,909 ราย (ร้อยละ 19.32), Cryptococcosis 50,419 ราย (ร้อยละ 13.74) และ Candidiasis (trachea, bronchi) 17,862 ราย (ร้อยละ 4.87) (ดัดแปลงจาก สำนักระบาดวิทยา, 2553)

การติดต่อของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii*

รูปแบบของการติดต่อของเชื้อในมนุษย์ยังไม่รู้แน่ชัด แต่เชื่อว่าติดต่อผ่านทางอากาศเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ จากมนุษย์สู่มนุษย์ ไม่พบการติดต่อระหว่างสัตว์และมนุษย์ (zoonosis) มีการศึกษาจำนวนน้อยมากที่ตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ในสิ่งแวดล้อมภายนอกโฮสต์ จากตัวอย่างเชื้อในอากาศ (Wakefield, 1996) และในแหล่งน้ำจืด (Casanova – Cardiel and Leibowitz, 1997) ซึ่งมีบางการศึกษาที่สามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ในอากาศภายในห้องที่มีผู้ป่วยโรค PCP (Olsson et al., 1996, Bartlett et al., 1997) สอดคล้องกับการศึกษาแบบจำลองการติดเชื้อในสัตว์ทดลองที่แสดงให้เห็นว่าการติดต่อผ่านทางอากาศเป็นสาเหตุการติดเชื้อจากมนุษย์สู่มนุษย์ (Aliouat et al., 1997, Dei-Cas et al., 1998, Dumoulin et al., 2000, Hong et al., 1992, McFadden et al., 1991, Powles et al., 1992)

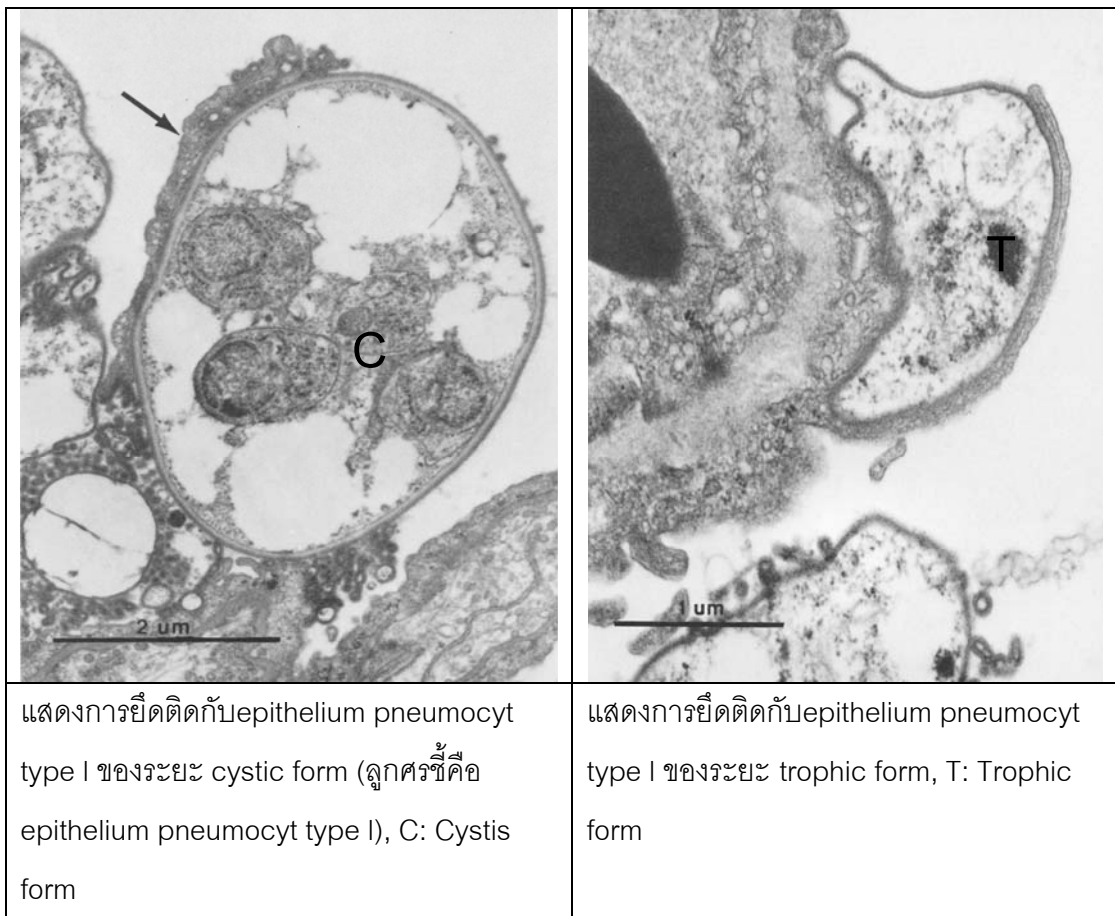
การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *Pneumocystis jirovecii*

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์เป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อ แต่ทำให้มีการอักเสบของปอดเพิ่มมากขึ้นโดยพบว่า alveolar macrophage และ CD4 T lymphocyte มีบทบาทสำคัญในการควบคุมและทำลายเชื้อ อย่างไรก็ตามการจับกินตัวเชื้อโดย macrophage จะไม่สามารถทำลายเชื้อได้โดยปราศจาก antibody ต่อ *Pneumocystis jirovecii* แม้ว่า complement อาจไม่มีผลในการทำลายเชื้อโดยตรงแต่อาจส่งเสริมให้เกิด phagocytosis และการสร้าง free-oxygen radical เพื่อทำลายเชื้อได้ดีขึ้น ผู้ป่วยที่เป็นโรคเอดส์มักเกิดภาวะแทรกซ้อนในปอดจากการติดเชื้อนี้เมื่อระดับ CD4 lymphocyte น้อยกว่า 200 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร เชื้อว่า interferon gamma ที่สร้างจาก activated CD4 เซลล์ จะกระตุ้น mononuclear cell และ macrophage ให้มีการทำลายเชื้อต่อไป สำหรับ interleukin 1 และ 6 มีผลต่อกระบวนการทำลายเชื้อได้เช่นกัน specific IgG และ IgA น่าจะมีบทบาทในการทำลายเชื้อเนื่องจาก antibody ที่จำเพาะดังกล่าวสามารถจับกับผนังเซลล์ในระยะ cystic form และ trophic form ของเชื้อได้เช่นกัน เกิดการอักเสบระหว่างปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันและเซลล์ที่เชื้อยึดติด เป็นผลทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปอด (diffuse alveolar damage) การแลกเปลี่ยนก๊าซผิดปกติ และเกิดภาวะหายใจล้มเหลว ความรุนแรงของการติดเชื้อมีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมากกว่าปริมาณเชื้อที่พบในปอด โดยพบว่าปริมาณ interleukin-8 (IL-8) และจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อ (Kongpolprom et al., unpublished data)

พยาธิกำเนิดและพยาธิสภาพ

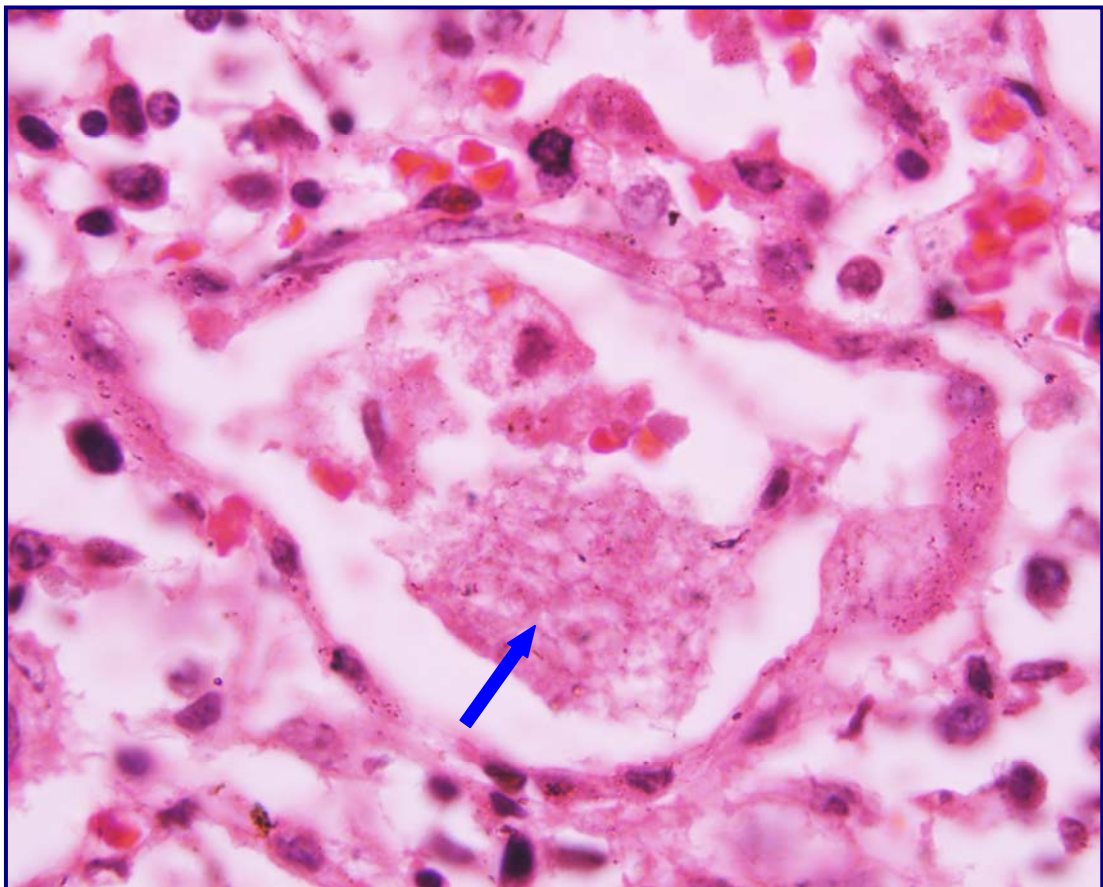
เนื่องจาก *Pneumocystis jirovecii* เป็นจุลชีพที่อาศัยอยู่นอกเซลล์ของโฮสต์มีเมทาบอลิซึมแบบใช้ออกซิเจน แม้ระยะต่าง ๆ ในวงจรชีวิตจะพบในปอดแต่อาศัยการเกาะติดกับเซลล์ของโฮสต์เท่านั้น ในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ trophic form หรือ cystic form จะเกาะติดกับ pneumocyte type I (Itatani and Marshall, 1988) (รูปที่7) ซึ่งเป็นเซลล์ที่บอบบาง ๆ อยู่นอกปอด เมื่อศึกษาภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบ filopodia ยึดติดกับ membrane ของเซลล์ปอด pneumocyte type I ดังนั้นตัวเชื่อน่าจะได้รับอาหารจากเซลล์ของโฮสต์โดยวิธีนี้ สำหรับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกาะติดดังกล่าวได้แก่ major surface glycoprotein (MSG) ที่มีขนาด 95-140 กิโลดาลตัน (kD) ของตัวเชื้อกับโปรตีนบนผิวของเซลล์โฮสต์ ได้แก่ laminin fibronectin และ fibrinogen ภายหลังการเกาะติดจะพบ vesicle จำนวนมากใน cytoplasm ของโฮสต์ใกล้กับบริเวณที่เกาะติด เชื่อว่ามีการขนส่งสารระหว่างตัวเชื้อและเซลล์ พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในระยะแรกจะพบการเพิ่มขึ้นของ alveolar-capillary membrane permeability ในส่วนที่มีการ

เกาะติดต่อมาจะเกิดการทำลายและหลุดลอกของเซลล์รอบ ๆ ถุงลมรวมทั้ง basement membrane ซึ่งอาจเกิดจากเอนไซม์ที่สร้างจากตัวเชื้อ ดังนั้นจึงมีภาวะการตอบสนองของโฮสต์ โดยพบ hypertrophy และ hyperplasia ของ pneumocyte type II ซึ่งเป็นเซลล์ที่จะพัฒนาต่อไปเป็น pneumocyte type I นอกจากนี้เชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ยังจับกับ hydrophilic surfactant proteins A (SP-A) และ D (SP-D) โดยอาศัย mannose moiety ใน major surface glycoprotein นอกจากนี้ยังทำให้องค์ประกอบของ surfactant เปลี่ยนไป ตลอดจนยับยั้งการขับสาร phosphatidylcholine จากเซลล์ pneumocyte type II

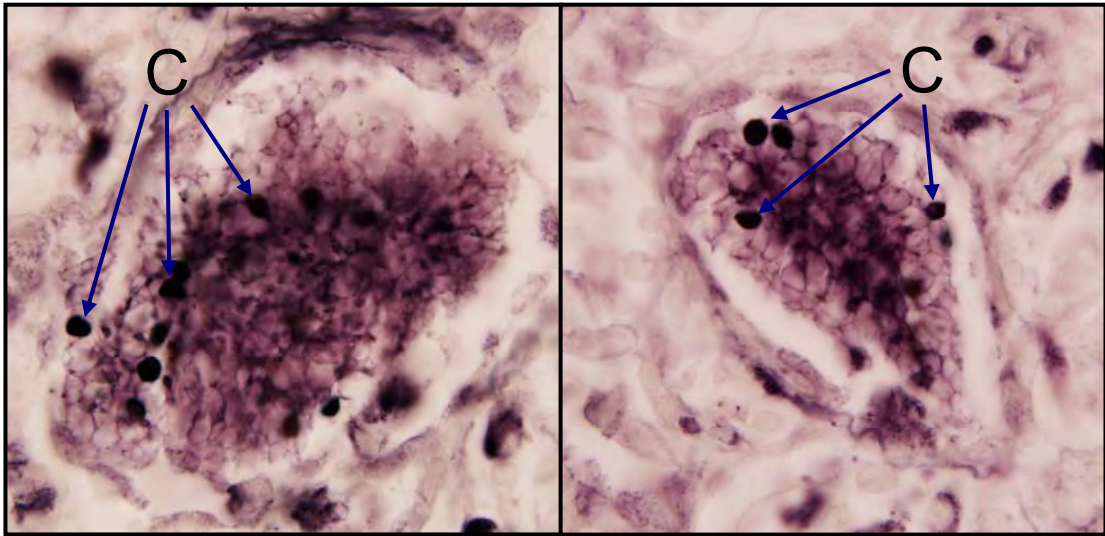


รูปที่ 7 แสดงการยึดติดของระยะ cystic form และ trophic form กับเซลล์ถุงลมปอด pneumocyt type I ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ดัดแปลงจาก Itatani and Marshall, 1988)

พยาธิสภาพในปอดจะพบการเพิ่มขึ้นของขนาดและน้ำหนักของปอด เยื่อหุ้มปอดจะหนาตัวกว่าปกติ ภาพตัดขวางของปอดจะพบว่าเป็นสีคล้ำ มีการหนาตัวของผนังกันปอดแต่จะกลับเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบการหนาตัวขึ้นของ interstitial tissues และพบการแทรกของเซลล์จำนวนมากส่วนใหญ่เป็น mononuclear cell และ plasma cell ผนังถุงลมหนาตัวขึ้นช่องว่างภายในถุงลมจะเต็มไปด้วย eosinophilic amorphous exudates ปนกับ histiocyte lymphocyte plasma cell และตัวเชื้อ (รูปที่8) เมื่อย้อมด้วยสี Gomori methenamine silver จะเห็นระยะ cystic form ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* อยู่ในถุงลมปอดเป็น foamy exudates (รูปที่9)



รูปที่ 8 ภาพตัดขวางของปอดแสดงพยาธิสภาพเมื่อย้อมด้วยสี Hematoxylin-Eosin จะเห็นภายในถุงลมเต็มไปด้วยสารน้ำที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาว eosinophilic exudates และตัวเชื้อรวมกันเป็นกลุ่มก้อน (ลูกศรสีน้ำเงิน) รวมเรียกว่า foamy exudates



รูปที่ 9 ภาพตัดขวางของปอดแสดงพยาธิสภาพเมื่อย้อมด้วยสี Gomori methenamine silver ภายในถุงลมจะเห็นระยะ cystic form (C) ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii*

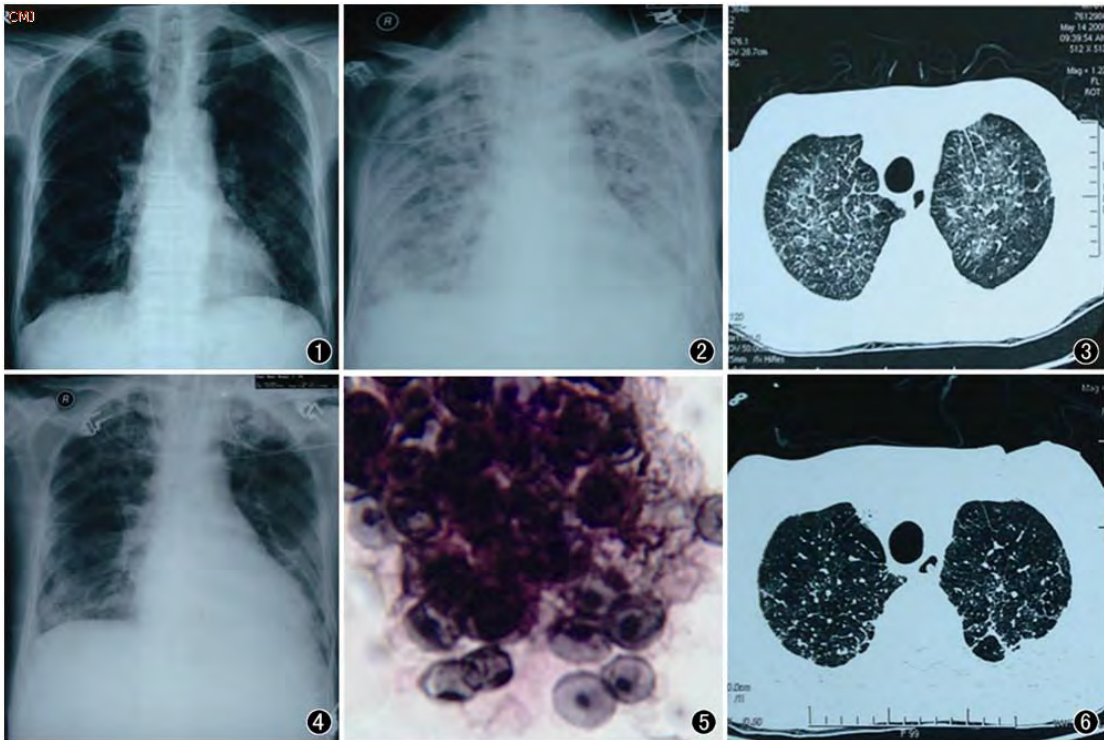
อาการและลักษณะแสดงทางคลินิก

อาการมักเกิดขึ้นค่อยเป็นค่อยไปและการดำเนินของโรคจะเกิดขึ้นช้า ๆ แต่อาจพบอาการปอดอักเสบเฉียบพลันและการดำเนินของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็วได้ในผู้ป่วยโรคเอดส์ ระยะพักตัวของโรคประมาณ 1-2 เดือน ผู้ป่วยจะมีอาการไอแห้ง ๆ ไม่มีเสมหะ จนในที่สุดจะเกิดสภาวะการหายใจล้มเหลว และอาการขาดออกซิเจน การฟังเสียงผิดปกติในปอดมักพบน้อยกว่าอาการของโรคซึ่งรุนแรงกว่า อาจมีไข้ต่ำ ๆ แต่ส่วนใหญ่มักไม่มีไข้ การตรวจเลือดจะพบปริมาณเม็ดเลือดขาวปกติหรือต่ำกว่าปกติเล็กน้อย ตลอดจนอาจพบปริมาณ eosinophil เพิ่มขึ้น สำหรับการติดเชื้อนอกปอดอาจพบอาการซีด ต่อม้ำเหลืองโต ตับและม้ามโต หรือพยาธิสภาพในอวัยวะอื่น ๆ ที่มีการติดเชื้อเช่น ในหูส่วนนอก เป็นต้น

