

## การตรวจวินิจฉัยหนอนพยาธิตัวกลมในสัตว์

หนอนพยาธิพยาธิตัวกลมต่างๆ ที่อยู่ในร่างกายคนหรือสัตว์ ตัวเต็มวัยจะอาศัยอยู่ในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายหลายแห่ง แตกต่างกันตามชนิดของพยาธิ เช่น อยู่ในตับ ปอด เลือด ลำไส้ และตามกล้ามเนื้อ เป็นต้น ส่วนมากไข่ของพยาธิเหล่านี้จะออกมาในลำไส้ปนกับอุจจาระ ดังนั้นในการตรวจหาไข่พยาธิส่วนใหญ่จะตรวจจากอุจจาระ

จุดมุ่งหมายของการตรวจอุจจาระก็เพื่อตรวจหาเชื้อหนอนพยาธิที่เป็นปรสิตที่อาศัยอยู่ในลำไส้ หรืออวัยวะอื่นๆ ที่มีทางติดต่อกับลำไส้ ตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ควรจะต้องมีวิธีการเก็บและนำส่งให้ถูกต้องจึงจะได้ผลการวิเคราะห์ที่แน่นอน และเนื่องจากการกระจายของไข่พยาธิในอุจจาระไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นตัวอย่างของอุจจาระที่จะนำมาตรวจหาพยาธิควรจะได้มาจากหลายๆ แห่งในตัวอย่างเดียวกัน และการตรวจซ้ำหลายๆ ครั้งในตัวอย่างเดิมก็จะช่วยให้อัตราการพบพยาธิเพิ่มขึ้น อีกทั้งไข่พยาธิแต่ละชนิดยังเปลี่ยนแปลงในแต่ละวัน

### การเก็บอุจจาระสำหรับตรวจหาพยาธิ

อุจจาระที่จะส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการมีวิธีการเก็บดังนี้คือ

#### 1. อุจจาระที่ถ่ายตามปกติ

1.1 ภาชนะใส่ควรจะเป็นขวดหรือพลาสติกที่มีฝาปิดมิดชิด เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงลงไปไข่

1.2 ภาชนะที่ใส่ต้องสะอาดแห้ง ไม่มีปัสสาวะหรือยาทำลายเชื้อโรคเจือปน เพราะจะไปฆ่าพวกปรสิต และนอกจากนั้นยาปฏิชีวนะอาจมีผลทำให้ไข่พยาธิลดน้อยลงทำให้ตรวจไม่พบ

1.3 อุจจาระที่จะเก็บตรวจไม่ควรถ่ายลงบนดิน จะทำให้มีสิ่งอื่นเจือปน เช่น ดินทราย นอกจากนั้นยังอาจมีพยาธิของสัตว์และพืชปะปน ทำให้ยากแก่การวินิจฉัย ควรถ่ายลงบนกระดาษหรือใบไม้ก่อน แล้วจึงตักใส่ภาชนะเก็บ

1.4 อุจจาระที่จะใช้ตรวจต้องมากพอ ถ้าน้อยเกินไปอาจตรวจไม่พบ และบางวิธีต้องใช้อุจจาระมากในการตรวจ

1.5 อุจจาระที่เก็บควรมีปริมาณมากพอเพื่อสะดวกในการตรวจ (1-5 กรัม) และควรเลือกเก็บเอาแต่ส่วนที่ผิดปกติ เช่น ส่วนที่เป็นมูก เลือด ส่วนที่เหลว หรือส่วนที่มีสีแตกต่างไป

1.6 อุจจาระที่จะตรวจควรรีบส่งห้องปฏิบัติการทันที หลังจากเก็บได้ ถ้าช้าเกินไปปรสิตบางชนิดอาจตายทำให้ยากแก่การตรวจ บางชนิดก็เจริญกลายเป็นตัวอ่อนแตกออกจากไข่ ถ้าไม่สามารถตรวจได้ทันทีควรเก็บไว้ในตู้เย็น

1.7 เก็บดองไว้ในน้ำยา เช่น 10% ฟอ์มาลีน หรือ MIF (Merthiolate Iodine Formaldehyde) น้ำยาเหล่านี้สามารถรักษาระยะ Trophozoite, ไข่พยาธิและตัวอ่อนของพยาธิเป็นอย่างดี

1.8 อูจจาระคนไข้ซึ่งกินยาจำพวก แบนเรียม บิสมัส หรือพวกไขมันไม่เหมาะแก่การตรวจ เพราะบางอย่างจะตกผลึกและบังสิ่งที่เราต้องการตรวจ ควรตรวจก่อนให้หรือหลังให้ยาพวกนี้ 1 อาทิตย์

1.9 เขียนรายละเอียดต่างๆ ไว้ข้างภาชนะสำหรับเก็บอุจจาระ เพื่อป้องกันการผิดพลาดสับสน เป็นต้นว่า ชื่อ.....อายุ.....เพศ.....วัน เดือน ปี ที่เก็บ

## 2. อุจจาระที่ได้จากการสวน หรือถ่ายยา

บางคนอาจท้องผูกหลาย ๆ วัน จึงจะถ่าย จำเป็นต้องใส่สารบางอย่างเข้าทางทวารหนัก สารที่ใช้ได้แก่พวกโซเดียมซัลเฟต และอาจให้ยาถ่าย พวกแมกนีเซียมซัลเฟต ซึ่งยาพวกนี้ไม่รบกวนการตรวจพยาธิ การเก็บและส่งตรวจก็ทำเช่นเดียวกับอุจจาระที่ถ่ายปกติ

ตัวอย่างอื่นๆ ที่ใช้ในการตรวจหาหนอนพยาธิตัวกลมนอกจากอุจจาระ คือ

1. เสมหะ เพื่อตรวจหาไข่พยาธิใบไม้ปอด และเชื้อบิดในปอด
2. ปัสสาวะ เพื่อตรวจหา ทริโคโมแนส และพยาธิใบไม้เลือด
3. หนอง ที่ดูดออกจากตับ เพื่อหาเชื้อบิด
4. ของเหลว ที่ดูดออกมาจากลำไส้เล็กส่วนต้นใช้ตรวจหาพยาธิสตรองจิลอยด์และไกอาเดีย
5. ชิ้นเนื้อหรือเนื้อเยื่อ ที่ตัดออกมาจากอวัยวะต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อจากลำไส้เพื่อตรวจหาพยาธิใบไม้เลือด พยาธิตัวจิ๋ว
6. เลือด เพื่อตรวจหา เชื้อไขจับสัน และโรคเท้าช้าง
7. Anal swab เป็นวิธีพิเศษเพื่อตรวจหาพยาธิเข็มหมุด โดยใช้แผ่นกาวใสแปะที่ก้น

### การเก็บรักษาตัวอย่าง

ตัวอย่างอุจจาระถ้าตรวจไม่ทันหรือต้องการเก็บไว้ เพื่อการเรียนรู้ การสอนต้องดองไว้ในน้ำยาต่างๆ ดังนี้

I. 5-10% ฟอรัมาลีน ใช้ดองไข่ ตัวอ่อน ตัวเต็มวัยของพยาธิและซิสต์ของโปรโตซัวโดยใช้ น้ำยา 3 ส่วนต่ออุจจาระ 1 ส่วนผสมให้เข้ากันปิดฝาจุกให้แน่นเก็บไว้ได้เป็นปี

วิธีเตรียม 10%ฟอรัมาลีน

1. ฟอรัมาลดีไฮด์ 40% 10 มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร

II. ฟีนอล -แอลกอฮอล์ -ฟอรัมาลีน (PAF) ใช้เก็บรักษาไข่ ตัวอ่อน โปรโตซัวระยะเคลื่อนไหวและระยะซิสต์ได้ดี

วิธีเตรียม

1. ฟีนอล (เกล็ด) 20 กรัม.
2. 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 825 มิลลิลิตรละลายฟีนอลด้วยน้ำเกลือก่อนแล้วเติม

3. 95% แอลกอฮอล์ 125 มิลลิลิตร

4. 40% ฟอรัมาลดีไฮด์ 50 มิลลิลิตร

ใช้อุจจาระ 1 ส่วนผสมน้ำยา PAF 3 ส่วน ผสมให้เข้ากันในขวดปิดฝาให้แน่นสามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นานหลายปี

III. น้ำยาเมอร์ไทโอเลท-ฟอรัมาลดีไฮด์(MIF) ใช้เก็บรักษาไข่ ตัวอ่อนพยาธิ โปรโตซัว ระยะเวลาเคลื่อนไหวและระยะชีสต์ได้ดีมาก เก็บได้นานหลายปี น้ำยาจะรักษาและย้อมสีปรสิตด้วย แต่ น้ำยาราคาแพง

#### วิธีเตรียม

1. 5% Lugol solution

ไอโอดีน (เกล็ด)	5	กรัม
โปแตสเซียมไอโอไดด์	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

2. MF solution

ฟอรัมาลดีไฮด์ 40%	5	มิลลิลิตร
ทิงเจอร์เมอร์ไทโอเลท (ลิลลี่ No. 99)	40	มิลลิลิตร
กลีเซอริน	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมสารตามหมายเลข 1 และ 2 แล้วใส่ MF 9.4 มิลลิลิตร ลงในน้ำยา Lugol 0.6 มิลลิลิตร ใช้ตัวอย่างอุจจาระ 1 ส่วน ต่อ น้ำยา 3 ส่วน ผสมให้เข้ากันในขวดปิดฝาให้แน่น (น้ำยาที่ผสมควรใช้ทันที เพราะถ้าทิ้งไว้นานจะตกตะกอนและเสื่อมสภาพ)

#### การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการและปริมาณความรุนแรงของการติดเชื้อ

1. การตรวจด้วยตาเปล่า เป็นการดูลักษณะต่างๆ ไป ของอุจจาระก่อนที่จะตรวจด้วยกล้องเพื่อดูลักษณะที่ผิดปกติ ซึ่งสามารถบอกได้ว่าการติดเชื้อพยาธิบางชนิด

1.1 ดูลักษณะอุจจาระว่าเป็นอย่างไร เป็นก้อน อ่อน เหลว หรือเป็นน้ำ

1.2 ดูสี ปกติสีน้ำตาลอ่อน หรือน้ำตาลเข้ม สีของอุจจาระอาจเกิดจากอาหารที่กินเข้าไป หรือมีปรสิตอยู่ เช่น สีเหลือง เนื่องจากกินอาหารพวกนมและไขมัน สีเขียวเนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ biliverdin สีแดงอาจมีเลือดออกทางส่วนล่างของลำไส้จากปรสิต สีดำเนื่องจากกินธาตุเหล็ก หรือเลือดถูกย่อย เนื่องจากเป็นแผลในกระเพาะ

1.3 ดูมูก (mucous) ถ้ามีมากเนื่องจากมีการระคายเคือง หรือมีการอักเสบของผนังลำไส้ พบในบิดจากเชื้ออะมีบา หรือบิดจากเชื้อแบคทีเรีย