ผู้ติดเชื้อ HIV เสี่ยงต่อการเกิดโรค PCP เมื่อระดับ CD4 ต่ำกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร อย่างไรก็ตามผู้ป่วยโรค AIDS ที่มีระดับ CD4 มากกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตรก็อาจเกิดโรค PCP ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่มีโรคเชื้อรา *Candida* ในปากมีไข้ไม่หายนานเกิน 2 สัปดาห์มีปริมาณ plasma HIV RNA load ในเลือดสูงหรือระดับ CD4 มีแนวโน้มที่จะลดลงอย่างรวดเร็ว ผู้ป่วยโรค PCP แทบทุกรายมีอาการทางระบบทางเดินหายใจเช่น ไอ ส่วนมากไอไม่มีเสมหะ หายใจหอบเหนื่อย อาการไอเป็นเลือดพบน้อยมาก อาการอื่นซึ่งไม่จำเพาะได้แก่ ไข้ อ่อนเพลีย น้ำหนักลด อาการดังกล่าวจะเป็นมากขึ้นเรื่อยๆ ในเวลาเป็นสัปดาห์ โดยเฉพาะผู้ป่วยมีอาการมา

ก่อนเฉลี่ยประมาณ 28 วันก่อนได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค PCP ต่างจากโรค PCP ในผู้ป่วย ภูมิคุ้มกันต่ำที่ไม่ได้ติดเชื้อ HIV ซึ่งมักมีอาการมาไม่นาน (เฉลี่ย 5 วัน) ก่อนได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค PCP

ผู้ป่วยโรค PCP ที่มาด้วยอาการไข้หนาวสั่นแบบเฉียบพลันพบได้ไม่บ่อย การตรวจร่างกาย อาจไม่พบความผิดปกติยกเว้นหายใจเร็ว หรือซีฟวรเด่นเร็ว อาจฟังได้แผ่วเบาที่ชายปอดทั้งสองข้างบางครั้งพบเชื้อรา *Candida* ในปากหรือ oral hairy leukoplakia ร่วมด้วย ภาพถ่ายรังสีทรวงอกปกติหรือก้ำกึ่งระหว่างปกติกับผิดปกติพบได้ร้อยละ 10 ถึง 39 ความผิดปกติของภาพถ่ายรังสีทรวงอกที่พบได้บ่อยที่สุดเป็น diffuse symmetrical interstitial infiltrates (รูปที่ 10) ที่พบน้อย ได้แก่ focal infiltrates, lobar consolidation, nodule (อาจมี cavity ร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้), pneumomediastinum, military infiltrates ส่วน apical infiltrates หรือ fibrocavitary PCP ซึ่งคล้ายวัณโรคปอดมักพบในผู้ป่วยที่ได้รับยา pentamidine ชนิดพ่น (aerosolized pentamidine) เพื่อป้องกันโรค PCP spontaneous pneumothorax พบได้ในผู้ป่วยที่เป็นโรค PCP ซ้ำหลายครั้ง ความผิดปกติของภาพถ่ายรังสีทรวงอกที่พบได้น้อยได้แก่ pneumatocele, mediastinal/hilar lymphadenopathy และน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด นอกจากนี้มีรายงานผู้ป่วยโรค PCP ที่มีภาพรังสีทรวงอกเป็น pleural-based masses ร่วมกับต่อมน้ำเหลืองที่ซั้วปอดโต การตรวจด้วย high resolution computerized tomography (HRCT) อาจมีประโยชน์ในรายที่ภาพถ่ายรังสีทรวงอกปกติ อย่างไรก็ตามมีรายงาน HRCT ปกติในผู้ป่วยโรค PCP ได้ การเปลี่ยนแปลงของภาพถ่ายรังสีทรวงอกอาจช้ากว่าการเปลี่ยนแปลงของอาการทางคลินิกไม่ว่าอาการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้นหรือเลวลง ในระยะแรกของการรักษาพบการเปลี่ยนแปลงของภาพถ่ายรังสีเลวลงได้บ่อย และในรายที่โรครุนแรงอาจมีการเปลี่ยนแปลงเป็น consolidation ได้ถ้าให้การรักษาเกิน 7-10 วันแล้วยังพบมีการเปลี่ยนแปลงของภาพรังสีที่เลวลงจะพิจารณาว่าการรักษาล้มเหลวระดับ serum lactate dehydrogenase (LDH) สูงพบได้บ่อยในผู้ป่วยโรค PCP มากกว่าปอดอักเสบจากการติดเชื้ออื่นแต่ไม่จำเพาะในการช่วยวินิจฉัยโรค PCP ร้อยละ 7 ของผู้ป่วยโรค PCP มีระดับ serum LDH ปกติระดับ LDH จะลดลงขณะที่ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น และจะสูงในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการเลวลง



รูปที่ 10 แสดงภาพถ่ายรังสีปอดในผู้ป่วยรายหนึ่งที่มีการติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ร่วมกับ chronic myelomonocytic leukemia ดังนี้ (Mu et al., 2009)

1. แสดงภาพถ่ายรังสีปอดปกติ (ยังไม่ติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii*)
2. แสดงภาพถ่ายรังสีปอดมีลักษณะเป็น diffuse symmetrical interstitial infiltrates
3. แสดงภาพถ่าย HRCT มีลักษณะเป็น diffuse ground glass
4. แสดงภาพถ่ายรังสีปอดมีลักษณะเป็น diffuse ground glass
5. แสดงระยะ cystic form ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* เมื่อย้อมด้วยสี Gomori methenamine silver จาก BAL
6. แสดงภาพถ่าย HRCT ภายหลังจากที่ได้รับการรักษาด้วยยา TMP-SMZ มีลักษณะการกระจายตัว diffuse ground glass ลดลงผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น

การตรวจ arterial blood gas โดยทั่วไปพบ P(A-a)O₂ เพิ่มขึ้น ส่วนค่า PaO₂ ขึ้นกับความรุนแรงของโรค ร้อยละ 25 ของผู้ป่วยอาจมีค่า PaO₂ มากกว่าหรือเท่ากับ 80 มิลลิเมตรของปรอท ในขณะที่หายใจอากาศธรรมดา P(A-a)O₂ ที่มากกว่า 29 หรือ PaO₂ ที่น้อยกว่า 71 มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี พบการติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* นอกปอดร้อยละ 13 (7 ใน 56 ราย) ส่วนใหญ่พบที่ต่อมน้ำเหลือง หู และที่ตาชั้น choroid การติดเชื้อที่อวัยวะอื่นได้แก่ ต่อมน้ำลาย ตับ ม้าม ต่อมนทรวงอก ไช้กระดูก กล้ามเนื้อ สมอง และเยื่อหุ้มสมอง ซึ่งทางเดินอาหารผู้ป่วย

อาจไม่มีโรค PCP ร่วมด้วยโดยเฉพาะผู้ป่วยโรค AIDS ที่ได้รับยา pentamidine ชนิดพ่นเพื่อป้องกันโรค PCP (เช็ดเกียรติ : ออนไลน์)

การรักษา

ยาที่ควรใช้เป็นอันดับแรก

Cotrimoxazole (trimethoprim-sufamethoxazole) (TMP-SMX) TMP 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันร่วมกับ SMX 75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน แบ่งให้วันละ 4 ครั้ง รับประทานหรือฉีดเข้าหลอดเลือดดำเป็นเวลา 21 วัน โดยแบ่งให้วันละ 3 ถึง 4 ครั้งถ้าผู้ป่วยทานยา Cotrimoxazole ไม่ได้เช่น แพ้มีฝุ่นขึ้นให้ใช้ยาอันดับรองต่อไปนี้

ยาที่เลือกใช้เป็นอันดับรอง

Clindamycin 600 มิลลิกรัม ฉีดเข้าหลอดเลือดดำทุก 8 ชั่วโมง หรือ 300 ถึง 450 มิลลิกรัม รับประทานทุก 6 ชั่วโมง และ primaquine 30 มิลลิกรัมต่อวัน รับประทานนาน 21 วัน หรือ TMP 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันหรือ 100 มิลลิกรัมต่อวันร่วมกับ dapsone 100 มิลลิกรัมต่อวัน รับประทานนาน 21 วัน หรือ pentamidine 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน หยอดเข้าหลอดเลือดดำในเวลา 60 นาทีหรือนานกว่า เป็นเวลา 21 วัน (มักให้ในรายที่อาการรุนแรง) (ตารางที่ 4) ผู้ติดเชื้อ HIV เกิดอาการไม่พึงประสงค์จาก TMP-SMX ได้บ่อยกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อ HIV ผลข้างเคียงของ TMP-SMX ที่พบบ่อยได้แก่ ฝุ่น (มักเกิดใน 7-14 วันหลังได้รับยา) ในรายที่แพ้ยา รุนแรงอาจเกิด Stevens Johnson syndrome, toxic epidermal necrolysis (TEN) หรือ exfoliative dermatitis ได้ผลข้างเคียงอื่น ๆ ได้แก่ ใช้ ระดับเอนไซม์ตับขึ้นสูง คลื่นไส้ อาเจียน โลหิตจาง เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำ ระดับ creatinine สูงขึ้นและ hyponatremia ผู้ป่วยร้อยละ 25 ถึง 50 ไม่สามารถทานยา TMP-SMX ได้และมักเกิดฝุ่นร่วมกับไข้ผลข้างเคียงของ dapsone ที่พบบ่อยได้แก่ ฝุ่น คัน ตับอักเสบ โลหิตจาง และหรือเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำ ที่สำคัญคือทำให้เกิดโลหิตจางจากเม็ดเลือดแดงมาก โดยผู้ป่วยขาด glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6-PD) หรือไม่มีก็ได้ ดังนั้นผู้ป่วยที่ขาด G6-PD ควรหลีกเลี่ยงการใช้ dapsone นอกจากนี้ dapsone ยังทำให้เกิด methemoglobinemia, agranulocytosis และ aplastic anemia ได้ TMP ทำให้ระดับยา dapsone เพิ่มขึ้น เมื่อให้ร่วมกันซึ่งอาจทำให้เกิด methemoglobinemia ได้ง่ายขึ้น ผู้ป่วยที่แพ้ TMP-SMX ไม่จำเป็นต้องแพ้ dapsone ด้วย Pentamidine มีผลข้างเคียงคือ ความดันโลหิตต่ำ ไตวาย ระดับโปแตสเซียมสูง ระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ ระดับน้ำตาลในเลือดสูง ตับอ่อนอักเสบ เม็ดเลือดขาวต่ำ เกร็ดเลือดต่ำ ตับอักเสบ ระดับแคลเซียมและแมกนีเซียมในเลือดต่ำ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และเบื่ออาหาร อาการไม่พึงประสงค์ที่สำคัญของ clindamycin คือ ฝุ่น คลื่นไส้ อาเจียน และท้องเสีย primaquine ทำให้ปวด

ต้องได้ลิ้นปี คลื่นไส้ อาเจียน และเกิด methemoglobinemia ได้ ควรหลีกเลี่ยงการใช้ clindamycin ร่วมกับ primaquine ในการรักษาผู้ป่วยที่ขาด G6-PD (เชิดเกียรติ : ออนไลน์)

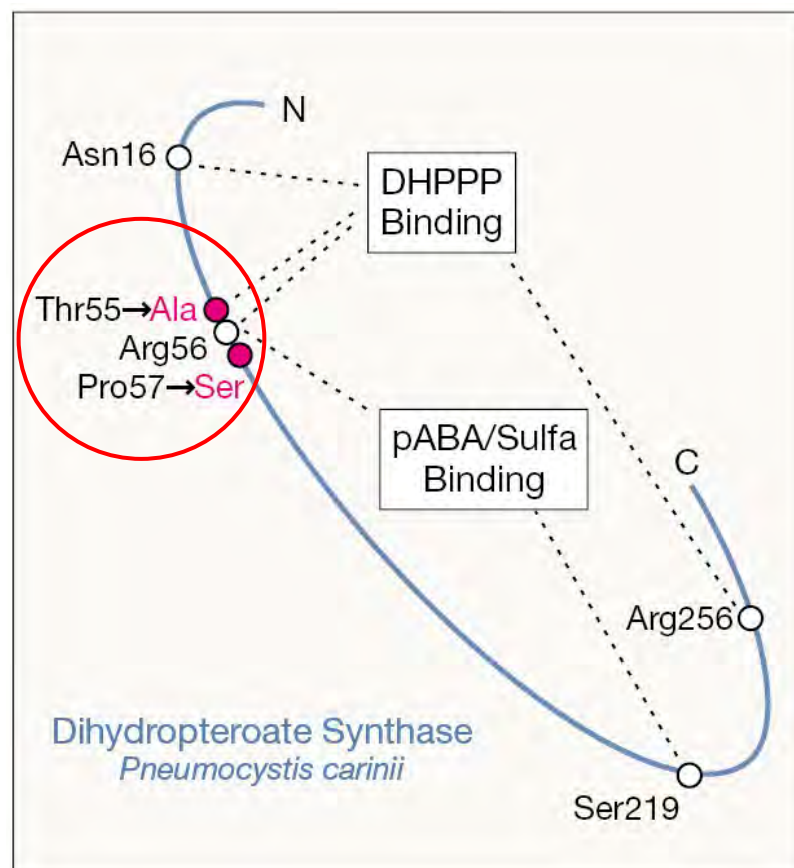
ผู้ป่วย PCP ที่มีอาการรุนแรง (PaO_2 ต่ำกว่า 70 มม.ปรอทหรือ A-a gradient มากกว่า 35 มม.ปรอทหรือ oxygen saturation น้อยกว่าร้อยละ 90 ขณะหายใจอากาศปกติ) ควรได้รับ corticosteroids ร่วมด้วย โดยให้ prednisolone 40 มิลลิกรัม รับประทานเช้า-เย็นนาน 5 วันแล้ว ลดเหลือ 40 มิลลิกรัมวันละครั้ง นาน 5 วัน ต่อด้วย 20 มิลลิกรัม วันละครั้งอีก 11 วัน โดยทั่วไป ผู้ป่วยตอบสนองต่อการรักษาดีถ้าให้การรักษาก่อนเกิดการหายใจวาย ถ้าผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษาภายใน 4 ถึง 5 วันในกรณีที่ได้ TMP-SMX หรือ ภายใน 5 ถึง 7 วันในกรณีที่ได้ pentamidine ให้นึกถึงภาวะอื่นร่วมด้วย เช่น การติดเชื้ออื่น (โดยเฉพาะเชื้อวัณโรคและ cytomegalovirus), fibrosis, adult respiratory distress syndrome, การแพ้ยา เป็นต้น มีรายงานการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของ dihydropteroate synthase (DHPS) gene (amino acid substitution ที่ codon 55 และ 57) ของ เชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ทำให้เชื้อดื้อต่อยา sulfamethoxazole และ dapsone ได้ มีรายงานผู้ป่วยที่เกิด PCP จากเชื้อที่ดื้อยามีอัตราการรอดชีวิตที่ 3 เดือนต่ำกว่าผู้ป่วยที่เกิด PCP จากเชื้อที่ไม่ดื้อยา แต่บางรายงาน ผู้ป่วยที่เกิด PCP จากเชื้อที่ไม่ดื้อยาตอบสนองต่อการรักษาไม่ต่างไปจาก PCP ที่ดื้อยา การให้ corticosteroids ร่วมด้วย ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็น PCP ชนิดรุนแรงโดยทั่วไปไม่ได้เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดผลแทรกซ้อน จากโรคติดเชื้ออวัยวะอื่นยกเว้นมีรายงานพบหลอดอาหารอักเสบจาก *Candida* เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ผู้ป่วยที่ได้รับ corticosteroids มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นและภาวะการหายใจยาลดลงในระยะเวลา 7 วันแรกของการรักษา (เชิดเกียรติ : ออนไลน์)

ตารางที่ 2 สรุปแนวทางในการใช้ยารักษาโรค PCP (Carmona and Limper, 2011)

PREFERRED OPTION		
Drug	Dose and route	Indications/other comments
TMP-SMX	15-20 mg/kg/day (TMP) 75-100 mg/kg/day (SMX) IV or oral In divided doses (3-4 times a day)	IV recommended in severe cases Oral for mild and moderate cases IV form can be switched to oral after clinical improvement Levels should be monitored
ALTERNATIVE REGIMENS		
Pentamidine	4 mg/kg/day IV or IM	Moderate to severe cases High incidence of toxicity
Primaquine + Clindamycin	30 mg/day orally + 600 mg/three times a day IV or oral	Mild to moderate cases Check for G6PD deficiency prior to the use of primaquine
Atovaquone	750 mg twice a day oral	Mild to moderate cases
TMP + Dapsone	5 mg/kg three times a day + 100 mg/day Oral	Mild to moderate case Methemoglobinemia with Dapsone
ADJUNCTIVE THERAPY		
Prednisone	40 mg twice a day for 5 days® 40 mg a day for 5 days® 20 mg a day for 11 days Oral	Moderate to severe cases Especially if hypoxemia PaO ₂ ≤70 or alveolar-arterial oxygen gradient ≥35 mmHg
<p>TMP-SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole; IV, intravenous; IM, intramuscular.</p> <p>Recommended duration of treatment is 21 days.</p>		

การดื้อต่อยาที่ใช้รักษาโรค PCP

ยาที่มีซัลฟาเป็นส่วนประกอบที่ใช้ในการรักษา และป้องกันการติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* นับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากนับตั้งแต่ทศวรรษที่ ค.ศ. 1970 เป็นต้นมา ซึ่งเป็นการใช้ตัวยาร่วมกันของสองอนุพันธ์ที่ยับยั้งในกระบวนการสร้างกรดโฟลิกของเชื้อ (sufamethoxazole และ trimethoprim) โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญสองตัวคือ DHPS และ DHFR จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า trimethoprim สามารถยับยั้งเชื้อ *Pneumocystis* ได้แต่การใช้เพียง trimethoprim เพียงตัวยาเดียวในการรักษายังมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในมนุษย์ การใช้ trimethoprim-sufamethoxazole ร่วมกันให้ผลการรักษา และป้องกันได้ดีกว่าที่จะให้ยาซัลฟาเพียงอย่างเดียว โดยที่ตัวยาจะไปยับยั้งเอนไซม์ DHPS ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารวมตัวของกรด para-aminobenzoic (pABA) และ 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate (DHPPP) จากการศึกษาพบว่าเชื้อดื้อยาซัลฟาเนื่องจากเกิดการผ่าเหล่าในตำแหน่งของ gene DHPS ทำให้เชื้อดื้อต่อยา sulfamethoxazole (รูปที่ 17) และการผ่าเหล่าในตำแหน่งของ gene DHFR ทำให้เชื้อดื้อต่อยา trimethoprim (Kovacs et al., 2001)



รูปที่ 11 แสดงตำแหน่งที่มีการผ่าเหล่าของ gene DHPS ทำให้เชื้อดื้อต่อยา sulfamethoxazole โดยที่มีการแทนตำแหน่งที่ 55 จาก Threonine เป็น Alanine และตำแหน่งที่ 57 จาก Proline เป็น Serine (วงกลมสีแดง) (ดัดแปลงจาก Achari et al., 1997)