1.4 กลิ่น กลิ่นคาวอาจเกิดจากการมีปรสิต กลิ่นเหม็นเน่าพบในพวกเนื้ออกและ  
แผลในลำไส้

1.5 เลือด อาจเนื่องจากเชื้อบิด, แผลในลำไส้, มะเร็ง

1.6 พยาธิ อาจพบปล้องสุกของพยาธิตืด ตัวเต็มวัยพยาธิไส้เดือนกลม และพยาธิเข็ม  
หมุด

2. การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจดูระยะไข่ ตัวอ่อนหรือตัวเต็มวัยของปรสิตที่  
ไม่อาจเห็นด้วยตาเปล่า มีทั้งการตรวจเพื่อวินิจฉัย และหาปริมาณความรุนแรงของการติดเชื้อ

#### วิธีการเตรียมและตรวจอุจจาระ

ในการเตรียมอุจจาระเพื่อตรวจหาปรสิตหนอนพยาธิมีหลายวิธี ที่จะกล่าวต่อไปนี้เป็นวิธี  
ที่ใช้กันอยู่แพร่หลายทั่วไป การจะเลือกใช้วิธีไหนขึ้นอยู่กับชนิดของพยาธิที่ต้องการตรวจหา วิธีต่าง ๆ  
มีดังนี้คือ

ก. วิธีตรวจอย่างง่าย (Direct fecal smear) เป็นวิธีเก่าแก่ ง่าย สะดวกและประหยัด  
สามารถเห็นไข่ได้ชัดเจน แต่อุจจาระที่ใช้้น้อย ประมาณ 1-2 มิลลิกรัม ต่อ 1 สไลด์ ในรายที่มีไข่พยาธิ  
ในอุจจาระน้อย จะตรวจไม่พบซึ่งควรจะต้องตรวจ 2-3 สไลด์ ต่อ 1 ตัวอย่าง วิธีนี้เหมาะสำหรับตรวจ  
หาโปรโตซัวระยะเคลื่อนไหวและระยะชีสต์

#### วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. กระจกสไลด์สำหรับตรวจ
3. กระจกสำหรับปิด (Cover glass)
4. ไม้จิ้มอุจจาระ
5. น้ำเกลือ 0.85%
6. น้ำยาไอโอดีน 1%

#### วิธีทำ

1. หยดน้ำเกลือ 1 หยด ลงบนกระจกสไลด์
2. ใช้ไม้จิ้มอุจจาระเขี่ยอุจจาระจากหลายๆ จุด ให้ได้อุจจาระปริมาณ 2 มิลลิกรัม  
(ประมาณเท่าหัวไม้ขีดไฟ) ละลายในน้ำเกลือให้เข้ากัน
3. ปิดด้วย Cover glass
4. ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้หัวที่มีกำลังขยาย 10x ถ้าสงสัย ต้องการตรวจสอบให้  
แน่นอน ก็ดูด้วยหัวที่มีกำลังขยาย 40x
5. ถ้าจะดูระยะชีสต์ของโปรโตซัวก็ใช้น้ำยา 1% ไอโอดีน ละลายอุจจาระแทนน้ำ  
เกลือแล้วเตรียมการตรวจเช่นเดียวกัน

ข. Kato thick smear เป็นวิธีของ Kato และ Miura ใช้อุจจาระมาก 20-30 เท่า ของวิธีแบบตรวจอย่างง่าย (Direct fecal smear) โดยใช้แผ่นกระดาษแก้วเซลโลเฟนปิดแทน Cover glass เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน สะดวก รวดเร็ว และค่อนข้างประหยัดประสิทธิภาพดีมาก ใช้ตรวจหาไข่พยาธิได้เกือบทุกชนิด ปกติไม่เหมาะสำหรับการตรวจหาตัวอ่อนของพยาธิและโปรโตซัว สามารถใช้ได้กับการตรวจหาพยาธิใบไม้ตับและหนอนพยาธิลำไส้

#### วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. แผ่นกระดาษแก้วเซลโลเฟน ขนาด 22x30 มม. นำซึ้มน้ำผ่านได้ ต้องแช่น้ำยากลิเซอริน-มาลาโคท์ กรีน อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนใช้
3. น้ำยากลิเซอริน-มาลาโคท์ กรีน ประกอบด้วย
 

กลีเซอริน	100	มิลลิลิตร
ฟีนอล 6%	100	มิลลิลิตร
3% มาลาโคท์กรีน	1	มิลลิลิตร
4. ปากคีบ (Forceps)
5. จุกยาง

#### วิธีทำ

1. ตักอุจจาระประมาณ 60-70 มิลลิกรัม ใส่บนกระดาษกรอง
2. ปิดด้วยแผ่นกระดาษแก้วเซลโลเฟนที่แช่อยู่ในน้ำยา
3. ใช้จุกยางกดลงบนกระดาษแก้วตรงบริเวณที่มีอุจจาระอยู่เพื่อให้อุจจาระกระจายสม่ำเสมอและบางพอสามารถตรวจได้
4. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชม. ที่ 25°C หรือ 20-30 นาที ที่ 34-40°C
5. ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

ค. วิธีตรวจโดยการทำให้เข้มข้น (Concentration technique) เป็นการแยกไข่พยาธิให้มารวมตัวกันมาก ๆ แล้วตกตะกอนในขณะที่กากอุจจาระและเศษอาหารขนาดใหญ่จะถูกกรองออกด้วยผ้าก๊อซ ส่วนขนาดเล็กจะถูกย่อย ถ้าเบาจะลอยขึ้นข้างบน ถ้าหนักจะตกตะกอนลงข้างล่างร่วมกับไข่พยาธิ และซิสต์ของโปรโตซัว การทำให้เข้มข้นแบ่งได้เป็น 2 วิธีคือ

1. การทำให้เข้มข้นโดยวิธีทำให้ไข่พยาธิลอยตัว (Floatation technique) ไข่พยาธิและซิสต์ของโปรโตซัวจะลอยขึ้นมาบนผิวของน้ำยา โดยการใช้ น้ำยาที่มีความถ่วงจำเพาะมากกว่าไข่พยาธิและซิสต์ของโปรโตซัว

- 1.1 วิธีลอยตัวแบบง่าย ๆ (Simple floatation) เป็นวิธีของ Willis 1921 ใช้น้ำเกลืออิ่มตัว ซึ่งมีความถ่วงจำเพาะ 1.20

#### วิธีทำ

- ใส่ น้ำเกลือลงในหลอดแก้วขนาด 15-20 มิลลิลิตร ครึ่งหลอด

- ใส่อุจจาระประมาณ 5 กรัมลงไป (ขนาดเท่าหัวแม่มือ)
- ใช้ไม้คนให้เข้ากันเพื่อกวนอุจจาระให้ละลาย
- ใช้ปิเปตดูดน้ำเกลือเติมลงไปให้หมดแก้วจนถึงขอบ
- ใช้ Cover glass ปิดหลอดแก้ว
- ตั้งทิ้งไว้ 20-30 นาที
- ค่อยๆ ยก Cover glass ออก
- ปิดลงบนสไลด์ แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.2 วิธีลอยตัวโดยการใช้เครื่องปั่น (Centrifuge floatation) เป็นวิธีของ Faust, et al., 1939. น้ำยาที่ใช้คือซิงค์ซัลเฟต ความถ่วงจำเพาะ 1.18 (ซิงค์ซัลเฟต 33 กรัม + น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)

วิธีทำ

- หลอดแก้วขนาด 10x13 มม. ใส่น้ำยาลงไปประมาณ 10 มิลลิลิตร
- ใส่อุจจาระลงไป ประมาณ 5 กรัม (ขนาดเท่าหัวแม่มือ)
- ใช้ไม้คนผสมให้เข้ากันเพื่อกวนอุจจาระให้ละลาย
- เติมน้ำยาลงไปอีกประมาณ 2/3 ของหลอดแก้ว แล้วปั่น 2,500 รอบ/นาที นาน 1

นาที

- ใช้ปิเปตดูดผิวหนังใส่สไลด์
- ปิดด้วย Cover glass แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

หมายเหตุ การทำให้เข้มข้นแบบลอยตัวทั้ง 2 วิธีนี้ ใช้ไม่ได้กับไข่พยาธิไส้เดือนที่ไม่ถูกผสมพันธุ์ ไข่พยาธิที่มีฝาปิดและซิสต์ของโปรโตซัว เนื่องจากมีความถ่วงจำเพาะสูงกว่าน้ำยาจะจมลงข้างล่าง

2. การทำให้เข้มข้นโดยวิธีตกตะกอน (Sedimentation technique) หลักการโดยใช้น้ำยาไปละลายตะกอน หลังจากสกัดด้วย อีเทอร์ และปั่น ไข่ของพยาธิจะตกตะกอนลงกันในขณะที่เศษอาหารและกากใหญ่ๆ จะถูกย่อยออกมา มีอยู่หลายวิธีที่นิยมใช้กัน คือ ฟอว์มาลีน อีเทอร์, เมอร์โทโอเลท ไอโอดีน-ฟอว์มัลดีไฮด์ และ เอ-เอ็ม-เอส III เทคนิคแต่ละวิธีมีหลักการเหมือนกัน แต่น้ำยาที่ใช้ต่างกัน สามารถใช้ได้กับไข่พยาธิทุกชนิด และโปรโตซัวระยะซิสต์ ดังนั้นจะขอกกล่าวเพียงบางวิธีที่เห็นว่าง่าย สะดวก ประสิทธิภาพสูงและใช้อยู่ทั่วไป

2.1 ฟอว์มาลีน-อีเทอร์-เทคนิค (Ritchie, 1948)

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาไข่ ตัวอ่อนของพยาธิ และซิสต์ของโปรโตซัว ได้ดี

วัสดุอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. เครื่องปั่นไฟฟ้า

3. หลอดแก้วกันแหลมขนาด 15 มิลลิลิตร
4. จุกยาง
5. ตลับพลาสติก
6. กรวยพลาสติก
7. ผ้าก๊อซ
8. 10% ฟอर्मาลีน
9. อีเทอร์
10. ไม้คนอุจจาระแผลไม้พันสำลี
11. น้ำเกลือ 0.85%