การป้องกันโรค PCP

ในผู้ป่วยโรค AIDS หรือผู้ติดเชื้อ HIV วิธีที่ดีที่สุดคือการรับประทานยาต้านไวรัส เพื่อให้ระดับ CD4+ สูงมากขึ้น โดยมากกว่า 200 ขึ้นไป การรับประทานยา Cotrimoxazole ในผู้ป่วย AIDS ที่มี CD4+ น้อยกว่า 200 ก็มีผลช่วยในการป้องกันโรค PCP สำหรับผู้ที่เคยติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* หรือเคยเป็นโรค PCP จะต้องได้รับยา Cotrimoxazole เป็นเวลาต่อเนื่อง เพื่อป้องกันการกลับมาเป็นโรคซ้ำอีกครั้ง ควรปฏิบัติตัวให้ถูกสุขอนามัยเช่นสวมหน้ากากเมื่อต้องสัมผัสใกล้ชิดกับผู้ป่วยโรค PCP หรือในบริเวณที่มีผู้ป่วยโรค PCP เพื่อป้องกันการติดเชื้อต่อไป

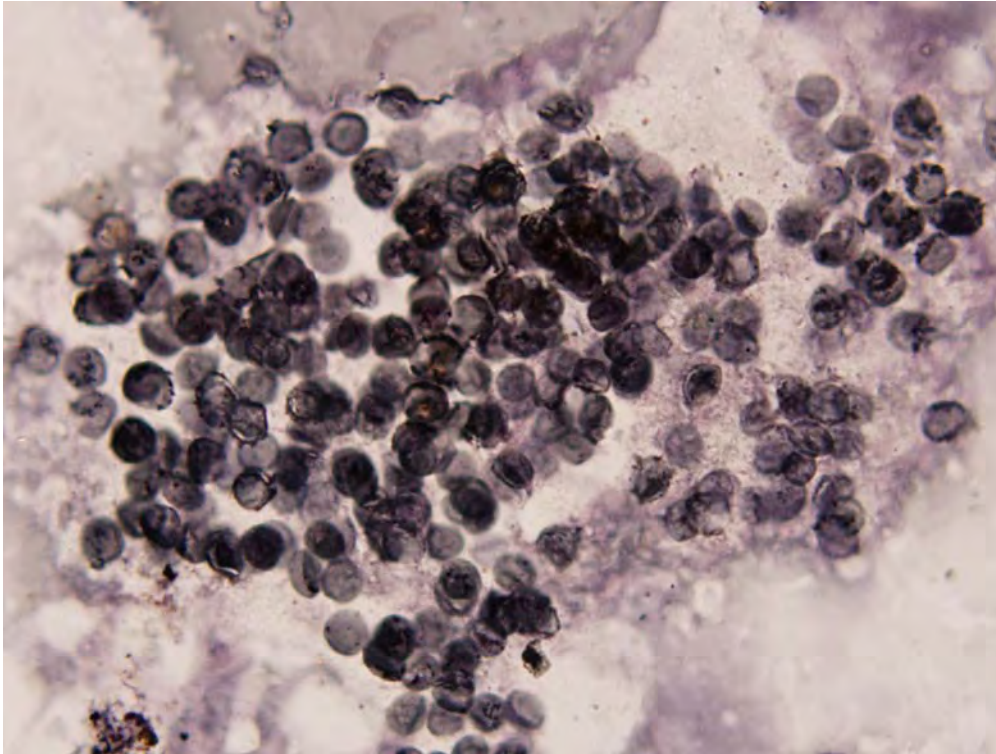
การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic detection)

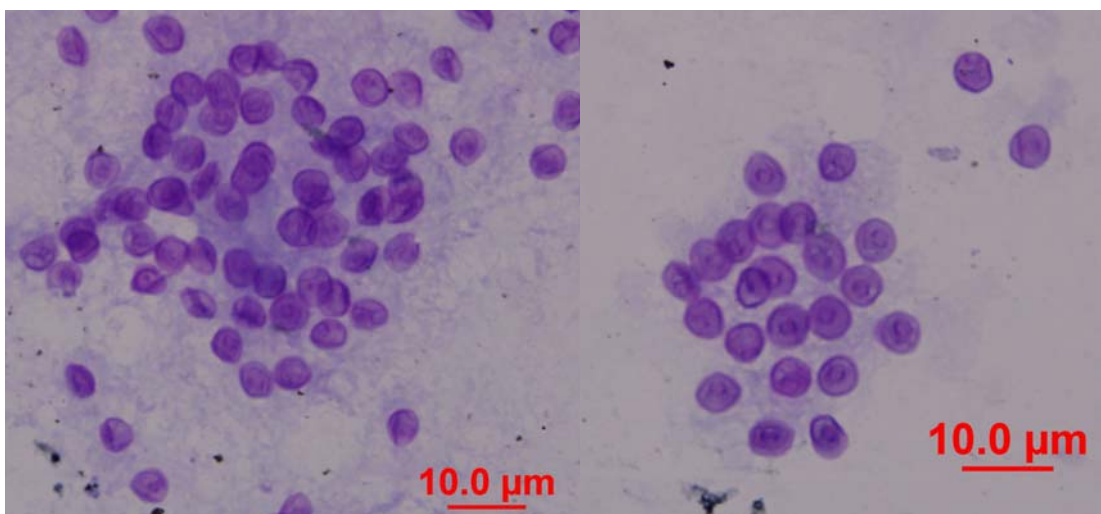
ในช่วงทศวรรษที่ ค.ศ. 1960 ถึงทศวรรษที่ ค.ศ. 1970 ได้มีการใช้วิธีการย้อมสีที่จำเพาะต่อระยะ cystic form ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* อย่างเช่น Gomori methenamine silver (รูปที่ 11), Gram-Weigert หรือ Toluidine blue O (รูปที่ 12) และสำหรับสี Giemsa (รูปที่ 13, 14) สามารถตรวจหาได้ทั้งระยะ trophic form และกลุ่มของ cystic form ได้ จำเป็นต้องอาศัยประสบการณ์ในการตรวจหาเชื้อ เนื่องจากตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยด้วยโรค PCP มักมีจำนวนระยะ cystic form น้อยหรือไม่พบ ทำให้มีโอกาสตรวจพบระยะ trophic form ได้มากกว่าแต่ระยะ trophic form นั้นวินิจฉัยได้ยากกว่าระยะ cystic form ต่อมาในช่วงแรกถึงกลางทศวรรษที่ ค.ศ. 1970 ได้มีการใช้วิธี transbronchial biopsy (TBB) และ BAL สำหรับตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ซึ่งตัวอย่างที่ได้มีความไวในการตรวจพบเชื้อที่ดีกว่า หลังจากนั้นมาในช่วงกลางทศวรรษที่ ค.ศ. 1980 ได้มีการใช้วิธีกระตุ้นเสมหะด้วยเครื่อง Ultrasonic nebulizer เพื่อเพิ่มปริมาณสารน้ำบนผิวเซลล์เยื่อในหลอดลมด้วยละอองน้ำเกลือเจือจาง (nebulized saline) ซึ่งสามารถเพิ่มความไวในการตรวจพบเชื้ออยู่ในช่วงร้อยละ 60 ถึงร้อยละ 95 เมื่อเทียบกับการเก็บเสมหะแบบเดิมที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (Masur et al., 1988) อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้มีโอกาสเกิดความไม่จำเพาะ (เกิดผลลบปลอมได้) และความไวของการทดสอบขึ้นอยู่กับ ชนิดของสิ่งส่งตรวจ และทักษะของผู้ทดสอบตัวอย่างเหล่านั้น

ในปี ค.ศ. 1986 monoclonal antibodies ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* (Kovacs et al., 1986) เป็นวิธีการย้อมเชื้อโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงจับกับแอนติเจนของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จะจับกันเป็นสารเชิงซ้อน (antigen-antibody complex) เรียกวิธีการนี้ว่า Immunofluorescence assay เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อมีเรืองแสงสีเขียวอมเหลือง สามารถตรวจพบได้ทั้งระยะ trophic form และระยะ cystic form (รูปที่ 15, 16) รวมทั้งมีความไวในการตรวจ

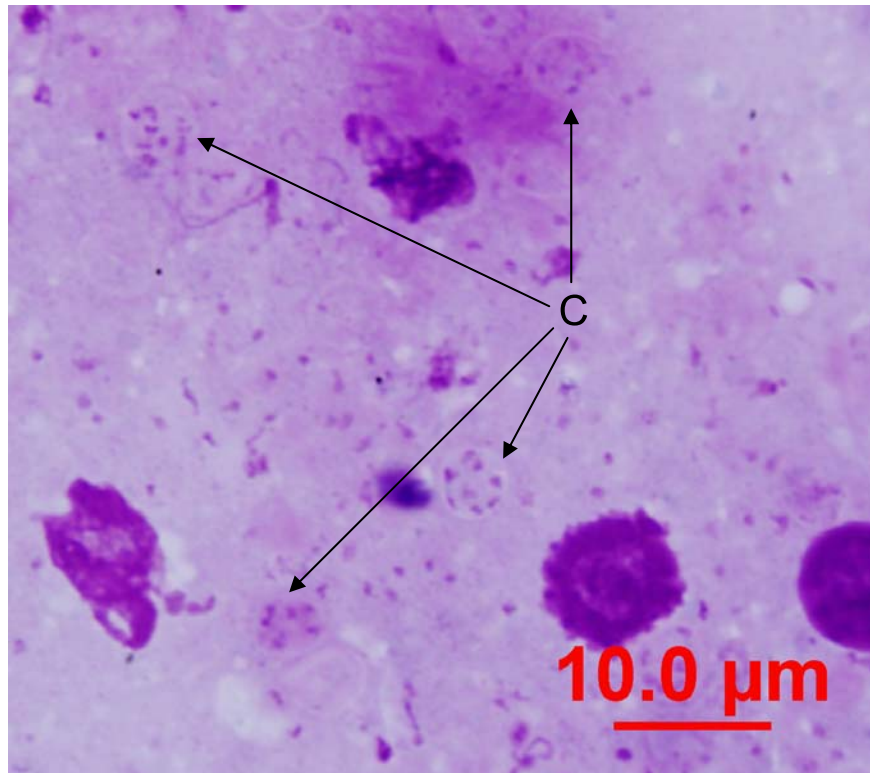
พบเชื้อและความจำเพาะต่อเชื้อสูง และใช้เวลาในการตรวจไม่เกิน 2 ชั่วโมง (Gill et al., 1987)
 อัตราการตรวจพบเชื้อจาก BAL และ induced sputum อาจลดลงในผู้ป่วยที่ได้รับยาพ่น
 pentamidine (Levine et al., 1991)



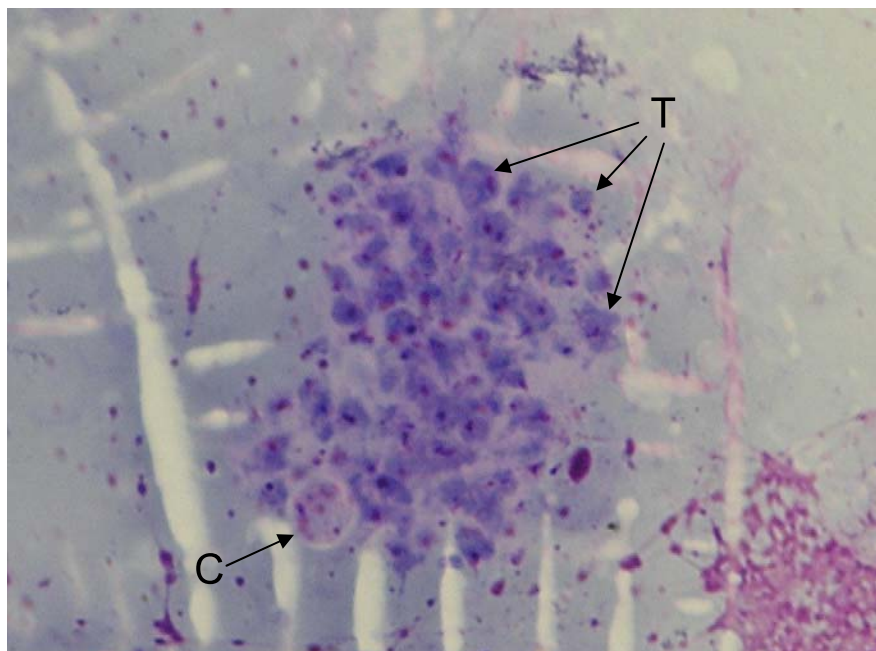
รูปที่ 12 แสดงเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ระยะ Cystic form เมื่อย้อมด้วยสี Gomori methenamine silver



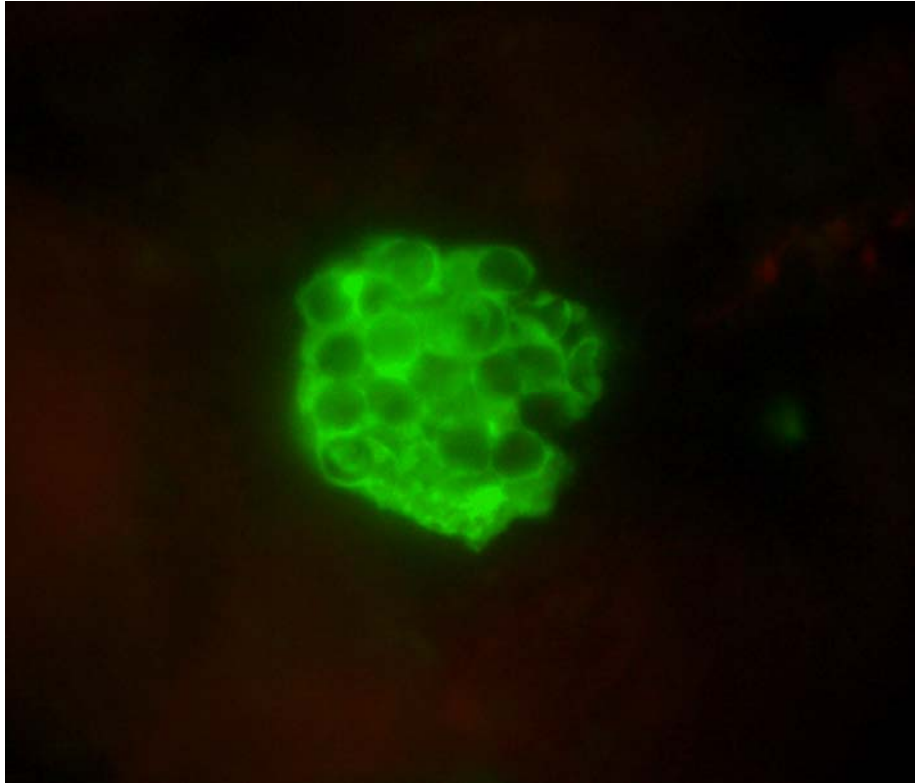
รูปที่ 13 แสดงเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ระยะ Cystic form เมื่อย้อมด้วยสี Toluidine blue O



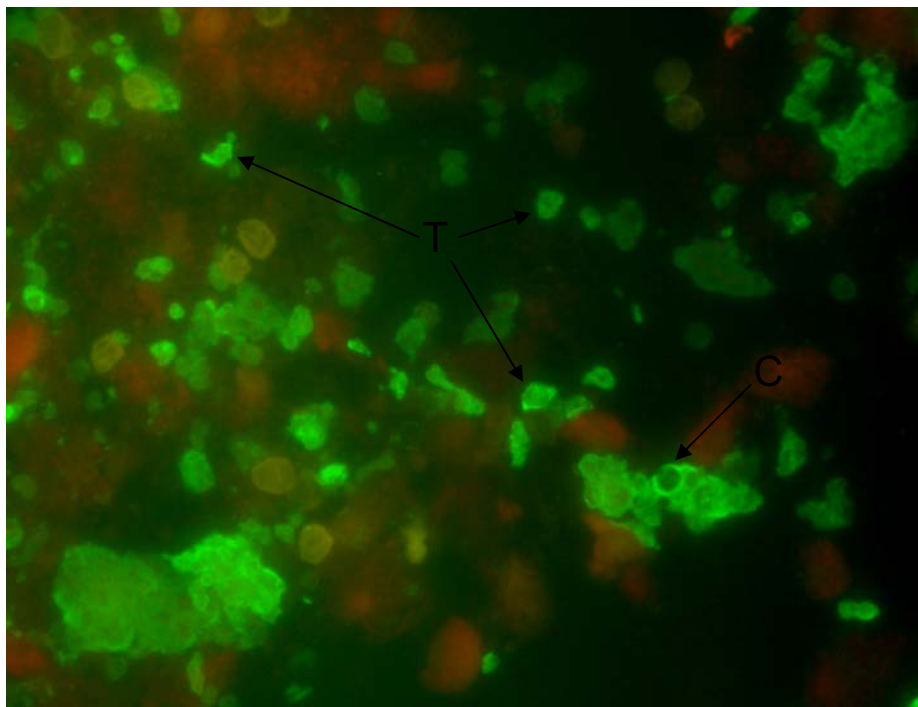
รูปที่ 14 แสดงเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ระยะ Cystic form เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa
C: Cystic form



รูปที่ 15 แสดงเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ระยะ Trophic form เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa
C: Cystic form, T: Trophic form



รูปที่ 16 แสดงเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ระยะเวลา Cystic form เมื่อย้อมด้วยวิธี IFA



รูปที่ 17 แสดงเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ระยะเวลา Trophic form เมื่อย้อมด้วยวิธี IFA

C: Cystic form, T: Trophic form

ปัจจุบันการวินิจฉัยโรค PCP จากผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อ HIV ซึ่งมีจำนวนเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ในสิ่งส่งตรวจน้อยทำให้ยากต่อการตรวจพบเชื้อ จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลซึ่งมีความไวในการตรวจพบมากกว่าวิธีการอื่นๆ ที่กล่าวมา อย่างไรก็ตามการตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากสิ่งส่งตรวจในระบบทางเดินหายใจเช่น เสมหะ หรือน้ำล้างปอด โดยการตรวจจากน้ำล้างปอดเป็นวิธีมาตรฐาน การตรวจหาเชื้อจากเสมหะมีความไวในการตรวจด้วยวิธีการย้อมสีต่ำกว่าวิธีการอื่น แต่ความไวในการตรวจสูงขึ้นมากด้วยวิธี PCR ทำให้ลดความเจ็บปวด และความเสี่ยงจากภาวะแทรกซ้อน รวมทั้งลดความจำเป็นของการส่งกล้องเพื่อวินิจฉัยได้ การตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากสิ่งส่งตรวจมีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่เชื่อมีการติดต่อยารักษา หรือตอบสนองต่อยารักษาช้า เพื่อยืนยันการติดเชื้อ และเป็นแนวทางในการรักษาโรค PCP ที่มีประสิทธิผลสูงสุด การตรวจหาเชื้อด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR detection)

การศึกษากการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดยวิธี PCR จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรคปอดอักเสบได้มีรายงานการศึกษาเป็นครั้งแรกโดย Wakefield (Wakefield et al., 1990) โดยการสกัด DNA จาก BAL ด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม และใช้ primer pAZ102-E กับ pAZ102-H จากตำแหน่งของยีนบน mitochondrial large subunit rRNA (mtLSU rRNA) สามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จาก BAL หลังจากนั้นมาได้มีรายงานการตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดยวิธี PCR อีกมากมายโดยการศึกษาทั้งจากตำแหน่งของยีนต่างๆ เช่น ITS, 18srRNA, mt LSU rRNA, mt SSU rRNA, TS, 5S rRNA, DHPS, DHFR, MSG เป็นต้น (Kitada et al., 1991, Lu et al., 1995, Olsson et al., 1993, Robberts et al., 2007) (ตารางที่ 2) ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา (BAL, sputum, lung biopsy, oral wash, oropharyngeal wash, blood, serum และ nasopharyngeal aspirates) การเปรียบเทียบวิธีการ PCR กับวิธีการย้อมสี (PCR : toluidine blue O : IFA, PCR : Giemsa:Gomori methenamine silver, PCR: IFA, PCR : giemsa : Gomori methenamine silver : Toluidine blue O) โดยวัดผล sensitivity และ specificity ที่ได้พบว่าวิธี PCR ให้ผล sensitivity สูงที่สุดและ specificity ก็มีความจำเพาะต่อเชื้อสูงเช่นกัน เมื่อเทียบกับการย้อมสีมีความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 100 แต่ความไวในการตรวจพบน้อยกว่าร้อยละ 60 (Flori et al.; 2004) ต่อมาได้มีการเปรียบเทียบวิธี PCR กับวิธี PCR แบบอื่นๆ (nested PCR, real-time PCR) (ตารางที่ 3) พบว่า nested PCR มี sensitivity ที่ดีกว่า single PCR แต่ specificity ต่ำกว่า single PCR ส่วน real-time PCR sensitivity จะต่ำกว่า nested PCR เล็กน้อยแต่จะให้ผล specificity ที่ดีกว่าเล็กน้อย

ตารางที่ 3 แสดง Primer ที่ใช้ในวิธี PCR

Primers		Sequences 5V- 3V	Size (bp.)	Reference
ITS				
Single	Pc1	ATTTATGGGTTTCAATGG	403	Olsson et al. (1993)
	Pc2	TGCAATATTAAGGGAAC		
First	1724F	AAGTTGATCAAATTTGGTC	550	Lu et al. (1995)
	ITS2R	CTCGGACGAGGATCCTCGCC		
Nested	ITS1F	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC		
	ITS2R1	GTTCAGCGGGTGATCCTGCCTG		
DHPS				
First	F1	CCTGGTATTAACCAGTTTTGCC	300	Lane et al. (1997)
	B45	CAATTTAATAAATTTCTTTCCAAATAGCATC		
Nested	A HUM	GCGCCTACACATATTATGGCCATTTAAATC		
	BN	GGAACCTTCAACTTGGAACCCAC		
DHPS				
Single	A HUM	GCGCCTACACATATTATGGCCATTTAAATC	750	Takahashi et al. (2000)
	B HUM	CATAAACATCATGAACCCG		
DHFR				
First	FR208	GCAGAAAGTAGGTACATTATTACGAGA	798	Ma et al. (1999)
	FR1038	AACCAGTTACCTAATCAAATATATTGC		
Nested	FR242	GTTTGGAATAGATTATGTTTCATGGTGTACG		
	FR1018	GCTTCAAACCTTGTGTAACGCG		
MSG				
seminested	JKK14	GAATGCAAATCCTTACAGACAACAG	249	Huang et al. (1999)
	JKK15	GAATGCAAATCTTTACAGACAACAG		
	JKK17	AAATCATGAACGAAATAACCATTGC		
mtLSUrRNA				
Single	pAZ102-E	GATGGCTGTTTCCAAGCCCA	346	Wakefield (1996)
	pAZ102-H	GTGTACGTTGCAAAGTACTC		
Nested	pAZ102-X	GTGAAATACAAATCGGACTAGG	260	
	PAZ102-Y	TCACTTAATTAATTGGGGAGC		
18S rRNA				
One-tube nested	Pc1	CCAGATTAGCTTTTGTGATCGCGGG	265	Mathis et al. (1997)
	Pc2	TTTACTTCCTCTAAATGACCAAATTTGATC		

Primers	Sequences 5V- 3V	Size (bp)	Reference
Pc5	CAGAGCCAGCAAGTTCATTTTC	120	Larsen et al. (2002) Kitada et al. (1991)
Pc6	CCAAATTTGATCAACTTTCCAG		
Real-time 5S F	AGTTACGGCCATACCTCAGA		
5S rRNA 5S R	AAAGCTACAGCACGTCGTAT		
Single 5S F	AGTTACGGCCATACCTCAGA		
5S R	AAAGCTACAGCACGTCGTAT		
Universal U1	CCAGCAGCCGCGGTAATACG	996	Lu et al. (2000)
U2	ATCGGTTACCTTGTACGACTTC		

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบ sensitivity และ specificity ของแต่ละวิธี PCR โดยใช้ตัวอย่าง BAL

Diagnostic values of PCR methods using BAL fluid			
Author (year)	Sample (n)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Single PCR			
Wakefield (1991)	51	95	96.8
Cartwright et al. (1994)	154	100	99.3
Roux et al. (1994)	132	86	98.7
Moonens et al. (1995)	43	100	96.7
Ribes et al. (1997)	129	100	79.3
Helweg-Larsen et al. (1998)	61	100	91
Caliendo et al. (1998)	112	100	97.9
Sing et al. (2000)	134	100	100
Takahashi et al. (2002)	81	100	80.7
Pinlaor et al. (2004)	21	100	90
Nested PCR			
Lipschik et al. (1992)	113	84.2	92.6
Atzori et al. (1995)	27	96	100
Skøt et al. (1995)	117	85	100
Rabodonirina et al. (1997)	127	100	77
Mathis et al. (1997)	312	96.5	97.8
Savoia et al. (1997)	128	91	93
Weig et al. (1997)	46	100	72.2

Agostoni et al. (2000)	146	100	76
Sing et al. (2000)	134	100	97.5
Torres et al. (2000)	47	100	86.2
Olsson et al. (2001)	34	87.5	58.3
Larsen et al. (2002)	49	94.7	63.4
Flori et al. (2004)	173	100	87
Real-time PCR			
Larsen et al. (2002)	49	84	93.4
Flori et al. (2004)	173	100	84.9

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบ sensitivity และ specificity ของแต่ละวิธี PCR โดยใช้ตัวอย่าง Sputum

Diagnostic values of PCR methods using Sputum			
Author (year)	Sample (n)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Single PCR			
Wakefield (1991)	37	90	94.1
Cartwright et al. (1994)	207	100	97.6
Chouaid et al. (1995)	49	100	100
Leibovitz et al. (1995)	84	75	92.1
Sing et al. (2000)	94	100	98.9
Nested PCR			
Lipschik et al. (1992)	71	100	92.6
Skøt et al. (1995)	33	69.2	95
Mathis et al. (1997)	403	91.7	98
Weig et al. (1997)	162	47.8	91.4
Caliendo et al. (1998)	120	95.5	93.9
Sing et al. (2000)	159	100	94.8
Olsson et al. (2001)	57	100	60

หลักการและวิธีปฏิบัติของการทดสอบที่ใช้การสกัด DNA จากการต้ม

เนื่องจากเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ เป็นผลให้ขาดแคลนวิธีวินิจฉัยที่เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) จึงเป็นโอกาสสำคัญในการหาแนวทางการวินิจฉัยที่ดีที่สุด การไม่มีข้อมูลทางเลือกของการวินิจฉัยที่มีค่าใช้จ่ายที่สมเหตุสมผลและการโต้แย้ง เรื่องปัญหาการดื้อยาบ่อยครั้ง การวินิจฉัยและการรักษาจึงมาจากประสบการณ์มากกว่าการทดลอง

จากข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมการสกัด DNA จากการต้มในเชื้อ malaria (Henning et al., 1998) ซึ่งเป็นเชื้อโปรโตซัวโดยการเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA จากการต้มกับวิธีอื่น ๆ อีก 3 วิธีคือ ฟีนอล คลอโรฟอร์ม QIAamp[®] blood kit และ template preparation dipstick ซึ่งได้ผลไม่แตกต่างกัน และจากการศึกษาในเชื้อ *Mycobacterium avium* (Sweeney et al., 2006) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA จากการต้มกับชุดสกัด DNA สำเร็จรูปและการใช้ตัวอย่างโดยตรงในการทำ PCR ผลที่ได้จากการสกัด DNA ทั้ง 2 วิธีจากการทำ PCR พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการใช้ตัวอย่างโดยตรงซึ่งให้ผลที่ต่ำกว่าอย่างชัดเจนและการสกัด DNA จากการต้มตัวอย่างเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (Afghani and Stutman, 1996) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA จากการต้มกับการสกัด DNA จากสารเคมีโดยเทียบ sensitivity ด้วยวิธี PCR และเทียบ specificity จากการเพาะเลี้ยง (culture) พบว่าวิธีการสกัด DNA จากการต้มให้ผลดีกว่าการสกัด DNA จากสารเคมีอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม การนำตัวอย่างที่เป็นเสมหะมาตรวจด้วยวิธีการ PCR โดยการใช้สารเคมีที่ใช้อยู่หรือทำละลายเมือก (mucolytic agent) ได้มีรายงานการศึกษาถึงผลการยับยั้งปฏิกิริยา PCR (Deneer, and Knight, 1994) ดังนั้นในการศึกษานี้จะทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA จากการต้ม และชุดสกัดสำเร็จรูปรวมทั้งการเลือกใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสพร้อมกับการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสม เพื่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* อันจะเป็นข้อมูลในการนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การศึกษาระยะเริ่มต้นเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเพื่อวินิจฉัยโรค (Diagnostic study)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการเตรียม DNA จากเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดยวิธีต้ม และชุดเตรียมสกัดสำเร็จรูป พร้อมทั้งเลือกยีนเป้าหมายและไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีย้อมสี Giemsa และ IFA จากผู้ป่วยติดเชื้อที่รับการวินิจฉัยจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือ ตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อ *Pneumocystis pneumonia* ได้แก่ น้ำล้างปอด และเสมหะ ที่มารับการตรวจรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

ประชากรตัวอย่าง (population sample) คือ กลุ่มตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด ที่เก็บมาจากประชากรเป้าหมาย

การตรวจฟิล์มแบบหนา (thick smear film) คือ การตรวจวินิจฉัยด้วยการย้อมสีตัวอย่างบนกระจกสไลด์ การย้อมลักษณะนี้จะมีปริมาณตัวอย่างมากกว่าฟิล์มแบบบาง ทำให้พบเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ได้ง่าย แต่การตรวจพบเชื้อ จำเป็นที่จะต้องปั่นเหวี่ยงเพื่อนำตะกอนมา ย้อม จะทำให้มีโอกาสพบเชื้อได้ง่ายขึ้น

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA เฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอนไซม์จำเพาะเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology)

สิ่งส่งตรวจที่ได้จากสารคัดหลั่งของผู้ป่วยที่เป็นโรคปอดอักเสบ (Pneumonia) ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีการเก็บข้อมูลของผู้ป่วยไว้แล้ว

Inclusion criteria

คือสิ่งส่งตรวจที่มีเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* และไม่มีเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากสารคัดหลั่งของผู้ป่วยที่เป็นโรคปอดอักเสบในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

Exclusion criteria

คือสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปอดอักเสบ

ขนาดของตัวอย่าง (Sample size)

จากการศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจ ซึ่งมีตัวอย่างทั้ง น้ำล้างปอด และเสมหะ ที่ได้จากผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 36 ตัวอย่าง

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ : ชนิดเครื่องมือและบริษัทผู้ผลิต

ชนิดเครื่องมือ

เครื่องให้ความร้อน (Heat block) รุ่น dry thermo unit

เครื่องปั่นตกสาร (Spin down)

เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

ไมโครปิเปต ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

เครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ

(PCR cycle รุ่น TP650)

เครื่องปั่นความเร็วสูง (Centrifuge) รุ่น MX-301

เครื่องซั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น FY-300

ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow)

เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอโดยกระแสไฟฟ้า

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง

(High pressure steam sterilizer รุ่น ES-315)

เครื่อง Molecular Image Gel Doc XR &

ChemiDoc XRS system

บริษัทผู้ผลิต

JAPAN

Prouge 6K, KOREA

EPPENDORF, U.S.A.

TAKARA, JAPAN

TOMY, JAPAN

DIETHELM&CO.,LTD, JAPAN

ENGLAND

MUPID-EXU, JAPAN

TOMY, JAPAN

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส	BRANDT, ENGLAND
ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส	PUFFER HUBBARD, U.S.A.
ตู้ป้อนเชื้อ (Incubator)	MEMMERT, GERMANY
อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ	MEMMERT, GERMANY
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	SCHOTT, GERMANY
เครื่องไมโครเวฟและแหล่งกำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต	
กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง	OLYMPUS, JAPAN
กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่มีแหล่งกำเนิดฟลูออเรสเซนต์	OLYMPUS, JAPAN
กล้องถ่ายภาพดิจิทัล	OLYMPUS, JAPAN

วัสดุและอุปกรณ์

บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100, 200, 500, 1000 มิลลิลิตร	
ปิเปตต์ทิพ (pipette tip) ขนาด 10, 100, 1000 ไมโครลิตร	
กระบอกตวง ขนาด 10, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร	
หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิด (microtube) ขนาด 0.1, 0.5, 1.5 มิลลิลิตร	
ที่ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เป็นพลาสติกทนความร้อนสำหรับวางแช่ในอ่างน้ำ	
หลอดทดลองพลาสติก (ficoll tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร	
กระจกสไลด์ ขนาด 2.5 x 7.5 เซนติเมตร	
กระจกสไลด์ชนิดหลายหลุม (glass 8-well multitest slide)	
ที่วางหลอดทดลอง สำหรับหลอดขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร	
กล่องโฟมใส่น้ำแข็ง	
กระดาษติดฉลาก	
กล่องพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง	
กล่องพลาสติกสำหรับเก็บสไลด์ตัวอย่าง	
ขวดสำหรับใส่สารเคมี	
ที่คีบ (forceps)	
นาฬิกาจับเวลา	
ถุงมือยางไม่มีแป้ง	
ถุงพลาสติก	
แท่งแก้วสำหรับคนสาร	
พาราฟิล์ม	

ปากกาเขียนเครื่องแก้ว

ข้อตักสารเคมีและกระดาษขึงสาร

แม่เหล็ก (magnetic) สำหรับผสมสาร

**เคมีภัณฑ์ : รายชื่อสารเคมีและแหล่งที่มา
ชื่อสารเคมี**

Acetone

Agarose powder

50 bp DNA ladder (Maker VI)

100 bp DNA ladder (Maker VI)

Bromophenol blue dye

Calcium chloride (molecular biology grade)

Dithiothreitol (DTT)

Ethanol (absolute)

Ethidium bromide solution

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

Giemsa stain

Glacial acetic acid

Hydrochloric acid concentration

Methanol (absolute)

Ethanol (absolute)

Permout

PNEUMO CEL

innuSPEED Tissue DNA Kit

Sodium Chloride

Taq DNA polymerase

Toluidine blue O

Tris Base (molecular biology grade)

Tris-EDTA buffer solution

Whatman 3M paper

Xylene

บริษัทผู้ผลิต

MERCK, GERMANY

1st BASE, SINGAPORE

FERMENTAS, U.S.A.

FERMENTAS, U.S.A.

PHARMACIA, SEWEDEN

SIGMA, U.S.A.

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

MERCK, GERMANY

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

PROMEGA, U.S.A.

MERCK, GERMANY

MERCK, GERMANY

MERCK, GERMANY

MERCK, GERMANY

MERCK, GERMANY

MERCK, GERMANY

Cellabs, AUSTRALIA

Analytik jena, GERMANY

SIGMA, GERMANY

FERMENTAS, U.S.A.

MERCK, GERMANY

PROMEGA, U.S.A.

FLUKA, SWITZERLAND

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

MERCK, GERMANY

Oligonucleotide primers

mt LSU rRNA

pAZ102H : 5'- GTGTACGTTGCAAAGTACTC -3'

pAZ102E : 5'- GATGGCTGTTTCCAAGCCCA -3'

pAZ102X : 5'- GTGAAATACAAATCGGGCTAGG -3'

pAZ102Y : 5'- CACTTAATATTAATTGGGGAGC -3'

DHFR

PJDHFRF0 : 5'- ATCTGGTTTGCTAGTTACTCG -3'

PJDHFRR0 : 5'- CGATTTAACCTTGAATGTTCC -3'

PJDHFRF1 : 5'- TCTAGGCCTCTTAAGAATCG -3'

PJDHFRR1 : 5'- ACCTATAACAAAGACTCGATT -3'

การเก็บตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด

ตัวอย่างเสมหะได้จากผู้ป่วยโรคปอดอักเสบที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 36 ตัวอย่าง ซึ่งทำการเก็บตัวอย่าง เสมหะโดยใช้วิธีบ้วนหรือไอออกมา และน้ำล้างปอดโดยแพทย์ของผู้ป่วยปริมาตร 2 มิลลิลิตร เก็บ ในหลอดพลาสติกที่มีฝาปิดมิดชิดขนาด 15 มิลลิลิตร นำแต่ละตัวอย่างมาทำการตรวจวินิจฉัยโดย นำตัวอย่างมาละลายด้วยสาร Dithiothreitol (DTT) ดูดใส่หลอด microtube แบ่งเป็น 4 หลอดทั้ง 2 ชนิดตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ ต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ ดังกล่าวเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศา เซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานทางคลินิก ได้แก่ เพศ อายุ ภูมิฐานะ ประวัติการติดเชื้อ HIV และการรักษาผู้ป่วย

การเตรียมตัวอย่างย้อมสี (Cytochemical staining)

นำตะกอนที่ได้หลอดที่ 1 มาเกลี่ยลงบนกระจกสไลด์ (smear) จำนวน 4 แผ่นเพื่อ เตรียมการย้อมฟิล์มชนิดหนา ด้วยสี Giemsa และสี Toluidine blue O เพื่อตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังนี้

การย้อมสี Giemsa

นำสไลด์ที่ smear แห้งแล้วนำไป fixed ด้วย Absolute Methanol เป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้สไลด์แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำมาย้อมสี Giemsa ที่มีอัตราส่วนต่อ Buffer pH 7.2 เป็น 1:20 เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำเปล่าทิ้งไว้ให้แห้งและนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การย้อมสี Toluidine blue O

สไลด์ที่ smear แห้งแล้วนำไปแช่ในกรด (45 มิลลิลิตร Glacial acetic acid รวมกับ 15 มิลลิลิตรของ Hydrochloric acid) เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำ (running water) 5 นาที นำไปแช่ในสี Toluidine blue O ที่เตรียมไว้เป็นเวลา 3 นาที จุ่มล้างสไลด์ใน Absolute Ethanol 3 ถึง 5 ครั้ง 2 รอบ ทิ้งไว้ให้แห้ง และนำมา mount slide ด้วยน้ำยา permount ทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay (IFA)

นำตะกอนที่ได้หลอดที่ 2 มา smear ลงใน glass 8-well multitest slide ประมาณ 10 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไป fixed ด้วย Acetone เป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้แห้งจึงนำมาย้อม IFA โดยใช้ PNEUMO CEL (Cellabs) มีขั้นตอนดังนี้

1. เติม RP1 ลงบนหลุมสไลด์ 10-15 ไมโครลิตร ให้คลุมทั่วตัวอย่าง
2. นำสไลด์ใส่ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้น และมีฝาปิดสนิทนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยไม่ปล่อยให้สไลด์แห้ง
3. นำสไลด์มาล้างในภาชนะที่บรรจุด้วย PBS โดยเขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1-2 นาที
4. นำสไลด์ขึ้นมาซับน้ำบริเวณรอบๆ หลุมออกด้วยกระดาษชำระ
5. เติม RMF ลงบนหลุมสไลด์และปิด cover slip โดยให้มีฟองอากาศ
6. นำสไลด์ไปตรวจสอบด้วยกล้อง fluorescence ที่กำลังขยาย 40x และ 100x
7. เชื้อ PCP จะแสดงผลเป็นสีเขียวอ่อน (apple-green fluorescence) โดย cystis form มีรูปร่างกลม ผนังหนา และพบ pleomorphic form เป็นจุดสีแดงอมน้ำตาล
8. ถ่ายรูปตัวอย่างและเก็บสไลด์ไว้ในกล่องที่มีความชื้นและมีมืด ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาไว้ได้ประมาณ 1 เดือน