#### วิธีทำ

1. ตักอุจจาระพอประมาณใส่ในตลับพลาสติก
2. ใส่น้ำเกลือหรือน้ำธรรมดาลงไปประมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. กรองด้วยผ้าก๊อซเปียกสองชั้นใส่ในหลอดแก้วกันแหลม
4. ปั่นด้วยความเร็ว 2,000-2,500 รอบ/นาที นาน 1-2 นาที
5. เทน้ำข้างบนทิ้ง ถ้ายังขุ่นอยู่ทำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง โดยเติมน้ำเกลือหรือน้ำธรรมดาลงไป  
ไปในตะกอนคนให้เข้ากันแล้วปั่นด้วยความเร็วเท่าเดิม
6. เทน้ำทิ้งแล้วเติม 10% ฟอर्मาลีนลงไป 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10  
นาที
7. เติมอีเทอร์ 3 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่นเขย่าแรงๆ 30 วินาที
8. ปั่นด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 1 นาที จะเห็นเป็น 4 ชั้น
  - 8.1 ชั้นบนเป็นอีเทอร์ที่เหลือน
  - 8.2 ชั้นต่อมาเป็นเศษอาหาร และผงที่ถูกสกัดออกมา
  - 8.3 ชั้นฟอर्मาลีน
  - 8.4 ตะกอนซึ่งมีไข่พยาธิ และซิสต์โปรโตซัวปนอยู่
9. ใช้ไม้เขี่ยเศษอาหาร แล้วเทคว่ำหลอดแก้ว
10. เช็ดข้างๆ หลอดแก้วด้วยไม้พันสำลี
11. หยอดน้ำเกลือลงไป 1 หยด ผสมตะกอนให้เข้ากันแล้วใช้แคปปิลารี-ปิเปตดูด  
ตะกอน หรือจะเทหลอดแก้วคว่ำลงบนสไลด์ แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.2 เมอร์ไทโอเลท-ไอโอดีน-ฟอर्मัลดีไฮด์ เทคนิค หรือ MIF technique (Blagg et al., 1955) เป็นวิธี concentration ที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ใช้ตรวจหาไข่ตัวอ่อนพยาธิ และซิสต์โปรโตซัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งไข่พยาธิซิสโตโซม นอกจากนั้นวิธีนี้ยังสามารถเก็บรักษาตัวอย่าง และย้อมสีได้เป็นอย่างดี

### วัสดุอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. เครื่องปั่นไฟฟ้า
3. หลอดแก้วกันแหลมขนาด 15 มิลลิลิตร
4. จุกยาง
5. ตลับพลาสติก
6. กรวยพลาสติก
7. ผ้าก๊อซ
8. น้ำยา เมอร์โทไอเลท-ไอโอดีน-ฟอร์มาลดีไฮด์ (MIF)
9. อีเทอร์
10. ไม้คนอุจจาระและไม้พันสำลี

### วิธีทำ

1. อุจจาระแช่อยู่ในน้ำยา MIF
2. เขย่าแรงๆ 5 วินาที
3. กรองด้วยผ้าก๊อซเปียก 2 ชั้น ใส่ในหลอดแก้วกันแหลมขนาด 15 มิลลิลิตร
4. เติมอีเทอร์ 3-4 มิลลิลิตร
5. ปิดด้วยจุกยางแล้วเขย่าแรงๆ
6. เอาจุกยางออก แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 นาที
7. ปั่นด้วยความเร็ว 1,600 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที
8. จะเห็นเป็น 4 ชั้น เช่นเดียวกับวิธีฟอร์มาลิน-อีเทอร์
  - 8.1 ชั้นบนเป็นชั้นของอีเทอร์
  - 8.2 ชั้นที่ 2 เป็นชั้นของกากอาหาร
  - 8.3 ชั้นที่ 3 น้ำยา MIF
  - 8.4 ชั้นล่างกันหลอดเป็นตะกอนซึ่งมีไข่พยาธิและชีสต์ของโปรโตซัว
9. เชี่ยวชั้นเศษอาหารแล้วเทคว่ำหลอดแก้ว
10. เช็ดข้างๆ หลอดแก้วด้วยไม้พันสำลี
11. ใช้แคปปีลารีปิเปตดูดตะกอน หรือเทหลอดแก้วคว่ำลงบนสไลด์
12. ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

### ง. การตรวจนับไข่พยาธิ

เป็นวิธีการตรวจเพื่อประเมินความรุนแรงของโรค คร่าวๆ ว่ามีพยาธิมากน้อยเพียงใดในร่างกาย สามารถใช้ได้กับพยาธิลำไส้หลายชนิด เช่น พยาธิปากขอ พยาธิไส้เดือนและพยาธิแส้ม้า หรือพยาธิของอวัยวะอื่นที่มีไข่ออกมากับอุจจาระ เช่น พยาธิใบไม้ตับ วิธีที่ใช้กันอยู่มี 4 วิธีคือ



1. นับโดยวิธี direct fecal smear เนื่องจากเราทราบคร่าวๆ ว่ามีวิธีนี้ใช้อุจจาระประมาณ 2 มิลลิกรัม ดังนั้นนับไข่พยาธิทั้งหมดที่พบในสไลด์แล้วคำนวณเป็นจำนวนไข่พยาธิต่ออุจจาระ 1 กรัม ซึ่งวิธีนี้ไม่ค่อยแน่นอน

2. วิธีของ บีเวอร์ (Beaver's direct smear) วิธีนี้ต้องมีเครื่องมือพิเศษ เป็นกัลวานอร์มิเตอร์ สำหรับวัดแสง เพื่อเทียบความขุ่นของอุจจาระที่ละลายในน้ำเกลือกับความขุ่นของสารละลายมาตรฐานที่มีอยู่ 1-2 มิลลิกรัม นับจำนวนไข่พยาธิทั้งหมดที่พบ แล้วคำนวณเป็นจำนวนไข่ต่ออุจจาระ 1 กรัม

3. Modified Kato-Katz วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธี Kato's ดั้งเดิม โดย Katz และผู้ร่วมงาน ใช้ได้ทั้งงานคุณภาพและปริมาณ หลักการของวิธีนี้ คือพวกกาออกุจจาระที่มีขนาดใหญ่ๆ จะถูกกรองออกด้วยตะแกรง น้ำยากลิเซอรินจะช่วยย่อยส่วนที่เหลือ ทำให้ใสและสีมалаโคท์กรีน จะทำหน้าที่ตัดแสงทำให้ตรวจง่าย

#### วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. กระจกสไลด์สำหรับตรวจ
3. ไม้เขี่ยอุจจาระ
4. กระดาษแก้วเซลโลเฟนตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยม ขนาด 22x30 มม. แฉในน้ำยากลิเซอริน-มалаโคท์กรีน 24 ชม. ก่อนใช้

#### น้ำยาประกอบด้วย

กลิเซอริน 100 มิลลิลิตร

ฟีนอล 60% 100 มิลลิลิตร

(ถ้าไม่มีฟีนอลใช้น้ำกลั่นแทน)

มалаโคท์กรีน 3% 1 มิลลิลิตร

5. กระดาษแข็งหรือพลาสติกสี่เหลี่ยมผืนผ้าหนา 1.37 มม. กว้าง 3 ซม. ยาว 4 ซม. เจาะรูตรงกลางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.