การสกัด DNA จากเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วย innuSPEED Tissue DNA Kit

นำตะกอนที่ได้หลอดที่ 3 มาสกัด DNA (รหัส KS= Kit Sputum และ KB= Kit BAL) ด้วย innuSPEED Tissue DNA Kit ทำตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังต่อไปนี้

1. นำเสมหะปริมาณ 50 ถึง 100 ไมโครลิตร มาเติม TLS บัฟเฟอร์ปริมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
2. เติม proteinase K ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยผสมทุก ๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าเสมหะจะแตกตัว
3. เติม TBS binding solution ปริมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน (vortex)
4. ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดจากข้อ 3 ใส่ลงใน innuSPEED Spin Column
5. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงนำ innuSPEED Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่
6. เติม HS 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยน receiver tube หลอดใหม่
7. เติม MS 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยน receiver tube หลอดใหม่
8. นำไปปั่นด้วยความเร็วสูงสุด 2 นาที และย้าย spin filter ไปยัง elution tube
9. เติม elution buffer 50 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
10. ดูด DNA ที่ได้เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดกลาง 0.5 มิลลิลิตร นำ DNA ที่สกัดได้ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแม่แบบ สำหรับทำ PCR ต่อไป

การสกัด DNA จากเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วยวิธีการต้ม (Boiling DNA extraction)

ทำการทดสอบหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับสกัด DNA โดยวิธีการต้มใน 3 ช่วงเวลาการเตรียม DNA ดังนี้ 30 นาที, 60 นาที และ 90 นาที โดยใช้ตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด อย่างละ 10 ตัวอย่าง โดยที่ตัวอย่างที่นำมาทดสอบให้ผลการตรวจพบเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์จากวิธีการย้อมสี (Giemsa, Toluidine blue O) และวิธี IFA ด้วยวิธี PCR ทำการทดสอบซ้ำอีกครั้ง

นำตะกอนที่ได้หลอดที่ 4 สำหรับสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการต้ม (รหัส BS= Boil Sputum และ BB= Boil BAL) ปริมาณ 50 ไมโครลิตรเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและ spin down นำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90 -100 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 60 นาที นำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ไว้สำหรับขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) ต่อไป

ข้อควรระวัง ในกรณีที่ตัวอย่างมีเลือดปนอยู่ จะต้องทำการปั่นล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ถึง 2 รอบที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดเมื่อโดนความร้อน

การเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

Sequence ที่ใช้เป็น Reference strain mt LSU rRNA คือ Accession number AF337535

Sequence ที่ใช้เป็น Reference strain DHFR คือ Accession number DQ269975

ยีนที่ทำการศึกษาคือ mitochondrial subunit ribosomal RNA gene (mt LSU rRNA)

และ dihydrofolate reductase gene (DHFR)

ไพรเมอร์อ้างอิงจากงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ในตำแหน่ง mt LSU rRNA คือ

ไพรเมอร์คู่นอก Forward primer pAZ102H : 5'- GTGTACGTTGCAAAGTACTC -3'

Reverse primer pAZ102E : 5'- GATGGCTGTTTCCAAGCCCA -3'

Size 347 bp

ไพรเมอร์คู่ใน Forward primer pAZ102X : 5'- GTGAAATACAAATCGGGCTAGG -3'

Reverse primer pAZ102Y : 5'- CACTTAATATTAATTGGGGAGC -3'

Size 252 bp

นำ DNA ที่สกัดไว้มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับทำ PCR โดยจะต้องใช้องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ในปริมาณสารละลายสุทธิ 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

DNA แม่แบบ (รอบแรก)	3.00	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ทั้ง forward และ reverse อย่างละ (pAZ102H และ pAZ102E)	0.0975	ไมโครลิตร
10X PCR Buffer	1.5	ไมโครลิตร
MgCl ₂	1.2	ไมโครลิตร
dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์	1.2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.075	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	7.53	ไมโครลิตร

นำหลอดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยสภาวะที่เหมาะสมคือ ทำให้ DNA แยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.10 นาที การทำให้ primer จับกับสาย DNA แม่แบบ (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.10 นาที และการสังเคราะห์สาย DNA (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.10 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นนำ PCR products ที่ได้นำไปตรวจหาผลผลิต PCR และทำ PCR รอบที่ 2 โดยจะต้องใช้องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ใน ปริมาณสารละลายสุทธิ 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

DNA แม่แบบ (รอบสอง)	2.00	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ทั้ง forward และ reverse อย่างละ (pAZ102X และ pAZ102Y)	0.0975	ไมโครลิตร
10X PCR Buffer	1.5	ไมโครลิตร
MgCl ₂	1.2	ไมโครลิตร
dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์	1.2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.075	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	7.53	ไมโครลิตร

นำหลอดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยสภาวะที่เหมาะสมคือ ทำให้ DNA แยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.50 นาที การทำให้ primer จับกับสาย DNA แม่แบบ (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.50 นาที และการสังเคราะห์สาย DNA (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.00 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นนำ PCR products ที่ได้นำไปตรวจหาผลผลิต PCR

ไพรเมอร์อ้างอิงจากงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ในตำแหน่ง DHFR คือ

ไพรเมอร์คู่นอก Forward primer PJDHFRF0 : 5'- ATCTGGTTTGCTAGTTACTCG -3'

Reverse primer PJDHFRR0 : 5'- CGATTTAACCTTGAATGTTCC -3'

Size 342 bp

ไพรเมอร์คู่ใน Forward primer PJDHFRF1 : 5'- TCTAGGCCTCTTAAGAATCG -3'

Reverse primer PJDHFRR1 : 5'- ACCTATAACAAAGACTCGATT -3'

Size 210 bp

นำ DNA ที่สกัดไว้มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับทำ PCR โดยจะต้องใช้องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ในปริมาณสารละลายสุทธิ 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

DNA แม่แบบ (รอบแรก)	3.00	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ทั้ง forward และ reverse อย่างละ (PJDHFRF0, R0)	0.0975	ไมโครลิตร
10X PCR Buffer	1.5	ไมโครลิตร
MgCl ₂	1.2	ไมโครลิตร
dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์	1.2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.075	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	7.53	ไมโครลิตร

นำหลอดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยสภาวะที่เหมาะสมคือ ทำให้ DNA แยกสาย ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.30 นาที การทำให้ primer จับกับสาย DNA แม่แบบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.30 นาทีและการสังเคราะห์สาย DNA ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.00 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นนำ PCR products ที่ได้นำไปตรวจหาผลผลิต PCR และทำ PCR รอบที่ 2

DNA แม่แบบ (รอบสอง)	2.00	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ทั้ง forward และ reverse อย่างละ (PJDHFRF1, R1)	0.0975	ไมโครลิตร
10X PCR Buffer	1.5	ไมโครลิตร
MgCl ₂	1.2	ไมโครลิตร
dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์	1.2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.075	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	7.53	ไมโครลิตร

นำหลอดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยสภาวะที่เหมาะสมคือ ทำให้ DNA แยกสาย ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.30 นาที การทำให้ primer จับกับสาย DNA แม่แบบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.30 นาทีและการสังเคราะห์สาย DNA ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.00 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ จากนั้นนำ PCR products ที่ได้นำไปตรวจหาผลผลิต PCR

การตรวจผลผลิต PCR โดยวิธี gel electrophoresis

ทำการเตรียม agarose gel ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยชั่งผง agarose 2 กรัม ละลายใน 1X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดแล้วเขย่าให้ agarose เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ agarose ไปเทลงใน gel chamber ที่เตรียมไว้ ใส่ comb แล้วทิ้งไว้จนอะกาโรสแข็งตัว ค่อย ๆ ดึง comb ออก โดยดึงปลายทั้งสองข้างออกพร้อมกัน ระวังอย่าให้เจลแตกหรือฉีกขาด ทำการเติม 1X TBE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ใน electrophoresis chamber นำผลผลิต PCR ที่ได้ผสมกับ loading dye ปริมาตรประมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในหลุมเจล และใช้ marker VI เป็น DNA บอกขนาดเพื่อใช้เปรียบ เทียบขนาดกับผลผลิต PCR ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 ถึง 40 นาที หลังจากนั้นนำ agarose gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 10 ถึง 15 นาที นำไปตรวจดูการเรืองแสงของแถบ DNA ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตและถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบ DNA โดยเปรียบเทียบกับ DNA บอกขนาด

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพได้แก่ เพศ อายุ ประวัติการติดเชื้อ HIVหรือเป็นโรค AIDS ค่า CD4+ การรักษาด้วยยา Bactrim การติดเชื้อร่วมกับเชื้ออื่น และสถานะผู้ป่วย วิเคราะห์ข้อมูลในรูปเปอร์เซ็นต์คำนวณเป็นร้อยละ
2. เปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธีการย้อมสีเปรียบเทียบกับวิธี PCR
3. วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของวิธีการเตรียม DNA และไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์คำนวณเป็นร้อยละ

บทที่ 4

ผลการการวิจัย

ลักษณะทั่วไป และข้อมูลทางคลินิกของประชากรตัวอย่าง

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจสำหรับการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนทั้งหมด 36 ราย โดยแต่ละรายมีทั้ง ตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด ซึ่งได้รับการวินิจฉัยเป็นโรค PCP จากผู้ติดเชื้อ HIV/AIDS ที่มีอาการทางคลินิก และภาพรังสีปอดที่เข้าเกณฑ์ปอดติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ซึ่งเป็น ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรค *Pneumocystis pneumonia* แผนกโรคปอด โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ เอื้อเฟื้อโดย แพทย์หญิง ฌับผลิกา กองพลพรหม และตัวอย่างสิ่งส่งตรวจได้อยู่ในช่วง ปี พ.ศ. 2549 ถึงปี พ.ศ. 2552 โดยตัวอย่างผู้ป่วยเพศชาย 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 47.22 และเพศ หญิงจำนวน 19 ราย คิดเป็นร้อยละ 52.78 ประชากรที่ศึกษามีอายุตั้งแต่ 19-65 ปี โดยมีอายุเฉลี่ย 36 ปี ประชากรที่ศึกษาเป็นผู้ติดเชื้อ HIV ทั้งหมด 36 ราย คิดเป็นร้อยละ 100 โดยผู้ติดเชื้อ HIV ที่มีค่า CD4+ น้อยกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตรมีจำนวน 35 ราย คิดเป็นร้อยละ 96.4 มีประวัติการรักษาด้วยยา Co-trimoxazole 36 ราย คิดเป็นร้อยละ 100 นอกจากนี้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ยังมี การติดเชื้ออื่นหรือโรคอื่นร่วม ได้แก่ Tuberculosis จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 13.89, Hepatitis B virus จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.56, Hepatitis C virus จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.56, Cytomegalovirus จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.33 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคปอดอักเสบ (PCP)

	Range	mean	n	%
age	19-65 years	36 years		
sex				
male			17	47.22
female			19	52.78
Underlying illness				
HIV with PCP			36	100
Other infection				
Tuberculosis			5	13.89
Hepatitis B virus			2	5.56
Hepatitis C virus			2	5.56
Cytomegalovirus			3	8.33
Antimicrobial prophylaxis				
Co-trimoxazole			36	100
CD4+ lymphocyte	1-442 cells/ μ l	54.9 cells/ μ l		
> 200 cells/ μ l			1	3.6
\leq 200 cells/ μ l			35	96.4

ผลการตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการศึกษานี้พบว่า การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการย้อมสี Giemsa จากตัวอย่างเสมหะตรวจพบเชื้อ 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 22.2 และน้ำล้างปอด 32 ราย คิดเป็นร้อยละ 88.9 สำหรับวิธีการย้อมสี Toluidine blue O จากตัวอย่างเสมหะตรวจพบเชื้อ 20 ราย คิดเป็นร้อยละ 55.6 และน้ำล้างปอด 33 ราย คิดเป็นร้อยละ 91.7 และวิธี IFA จากตัวอย่างเสมหะตรวจพบเชื้อ 31 ราย คิดเป็นร้อยละ 86.1 และน้ำล้างปอด 35 ราย คิดเป็นร้อยละ 97.2 จากผลการศึกษานี้พบว่าวิธี IFA จากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดมีความไวในการตรวจพบเชื้อสูงกว่าวิธีการย้อมสีอื่น (ตารางที่ 7-8)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความไวการตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างเสมหะ ภายใต้อากาศจลทรรศน์ (n=36)

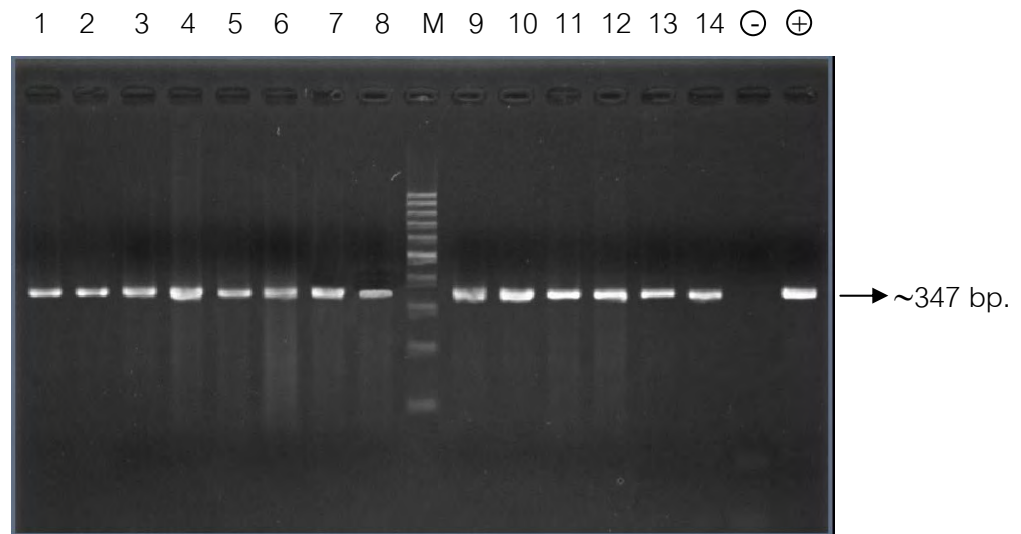
ผลการวินิจฉัย	Giemsa	Tuoludine blue O	IFA
Positive	8 ราย (22.2%)	20 ราย (55.6%)	31 ราย (86.1%)
Negative	28 ราย (77.8%)	16 ราย (44.4%)	5 ราย (13.9%)

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบความไวการตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างน้ำล้างปอดภายใต้อากาศจลทรรศน์ (n=36)

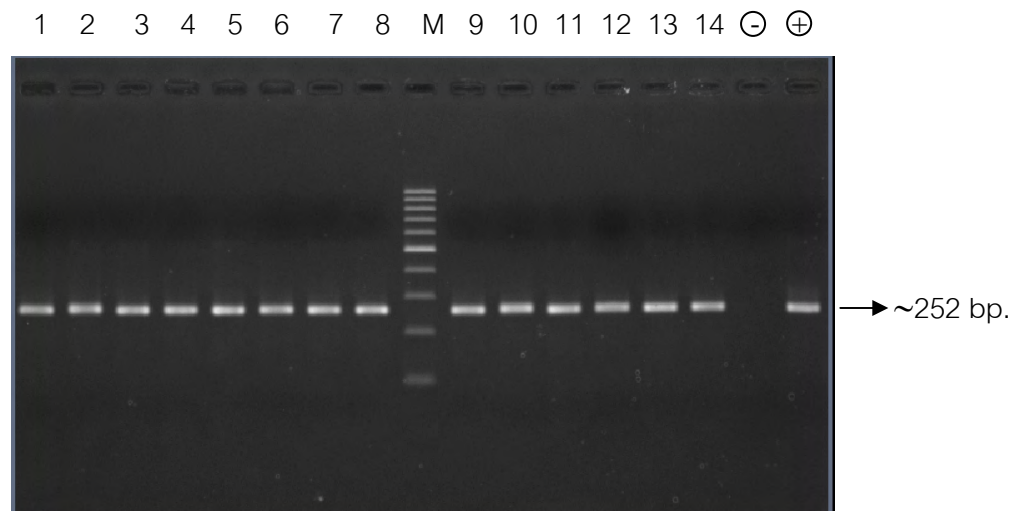
ผลการวินิจฉัย	Giemsa	Tuoludine blue O	IFA
Positive	32 ราย (88.9%)	33 ราย (91.7%)	35 ราย (97.2%)
Negative	4 ราย (11.1%)	3 ราย (8.3%)	1 ราย (2.8%)

ผลการตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วยวิธี PCR

จากการศึกษาพบว่า การเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของยีน mt LSU rRNA โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากการทำ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* สามารถวิเคราะห์ผลผลิต PCR จากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด ในแต่ละตัวอย่างได้ทั้งหมด 36 ตัวอย่าง ทำการตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานบอกขนาดคือ 100 bp. ladder พบว่าให้ผล PCR บวกของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากไพรเมอร์คู่นอก pAZ102H และ pAZ102E มีขนาดประมาณ 347 bp. ดังแสดงในรูปที่ 19 และไพรเมอร์คู่ใน pAZ102X และ pAZ102Y ซึ่งมีขนาดประมาณ 252 bp. ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 18 แสดงผลผลิต PCR รอบแรกของตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วยไพรเมอร์ pAZ102H และ pAZ102E ในส่วนของยีน mt LSU rRNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วย 2 % agarose gel electrophoresis โดย 1-3, 5-6, 8-9 = ตัวอย่างเสมหะ และ 4, 7, 10 -14 = ตัวอย่างน้ำล้างปอด โดยที่ M = 100 bp. ladder ⊖ = Negative control ⊕ = Positive control M = DNA Ladder มาตรฐาน 100 bp.



รูปที่ 19 แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองของตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วยไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y ในส่วนของยีน mt LSU rRNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วย 2 % agarose gel electrophoresis โดย 1-3, 5-6, 8-9 = ตัวอย่างเสมหะ และ 4, 7, 10 -14 = ตัวอย่างน้ำล้างปอด โดยที่ M = 100 bp. ladder ⊖ = Negative control ⊕ = Positive control M = DNA ladder มาตรฐาน 100 bp.

ผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วยวิธี PCR ในตำแหน่งของยีน mt LSU rRNA จากตัวอย่างเสมหะ โดยวิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป (KS) มีอัตราการพบเชื้อในรอบแรกด้วยไพรเมอร์ pAZ102H และ pAZ102E คิดเป็นร้อยละ 94.44 (34 ตัวอย่าง จาก 36 ตัวอย่าง) และมีอัตราการพบเชื้อเพิ่มขึ้นในรอบที่สองด้วยไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y เป็นร้อยละ 100 (36 ตัวอย่างจาก 36 ตัวอย่าง) ในส่วนของตัวอย่างน้ำล้างปอด ผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วยวิธี PCR ในรอบแรกจากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป (KB) มีอัตราการพบเชื้อในรอบแรกด้วยไพรเมอร์ pAZ102H และ pAZ102E คิดเป็นร้อยละ 100 (36 ตัวอย่างจาก 36 ตัวอย่าง) และมีอัตราการพบเชื้อในรอบที่สองด้วยไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y เป็นร้อยละ 100 (36 ตัวอย่างจาก 36 ตัวอย่าง) (ตารางที่ 9)

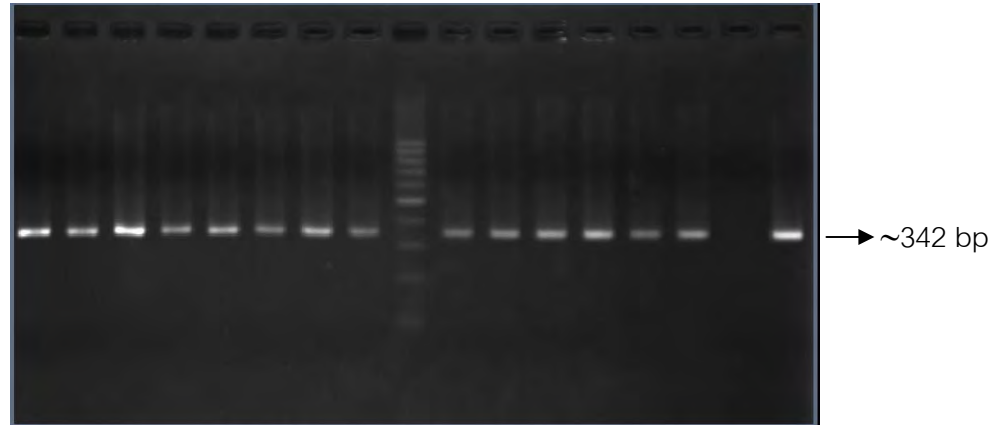
ตารางที่ 9 แสดงผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ในตำแหน่งของยีน mt LSU rRNA โดยวิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปจากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด

	mtLSU rRNA primer	
Kit Sputum (KS)	pAZ102H, pAZ102E (รอบแรก)	pAZ102X, pAZ102Y (รอบสอง)
Positive	34 (94.44 %)	36 (100 %)
Negative	2 (5.56 %)	0
รวม	36	36
	mtLSU rRNA primer	
Kit BAL (KB)	pAZ102H, pAZ102E (รอบแรก)	pAZ102X, pAZ102Y (รอบสอง)
Positive	36 (100 %)	36 (100 %)
Negative	0	0
รวม	36	36

สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของยีน DHFR โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จากการทำ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด ในแต่ละตัวอย่างจำนวน 36 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานบอกขนาดคือ 100 bp ladder พบว่าเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากไพรเมอร์คู่นอก

PJDHFRF0, R0 มีขนาดประมาณ 342 bp ดังแสดงในรูปที่ 23 และไพรเมอร์คู่ใน PJDHFRF1, R1 มีขนาดประมาณ 210 bp ดังแสดงในรูปที่ 24

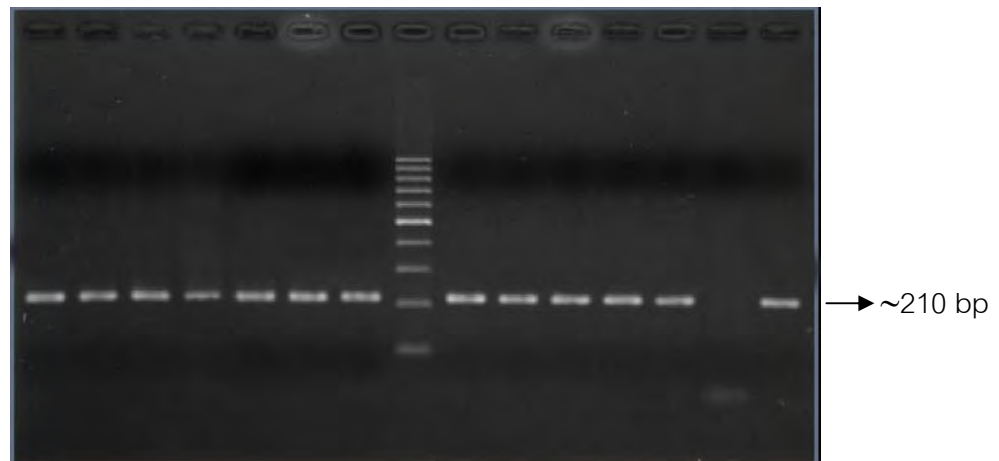
1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 ⊖ ⊕



รูปที่ 20 แสดงผลผลิต PCR รอบแรกของตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วยไพรเมอร์ PJDHFRF0, R0 ในส่วนของยีน DHFR ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดย 4, 5, 7, 11 และ 14 = ตัวอย่างเสมหะ และ 1-3, 6, 8-10, 12-14 = ตัวอย่างน้ำล้างปอด โดยที่ M = 100 bp ladder

⊖ = Negative control ⊕ = Positive control

1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 ⊖ ⊕



รูปที่ 21 แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองของตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดด้วยไพรเมอร์ PJDHFRF1, R1 ในส่วนของยีน DHFR ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดย 1-7 = ตัวอย่างเสมหะ 8-12 = ตัวอย่างน้ำล้างปอด โดยที่ M = 100 bp ladder ⊖ = Negative control ⊕ = Positive control

ผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วยวิธี PCR ในตำแหน่งของยีน DHFR จากตัวอย่างเสมหะ พบว่าวิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป (KS) มีอัตราการพบเชื้อในรอบแรกด้วยไพรเมอร์ PJDHFRF0 และ PJDHFRR0 คิดเป็นร้อยละ 77.78 (28 ตัวอย่างจาก 36 ตัวอย่าง) และในรอบที่สองมีอัตราการพบเชื้อเพิ่มขึ้นด้วยไพรเมอร์ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1 คิดเป็นร้อยละ 94.44 (34 ตัวอย่างจาก 36 ตัวอย่าง) ในส่วนของตัวอย่างน้ำล้างปอด ผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วยวิธี PCR ในรอบแรก จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป (KB) มีอัตราการพบเชื้อในรอบแรกด้วยไพรเมอร์ PJDHFRF0 และ PJDHFRR0 คิดเป็นร้อยละ 97.22 (35 ตัวอย่างจาก 36 ตัวอย่าง) และมีการพบเชื้อเพิ่มขึ้นในรอบที่สองด้วยไพรเมอร์ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1 คิดเป็นร้อยละ 100 (36 ตัวอย่างจาก 36 ตัวอย่าง) (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 แสดงผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ในตำแหน่งของยีน DHFR โดยวิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปจากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด

DHFR primer		
Kit Sputum (KS)	PJDHFRF0, R0 (รอบแรก)	PJDHFRF1, R1 (รอบสอง)
Positive	28 (77.78 %)	34 (94.44 %)
Negative	8 (22.22 %)	2 (5.56 %)
รวม	36	36
DHFR primer		
Kit BAL (KB)	PJDHFRF0, R0 (รอบแรก)	PJDHFRF1, R1 (รอบสอง)
Positive	35 (97.22 %)	36 (100 %)
Negative	1 (2.78 %)	0
รวม	36	36

เปรียบเทียบความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในวิธี PCR

จากผลการศึกษานี้พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างเสมหะ โดยวิธีการเตรียม DNA ด้วยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปจากไพรเมอร์ pAZ102H และ pAZ102E ในปฏิกิริยา PCR รอบแรกที่มีร้อยละ 94.44 (34 ตัวอย่าง) เปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างเสมหะ โดยวิธีการเตรียม DNA ด้วยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปจากไพรเมอร์ PJDHFRF0 และ PJDHFRR0 ในปฏิกิริยา PCR รอบแรกที่มีร้อยละ 77.78 (28 ตัวอย่าง) ซึ่งผลของไพรเมอร์ pAZ102H และ pAZ102E ให้ผลการตรวจพบมากกว่าไพรเมอร์ PJDHFRF0 และ PJDHFRR0 6 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 16.67 และให้ผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y ในปฏิกิริยา PCR รอบสองที่มีร้อยละ 100 (36 ตัวอย่าง) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างเสมหะ โดยวิธีการเตรียม DNA ด้วยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปจากไพรเมอร์ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1 ในปฏิกิริยา PCR รอบสองที่มีร้อยละ 94.44 (34 ตัวอย่าง) โดยจากไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y ให้ผลการตรวจพบมากกว่าไพรเมอร์ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1 2 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 5.56 (ตารางที่ 11)

สำหรับจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างน้ำล้างปอด โดยวิธีการเตรียม DNA ด้วยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป จากไพรเมอร์ pAZ102H และ pAZ102E ในปฏิกิริยา PCR รอบแรกที่มีร้อยละ 100 (36 ตัวอย่าง) เปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างเสมหะ โดยวิธีการเตรียม DNA ด้วยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป จากไพรเมอร์ PJDHFRF0 และ PJDHFRR0 ในปฏิกิริยา PCR รอบแรกที่มีร้อยละ 97.22 (35 ตัวอย่าง) โดยไพรเมอร์ pAZ102H และ pAZ102E ให้ผลการตรวจพบมากกว่าไพรเมอร์ PJDHFRF0 และ PJDHFRR0 1 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 2.78 และให้ผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y ในปฏิกิริยา PCR รอบสองที่มีร้อยละ 100 (36 ตัวอย่าง) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างเสมหะ โดยวิธีการเตรียม DNA ด้วยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป จากไพรเมอร์ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1 ในปฏิกิริยา PCR รอบสองที่มีร้อยละ 100 (36 ตัวอย่าง) โดยให้ผลการตรวจพบไม่แตกต่างกันในปฏิกิริยา PCR รอบสอง (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงผลการเปรียบเทียบการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด จำนวน 36 ตัวอย่าง ด้วย 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในวิธี PCR

PCR รอบแรก		PCR รอบสอง	
Kit Sputum	Positive	Kit Sputum	Positive
pAZ102H, E	34 (94.44 %)	pAZ102X, Y	36 (100 %)
DHFRF0, RO	28 (77.78 %)	DHFRF1, R1	34 (94.44 %)
ผลต่าง	6 (16.67 %)	ผลต่าง	2 (5.56 %)
Kit BAL	Positive	Kit BAL	Positive
pAZ102H, E	36 (100 %)	pAZ102X, Y	36 (100 %)
DHFRF0, RO	35 (97.22 %)	DHFRF1, R1	36 (100 %)
ผลต่าง	1 (2.78 %)	ผลต่าง	0

เปรียบเทียบความไวของวิธีการเตรียม DNA โดยวิธีการต้ม

ผลการเปรียบเทียบวิธีการเตรียม DNA โดยวิธีการต้มใน 3 ช่วงเวลา (30, 60, 90 นาที) เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับวิธีการเตรียม DNA โดยวิธีการต้ม ซึ่งผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างเสมหะ 10 ตัวอย่างพบว่า ช่วงเวลา 60 นาทีให้ผลการตรวจพบสูงสุด 7 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 70 (ตารางที่ 12) และผลการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างน้ำล้างปอดจำนวน 10 ตัวอย่างพบว่าช่วงเวลา 60 นาทีให้ผลการตรวจพบสูงสุด 10 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 100 (ตารางที่ 13) ซึ่งทำการทดสอบซ้ำ สามารถให้ผลดังเดิม

ตารางที่ 12 แสดงผลความไวในการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดยวิธี PCR จากวิธีการเตรียม DNA ด้วยวิธีการต้ม 3 ช่วงเวลา จากตัวอย่างเสมหะ จำนวน 10 ตัวอย่าง รายงานผลเป็นจำนวน และคำนวณเป็นร้อยละ

PCR (n = 36)	Boiling time (minutes)		
	30	60	90
Positive	5 (50%)	7 (70%)	4 (40%)
Negative	5 (50%)	3 (30%)	6 (60%)

ตารางที่ 13 แสดงผลความไวในการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดยวิธี PCR จากวิธีการเตรียม DNA ด้วยวิธีการต้ม 3 ช่วงเวลา จากตัวอย่างน้ำล้างปอด จำนวน 10 ตัวอย่าง รายงานผลเป็นจำนวน และคำนวณเป็นร้อยละ

PCR (n = 36)	Boiling time (minutes)		
	30	60	90
Positive	8 (80%)	10 (100%)	7 (70%)
Negative	2 (20%)	0	3 (30%)

เปรียบเทียบวิธีการเตรียม DNA โดยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป และวิธีการเตรียม DNA โดยวิธีการต้ม ด้วยวิธี PCR

ผลจากการเปรียบเทียบ 2 วิธีในการเตรียม DNA จากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด จำนวนตัวอย่างละ 36 ตัวอย่าง พบว่าวิธีการเตรียม DNA โดยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปให้ผลการตรวจพบด้วยไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y ในปฏิกิริยา PCR รอบสองจากตัวอย่างเสมหะที่ร้อยละ 100 (36 ตัวอย่าง) และน้ำล้างปอดที่ร้อยละ 100 (36 ตัวอย่าง) โดยผลการตรวจพบด้วยไพรเมอร์ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1 ในปฏิกิริยา PCR รอบสองจากตัวอย่างเสมหะที่ร้อยละ

94.4 (34 ตัวอย่าง) และน้ำล้างปอดที่ร้อยละ 100 (36 ตัวอย่าง) สำหรับวิธีการเตรียม DNA โดยวิธีการต้มให้ผลการตรวจพบด้วยไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y ในปฏิกิริยา PCR รอบสอง จากตัวอย่างเสมหะที่ร้อยละ 66.7 (24 ตัวอย่าง) และน้ำล้างปอดที่ร้อยละ 100 (36 ตัวอย่าง) โดยผลการตรวจพบด้วยไพรเมอร์ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1 ในปฏิกิริยา PCR รอบที่สองจากตัวอย่างเสมหะที่ร้อยละ 38.9 (14 ตัวอย่าง) และน้ำล้างปอดที่ร้อยละ 94.4 (34 ตัวอย่าง) (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 แสดงผลบวกการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วย 2 วิธี PCR จากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด

Target gene	Sputum		BAL	
	Commercial Kit	Boil	Commercial Kit	Boil
mt LSU rRNA PCR	36 (100%)	24 (66.7%)	36 (100%)	36 (100%)
DHFR PCR	34 (94.4%)	14 (38.9%)	36 (100%)	34 (94.4%)

เปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธี PCR โดยการเตรียม DNA ด้วยวิธีการต้ม กับชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป

ผลการศึกษาเปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ในตำแหน่งของยีน mt LSU rRNA จากตัวอย่างเสมหะ (36 ตัวอย่าง) โดยวิธีการเตรียม DNA ทั้งสองแบบพบว่าวิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปมีค่าความไวในการตรวจพบคิดเป็นร้อยละ 100 และค่าความจำเพาะคิดเป็นร้อยละ 0 (ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นผู้ติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ทั้งหมด) โดยวิธีการเตรียม DNA ด้วยวิธีการต้มมีค่าความไวในการตรวจพบคิดเป็นร้อยละ 66.67 และค่าความจำเพาะคิดเป็นร้อยละ 0 เช่นกัน (ตารางที่ 15)

สำหรับผลการศึกษาเปรียบเทียบความไว และความจำเพาะของวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ในตำแหน่งของยีน mt LSU rRNA จากตัวอย่างน้ำล้างปอด (36 ตัวอย่าง) โดยวิธีการเตรียม DNA ทั้งสองแบบพบว่าวิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปมีค่าความไวในการตรวจพบคิดเป็นร้อยละ 100 ค่าความจำเพาะคิดเป็นร้อยละ 0 (ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นผู้ติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ทั้งหมด) โดยวิธีการเตรียม DNA ด้วยวิธีการต้มมีค่าความไวในการตรวจพบคิดเป็นร้อยละ 100 ค่าความจำเพาะคิดเป็นร้อยละ 0 เช่นกัน (ตารางที่ 16) เมื่อคิดเป็น

อัตราส่วนของผลบวกจากวิธีพีซีอาร์เมื่อใช้ดีเอ็นเอจากเสมหะ และน้ำล้างปอดที่เตรียมโดยวิธีการต้มต่อดีเอ็นเอที่เตรียมจากชุดเตรียมดีเอ็นเอสำเร็จรูปมีค่า 0.67 และ 1.0 ตามลำดับ

ตารางที่ 15 แสดงผลความไว และความจำเพาะ ของการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ในตำแหน่งของยีน mt LSU rRNA จากตัวอย่างเสมหะ

mt LSU rRNA PCR(N=36)		Boil Sputum			Sensitivity, Specificity (%)
		Positive	Negative	Total	
Kit Sputum	Positive	24 a	12 c	36	Sens.=100
	Negative	0 b	0 d	0	Spec.=0
	Total	24	12		
mt LSU rRNA PCR (N=36)		Kit Sputum			Sensitivity, Specificity (%)
		Positive	Negative	Total	
Boil Sputum	Positive	24 a	0 c	24	Sens.=66.67
	Negative	12 b	0 d	12	Spec.=0
	Total	36	0		

Sensitivity = $a / (a + b) \times 100$; Specificity = $d / (c + d) \times 100$

ตารางที่ 16 แสดงผลความไว และความจำเพาะ ของการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ในตำแหน่งของยีน mt LSU rRNA จากตัวอย่างน้ำล้างปอด

mt LSU rRNA PCR (N=36)		Boil BAL			Sensitivity, Specificity (%)
		Positive	Negative	Total	
Kit BAL	Positive	36 a	0 c	36	Sens.=100
	Negative	0 b	0 d	0	Spec.=0
	Total	36	0		
mt LSU rRNA PCR (N=36)		Kit BAL			Sensitivity, Specificity (%)
		Positive	Negative	Total	
Boil BAL	Positive	36 a	0 c	36	Sens.=100
	Negative	0 b	0 d	0	Spec.=0
	Total	36	0		

Sensitivity = $a / (a + b) \times 100$; Specificity = $d / (c + d) \times 100$

เปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดยวิธีการย้อมสีกับวิธี PCR

ผลการศึกษาวิธีการตรวจพบเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ในตัวอย่างเสมหะเรียงจากน้อยไปมากตามลำดับดังนี้ Giemsa (8 ตัวอย่าง), Tuoludine blue O (20 ตัวอย่าง), Boil PCR (24 ตัวอย่าง), IFA (31 ตัวอย่าง), Kit PCR (36 ตัวอย่าง) (ตารางที่ 17) สำหรับผลการตรวจพบเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ในตัวอย่างน้ำล้างปอดซึ่งมีอัตราการตรวจพบเชื้อได้มากกว่าตัวอย่างเสมหะอย่างมีนัยสำคัญโดยเรียงจากน้อยไปมากตามลำดับดังนี้ Giemsa (32 ตัวอย่าง), Tuoludine blue O (33 ตัวอย่าง), IFA (35 ตัวอย่าง), Boil PCR (36 ตัวอย่าง), Kit PCR (36 ตัวอย่าง) (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 แสดงผลการตรวจพบเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* โดยวิธีย้อมสี, IFA และ PCR จาก 2 วิธีการเตรียม DNA ด้วยไพรมเมอร์ในตำแหน่งของยีน mt LSU rRNA จากตัวอย่างเสมหะและน้ำล้างปอด

		Giemsa	Tuoludine blue O	IFA	Boil PCR	Kit PCR
Sputum	Positive	8	20	31	24	36
	Negative	28	16	5	12	0
	Total	36	36	36	36	36
BAL	Positive	32	33	35	36	36
	Negative	4	3	1	0	0
	Total	36	36	36	36	36

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

โรคปอดอักเสบที่เกิดจากเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) เป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญในผู้ป่วย HIV และผู้ป่วยที่ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องอื่น ๆ ซึ่งก่อให้เกิดความเจ็บป่วย และเสียชีวิตสูงถ้าไม่ได้รับการรักษา หรือรักษาช้าเกินไป แม้ว่าการวินิจฉัยโรค PCP สามารถวินิจฉัยจากอาการทางคลินิก และให้ยารักษาทันทีที่สงสัยปอดติดเชื้อ โดยไม่ต้องรอผลการตรวจเสมหะ หรือน้ำล้างปอดก็ตาม แต่การตรวจเสมหะ หรือน้ำล้างปอดนั้นมีความสำคัญเป็นอย่างมากโดยจะช่วยยืนยันการวินิจฉัย เพื่อช่วยตัดสินใจในการรักษาปอดติดเชื้อ