6. ตะแกรงลวดขนาด 105 ช่องต่อตารางนิ้ว หรือขนาดของช่อง 0.1-0.15 มม. ตัดเป็นแผ่นขนาดเท่ากระดาษแข็ง

7. กระดาษซับหรือกระดาษหนังสือพิมพ์

8. ปากคีบ (สำหรับจับและกดตะแกรงลวด)

9. จุกยาง

#### วิธีทำ

1. ใช้ไม้เขี่ยอุจจาระจากหลายๆ จุด แล้วใส่ลงบนกระดาษหนังสือพิมพ์ เพื่อให้ซับน้ำออกบ้าง

2. กดตะแกรงลวดลงบนอุจจาระ (หากใช้ปากคีบกดตะแกรงต้องฆ่าเชื้อรายต่อราย)

3. ใช้ไม้เขี่ยอุจจาระส่วนที่ลอดผ่านตะแกรงลวดออกมาใส่ในรูของกระดาษแข็งซึ่งวางอยู่บนกระจกตรวจจนเต็มพอดี (ใช้ไม้ปาดให้เสมอ)

4. ค่อยๆ ยกกระดาษแข็งออก

5. เอาแผ่นกระดาษแก้วเซลโลเฟนที่แช่อยู่ในน้ำยาเกลือเชอริน-มาลาโคทกรีน ปิดลงบนอุจจาระ

6. ใช้จุกยางกดบนกระดาษแก้วเซลโลเฟน เพื่อให้อุจจาระแผ่กระจายออกไป และให้บางพอเหมาะที่จะตรวจได้ตลอด

7. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30-60 นาที

8. ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

9. ถ้าต้องการทราบความรุนแรงของพยาธิก็นับจำนวนไข่ที่ตรวจพบแต่ละชนิดทั้งหมดในสไลด์

10. คำนวณหาจำนวนไข่พยาธิในอุจจาระ 1 กรัม

จำนวนไข่ที่นับได้  $\times 23 =$  จำนวนไข่/อุจจาระ 1 กรัม

4. การตรวจด้วยวิธี สตอลล์ (Stoll's Dilution Egg-Count Technique) เป็นวิธีเก่าคิดโดย Stoll และ Hausheer ความแม่นยำค่อนข้างสูง แต่เครื่องมือราคาแพง และหายากในบ้านเรา

วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์

2. กระจกสไลด์ และ cover glass ขนาด 22x40 มม.

3. สตอลล์ฟลอสก์ (Stoll flask)

4. สตอลล์ปิเปต (Stoll pipette)

5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล (0.1 N. NaOH)

6. ลูกแก้ว (glass beads)

7. จุกยาง

วิธีทำ

1. ใส่น้ำยา 0.1 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดจนถึงขีด 56 มิลลิลิตร

2. ใส่อุจจาระลงไปจนถึงขีด 60 มิลลิลิตร

3. ใส่ลูกแก้ว 4-8 ลูก

4. ปิดขวดด้วยจุกยางเขย่า แล้วตั้งทิ้งไว้ 2-6 ชม. ถ้าอุจจาระแข็งควรตั้งทิ้งไว้ 12-24 ชม. เขย่าเป็นครั้งคราว

5. เมื่อเขย่าให้เข้ากันดีแล้ว ดูดด้วยปิเปตจนถึงขีด 0.15 มิลลิลิตร

6. หยดลงบนสไลด์ 2 แผ่นๆ ละ 0.075 มิลลิลิตร

7. นับไข่พยาธิทั้ง 2 สไลด์ รวมกันแล้วคูณด้วย 100

8. ดูความเหลวแข็ง (Consistency) ของอุจจาระ แล้วคูณด้วยแฟคเตอร์ความเหลวแข็งของอุจจาระ ดังนี้

- อุจจาระแข็ง (Hard) x 1
- อุจจาระอ่อน (Soft) x 2
- อุจจาระเหลว (Loose) x 3
- อุจจาระเป็นน้ำ (Diarrhea) x 4

9. รายงานผลเป็นจำนวนไข่พยาธิต่ออุจจาระ 1 กรัม

เนื่องจากวิธี Stoll's dilution technique เครื่องมือที่ใช้ราคาแพงมาก และหายาก นอกจากนั้นอุจจาระที่ใช้ก็มักไม่เหมาะกับการสำรวจโครงการใหญ่ๆ ซึ่งต้องตรวจทันทีที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานๆ ดังนั้นจึงมีผู้คิดดัดแปลงพัฒนาให้เหมาะสมกับการสำรวจ (Survey) ยิ่งขึ้น

5. วิธี Modified Stoll's Dilution Egg Count Technique (Impand et. al.,)

วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. กระจกสไลด์และ cover glass ขนาด 22 x 40 มม.
3. ขวดเกลียวปากกว้างขนาดจุประมาณ 18-22 มิลลิลิตร มีเครื่องหมายบอกปริมาตร 4, 5 และ 15 มิลลิลิตร
4. จุกเกลียว
5. สตอลล์ปีเปตหรือปีเปตที่มีขีดบอก 0.1 มิลลิลิตร
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล
7. ฟอรัมาลิน 10%
8. ลูกแก้ว

วิธีทำ

1. ใส่น้ำยา 10% ฟอรัมาลินลงในขวดให้ถึงขีด 4 มิลลิลิตร
2. ใส่อุจจาระลงไปจนถึงขีด 5 มิลลิลิตร
3. ผสมให้เข้ากัน
4. เมื่อจะนับไข่พยาธิเติมน้ำยาโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัลลงไปถึงขีด 15 มิลลิลิตร
5. ใส่ลูกแก้วลงไป 2-3 ลูก
6. ปิดจุกให้แน่น เขย่าให้ผสมกัน
7. ตั้งทิ้งไว้ 2-24 ชม. เขย่าเป็นครั้งคราว
8. ใช้ปีเปตดูดส่วนผสมอุจจาระจนถึงขีด 0.15 มิลลิลิตร ใส่กระจกสไลด์ 2 สไลด์ๆ ละ 0.075 มิลลิลิตร

9. นับไข่ม้วนทั้ง 2 สไลด์ รวมกันแล้วคูณด้วย 100

10. คุณด้วยแฟคเตอร์ความแข็ง (consistency) ของอุจจาระ

หมายเหตุ เมื่อไม่สามารถตรวจได้ทันทีที่ต้องการเก็บตัวอย่างไว้ก่อน ให้ทำตามขั้นตอนที่ 1,2 และ 3 เมื่อจะนับ ให้เติมน้ำยาโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล ลงไปย่อย แต่ถ้าต้องการตรวจทันทีใช้น้ำยาโซเดียมไฮดรอกไซด์แทน 10% ฟอรัมาลินได้เลย

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สิ่งที่เราอาจพบได้ในอุจจาระ เป็นสิ่งแปลกปลอม (Artifact) และทำให้เข้าใจว่าเป็นปรสิต คือ

1. ฟองอากาศ

2. ไขมัน รูปกลมรี หรือ flask shape เห็นเป็นเงา ๆ ขอบสีดำหรือขาว สะท้อนแสงพบได้เนื่องจากอาหารที่กินเข้าไปหรืออุจจาระที่สวน

3. ยีสต์ (yeast) เช่น พวก Blastocystis hominis ลักษณะคล้ายซีสต์ของโปรโตซัว มีก้อนกลม ๆ อยู่ข้างใน ขอบเซลล์บาง อาจกลมหรือเป็นรูปไข่

4. แป้ง (Starch) เมื่ออยู่ในน้ำเกลือจะมีลักษณะใส ๆ เป็นรูปสี่เหลี่ยม หรือห้าเหลี่ยม อยู่เป็นหย่อม ๆ

5. ส่วนของพืช

- Vegetable fiber ลักษณะเป็นขดคล้ายลวดสปริง

- Vegetable cells ขอบหนาอาจเป็นสีเขียวของคลอโรฟิลล์ข้างใน

- Pollen grain เกษรดอกไม้

- Vegetable hair กลมยาวเรียวยคล้ายตัวอ่อนของพยาธิ

6. ส่วนที่มาจากเนื้อสัตว์

- Muscle fiber เป็นแผ่นสี่เหลี่ยมยาว ๆ ขอบไม่เรียบมีลายขวางเป็นเส้น ๆ ตลอด

- Connective tissue ขอบไม่ชัดเจนจะเห็นเป็นเส้น ๆ ตามยาว ไม่สม่ำเสมอ

7. เซลล์ของร่างกาย

- Epithelium cells เป็นเซลล์จากเยื่อบุลำไส้ใหญ่ พบมากในรายที่เป็นแผลของลำไส้

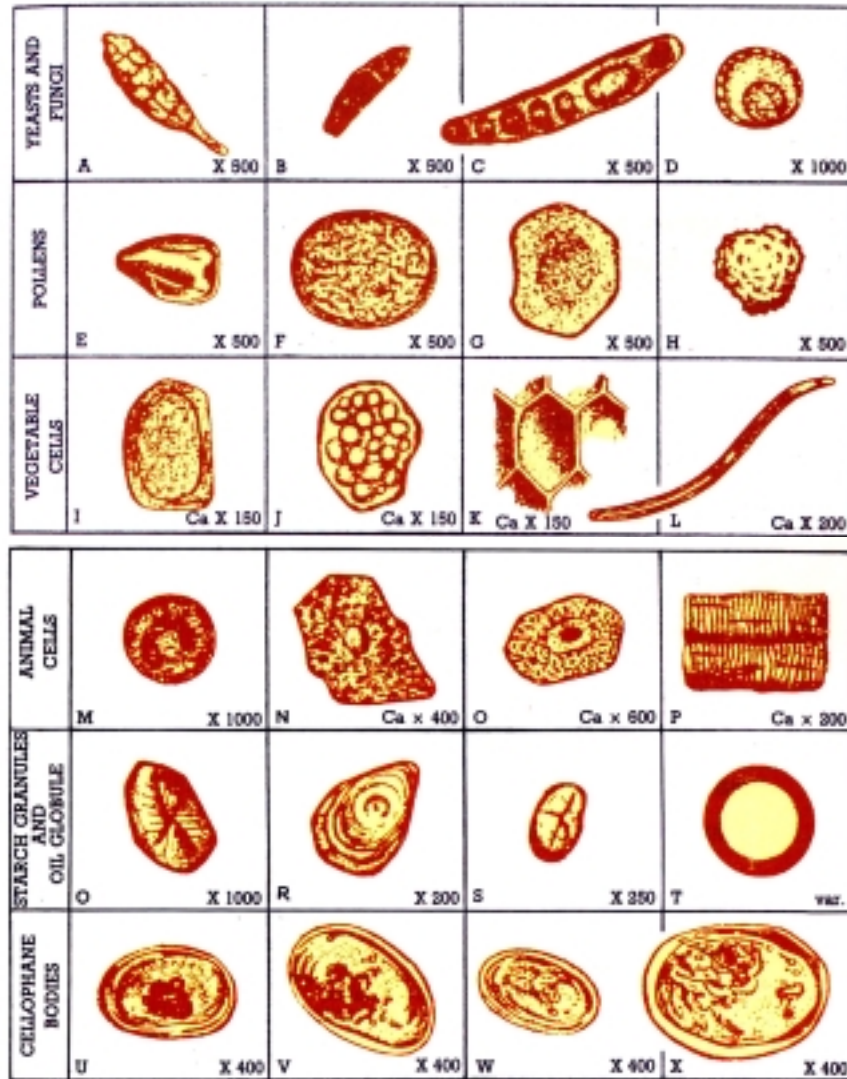
- Macrophage เป็นพวกเม็ดเลือดขาวตัวใหญ่ พบมากในรายที่เป็นแผลของลำไส้

- Leukocytes เป็นเม็ดเลือดขาว ปกติพบได้เล็กน้อย ถ้ามีมาก ๆ อาจพบในโรคบิดจากเชื้อแบคทีเรีย และแผลในลำไส้

- Erythrocyte เป็นเม็ดเลือดแดง ปกติไม่พบในอุจจาระนอกจากในรายที่มีแผลในลำไส้ใหญ่ ทวารหนัก และในรายที่เป็นบิดจากเชื้ออะมีบา

## 8. Crystal

- Charcot-Leyden crystals ไม่มีสี รูปเข็ม หรือกระสวยปลายแหลมพบใน  
รายที่เป็นพยาธิไส้เฒ่า พยาธิแคปิลลาเรีย และผู้ป่วยที่เป็นบิดจากเชื้ออะมีบา



ภาพที่ 15-1 สิ่งแปลกปลอมที่อาจตรวจพบได้ในอุจจาระ

ลักษณะต่างๆ ที่ใช้ประกอบการพิจารณาว่าเป็นไข่พยาธิหรือไม่ได้แก่สิ่งต่างๆ ดังนี้

- ขนาด (Size) พยาธิที่มีไข่ขนาดใหญ่ได้แก่ *Fasciolopsis buski*, Echinostome, Schistosome, *Paragonimus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Hymenolepis diminuta*  
พวกที่มีไข่ขนาดกลางได้แก่ *Ascaris* spp., Hookworm, *Trichuris* spp., *Enterobius* spp., *Taenia* spp. และ *Hymenolepis nana*.  
พวกที่ไม่มีไข่ขนาดเล็กได้แก่ *Opisthorchis* spp., และพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก เช่น *Haplorchis* spp., *Prosthodendrium* spp. และ *S. tellanthchasmus* spp.

2. รูปร่าง (Shape) ส่วนมากไข่พยาธิจะเหมือนกันทั้งสองด้าน แต่มีบางชนิดต่างกัน เช่น *Trichostrongylus*, *Enterobius* และบางชนิดผิวไม่สม่ำเสมอ เช่น ไข่พยาธิไส้เดือนที่ไม่ได้ถูกผสมพันธุ์

3. สี (color) บางชนิดไม่มีสี เช่น *Hymenolepis nana*, Hookworm, *Trichostrongylus* spp., *Enterobius* spp., ไข่พยาธิไส้เดือนที่เปลือกชั้นนอกหลุดออก

บางชนิดมีสีเหลืองอ่อน (light yellow) ได้แก่ ไข่พยาธิ *Schistosoma*, *Opisthorchis* spp., *Fasciolopsis buski*

บางชนิดมีสีน้ำตาล (brown) ได้แก่ ไข่พยาธิ *Ascaris* spp., *Trichuris* spp., *Hymenolepis diminuta*, *Taenia* spp.

บางชนิดมีสีเหลืองทอง (golden yellow) ได้แก่ ไข่พยาธิ *Paragonimus* spp.

4. เปลือกนอก และส่วนประกอบอื่นๆ (eggshell and accessories)

บางชนิดเปลือกบางได้แก่ ไข่พยาธิ Hookworm, *Trichostrongylus* spp., *Echinostome*, *Fasciolopsis buski*.

บางชนิดเปลือกหนา ได้แก่ ไข่พยาธิ *Ascaris* spp., *Trichuris* spp., *Paragonimus* spp.

บางชนิดมีลายขวางที่เปลือกได้แก่ ไข่พยาธิ *Taenia* spp. บางชนิดมีฝา (operculum) ได้แก่ *Opisthorchis* spp., *Paragonimus* spp., *Echinostome* และไข่พยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก

บางชนิดหนามแหลมยื่นออกมา ได้แก่ ไข่ *Schistosoma*

บางชนิดมีหนามอยู่ข้างใน ได้แก่ *Taenia* spp., *Hymenolepis* spp.

บางชนิดมีตัวอ่อน (miracidium) อยู่ข้างในได้แก่ ไข่ *Schistosoma*, *Opisthorchis* spp., พยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก (small intestinal fluke)



ภาพที่ 15-2 ไข่พยาธิที่ตรวจพบในคนและสัตว์