Pneumocystis jirovecii ได้อย่างถูกต้อง การวินิจฉัยจำเป็นต้องอาศัยวิธีการตรวจพบเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเชื้อนี้ในปัจจุบันยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ ภายนอกปอดของโฮสต์ เป็นผลให้ขาดแคลนวิธีวินิจฉัยที่เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ทำให้การวินิจฉัยหาเชื้อมีความสำคัญต่อการรักษาเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากโรค PCP มีอาการคล้ายคลึงกับโรคปอดติดเชื้ออื่นๆ อีกหลายโรค

การวินิจฉัยเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ที่ถูกต้องคือการตรวจพบเชื้อหรือตรวจพบ DNA ของเชื้อจากตัวอย่างชิ้นเนื้อปอด เสมหะ หรือน้ำล้างปอด ก่อนที่จะมีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาใช้ในการวินิจฉัย พบว่าการวินิจฉัยจากผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จากการย้อมสีสิ่งส่งตรวจด้วยสี Giemsa, Toluidine blue O หรือ Methenamine silver stain นั้นมีความในการตรวจค่อนข้างต่ำ แม้ว่าต่อมาจะได้มีการพัฒนาการตรวจด้วยวิธี IFA ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลการวินิจฉัยที่มีความไว และความถูกต้องสูงกว่าการตรวจด้วยวิธีการย้อมสีดังกล่าวข้างต้น แต่อย่างไรก็ตาม ความไวของการตรวจด้วยวิธี IFA ก็ยังให้ผลต่ำกว่าความเป็นจริง (Pinlaor et al., 2004, Azoulay et al., 2009, Jarboui et al., 2010) นอกจากนี้การอ่านผล IFA ยังมีอุปสรรคจากความไม่ชัดเจนของตัวอย่างเชื้อในบางตัวอย่าง โดยเฉพาะระยะ trophic จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการอ่านผลได้ (Robberts et al., 2007) จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าผลการตรวจด้วยวิธี IFA ให้ผลไวว่าการตรวจด้วยวิธีการย้อมสี Toluidine blue O และ Giemsa ทั้งจากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอด ซึ่งให้ผลการตรวจพบเชื้อร้อยละ 86.1, 55.6, 22.2 และ 88.9, 91.7, 97.2 ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นการตรวจด้วยการย้อมสี Giemsa ให้ผลความไวต่ำสุดในทั้งสองตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ นอกจากนี้ น้ำล้างปอดยังเป็นสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลบวกต่อการตรวจพบเชื้อมากกว่าเสมหะ โดยทั่วไปการรายงานผลจากวิธีการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ยังขึ้นอยู่กับทักษะของผู้ทดสอบ

ตัวอย่างแต่ละบุคคลทำให้วิธีการเหล่านี้มีโอกาสเกิดความไม่จำเพาะ และความไวที่หลากหลายมากขึ้น

วิธีการตรวจวินิจฉัยหาลำเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วยวิธี PCR นั้น ให้ผลความไวที่ดีกว่าการตรวจด้วยวิธีการย้อมสี ส่งผลให้จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อมีเพิ่มมากขึ้นจากการศึกษาในหลาย ๆ พื้นที่ (Carmona et al., 2011) ในปัจจุบันการตรวจด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pAZ102H และ pAZ102E สำหรับ PCR รอบแรก และ pAZ102X และ pAZ102Y สำหรับ PCR รอบที่สองนั้นเป็นที่นิยมแพร่หลายในกลุ่มผู้วิจัยทั่วไปสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* (Wakefield et al., 1990, Tamburrini et al., 1996) ซึ่งผลความไวของการตรวจด้วยวิธี PCR นั้นยังคงขึ้นอยู่กับจำนวน copy number ของยีนเป้าหมาย ดังนั้นความไวของการตรวจเมื่อใช้ยีนเป้าหมายที่เป็น single copy gene จะต้องให้ผลที่ต่ำกว่าการตรวจโดยการใช้อยีนเป้าหมายที่เป็น multicopy gene เช่น mtLSU rRNA อย่างเช่นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (Robberts et al., 2007) อย่างไรก็ตามความไวของการตรวจโดยการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pAZ102H และ pAZ102E ของยีน mtLSU rRNA ครั้งเดียวยังให้ผลต่ำกว่าการตรวจด้วยการทำ PCR สองรอบของ single copy gene เช่น ITS และ 18S rRNA (Lu et al., 1995) แต่จากผลการศึกษาค้นนี้จะพบว่าผลการเปรียบเทียบความไวของการใช้ไพรเมอร์ที่คณะผู้วิจัยได้นำมาใช้ศึกษาเปรียบเทียบในตำแหน่งของยีน DHFR คือไพรเมอร์ PJDHFRF0 และ PJDHFRR0 สำหรับ PCR รอบแรก และ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1 สำหรับ PCR รอบที่สอง โดยที่วิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปจากตัวอย่างเสมหะด้วยไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y ตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ได้มากกว่าไพรเมอร์ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1 2 รายจากผู้ป่วยที่พบเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* 36 รายคิดเป็นอัตราการตรวจพบเชื้อสูงกว่าที่ร้อยละ 5.6 โดยที่วิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปจากตัวอย่างน้ำล้างปอดด้วยไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y ตรวจพบ DNA *Pneumocystis jirovecii* ได้เท่ากับกับไพรเมอร์ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1 สำหรับวิธีการเตรียมเตรียม DNA ด้วยวิธีการต้มจากตัวอย่างเสมหะด้วยไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y ตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ได้มากกว่าไพรเมอร์ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1 10 รายจากผู้ป่วยที่พบเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* 36 รายคิดเป็นอัตราการตรวจพบเชื้อสูงกว่าที่ร้อยละ 27.8 โดยที่วิธีการเตรียม DNA ด้วยวิธีการต้มจากตัวอย่างน้ำล้างปอดด้วยไพรเมอร์ pAZ102X และ pAZ102Y ตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ได้เท่ากับกับไพรเมอร์ PJDHFRF1 และ PJDHFRR1

จากผลการศึกษาวิธีการเตรียม DNA โดยวิธีการต้มเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียม DNA โดยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปจากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดมีอัตราส่วนผลบวก 0.67 และ 1.0 ตามลำดับ นั้นแสดงให้เห็นว่า วิธีการเตรียม DNA โดยวิธีการต้มจากไพรเมอร์ pAZ102X และ

pAZ102Y ในตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดสามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วยวิธี PCR ได้โดยสามารถลดค่าใช้จ่ายต่อหน่วย (Unit Cost) สำหรับวิธีการตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ในห้องปฏิบัติการเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปโดยวิธีการต้มมีค่าใช้จ่ายเมื่อรวมกับค่าสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR 2 รอบ PCR ต่อ 1 ตัวอย่างประมาณ 40 บาท เปรียบเทียบกับวิธีเตรียม DNA จากชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปมีค่าใช้จ่ายเมื่อรวมกับค่าสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR 2 รอบ PCR ต่อ 1 ตัวอย่างประมาณ 220 บาท ดังนั้นการตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ด้วยวิธี PCR ควรทำการเตรียม DNA โดยวิธีการต้มแล้วทำ PCR เมื่อทราบผล ตัวอย่างใดที่ให้ผลการตรวจพบเชื้อเป็นลบ จึงค่อยนำตัวอย่างนั้นมาเตรียม DNA ด้วยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป โดยที่ตัวอย่างที่ให้ผลบวกก็ไม่ต้องนำมาเตรียม DNA ด้วยชุดเตรียม DNA สำเร็จรูป ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายตรงส่วนนี้ไปได้ นอกจากนี้วิธี PCR สำหรับการวินิจฉัยหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ยังมีค่าใช้จ่ายถูกกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี IFA ถึงแม้ว่าวิธีการย้อมสีจะมีราคาค่าใช้จ่ายต่อหน่วยน้อยกว่าวิธี PCR แต่ก็ให้ผลความไวในการตรวจพบน้อยกว่าชัดเจน สำหรับค่าความจำเพาะต่อเชื้อในการศึกษานี้มีค่าเท่ากับศูนย์เนื่องจากตัวอย่างทั้งหมดเป็นตัวอย่างผู้ป่วยโรค PCP จึงทำให้ขาดตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง แต่จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าไพรเมอร์จากตำแหน่งของยีน mtLSU rRNA มีค่าความไวและความจำเพาะสูงสุด (Robberts et al., 2007) โดยไม่สามารถให้ผลบวกจากเชื้อชนิดอื่นๆได้ (ผลบวกปลอม)

ดังนั้นเทคนิค PCR จากวิธีการเตรียม DNA ในการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการวินิจฉัยเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในด้านการลดค่าใช้จ่ายต่อหน่วย อันจะมีผลต่อการป้องกัน ควบคุม และการรักษาโรคปอดอักเสบที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้ซึ่งมีความสำคัญทางการแพทย์ทั่วโลกเป็นอย่างมากในปัจจุบัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้จำนวนตัวอย่างเชื้อเพิ่มมากขึ้นทั้งกลุ่ม HIV และ non-HIV เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการพบเชื้อในประชากรสองกลุ่มนี้
2. ควรนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปศึกษาต่อโดยใช้ตัวอย่างเชื้อจากกลุ่มคนปกติ หรือบุคลากรที่มีความใกล้ชิดกับผู้ป่วย PCP เพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อที่เป็น colonization
3. ควรตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างเสมหะหรือ BAL ภายหลังจากผู้ป่วยได้รับการรักษาเพื่อติดตามผลการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ
4. การเตรียม DNA โดยวิธีการต้ม จากการศึกษานี้พบว่าความไวของการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* จากตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดสามารถนำมาใช้เตรียม DNA แทนชุดเตรียม DNA สำเร็จรูปได้ และมีความถูกต้องของผลการตรวจวินิจฉัยที่ดีกว่าการนำตัวอย่างเสมหะ และน้ำล้างปอดมาใช้โดยตรงในกระบวนการ PCR ซึ่งช่วยให้สะดวกในการตรวจวินิจฉัยโรค PCP อีกทั้งยังสามารถประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายต่อการทดสอบหาเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- พวงทิพย์ รัตนะรัต. และสุวดี ดีวงษ์. 2552. โรคเอดส์ (AIDS). Annau Epidemiological Surveillance Report 2009. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา:
http://epid.moph.go.th/Annual/Annual%202552/AESR52_Part1/B_Part1_52/2952_AIDS.doc
- ภ.ก.เชิดเกียรติ แก้วกสิกิจ. การป้องกันและการดูแลรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา:
<http://203.157.45.67/napha9/oiinfect/oiinfection2.html>
- สำนักกระบวนวิชา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2553. สถานการณ์ผู้ป่วยเอดส์ ณ วันที่ 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2553. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา:
http://www.boe.moph.go.th/files/report/20100830_58172773.pdf

ภาษาอังกฤษ

- Achari, A., et al. 1997. Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. Nat Struct Biol. 4: 490–497.
- Afghani, B., and Stutman, H.R., 1996. Polymerase chain reaction for diagnosis of *M. tuberculosis*: comparison of simple boiling and a conventional method for DNA extraction. Biochem Mol Med. 57: 14–18.
- Agostoni, F., et al. 2000. *Pneumocystis carinii* diagnosis: an update. Int J Antimicrob Agents. 16: 549–557.
- Aliouat-Denis, C.M., et al. 2009. The *Pneumocystis* life cycle. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104: 419–26.
- Aliouat, E.M., et al. 1996. High Infectivity of *Pneumocystis carinii* cultivated on L2 rat alveolar epithelial cells. J Eukaryot Microbiol. 43: 22S.
- Aliouat, E.M., et al. 1997. Development of *pneumocystosis* animal models: corticosteroid-treated Wistar rat; SCID mouse and nude rat. J Eukaryot Microbiol. 44: 41S–42S.
- Ammich, O. 1938. Über die nichtsyphilitische interstitielle Pneumonie des ersten Kindesalters. Virchows Arch Pathol Anat. 302: 539–554.

- Anuradha., and Sinha, A. 2007. Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infection in an AIDS patient: a case report. Acta Cytol. 51: 599–601.
- Atzori, C., et al. 1995. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients by using polymerase chain reactions on serum specimens. J Infect Dis. 172: 1623–1626.
- Bartlett, M.S., et al. 1997. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. J Clin Microbiol. 35: 2511–2513.
- Beck, J.M., and Cushion, M.T. 2009. *Pneumocystis* Workshop: 10th Anniversary Summary. Eukaryot Cell. 8: 446–460.
- Benecke, E. 1938. Eigenartige Bronchiolenerkrankung im ersten Lebensjahr. Verh Dtsch Ges Pathol. 31: 402–406.
- Caliendo, A.M., et al. 1998. Performance of a PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. J Clin Microbiol. 36: 979–982.
- Carini, A. 1910. Formas des eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*. Bol Soc Med de Med e Cir de Sao Paulo. 18: 204.
- Carmona, E.M., and Limper, A.H. 2011. Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. Ther Adv Respir Dis. Feb: 5: 41-59.
- Cartwright, C.P., et al. 1994. Development and evaluation of a rapid and simple procedure for detection of *Pneumocystis carinii* by PCR. J Clin Microbiol. 32: 1634–1638.
- Casanova-Cardiel, L., and Leibowitz, M.J. 1997. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. J Eukaryot Microbiol. 44: 28S.
- Centers for Disease Control. 1986. CDC update. Acquired immunodeficiency syndrome UnitedStates. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 35: 17–21.
- Centers for Disease Control. 1989. Guidelines for prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia for persons infected with human immunodeficiency virus. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 38: 1–9.
- Centers for Disease Control and Prevention, 1977 HIV/AIDS Surveillance Report, p.18
- Chagas, C. 1909a. Neue Trypanosomen. Vorläufige Mitteilung. Arch Schiff Tropenhyg. 13: 120–122.

- Chagas, C. 1909b. Trabalho do Instituto Manguinhos sobre uma nova trypanosomiase humana, pelo dr. Carlos Chagas, assistente do Instituto. Ann Acad Med Rio de Janeiro. 75: 188–190.
- Chagas, C. 1909c. Nova tripanozomiase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1: 159–218.
- Chagas, C. 1911. Nova entidade morbida do homem: regumo general de estudos etiologicos e clinicos. Mem Inst Oswaldo Cruz. 3: 219–275.
- Chave, J.P., et al. 1991. Transmission of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients to other immunosuppressed patients: a Cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients. Aids. 5: 927–932.
- Cheung, Y.F., et al. 1994. An outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in children with malignancy. J Paediatr Child Health. 30: 173–175.
- Cushion, M.T., et al. 2000. Effects of atovaquone and diospyrin-based drugs on the cellular ATP of *Pneumocystis carinii* f. sp. carinii. Antimicrob Agents Chemother. 44: 713–719.
- Cushion, M.T., et al. 2004. Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. Mycologia. 96: 429–438.
- Cushion, M.T., et al., 2005. Validation of the name *Pneumocystis wakefieldiae*. Mycologia. 97: 268.
- Cushion, M.T., and Stringer, J.R. 2010. Stealth and Opportunism Alternative Lifestyles of Species in the Fungal Genus *Pneumocystis*. Annu Rev Microbiol. 13: 64: 431–452.
- Dei-Cas, E., et al. 1998. Animal models of *pneumocystosis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 22: 163–168.
- Dei-Cas, E., et al. 2006. *Pneumocystis oryctolagi* sp. nov., an uncultured fungus causing pneumonia in rabbits at weaning: review of current knowledge, and description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. FEMS Microbiol Rev. 30: 853–871.

- Delanoë, P., and Delanoë, M. 1912. Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. Comptes rendus de l'Academie des sciences. 155: 658–661.
- Deneer, H.G, and Knight, I. 1994. Inhibition of the polymerase chain reaction by mucolytic agents. Clin Chem. 40: 171–172.
- Denis, C.M., et al. 2000. Genetic divergence at the SODA locus of six different formae speciales of *Pneumocystis carinii*. Med Mycol. 38: 289–300.
- de Souza, W., and Benchimol, M. 2005. Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 100: 903–908.
- Dore, G.J., et al. 2002. Impact of highly active antiretroviral therapy on individual AIDS-defining illness incidence and survival in Australia. J Acquir Immune Defic Syndr. 29: 388–395.
- Dumoulin, A., et al. 2000. Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 19: 671–678.
- Dutz, W. 1970. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Pathol Annual 5: 309–341.
- Dyer, M., et al. 1992. Cloning and sequence of a β -tubulin cDNA from *Pneumocystis carinii*: possible implications for drug therapy. Mol Microbiol. 6: 991–1001.
- Edlind, T.D., et al. 1991. Characterization of the beta-tubulin gene of *Pneumocystis carinii*. J Protozool. 38: 62S–63S.
- Edlind, T.D., et al. 1992. The beta-tubulin gene from rat and human isolates of *Pneumocystis carinii*. Mol Microbiol. 6: 3365–3373.
- Edman, J.C., et al. 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature. 11: 334: 519–522.
- Edman, J.C., et al. 1989a. Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase gene. Proc Natl Acad Sci USA. 86: 8625–8629.
- Edman, U., et al. 1989b. Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidylate synthase gene. Proc Natl Acad Sci USA. 86: 6503–6507.
- Eisen, D., et al. 1994. Comparison of *Pneumocystis carinii* detection by toluidine blue O staining, direct immunofluorescence and DNA amplification in sputum specimens from HIV positive patients. Pathology. 26: 198–200.

- Enomoto, T., et al. 2010. Differences in the clinical characteristics of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromized patients with and without HIV infection. Respirology. 15: 126–131.
- Fallo, A.A., et al. 2002. Clinical and epidemiologic aspects of human immunodeficiency virus-1-infected children in Buenos Aires, Argentina. Int J Infect Dis. 6: 9–16.
- Fischer, S., et al. 2001. The use of oral washes to diagnose *Pneumocystis carinii* pneumonia: a blinded prospective study using a polymerase chain reaction-based detection system. J Infect Dis. 184: 1485–1488.
- Flori, P., et al. 2004. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol. 53: 603–607.
- Frenkel, J.K. 1976. *Pneumocystis jirovecii* n. sp. from man: morphology, physiology and immunology in relation to pathology. Natl Cancer Inst Monogr. 43: 13–30.
- Gill, V.J., et al. 1987. Detection of *Pneumocystis carinii* by fluorescent-antibody stain using a combination of three monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 25: 1837–1840.
- Glatt, A.E., and Chirgwin, K. 1990. *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients. Arch Intern Med. 150: 271–279.
- Helweg-Larsen, J., et al. 1998. Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples. J Clin Microbiol. 36: 2068–2072.
- Hennequin, C., et al. 1995. Outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a renal transplant unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 14: 122–126.
- Henning, L., et al.; 1999. Rapid DNA extraction for molecular epidemiological studies of malaria. Acta Trop. 15: 72: 149–155.
- Hong, S.T., et al. 1992. Transmission modes of *Pneumocystis carinii* among rats observed by karyotype analysis. Kisaengchunghak Chapchi. 30: 283–228.
- Huang, S.N., et al. 1999. Development of a PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia based on amplification of the multicopy major surface glycoprotein gene family. Diagn Microbiol Infect Dis. 35: 27–32.

- Hughes, W.T., et al. 1974. Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. Antimicrob Agents Chemother. 5: 289–293.
- Hughes, W.T., 1989. *Pneumocystis carinii*: taxing taxonomy. Eur. J. Epidemiol. 5: 265–269.
- Itatani, C.A., and Marshall, G.J. 1988. Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* in situ and from bronchoalveolar lavage. J Parasitol. 74: 700–712.
- Ivady, G., and Paldy, L. 1958. Ein neues Behandlungsverfahren der interstitiellen plasmazelligen Pneumonie Frühgeborener mit funfwertigen Stibium und aromatischen Diamidinen. Monatsschr Kinderheilkd. 106: 10–15.
- Ives, N.J., et al. 2001. The changing pattern of AIDS-defining illnesses with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in a London clinic. J Infect. 42: 134–139.
- Jírovec, O. 1952. *Pneumocystis carinii* puvodce t. zv interstitialnich plasmocelularnich pneumonii kojencw (*Pneumocystis carinii*, the cause of interstitial plasmacellular pneumonia in neonates). P Csl Hyg epid mikrob. 1: 141.
- Keely, S.P., et al. 2004. Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp. nov., a new species in laboratory mice. Microbiology. 150: 1153–1165.
- Kelley, C.F.; Checkley, W.; Mannino, D.M. et al. 2009. Trends in hospitalizations for AIDS-associated *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in the United States (1986 to 2005). Chest. 136: 190–197.
- Khawcharoenporn, T., et al. 2006. Dual infection with Mycobacterium tuberculosis and *Pneumocystis jirovecii* Lymphadenitis in a Patient with HIV infection: case report and review of the literature. AIDS Patient Care STDS. 20: 1–5.
- Kitada, K., et al. 1991. Diagnosis of *Pneu-mocystis carinii* pneumonia by 5S ribosomal DNA amplification. J Protozool. 38:90S–91S.
- Koch, M., and Heizmann, W. 1990. Problems in the detection of *Pneumocystis carinii* by indirect immunofluorescence. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 9: 58–59.

- Kovacs, J.A., et al. 1984. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. Ann Intern Med. 100: 663–671.
- Kovacs, J.A., et al. 1986. Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Lancet. 2: 1–3.
- Kovacs, J.A., et al. 1988. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: Improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. N Engl J Med. 318: 589–593.
- Kovacs, J.A., et al. 2001. New Insights Into Transmission,Diagnosis, and Drug Treatment of *Pneumocystis carinii* Pneumonia. JAMA. 21: 286: 2450-2460.
- Krentz, H.B., et al. 2003. Changing mortality rates and causes of death for HIV-infected individuals living in Southern Alberta, Canada from 1984 to 2003. HIV Med. 6: 99–106.
- Lane, B.R., et al. 1997. Dihydropteroate synthase polymorphisms In *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis. 175: 482–485.
- Larsen, H.H., et al. 2002. Development and evaluation of quantitative, touch-down real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Clin Microbiol. 40: 490–494.
- Lee, C.H., et al. 1993. Proliferation of rat *Pneumocystis carinii* on cells sheeted on microcarrier beads in spinner flasks. J Clin Microbiol. 31: 1659–1662.
- Levine, S.J., et al. 1991. Effect of aerosolized pentamidine prophylaxis on the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by induced sputum examination in patients infected with the human immunodeficiency virus. Am Rev Respir Dis. 144: 760–764.
- Li, Z., et al. 2008. Molecular phylogeny of *Pneumocystis* based on 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers of rRNA gene sequences. Sci China Ser C Life Sci. 51: 445–452.
- Linder, E., et al. 1986. Monoclonal antibody to detect *Pneumocystis carinii*. Lancet. 2: 634.

- Lipschik, G.Y., et al. 1992. Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. Lancet. 25: 340: 203–206.
- Liu, Y., et al. 1992. Sequence and variability of the 5.8S and 26S rRNA genes of *Pneumocystis carinii*. Nucleic Acids Res. 20: 3763–3772.
- Lu, J.J., et al. 1995. Comparison of six different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. J Clin Microbiol. 33: 2785–2788.
- Lu, J.J., et al. 2000. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 38: 2076–2080.
- Lumbiganon, P., et al. 2000. Survival of children with AIDS: Experience in a university hospital in northeast Thailand. J Med Assoc Thai. 83: 652–656.
- Ma, L., et al. 1999. *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim–sulfamethoxazole or dapsone use. J Infect Dis. 180: 1969–1978.
- Mansharamani, N.G., et al. 2000. Management and outcome patterns for adult *Pneumocystis carinii* pneumonia, 1985 to 1995: complication of HIV–associated case to other immunocompromised states. Chest. 118: 704–711.
- Meneau, I., et al. 2004. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms confer resistance to sulfadoxine and sulfanilamide in *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob Agents Chemother. 48: 2610–2616.
- Masur, H., et al. 1988. Diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia by induced sputum technique in patients without the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med. 109: 755–756.
- Mathis, A., et al. 1997. Simplified sample processing combined with a sensitive one-tube nested PCR assay for the detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. J Clin Microbiol. 35: 1691–1695.
- Matsumoto, Y., and Yoshida, Y. 1984. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. J Protozool. 31: 420–428.

- McFadden, D.C., et al. 1991. Establishment of *Pneumocystis carinii* in various mouse strains using natural transmission to initiate infection. J Protozool. 38: 126S–127S.
- McNaghten, A.D., et al. 1999. Effects of antiretroviral therapy and opportunistic illness primary chemoprophylaxis on survival after AIDS diagnosis. Adult/Adolescent Spectrum of Disease Group. AIDS. 13: 1687–1695.
- McNeill, J., et al. 2006. International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code). Regnum Vegetabile. 146: article 45.4
- Moonens, F., et al. 1995. Rapid simple and nested polymerase chain reaction for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Scand J Infect Dis. 27: 358–362.
- Morris, A., et al. 2003. Improve survival with highly active antiretroviral therapy in HIV infected patients with severe *Pneumocystis carinii* pneumonia. AIDS. 17: 73–80.
- Morris, A., et al. 2004. Current Epidemiology of *Pneumocystis* Pneumonia. Emerg Infect Dis. 10: 1713–1720.
- Morris, A. 2008. Is there anything new in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia? Changes in *P. jirovecii* pneumonia over the course of the AIDS epidemic. Clin Infect Dis. 15: 634–636.
- Morrow, B.M., et al. 2010. *Pneumocystis* pneumonia in South African children with and without human immunodeficiency virus infection in the era of highly active antiretroviral therapy. Pediatr Infect Dis J. 29: 535–539.
- Mu, X.D., et al. 2009. Caspofungin in salvage treatment of severe *Pneumocystis* pneumonia: case report and literature review. Chin Med J. 20; 122: 996–9.
- Nahimana, A., et al. 2004. Mutations of *Pneumocystis jirovecii* Dihydrofolate Reductase Associated with Failure of Prophylaxis. Antimicrob Agents Chemother. 48: 4301–4305.
- Neff, R.T., et al. 2009. Analysis of USRDS: incidence and risk factors for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Transplantation. 88: 135–141.
- Ng, V.L., et al. 1997. Extrapulmonary *pneumocystosis*. Clin Microbiol Rev. 10: 401–418.
- Nissapatorn, V., et al. 2003. AIDS-related opportunistic infections in Hospital Kuala Lumpur. Jpn J Infect Dis. 56: 187–192.

- Olsson, M., et al. 1993. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA In sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 31: 221–226.
- Olsson, M., et al. 1998. Identification of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis gene sequences in filtered air in hospital environments. J Clin Microbiol. 36: 1737–1740.
- Olsson, M., et al. 2001. Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Clin Microbiol Infect. 7: 492–497.
- Perez, E., et al. 2005. HIV patient hospitalization during the pre and post-HAART era. Medicina (B Aires). 65: 482–488.
- Peters, S.E., et al. 2001. Synaptonemal complexes in the pre-cyst of *Pneumocystis carinii*. J Eukaryot Microbiol. 48: 134S.
- Pinlaor, S., et al. 2004. PCR diagnosis of *Pneumocystis carinii* on sputum and bronchoalveolar lavage samples in immuno-compromised patients. Parasitol Res. 94: 213–218.
- Powles, M.A., et al. 1992. Mouse model for *Pneumocystis carinii* pneumonia that uses natural transmission to initiate infection. Infect Immun. 60: 1397–1400.
- Rabodonirina, M., et al. 1997. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from human immunodeficiency_virus-infected patients: use of a simple DNA extraction procedure and nested PCR. J Clin Microbiol. 35: 2748–2751.
- Rabodonirina, M., et al. 1999. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood specimens from human immunodeficiency virus-Infected patients by nested PCR. J Clin Microbiol. 37: 127–131.
- Redhead, S.A., et al. 2006. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. J Eukaryot Microbiol. 53: 2–11.
- Ribes, J.A., et al. 1997. PCR detection of *Pneumocystis* in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity. J Clin Microbiol. 35: 830–835.
- Robberts, F.J., et al. 2007. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jiroveci*: evaluation of 9 assays. Diagn Microbiol Infect Dis. 58: 385–392.

- Roux, P., et al. 1994. Usefulness of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* DNA. J Clin Microbiol. 32: 2324–2326.
- Ruebush, T.K., et al. 1978. An outbreak of *Pneumocystis* pneumonia in children with acute lymphocytic leukemia. Am J Dis Children. 132: 143–148.
- Saritsiri, S., et al. 2006. Nontuberculous mycobacterial infections in King Chulalongkorn Memorial Hospital. J Med Assoc Thai. 89: 2035–2046.
- Savoia, D., et al. 1997. Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification in human immunodeficiency virus-positive patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 29: 61–65.
- Shah, J.S., et al. 1996. Diversity of host species and strains of *Pneumocystis carinii* is based on rRNA sequences. Clin Diagn Lab Immunol. 3: 11–27.
- Sinclair, K., et al. 1991. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. Mol Biochem Parasitol. 45: 183–184.
- Sing, A., et al. 2000. Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. J Clin Microbiol. 38: 1461–1467.
- Singer, C., et al. 1975. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a cluster of eleven cases. Ann Intern Med. 82: 772–777.
- Skøt, J., et al. 1995. *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage and induced sputum: detection with anested polymerase chain reaction. Scand J Infect Dis. 27: 363–367.
- Sloand, E., et al. 1993. The challenge of *Pneumocystis carinii* culture. J Eukaryot Microbiol. 40: 188–195.
- Soares, V.Y., et al. 2008. Clinical and epidemiological analysis of patients with HIV/AIDS admitted to a reference hospital in the northeast region of Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 50: 327–332.
- Sritangratanakul, S., et al. 2004. *Pneumocystis* pneumonia: an update. J Med Assoc Thai. 87: 309S–317S.
- Stringer, J.R., et al. 2001. New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. Proceedings of the Seventh International Workshops on Opportunistic Protists. J Eukaryot Microbiol. 184S–189S.

- Stringer, S.L., et al. 1989. Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. J Protozool. 36: 14S–16S.
- Sweeney, R., et al. 2006. Comparison of three DNA preparation for real-time polymerase chain reaction confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* growth in an automated broth culture system. J Vet Diagn Invest. 18: 587–590.
- Takahashi, T., et al. 2000. Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. J Clin Microbiol. 38: 3161–3164.
- Takahashi, T., et al. 2002. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompromised patients with and without human immunodeficiency virus infection. J Med Microbiol. 51: 611–614.
- Tamburrini, E., et al., and Wakefeld, A.E. 1996. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in Blood by PCR Is Not of Value for Diagnosis of *P. carinii* Pneumonia. J Clin Microbiol. 34: 1586–1588.
- Tamburrini, E., et al. 1997. Detection of *Pneumocystis carinii* in oropharyngeal washings by PCR-SHELA and nested PCR. J Eukaryot Microbiol. S44–S48.
- The United Nations program on HIV/AIDS (UNAIDS); 2009. AIDS Epidemic Update 2009. Epidemiology Core Slides.ppt
- Thomas, S.F., et al. 1966. *Pneumocystis carinii* pneumonia (plasma cell pneumonia); roentgenographic, pathologic and clinical correlation. Am J Roentgenol Radium Therapy Nucl Med. 98: 318–322.
- Torres, J., et al. 2000. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients with polymerase chain reaction: a blinded comparison to standard methods. Clin Infect Dis. 30: 141–145.
- Van der Meer, M.G., and Brug, S.L. 1942. Infection à *Pneum ocys tis* chez l'homme et chez les animaux. Amer Soc Belge Méd Trop. 22: 301–309.
- Vanek, J. 1951. Atypická (interstitiální) pneumonie detí vyvolaná *Pneum ocys tis carinii* (Atypical interstitial pneumonia of infants produced by *Pneumocystis carinii*). Casop lék cesk. 90: 1121–1124.

- Vanek, J., et al. 1953. Interstitial plasma cell pneumonia in infants. Ann Paediatrici. 180: 1–21.
- Wakefield, A.E., et al. 1990. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. Lancet. 24: 336: 1329.
- Wakefield, A.E., et al. 1991. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Lancet. 8: 337: 1378–1379.
- Wakefield, A.E. 1996. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. carinii and *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis in samples of air spora. J Clin Microbiol. 34: 1754–1759.
- Wakefield, A.E. 1998. Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. FEMS Immunol Med Microbiol. 22: 5–13.
- Wannamethee, S.G., et al. 1998. Clinical and immunological features of human immunodeficiency virus infection in patients from Bangkok, Thailand. Int J Epidemiol. 27: 289–295.
- Weig, M., et al. 1997. Usefulness of PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in different patient groups. J Clin Microbiol. 35: 1445–1449.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. เกณฑ์เข้าได้กับปอดติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* (Kongpolprom, et al., unpublished data)

มีอาการทางคลินิก 3 ใน 5 ข้อ และภาพถ่ายรังสีปอดเข้าได้กับปอดติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ซึ่งมีข้อกำหนดดังนี้

1. มีไข้ 3 วัน ถึง 3 สัปดาห์
2. มีอาการเหนื่อยที่ดำเนินไปอย่างช้าๆ
3. มีอาการไอต่อเนื่อง
4. ภาวะออกซิเจนในเลือดต่ำ
5. ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยารักษาโรค PCP ได้แก่ trimethoprim-sulfamethoxazole หรือ clindamycin กับ primaquine

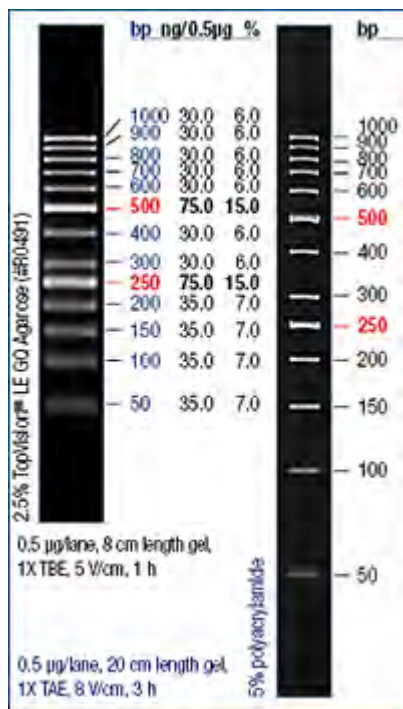
ภาพรังสีปอดของโรคปอดติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* อาจมีลักษณะอย่างหนึ่งอย่างใดดังนี้

1. ปกติ
2. diffuse infiltration
3. perihilar infiltration

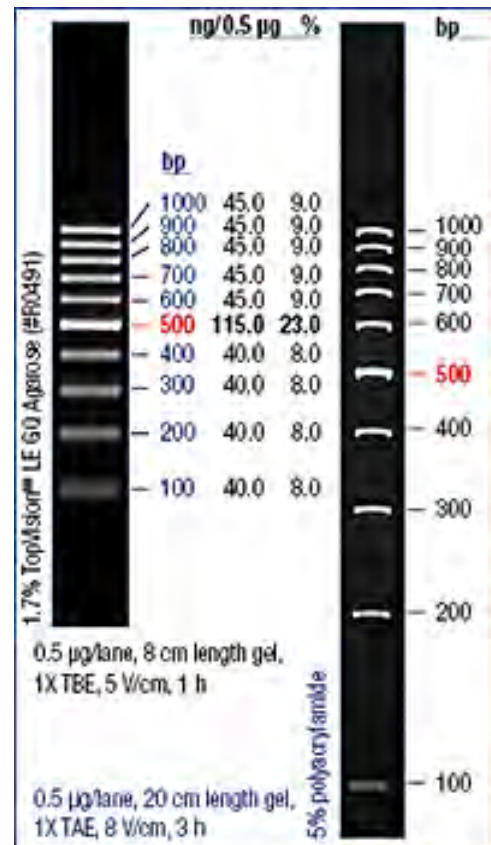
ภาคผนวก ข

2. DNA มาตรฐาน

A) DNA มาตรฐาน 50 bp. ladder



B) DNA มาตรฐาน 100 bp. ladder



ภาพที่ 22 แสดงแผนที่ของ DNA มาตรฐาน A) DNA ของ 50 bp. ladder ประกอบด้วย ซึ้น DNA 13 ซึ้น มีขนาด 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 และ 50 bp. ตามลำดับ โดยมี reference band ที่ 250, 500 bp. (Fermentas Life Science) B) DNA มาตรฐาน 100 bp. ladder ประกอบด้วยซึ้น DNA 10 ซึ้น มีขนาด 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 bp. ตามลำดับ โดยมี reference band ที่ 500 bp. (Fermentas Life Science)

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียมสารเคมี

การเตรียม 0.3% Dithiothreitol (DTT)

DTT	0.3	g
Double distilled water	100	ml

ละลายให้เข้ากันแล้วเก็บรักษาที่ -20°C

การเตรียม gel-loading buffers

bromophenol blue	0.25	g
xylene cyanol FF	0.25	g
glycerol in water	30	g

ละลายในน้ำกลั่น โดยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร

การเตรียมสี Giemsa (stock)

สี Giemsa (ผง)	25	g
Absolute Methanol	1650	ml
Glycerine	1650	ml

บดผงสีก่อน โดยค่อยๆเติม glycerine ไปทีละน้อยๆ จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส พร้อมกับเท glycerine ที่เหลือผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม absolute methanol ลงไปเขย่าให้เข้ากัน และนำเอา stock solution นี้เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลประมาณ 1-3 เดือน ก่อนนำมาใช้จะทำให้การย้อมสีดีกว่าใช้ในขณะเตรียมเสร็จใหม่ๆ

การเตรียมสี Toluidine blue O (stock)

สี Toluidine blue O (ผง)	0.5	g
Absolute Methanol	20	ml
น้ำกลั่น	80	ml

ก่อนนำไปใช้ให้ dilute สี 1 ต่อ 15 (สี 1 ml ต่อ น้ำ 14 ml)

การเตรียม buffer ย้อมสี (stock buffer)

buffer I	Na ₂ H ₂ PO ₄ .H ₂ O	9.2 g
	น้ำกลั่น	1000 ml
Buffer II	Na ₂ HPO ₄	9.5 g
	น้ำกลั่น	1000 ml
	ผสมให้เข้ากัน	

การเตรียม marker

DNA marker	20 µl
Gel loading buffer	80 µl
TE buffer	360 µl

การเตรียม TBE buffer (10x)

Tris base	108 g
Boric acid	55 g
EDTA	7.4 g

ปรับค่า pH และปริมาตรให้เท่ากับ 8.3 และ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน

การเตรียม TE buffer (10x)

1 M Tris	800 ml
0.5 M EDTA	200 ml

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อก่อนที่จะใช้

การเตรียม TBS buffer

10 mM Tris.HCl, pH 7.5
150 mM NaCl

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ – สกุล	นายทวีศักดิ์ แซ่เตีย
วันเดือนปีเกิด	วันที่ 3 เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2514
ภูมิลำเนา	จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2539 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต
หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
- พ.ศ. 2550 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย