



การศึกษาลักษณะชีวิตและระบุชนิดทางพันธุกรรมของอะแคนทามีบา จากแหล่งน้ำใน
สิ่งแวดล้อม จากชุมชนตำบลเมืองเก่า จังหวัดสระบุรี

ENCYSTATION CHARACTERISTICS AND GENETIC IDENTIFICATION OF
ACANTHAMOEBA SPP. FROM ENVIRONMENTAL IN MUEANG KOAW
VILLAGE, SARABURI PROVINCE

ปฐิภาณ	เพชรน้อย
พรชิตา	สว่างศรี
สิริวิษญ์	อภินันท์ธนากร
อภิญญา	เวบส์เตอร์
อโณมา	เรืองจำเนียร
อัจจิมา	ทิตตเมธา

ภาคนิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์
คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยรังสิต

พ.ศ.2567



**ENCYSTATION CHARACTERISTICS AND GENETIC IDENTIFICATION OF
ACANTHAMOEBA SPP. FROM ENVIRONMENTAL IN MUEANG KOAW
VILLAGE, SARABURI PROVINCE.**

PATIPHAN

PHETRNOI

PORNCHITA

SAWANGSRI

SIRAWICH

APINONTANAKORN

APINYA

WEBSTER

ANOMA

RUENGJUMNIEN

AJIMA

THITTAMETHA

**A TERM PAPER SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHELOR
OF SCIENCE IN MEDICAL TECHNOLOGY
MEDICAL TECHNOLOGY**

RANGSIT UNIVERSITY

2024

ภาคินพนธ์เรื่อง

การศึกษาลักษณะชีวิตและระบบนิเวศทางพันธุกรรมของอะแคนทามีบา จากแหล่งน้ำใน
สิ่งแวดล้อม จากชุมชนตำบลเมืองเก่า จังหวัดสระบุรี

โดย

ปฏิภาณ	เพชรน้อย
พรชิตา	สว่างศรี
สิริวิษญ์	อภินันท์ธนากร
อภิญญา	เวบส์เตอร์
อโนมา	เรืองจำเนียร
อัจจิมา	ทิตตเมธา

ได้รับพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์
เมื่อวันที่ 18 ตุลาคม 2568

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เฉลิมพล แก้วใจ)
ประธานกรรมการภาคินพนธ์

(ผศ.ดร.สุพัตรา วัฒนสาธิตอาภา)

กรรมการ

อุมภัสร์ พุทธิผดุงวิมล

(ดร.อุมภัสร์ พุทธิผดุงวิมล)

หัวหน้าสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

ณัฏฐา พงษ์ขจรพงศ์

(ดร.ณัฏฐา พงษ์ขจรพงศ์)

กรรมการ

ค.ช

(รองศาสตราจารย์เยาวลักษณ์ พิมายนอก)

คณบดีคณะเทคนิคการแพทย์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ นายสุรรัตน์ อัครพันธ์ นายกเทศมนตรีตำบลเมืองเก่า ที่ได้อนุญาตให้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างในพื้นที่ เพื่อนำมาใช้ในการจัดทำปริญญานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์เฉลิมพล แก้วใจ, ผศ.ดร.สุพัตรา วัฒนสาธิตอาภา, และ ดร.ณัฐนิชา ศุภกรชวงส์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนอย่างยิ่ง โดยให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยปรับปรุงแก้ไขเนื้อหา ทั้งในด้านทฤษฎีและปฏิบัติ จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้อำนวยความสะดวกในการจัดหาเครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับการจัดทำปริญญานิพนธ์ครั้งนี้

นอกจากนี้ คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่ได้ร่วมมือ สนับสนุน และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา รวมถึงการแบ่งปันประสบการณ์ที่มีคุณค่า ซึ่งช่วยให้การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จตามเป้าหมาย

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจศึกษา และสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยในอนาคตได้

ปฏิภาณ	เพชรน้อย
พรชิตา	สว่างศรี
สิริวิษญ์	อภินันท์ธนากร
อภิญา	เวสต์เตอร์
อโณมา	เรืองจำเนียร
อัจจิมา	ทิตตเมธา

บทคัดย่อ

6403222, 6505041, 6506778, 6505042,

: สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

6506777, 6505054

วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

คำสำคัญ : *ACANTHAMOEBA* SPP. , SURFACE WATER, SAOHAI SARABURI PROVINCE

ปฐกนิพนธ์ เพชรน้อย, พรชิตา สว่างศรี, สิริวิษญ์ อนันันท์ธนากร, อภิญญา เวบส์เตอร์, อโณมา เรืองจำเนียร, อัจจิมา ทิตตเมธา

การตรวจหาเชื้ออะแคนตามีบาจากน้ำในบริเวณชุมชน อำเภอเสนาห์ จังหวัดสระบุรี

(DETECTION OF *ACANTHAMOEBA* SPP. FROM SURFACE WATER AND SOIL IN SAO HAI DISTRICT, SARABURI PROVINCE)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เฉลิมพล แก้วใจ, 41หน้า

อะแคนตามีบา (*Acanthamoeba*) เป็นโปรโตซัวชนิดเซลล์เดี่ยวที่เคลื่อนที่ด้วยขาเทียม (pseudopodia) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น แหล่งน้ำ ดิน และฝุ่น เชื้อนี้สามารถก่อโรคในคนแบบติดเชื้อโดยบังเอิญ และเป็นสาเหตุสำคัญของ โรคกระจกตาอักเสบ (*Acanthamoeba keratitis*) และโรคสมองอักเสบแบบแกรนูโลมา (GAE) การศึกษานี้ดำเนินในพื้นที่ บึงโง้ง อำเภอเสนาห์ จังหวัดสระบุรี โดยตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp. จากน้ำจำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วย 3 วิธี ได้แก่ การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ การเพาะเลี้ยง และการตรวจแบบ Conventional PCR พบว่า น้ำมีอุณหภูมิเฉลี่ย 25.8°C และ pH 8.1

ผลตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่พบเชื้อ แต่ การเพาะเลี้ยงพบเชื้อร้อยละ 30 โดยมีลักษณะคล้ายกลุ่ม *Astronyxid* และ *Polyphagid* ซึ่งพบในสิ่งแวดล้อมและอาจก่อโรคในมนุษย์ ส่วนการตรวจด้วย PCR ไม่พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ อาจเกิดจากปริมาณดีเอ็นเอต่ำหรือมีสารรบกวน

สรุปได้ว่าการตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ในแหล่งน้ำควรใช้ทั้งวิธีเพาะเลี้ยงและเทคนิคอณูชีววิทยาร่วมกัน เพื่อเพิ่มความแม่นยำและความไวในการตรวจหาเชื้อจากสิ่งแวดล้อม

ABSTRACT

6403222, 6505041, 6506778, 6505042, : MAJOR MEDICAL TECHNOLOGY
6506777, 6505054 B.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)

KEY WORD : *ACANTHAMOEBA* SPP., SURFACE WATER, SAOHAI SARABURI
PROVINCE

**PATIPHAN PHETRNOI, PORNCHITA SAWANGSRI, SIRAWICH APINONTANAKORN,
APINYA WEBSTER, ANOMA RUENGJUMNIEN, AJIMA THITTAMETHA
DETECTION OF *ACANTHAMOEBA* SPP. FROM SURFACE WATER IN SAO HAI
DISTRICT, SARABURI PROVINCE**

THESES ADVISOR: ASST. PROF. CHALERMPON KAEWJAI, 41 pages.

Acanthamoeba is a free-living unicellular protozoan that moves using pseudopodia. It is commonly found in natural environments such as water, soil, and dust. Human infection occurs accidentally and may lead to *Acanthamoeba* keratitis or granulomatous amoebic encephalitis (GAE). This study investigated water sources at Bueng Ngong, Sao Hai District, Saraburi Province, Thailand, using three detection methods for *Acanthamoeba* spp.: microscopic examination, culture, and conventional PCR. Thirty water samples were collected, with an average temperature of 25.8°C and pH 8.1

Microscopic examination did not detect the organism. However, 30% of samples were positive in culture, with isolates showing characteristics similar to the Astronyxid and Polyphagid groups, which are environmentally common and potentially pathogenic. Conventional PCR did not detect *Acanthamoeba* DNA, likely due to low DNA concentration or PCR inhibitors.

In conclusion, detection of *Acanthamoeba* spp. in environmental water should combine culture and molecular methods to improve accuracy and sensitivity.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญรูปภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	2
1.4 ระยะเวลาการดำเนินงาน	2
1.5 สมมุติฐานการวิจัย	2
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	
2.1 ความหมายของเชื้ออะแคนทามีบา	3
2.2 วงจรชีวิตของเชื้ออะแคนทามีบา	3
2.3 การถูกค้นพบครั้งแรกในโลกและประเทศไทย	4
2.4 ความสำคัญของการก่อโรค	5
2.5 การจัดกลุ่มจำแนกเชื้อ	6
2.6 กลไกการติดเชื้อ	7
2.7 การวินิจฉัย	8
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การออกแบบการวิจัย	11
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	11
3.3 สารเคมีและน้ำยาทดสอบ	12
3.4 วิธีการศึกษา	12

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การตรวจหาเชื้อ <i>Acanthamoeba</i> spp. ในน้ำโดยใช้กล้องจุลทรรศน์	17
4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ (<i>Acanthamoeba</i> spp. cultivation)	18
4.3 การตรวจหาเชื้อ <i>Acanthamoeba</i> spp. ในน้ำโดยวิธีการทำ Conventional PCR	19
4.4 ผลการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล (Tests of Normality)	20
4.5 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (Spearman's Rank Correlation)	21
4.6 ช่วงความเชื่อมั่นของค่าสหสัมพันธ์ (Confidence Interval of Spearman's rho)	22

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	24
5.2 ข้อเสนอแนะ	25

บรรณานุกรม

ภาคผนวก ก รายละเอียดการเตรียมสารเคมี	28
ภาคผนวก ข การเก็บสิ่งตัวอย่าง	31
ภาคผนวก ค วิธีการตรวจสิ่งตัวอย่าง	34

ประวัติผู้วิจัย

36

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงผลค่า สี ความขุ่น pH และอุณหภูมิ ตัวอย่างน้ำจากบึงไฉ่ ตำบลเมืองเก่า	19
4.2 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างน้ำจากบึงไฉ่ ตำบลเมืองเก่า	20

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 วงจรชีวิตของ <i>Acanthamoeba</i> spp.	4
2.2 การจัดจำแนกกลุ่มอะแคนทามีบาตามขนาดและรูปร่างของซิสต์ จำแนกตาม หลักเกณฑ์ของ Pussard and Pons (1977)	7
4.1 ผลของ conventional PCR	20
4.2 แสดงผลการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล (Tests of Normality)	21
4.3 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (Spearman's Rank Correlation)	22
4.4 ช่วงความเชื่อมั่นของค่าสหสัมพันธ์ (Confidence Interval of Spearman's rho)	23

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

NNA : Non-nutrient agar

DW : Distilled water

NaCl : Sodium chloride

KH_2PO_4 : Potassium dihydrogen phosphate

Na_2HPO_4 : Disodium hydrogen phosphate

$\text{Ca Cl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$: Calcium chloride hexahydrate

$\text{MgSO}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: Magnesium sulphate heptahydrate

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

บทที่ 1

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหาวิจัย

อะแคนทามีบา (*Acanthamoeba*) เป็นสัตว์เซลล์เดียวที่อยู่ในตระกูลโปรโตซัว เคลื่อนที่โดยใช้ขาเทียม (pseudopod) โดยทั่วไปเชื้อจะดำรงชีพอยู่ตามธรรมชาติ เช่น แหล่งน้ำ ดิน ฟุ่น ละออง โดยที่เชื้อจะก่อโรคในร่างกายคนได้นั้นเกิดจากการติดเชื้อ โดยบังเอิญ (accidental host) อะแคนทามีบายังเป็นสาเหตุของโรคกระจกตาอักเสบและโรคเนื้อสมองอักเสบแบบแกรนูโลมา วงจรชีวิตของอะแคนทามีบาประกอบไปด้วย 2 ระยะ ได้แก่ ระยะโทรโฟซอइट (trophozoite) เป็นระยะที่มีการเคลื่อนที่และพบการแบ่งตัวจำนวนมาก ใช้เท้าเทียมในการนำอาหารเข้าสู่เซลล์ และมีการสืบพันธุ์แบ่งตัวได้ ส่วนระยะซิสต์ (cyst) เป็นระยะที่มีผนังหนาสองชั้น ไม่มีการเจริญเติบโตและทนทานในสิ่งแวดล้อมเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ระยะซิสต์และระยะโทรโฟซอइटยังเป็นระยะที่สามารถติดต่อกับผู้อื่น เชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง เช่น เข้าทางผิวหนังเมื่อมีบาดแผลหรือเข้าทางตาโดยตรง จะทำให้เชื้อสามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วทั่วร่างกาย ถึงแม้ว่าจะมีการรายงานผู้ติดเชื้อไม่มากนัก แต่ในประเทศไทยก็ยังมีพบการรายงานผู้ติดเชื้อ โดยในปัจจุบันมีการศึกษาสายพันธุ์ของอะแคนทามีบา สามารถแบ่งออกได้เป็น 22 genotypes ได้แก่ T1-T24 genotype ที่พบได้ ซึ่งการเก็บตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติ พบสายพันธุ์ T4, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20 และ T21 ทว่าเชื้อที่กล่าวมาข้างต้นไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ที่จะก่อโรคในคน เช่น สายพันธุ์ T17, T18, T23 และ T24 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค

จากการรายงานการพบเชื้ออะแคนทามีบาในประเทศไทยนั้น พบได้ใน 28 จังหวัด อีพิดีโอมเมื่อวันที่ 27 สิงหาคม 2021 (Nature, 2021) ได้แก่ จังหวัดตาก นครสวรรค์ พิชณุโลก ลำปาง กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ อุบลราชธานี ศรีสะเกษ ร้อยเอ็ด มหาสารคาม บุรีรัมย์ นครราชสีมา ขอนแก่น ชัยนาท อ่างทอง กรุงเทพมหานคร อุทัยธานี ฉะเชิงเทรา จันทบุรี ตรัง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลาและนราธิวาส ซึ่งยังไม่มีการพบอุบัติการณ์การสำรวจในจังหวัดสระบุรี ผู้วิจัยจึงเกิดความสนใจที่จะศึกษาอัตราการตรวจพบของเชื้ออะแคนทามีบาในจังหวัดสระบุรี เนื่องจากภาคกลางมีแหล่งน้ำและดินเป็นแหล่งเกษตรกรรมและท่องเที่ยว นอกจากนี้สระบุรียังเป็นจังหวัดที่อยู่ใกล้เคียงกับจังหวัดที่มีการรายงานผู้ติดเชื้อ ดังนั้นในการศึกษารุ่นนี้จึงสนใจในการตรวจหาความชุกของเชื้อเพื่อเป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัย รวมทั้งเพื่อเป็นการเฝ้าระวังและป้องกันในบริเวณชุมชน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาลักษณะของชนิดของซิสต์และตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาในแหล่งน้ำที่เก็บจากบริเวณชุมชนในตำบลเมืองเก่า อำเภอเสนาห์ จังหวัดสระบุรี

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาโดยการลงพื้นที่เพื่อไปเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำจากบึงโง้ง จังหวัดสระบุรี โดยจะเริ่มค้นลงพื้นที่บึงโง้งตั้งอยู่ตำบลเมืองเก่าในการเก็บตัวอย่างวันที่ 11 เดือนมกราคม พ.ศ. 2568 จากนั้นจึงนำตัวอย่างจากแหล่งน้ำเหล่านี้มาทำการหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp. โดยการตรวจด้วยวิธีการอย่างง่ายกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ซึ่งมีวิธีในการเก็บตัวอย่าง ดังนี้ การเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำ เก็บตัวอย่างที่ผิวน้ำระยะประมาณ 10 ถึง 50 เซนติเมตร โดยใช้ขวดโพรพิลีนที่ปราศจากเชื้อ 500 มิลลิเมตร จำนวนตัวอย่างที่เก็บรวบรวมขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวโดยประมาณของแต่ละจุด โดยการสุ่มตามพื้นที่ของแต่ละจุด จำนวน 30 ตัวอย่าง ตัวอย่างน้ำจะถูกรวบรวมโดยครอบคลุมระยะทางประมาณ 1 กิโลเมตร โดยมีระยะห่างแต่ละจุดประมาณ 150 เมตร จากนั้นเก็บใส่ในภาชนะที่สะอาดพร้อมระบุ ตำแหน่ง สถานที่ และบริเวณที่เก็บตัวอย่างน้ำ จากนั้นจึงนำตัวอย่างน้ำมาทำการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

1.4 ระยะเวลาดำเนินการ

ดำเนินการรวบรวมข้อมูลและทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2567 จนถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2568

1.5 สมมติฐานของการวิจัย

การสำรวจแหล่งน้ำของจังหวัดสระบุรีมีความน่าจะเป็นในการพบเชื้อ *Acanthamoeba* spp.

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบว่าแหล่งน้ำในจังหวัดสระบุรีมีการพบเชื้อ *Acanthamoeba* spp.
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อและประโยชน์ในเชิงเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดเชื้อสำหรับผู้ที่สนใจ
3. สามารถทราบลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ที่ตรวจพบจากการเก็บตัวอย่างน้ำ

บทที่ 2

บททวนเอกสาร

2.1 ความหมายของเชื้ออะมีบา

อะแคนตามีบา (*Acanthamoeba*) เป็นสัตว์เซลล์เดียว (unicellular eukaryotes) ประเภทโปรโตซัว (protozoa) เคลื่อนที่ได้โดยใช้เทียม (pseudopod) มีการดำรงชีวิตอิสระในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติเนื่องจากเป็นกลุ่ม free-living amoebae สามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มจำนวนได้โดยไม่ต้องอาศัยโฮสต์ พบ *Acanthamoeba* spp. ได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น แหล่งน้ำตามธรรมชาติ สระว่ายน้ำ ดิน ฟุ่นละออง และสามารถพบได้ในคอนแทกเลนส์ที่ไม่สะอาดมีการปนเปื้อน

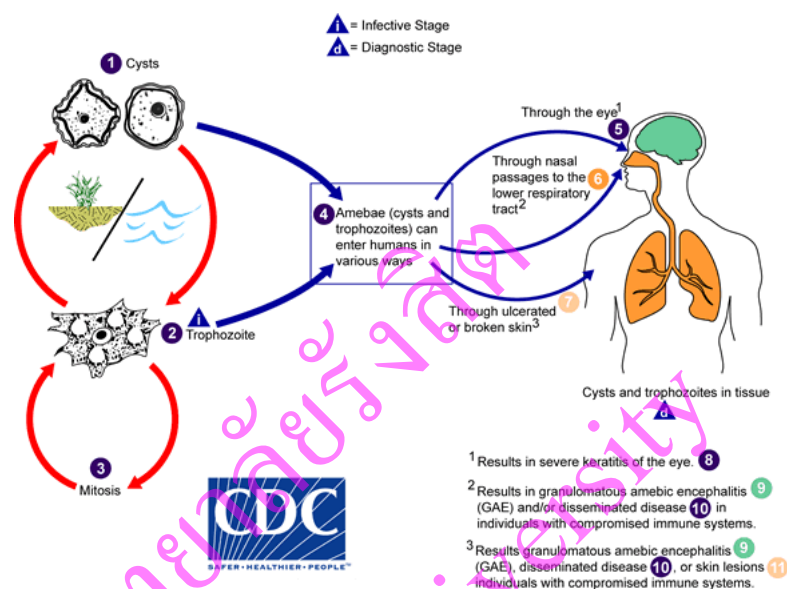
2.2 วงจรชีวิตของเชื้ออะมีบา

อะแคนตามีบาประกอบด้วย 2 ระยะ คือ trophozoite กับ cyst ระยะโทรโฟซอยต์ (trophozoite) เป็นระยะที่กินอาหารมีการเจริญเติบโตและมีการสืบพันธุ์ ส่วนระยะซิสต์ (cyst) เป็นระยะที่หยุดการเจริญเติบโตชั่วคราว สามารถทนทานกับสภาวะแวดล้อมภายนอกที่ไม่เหมาะสมเป็นอย่างมากยังมีความสามารถในการก่อโรคได้

ระยะโทรโฟซอยต์ (trophozoite stage) เป็นระยะที่มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-35 ไมโครเมตร เป็นโปรโตซัวที่มีนิวเคลียสเดี่ยว มีคาร์ิโอโซมที่แน่น กลมนิวเคลียสที่กลมใหญ่อยู่ตรงกลาง เคลื่อนที่ได้โดยยื่นขาเทียม ส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายหนามเรียกว่า อะแคนโทโปเดีย (acanthopodia) อะมีบาในระยะนี้จะพบได้ทั่วไปและมีความสามารถในการก่อโรค

ระยะซิสต์ (Cyst stage) เป็นระยะที่อะมีบาไม่แบ่งตัว มีนิวเคลียสเพียงหนึ่งเดียว และมีลักษณะเด่นคือมีองค์ประกอบของ cellulose ในปริมาณสูง ทำให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น การอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น การขาดแคลนอาหาร อุณหภูมิสูง ความเป็นกรด-ด่างที่ผิดปกติ ภาวะแห้งแล้ง รวมถึงการสัมผัสสารเคมีบางชนิด เมื่อ *Acanthamoeba* spp. เผชิญกับสภาวะไม่เอื้อต่อการดำรงชีวิตจะเข้าสู่ระยะซิสต์ ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า การเข้าซิสต์ (Encystation) ส่วนเมื่อสิ่งแวดล้อมกลับมาเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตซิสต์จะกลับคืนสู่ระยะโทรโฟซอยต์ โดยกระบวนการนี้เรียกว่า การออกจากซิสต์ (Excystation) กระบวนการ Excystation มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของ *Acanthamoeba* spp. และอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อในกรณีที่มีการรักษาไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ ปัจจัยต่าง ๆ เช่น ค่าออกซิโมลาลิตี และค่า pH ระหว่าง 3.9-9.8 รวมถึงการ

สัมผัสสารเคมีหรือยารักษา ล้วนเป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์สร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโต และเปลี่ยนรูปร่างจากโทรโฟซอยต์ไปเป็นซิสต์



รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของ *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba spp. สามารถติดเชื้อได้หลายทาง เช่น น้ำสกปรกเข้าทางจมูก หรือทางตาโดยการใช้คอนแทคเลนส์ที่ไม่สะอาด ฝุ่นละอองในอากาศ การหายใจ บาดแผลที่ผิวหนังได้ เชื้อนี้จะเข้าไปเจริญในอวัยวะต่างๆมีการทำลายเนื้อเยื่อทำให้เกิดพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆ และสามารถเปลี่ยนจากโทรโฟซอยต์เป็นซิสต์

Acanthamoeba มี 2 ระยะคือซิสต์ (1) และโทรโฟซอยต์ (2) โทรโฟซอยต์เพิ่มจำนวนโดยวิธี binary fission (3) โทรโฟซอยต์เป็นระยะติดต่อ และเชื่อว่าผ่านเข้าสู่ร่างกายทาง lower respiratory tract ทางแผลและบุกรุกสู่ระบบประสาทส่วนกลางโดย hematogenous dissemination (4) *Acanthamoeba* spp. ระยะซิสต์ และโทรโฟซอยต์พบในเนื้อเยื่อ

2.3 การถูกค้นพบครั้งแรกในโลกและประเทศไทย

Acanthamoeba ถูกพบครั้งแรกโดย Castellani A. ในปี พ.ศ. 2473 ปนเปื้อนมาระหว่างเพาะเชื้อรา *Cryptococcus pararoseus* การสังเกตลักษณะภายนอกของเชื้อระยะ cyst และ trophozoite ได้จัดกลุ่ม Amoeba ไว้ในนามสกุล (genus) *Hartmannella* และ *Hartmannella castellanii* ต่อมา พ.ศ. 2474 Volonsky M. ได้ศึกษาเพิ่มเติมลักษณะของผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ จึงจำแนกออกมา 3 สกุล ได้แก่ *Hartmannella*, *Glaeseria* และ *Acanthamoeba* spp. ในปี พ.ศ. 2510 สรุปได้ว่า

มีลักษณะเฉพาะใช้ส่วน cytoplasm เป็นอวัยวะในการเคลื่อนที่เรียกว่า ขาเทียม (pseudopodia) และสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสอง โครงสร้างระยะซิสต์และลักษณะขาเทียมซึ่งหนามแหลม (acanthopodia) และระยะโทรโฟซอยต์นั้นเป็น 2 ลักษณะเด่นชัดจึงจำแนกออกจาก *Hartmannella*

ประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อตั้งแต่ พ.ศ. 2531 และการสำรวจ Free-living amoeba (FLA) ในแหล่งน้ำในช่วง พ.ศ. 2542-2544 พบ FLA 49 isolates ในจำนวนนี้พบ *Acanthamoeba* spp. ร้อยละ 36.7%

2.4 ความสำคัญของการก่อโรค

Acanthamoeba spp. เป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของโรคที่เกิดจากอะมีบาดำรงชีพอิสระ (Free-living amoeba) ซึ่งโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมา *Acanthamoeba* spp. ที่พบได้บ่อยได้แก่ โรคกระจกตาอักเสบ (Amebic keratitis) โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Granulomatous amebic encephalitis)

2.4.1 โรคกระจกตาอักเสบ (Amebic keratitis)

เกิดได้จากการที่ผู้ป่วยอาจใช้มือขยี้ตาหรือสัมผัสกับ น้ำ ดิน อวัยวะ หรือสิ่งของอื่นๆที่ปนเปื้อน รายงานส่วนใหญ่ร้อยละ 70 ผู้ที่สวมคอนแทคเลนส์สามารถติดเชื้อ *Acanthamoeba* เนื่องจากการดูแลรักษาเลนส์ที่ไม่สะอาดและการสวมคอนแทคเลนส์อย่างไม่ถูกสุขลักษณะ เช่น การสวมคอนแทคเลนส์ขณะว่ายน้ำ การใช้ยาล้างเลนส์ที่ไม่มีคุณภาพ โดยที่ระยะพักตัวของโรคจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆเช่น ปริมาณเชื้อที่เข้าตา, ขนาดของแผลที่กระจกตาชนิดและความรุนแรงของเชื้อก่อโรค โดยที่เชื้อ *Acanthamoeba* สามารถเข้าสู่ดวงตาได้โดยตรงหากมีรอยถลอกที่กระจกตา (Cornea abrasion) การดำเนินโรคเกิดขึ้นแบบช้าๆอาจเป็นๆหายๆระยะหนึ่งแล้วรุนแรงขึ้นทันทีอาการที่เกิดขึ้นจะเป็นการเกิดรอยโรคที่ดวงตา การมองเห็นที่แยลงตาไม่สู้แสง ตาแดง ม่านตาอักเสบ และมีการสร้างน้ำตาที่เยอะผิดปกติ โดยการเกิดฝู รูปวงแหวนเป็นลักษณะเด่นที่พบได้บนกระจกตาของผู้ป่วย

2.4.2 โรคสมองอักเสบ (Granulomatous amebic encephalitis)

เกิดจากการที่ผู้ป่วยเป็นคนที่ภูมิคุ้มกันต่ำหรือรับยากดภูมิซึ่งมักเกิดกับผู้ป่วยโรคเอดส์ ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ที่ได้รับรังสีจากการรักษาโรคมะเร็ง หรือ ผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอกว่าปกติและอาจพบการติดเชื้อในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันปกติได้แต่ติดเชื้อเพราะมีพฤติกรรมเสี่ยง เช่น การที่สัมผัสกับน้ำและดินเป็นประจำโดยที่สันนิษฐานว่าเชื้อที่สมองมาจากการติดเชื้อที่ปอดหรือแผลที่ผิวหนังมาก่อนแล้วจึงแพร่ผ่านกระแสเลือดไปที่สมอง ซึ่งโรคนี้แสดงอาการไม่แน่ชัดขึ้นอยู่กัภูมิ

ตำนานของโฮสต์ โดยอาการเบื้องต้นคือ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน และมีการพบการระคายเคือง เยื่อหุ้มสมองและสมองอักเสบตามมา

2.5 การจัดกลุ่มจำแนกเชื้อ

2.5.1 Cyst morphology

การใช้ลักษณะรูปร่างไม่สามารถบอกได้ถึงระดับ species จึงได้จัดเป็นสามกลุ่มตามการจำแนกของ Pussard และ Pons โดยอาศัยลักษณะกายวิธานวิทยาที่สำคัญของระยะ cyst ได้แก่ ขนาดของ cyst และจำนวนจุดที่ผนังชั้นนอกและผนังชั้นในมาแตกต่างกัน ปัจจุบันสามารถจำแนกได้แล้ว 20 ชนิด (species)

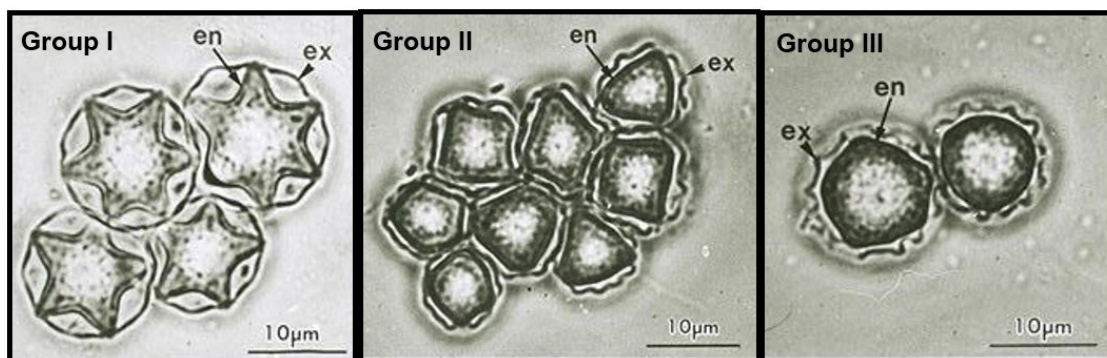
2.5.1.1 กลุ่มที่ 1 Astronyxids

มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 18 μm ผนังชั้นนอกและผนังชั้นในห่างกันมาก ผนังชั้นนอกเรียบ ผนังชั้นในมีลักษณะเหมือนดาว ได้แก่ *A. astronyris*, *A. comandoni*, *A. echinulata* และ *A. tubiashi*

2.5.1.2 กลุ่มที่ 2 Polyphagid

เป็นกลุ่มใหญ่พบได้บ่อยและทั่วไป มีมากกว่า 10 species มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยน้อยกว่า 18 μm สามารถแยกได้จากกระจกตาและคอนแทคเลนส์ ผนังชั้นนอกและผนังชั้นในอาจใกล้กันหรือแยกห่างกันก็ได้ ผนังชั้นนอกอาจหนาหรือบางก็ได้ ผนังชั้นในอาจเป็นรูปหลายเหลี่ยม รูปดาว ทรงกลม หรือทรงรีก็ได้ มักไม่ค่อยเห็นจุดที่แตกต่างระหว่างผนังชั้นนอกกับผนังชั้นใน ได้แก่ *A. quina*, *A. divionensis*, *A. castellani*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. mauritaniensis*, *A. triangularis*, *A. griffini*, *rhysodes* และ *A. paradivionensis*

2.5.1.3 กลุ่มที่ 3 Culbertsonids



รูปที่ 2.2 การจัดจำแนกกลุ่มอะแคนทามีบาตามขนาดและรูปร่างของซิสต์จำแนกตามหลักเกณฑ์ของ Pussard and Pons (1977)

มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยน้อยกว่า 18 μm ผนังชั้นนอกบางอาจจะขรุขระหรือเรียบก็ได้ ส่วนผนังชั้นในค่อนข้างกลม อาจมีจุดติดกับผนัง ชั้นนอก 3-5 จุดได้แก่ *A. royreba*, *A. culbertsoni*, *A. palestinensis*, *A. lenticulata* และ *A. pustulosa* ต่อมาพบว่าการใช้ลักษณะของ cyst แต่เพียงอย่างเดียวในการจำแนกชนิดนั้นยังมีปัญหาอยู่มาก เช่น พบว่ารูปร่างของ cyst จะเปลี่ยนแปลงไปในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน จึงมีการจัดจำแนกชนิดใหม่ โดยการใช้เทคนิคทางอณูวิทยาศาสตร์เข้ามาช่วย เช่น PCR โดยศึกษาลำดับเบสของ ribosomal RNA gene ซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต มีความน่าเชื่อถือสูง และด้วยวิธีนี้นักวิทยาศาสตร์ได้แบ่งเชื้อใน genus *Acanthamoeba* ออกได้ เป็น 15 genotypes (T1-T15) แต่ละ genotype มีความแตกต่างของลำดับเบสมากกว่าร้อยละ 5 ขึ้นไป นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาแบบแผนของไอโซเอนไซม์ (isoenzyme pattern) และรูปแบบ ของการย่อยดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรีย RFLP มาใช้ในการจำแนกชนิดด้วย

2.6 กลไกการติดเชื้อ

ปัจจัยหรือกลไกที่ทำให้อะแคนทามีบาก่อโรคได้ในคนแบ่งเป็นได้เป็น 2 ประเด็นหลัก คือ contact dependent mechanism กับ contact independent mechanism กลไกที่อาศัยการสัมผัสกับ host cell ที่สำคัญที่สุดคือ จะต้องมีความ binding protein ของ trophozoite สามารถยึดเกาะได้ การเกาะของเชื้อจะกระตุ้นกลไกหลายอย่างตามมา ได้แก่ กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่างๆของตัวเชื้อ เช่น protease, cysteine, protease, metalloprotease, phospholipase ซึ่งจะเข้าไปทำลาย collagen, connective tissue ให้เอื้อต่อการที่เชื้อเคลื่อนที่เข้าไปในเซลล์ เป็น contact dependent mechanism ในทำนองเดียวกันที่ผิวเซลล์ของเชื้อ *Acanthamoeba* ระยะ trophozoite ก็จะมี ATPase enzyme ไปปรากฏอยู่ที่ผิวด้านนอกของเซลล์ เรียกว่า exoATPase ย่อยสลาย ATP ที่อยู่นอกเซลล์ให้กลายเป็น

ADP และ ADP จะมีผลในการกระตุ้นระบบต่างๆในการทำลายเซลล์ต่อไป ปัจจัยอื่นๆที่อาจเกี่ยวข้องได้แก่ การเปลี่ยนภาวะจากระยะ trophozoite เป็นระยะ cyst ที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว สายพันธุ์ หรือ species หรือ genotype ที่ก่อโรคในคนได้จะมีความทนทานกับภาวะต่างๆ อาทิ ความเป็นเกลือ อุณหภูมิ pH ใต้สูง ในขณะที่กลุ่มไม่ก่อโรคจะตายง่าย ถ้าอยู่ในภาวะที่ต่างไปจากเดิมที่เคยอยู่นอกจากนี้ mannose binding protein จะกระตุ้น cell signaling pathway ของเซลล์ที่เชื้อไปเกาะทำให้เกิด program cell death หรือ apoptosis เกิดขึ้น ในขณะเดียวกัน protease ที่เชื้อสร้างออกมาจะไปทำลาย cell adhesion molecule, intercellular adhesion molecule ทำให้ permeability ของเซลล์เปลี่ยนไปจากปกติ เซลล์ก็จะถูกทำลายไปในที่สุด อะแคนตามีบาในระยะ trophozoite เท่านั้น ที่มี mannose binding protein ระยะ cyst ไม่มี mannose binding protein ที่ผิวจึงไม่เกาะติด เป็นระยะที่ไม่ติดต่ออย่างไก็ตาม ระยะ cyst เป็นระยะที่ทนทาน ทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้นาน มีน้ำหนักรวมเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมมีสารอาหารที่ต้องการในการเจริญเติบโตเป็นระยะโทรโฟซอยต์ และเป็นพาหะของแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ โดยเฉพาะ *Legionella pneumophila* ที่เป็นสาเหตุของโรคปอดอักเสบลิเจียนแนร์

2.7 การวินิจฉัย

การวินิจฉัยการติดเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ในผู้ป่วยที่มีอาการทางระบบประสาทส่วนกลางสามารถทำได้โดยการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์จากน้ำไขสันหลัง (Cerebrospinal fluid; CSF) ทั้งในรูปแบบ wet smear หรือจากตะกอนของ CSF ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง โดยแนะนำให้ปั่นด้วยความเร็วต่ำ ประมาณ 10 นาที เพื่อป้องกันการแตกของระยะ trophozoite ซึ่งสามารถตรวจพบได้จากตัวอย่างแบบ wet smear อย่างไรก็ตาม การแยกระหว่าง trophozoite ของ *Acanthamoeba* spp. กับ macrophage อาจทำได้ยากในบางกรณี แม้ว่าการตรวจ CSF จะช่วยในการวินิจฉัยโรค Granulomatous Amebic Encephalitis (GAE) ได้ แต่การเก็บตัวอย่างด้วยการเจาะหลัง (lumbar puncture) ห้ามใช้ในผู้ป่วยที่มีภาวะความดันในกะโหลกศีรษะสูง (increased intracranial pressure) เนื่องจากอาจเป็นอันตรายต่อผู้ป่วย ตะกอนของ CSF สามารถนำมาทำสไลด์โดยการตรึงด้วยเมทานอล (methanol fixation) และย้อมด้วย Giemsa stain หรือ Wright stain ผลการตรวจทางเคมีของ CSF มักพบ pleocytosis โดยมี lymphocyte เด่นชัด ร่วมกับ polymorphonuclear leukocyte บางส่วน ระดับกลูโคสมีก่ลดลง และระดับโปรตีนสูงขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะที่ช่วยสนับสนุนการวินิจฉัย GAE ได้ นอกจากนี้ การเตรียมตัวอย่างจาก CSF หรือ bronchoalveolar lavage fluid (BALF) ด้วยวิธี cytopsin preparation ยังสามารถใช้ช่วยระบุการมีอยู่ของอะมีบาในผู้ป่วยที่สงสัยติดเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ในระบบประสาทหรือระบบทางเดินหายใจได้

ในระยะ trophozoite ของ *Acanthamoeba* spp. มีลักษณะเฉพาะ คือ มี nucleolus เด่นชัด, มี contractile vacuole, และมี cytoplasmic vacuoles ซึ่งสามารถสังเกตได้ชัดเจนขึ้นเมื่อย้อมด้วย Trichrome stain หรือ Hematoxylin and Eosin (H&E) โดยเฉพาะในตัวอย่างที่เตรียมจากตะกอนเซลล์หลังการปั่นเหวี่ยง (centrifuged cell preparation) มากกว่าการเตรียมสเมียร์แบบแห้ง (air-dried smear)

สำหรับการวินิจฉัย โรคกระจกตาอักเสบจากอะมีบา (*Acanthamoeba* keratitis) เชื้อจะเข้าสู่ร่างกายผ่านกระจกตา (cornea) และสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ชั้นลึก หากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันต่วงทีอาจทำให้สูญเสียการมองเห็นถาวรได้ การวินิจฉัยทางคลินิกอาศัยการประเมินอาการ เช่น ตาแดงรอบกระจกตา มีขี้ตาสีเหลืองหรือเขียว กระจกตาขุ่นหรือเป็นแผล อาจพบหนองในช่องหน้าลูกตา (hypopyon) หนองตาขาว และรูม่านตาหดเล็ก การตรวจเพิ่มเติมที่ช่วยยืนยันการวินิจฉัย ได้แก่

1. การส่องตรวจตาด้วยเครื่อง slit-lamp biomicroscope เพื่อประเมินความผิดปกติของกระจกตา
2. การย้อมกระจกตาด้วย fluorescein stain เพื่อระบุบริเวณแผลหรือการติดเชื้อ
3. การตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp. โดยตรง
 - การตรวจสเมียร์โดยตรง (direct smear)
 - การเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) เพื่อยืนยันผลการวินิจฉัย

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผศ.ดร.ภัทรกร บุปผันและคณะ (2560) ดำรวจหาความชุกของอะแคนตามีบาจากตัวอย่างน้ำที่เก็บสวนสาธารณะและจัดกลุ่มอะแคนตามีบาโดยใช้รูปร่างลักษณะของซิสต์ จากตัวอย่างน้ำทั้งหมด 300 ตัวอย่าง โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อที่ฉาบด้วย *Escherichia coli* ผลการวิจัยพบ *Acanthamoeba* spp. ร้อยละ 35 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด

รศ.ดร.จตุรงค์ พุทธรพิทย และคณะ (2564) ดำรวจอะแคนตามีบาในแหล่งน้ำจืดสาธารณะ 100 แห่งใน 28 จังหวัดทั่วประเทศไทย และได้ระบุไบโโนไทป์ 9 ชนิด ได้แก่ T2-6, T3-T5, T9, T11, T12, T18 และ T23 ชนิดใหม่จาก 131 ไอโซเลต

ผศ.จิตรกุล สุวรรณเจริญ และคณะ (2560) ดำรวจหาความชุกของอะแคนตามีบาจากแหล่งน้ำรอบมหาวิทยาลัยพะเยา และสำรวจหอะแคนตามีบาจากน้ำ 60 ตัวอย่างโดยการเพาะเลี้ยง และ

จำแนกกลุ่มโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของซิสต์ตามวิธีการของ Pussard และ Pons ผลการทดลองพบอะแคนทามีบาร้อยละ 48.3

จารุวรรณ สายรุ่งเรืองศิลป์ และคณะ (2556) ีอะแคนทามีบา ในคลองคอนแทกเลนส์ และศึกษาข้อมูลการใช้การดูแลรักษาคลองคอนแทกเลนส์ของนักศึกษากลุ่ม วิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ใช้คอนแทกเลนส์แบบรายเดือนถึงรายปี

Layson, S. N., et al. (2024) งานวิจัยนี้ศึกษา surface water บริเวณชายฝั่งทะเลในประเทศฟิลิปปินส์ ได้แก่ Mariveles (Manila Bay) และ Lingayen Gulf โดยเก็บตัวอย่างน้ำผิวดินจำนวน 80 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าร้อยละ 23.75 ของตัวอย่างมีการเจริญเติบโตของ *Acanthamoeba* spp. จากนั้นทำการตรวจยืนยันด้วย PCR และ gene sequencing พบสายพันธุ์ที่สำคัญ เช่น *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba castellanii* และ genotype T4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการก่อโรค

เคลือวัลย์ และคณะ (2565) งานวิจัยนี้ ได้เก็บตัวอย่าง น้ำ 51 ตัวอย่าง และ ดิน 20 ตัวอย่าง จากพื้นที่ที่มีกิจกรรมของมนุษย์ในภาคใต้ของประเทศไทย พบอะมีบาอิสระทั้งหมด 56 ตัวอย่าง โดย 56% ของทั้งหมดสามารถระบุทางสัณฐานวิทยาว่าเป็น *Acanthamoeba* spp.

บทที่ 3

ระเบียบวิจัย

3.1 การออกแบบงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพื้นฐานในสาขาปรสิตวิทยา โดยใช้ระเบียบวิธีเชิงสำรวจเพื่อศึกษา *Acanthamoeba* spp. จากผิวน้ำ บึงโง้ง ตำบลเมืองเก่า อำเภอเสนาห์ จังหวัดสระบุรี โดยใช้วิธีการเก็บตัวอย่างอย่างง่ายและการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องมือ

1. Inverted microscope : รุ่น ECLIPSE Ti2 / Nikon / Japan
2. Incubator : รุ่น IN30 / Memmert / Germany
3. CO₂ incubator : รุ่น EG110IR / Jouan / Germany
4. Autoclave : รุ่น HVE-50 / Hirayama / Japan
5. Vortex mixer : รุ่น G650E / Scientific Industries / Japan
6. Centrifuge : รุ่น Rotofix 32 / Hettich Zentrifugen / Germany
7. Autopipette : ขนาด 2-10 และ 20-100 ไมโครลิตร
8. เครื่อง PCR TECHNE : รุ่น TC-3000

3.2.2 อุปกรณ์

1. Hot plate stirrer
2. Centrifuge tubes
3. Cotton swabs
- 4) Culture plate
- 5) Eppendorf
- 6) Pasture pipette
- 7) Seropipette ขนาด 1 mL และ 5 ml

- 8) ขวดแก้วขนาด 500 mL
- 9) Cell culture flask 15 mL

3.3 สารเคมีและน้ำยาทดสอบ

3.3.1 สารเคมี

- 1) NaCl : BRIGHTCHEM SDN BHD/New Zealand
- 2) KH_2PO_4 : MALLINCKRODT CHEMICAL WORKS/USA
- 3) Na_2HPO_4 : SIGMA-ALORICH/Germany
- 4) $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: MERCK/Germany
- 5) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: MERCK/Germany

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) Non-active *Escherichia coli* ATCC 25922 (Turbidity = 0.5 McFarland standards)
- 2) Agar powder : HIMEDIA/India
- 3) Proteose-Yeast Extract-Glucose (PYG) medium
- 4) Non-nutrient agar

3.3.5 เชื้อมาตรฐาน

เชื้อ *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30234 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ธีรรัตน์ กะลัมพะเหติ คณะวิทยาศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อเป็น positive control โดยนำ *Acanthamoeba* ATCC30234 มาเพาะเลี้ยง เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพในการทดลองกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ที่ทำการสำรวจจากตัวอย่างน้ำ

3.4 วิธีการศึกษา

3.4.1 กลุ่มตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างจากน้ำจาก บึงโง้ง ตำบลเมืองเก่า อำเภอสทิงพระ จังหวัดสงขลา โดยการคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$n = \frac{z^2 \alpha^2 (p)(1-p)}{e^2}$$

$$n = \frac{1.96^2 (0.92)(1 - 0.08)}{0.1^2}$$

$$n = 28.27$$

$$n \approx 30$$

เมื่อ

n = ขนาดตัวอย่างที่ต้องการ

z = ค่าคงที่กำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 = 1.96

p = ความชุกของ *Acanthamoeba* spp. จากข้อมูลการสำรวจ *Acanthamoeba* spp. จากแหล่งน้ำและแหล่งดินธรรมชาติในประเทศไทย = ร้อยละ 8 (Pattakorn B et al., 2017)

e = ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับร้อยละ 10 = 0.1

3.4.2 วิธีการทดลอง

โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำที่ผิวน้ำวัดระยะประมาณ 20 ถึง 50 เซนติเมตร จากขอบแหล่งน้ำและลึก 10 ถึง 20 เซนติเมตร โดยใช้ขวดโพรพิลีนที่ปราศจากเชื้อ 500 มิลลิลิตร การเก็บตัวอย่างน้ำจะถูกรวบรวมโดยครอบคลุมระยะทางประมาณ 5 เมตร เก็บใส่ในภาชนะที่สะอาดพร้อมวัดค่า pH และ อุณหภูมิของน้ำที่เก็บ ตัวอย่างละ 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย ระบุตำแหน่ง สถานที่ และวัน/เดือน/ปี ตัวอย่างน้ำนำส่งที่ห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

3.4.3 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำนำมาผ่านวิธีการตกตะกอน โดยนำมาใส่ในหลอดปั่นตกตะกอนแล้วปิดฝา นำไปปั่นด้วยความเร็วที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนบนทิ้ง แล้วนำส่วนตะกอนมาตรวจหาด้วยวิธีต่างๆ

3.4.4 การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำสิ่งตัวอย่างที่ผ่านการปั่นตกตะกอนและกรองเศษปฏิจุล หยดตัวอย่าง ปริมาตร 1 หยดลงบนสไลด์ หลังจากนั้นใช้น้ำเกลือ 0.8% NSS 1 หยด แล้วปิดด้วย coverslip ซึ่งเตรียมด้วยวิธี Direct

smear examination มาตรฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400x โดยวางสไลด์ลงบนแท่นวางวัตถุปรับปริมาณแสงด้วย diaphragm ให้พอเหมาะ และทำการบันทึกผลเมื่อพบลักษณะการเคลื่อนที่ของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Acanthamoeba* ระยะ trophozoites หรือระยะ cyst จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับการศึกษาการจำแนกลักษณะเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ของ Pussard & Pons

3.4.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acanthamoeba* spp.

นำสิ่งตัวอย่างที่ได้ปั่นตกตะกอนแล้ว แยกใส่ eppendorf tube 0.5 mL และ pipette ตัวอย่างมาปริมาตร 20 μ L หยดลงบน NNA ที่เคลือบด้วย 0.5 McFarland *E.coli* solution แล้วนำไปบ่มที่ตู้ CO₂ incubator ที่ 37°C ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted microscope และทำการบันทึกผลเมื่อพบลักษณะการเคลื่อนที่ของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Acanthamoeba* ระยะ trophozoites หรือระยะ cyst จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับการศึกษาการจำแนกลักษณะเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ของ Pussard & Pons

3.4.6 การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (DNA Extraction and Purification)

เชื้อ *Acanthamoeba* spp. ทั้งระยะซิสต์ (cyst) และระยะโทรโฟซอยต์ (trophozoite) ถูกเก็บจากจานเพาะเลี้ยงที่ให้ผลบวก โดยเติมน้ำเกลือ Page's amoeba saline (PAS) ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2–8°C ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ จากนั้นเติม PAS ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงบนผิวของอาหารวุ้น เพื่อชะล้างและแยกเซลล์ที่เกาะอยู่บนพื้นผิว หากบริเวณที่พบเชื้อมีขนาดจำกัด จะใช้ใบมีดปลดเชื้อชุดผิววุ้นอย่างเบามือ แล้วดูดของเหลวที่ชะล้างเซลล์ร่วมกับ PAS ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ดังกล่าว ทำให้ได้ตัวอย่างที่มีปริมาตรรวมประมาณ 800 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนของชุดน้ำยา Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research, USA)

3.4.6.1 ขั้นตอนการเตรียมและสกัดดีเอ็นเอ

1. การเตรียมสารละลาย (Reagent Preparation)

เตรียมสารละลาย Proteinase K โดยเติมสารละลาย buffer ปริมาตร 1,040 ไมโครลิตร ลงในผง Proteinase K (20 มิลลิกรัม) แล้วผสมให้เข้ากัน ความเข้มข้นสุดท้ายของ Proteinase K จะอยู่ที่ประมาณ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

2. ขั้นตอนการย่อยตัวอย่าง (Sample Digestion)

นำตัวอย่างปริมาตรไม่เกิน 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ จากนั้นเติม

- BioFluid & Cell Buffer (สีแดง) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

(หากปริมาตรตัวอย่างน้อยกว่า 200 ไมโครลิตร ให้ปรับปริมาณของ BioFluid & Cell Buffer และ Proteinase K ตามสัดส่วน)

ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าด้วยเครื่อง Vortex ประมาณ 10–15 วินาที แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อย่อยสลายเซลล์ หลังจากนั้นเติม Genomic Binding Buffer ในอัตราส่วน 1:1 กับตัวอย่างที่ผ่านการย่อย แล้วผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex อีกครั้ง ตัวอย่างเช่น หากตัวอย่างหลังการย่อยมีปริมาตร 105 ไมโครลิตร ให้เติม Genomic Binding Buffer ปริมาตร 105 ไมโครลิตร

3. การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA Purification)

1. นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในคอลัมน์ Zymo-Spin™ HC-XLR ที่วางอยู่ในหลอดเก็บตัวอย่าง จากนั้นปั่นที่ความเร็ว $\geq 12,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลวที่ไหลผ่าน
2. เติม DNA Pre-Wash Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็ว $\geq 12,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวที่ไหลผ่านออก จากนั้นเปลี่ยนหลอดเก็บตัวอย่างใหม่
3. เติม g-DNA Wash Buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็ว $\geq 12,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลวที่ไหลผ่าน จากนั้นเปลี่ยนหลอดเก็บตัวอย่างใหม่
4. เติม g-DNA Wash Buffer อีกครั้ง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็ว $\geq 12,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลวที่ไหลผ่าน
5. ย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ที่สะอาด แล้วเติม DNA Elution Buffer หรือน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (nuclease-free water) ปริมาตรอย่างน้อย 50 ไมโครลิตร ลงบนเมมเบรนของคอลัมน์ ปิดไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นปั่นด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ได้สารละลายดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาได้ทันที หรือ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ $\leq -20^{\circ}\text{C}$ สำหรับใช้ในอนาคต

หมายเหตุ

1. หากปริมาตรตัวอย่างหลังสกัดน้อยกว่า 50 ไมโครลิตร ควรปรับเพิ่มให้ครบด้วย DNA Elution Buffer

2. การบ่มด้วย Proteinase K ข้ามคืนสามารถทำได้โดยไม่ส่งผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอ
3. หากพบตะกอนหรือชั้นไขมันหลังการสกัด ให้ปั่นที่ความเร็ว $\geq 12,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที แล้วถ่ายเฉพาะส่วนใสไปยังหลอดใหม่
4. หากมีของเหลวคงเหลือในคอลัมน์ ควรปั่นต่ออีก 1 นาที หรือจนกระทั่งของเหลวหมด

3.4.7 ไพรเมอร์ PCR (PCR Primers)

ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาได้มาจากการวิจัยของ Schroeder et al.(2001) โดยไพรเมอร์ถูกสังเคราะห์โดยบริษัท Macrogen® จาก Korea ไพรเมอร์ที่ใช้จำเพาะต่อสกุล *Acanthamoeba* ได้รับการออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 18S rRNA ดังนี้:

ชุดไพรเมอร์ที่ใช้คือ JDP1 และ JDP2 ซึ่งถูกออกแบบมาจากยีน 18S rRNA ของ *Acanthamoeba* spp. โดยขนาดที่คาดการณ์ของผลิตภัณฑ์ PCR อยู่ที่ประมาณ 450-470 กิโลเบส และถูกเลือกโดยโปรแกรมออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์

(JDP1) 5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3'

(JDP2) 5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGA-3'

3.4.8 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction - PCR)

การทำปฏิกิริยา PCR จะดำเนินการในปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยใช้ดีเอ็นเอจีโนมิกขนาด 1-2 นาโนกรัม ไพรเมอร์แต่ละตัวความเข้มข้น 2 นาโนโมล ในน้ำยาบัฟเฟอร์ PCR (ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM potassium chloride และ 1.5mM magnesium chloride) และ deoxynucleoside triphosphates 200 ไมโครโมลาร์ รวมถึง Taq DNA polymerase 1 หน่วย การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทำในเทอร์โมไซเคิลอร์โดยใช้โปรแกรมอุณหภูมิดังนี้:

ทำให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวที่ :94°C เป็นเวลา 5 นาที

ทำซ้ำ 30 รอบ ประกอบด้วย:

การแยกสายดีเอ็นเอ(Denature)ที่ :94°C เป็นเวลา 1 นาที

การจับคู่ของไพรเมอร์(Annealing)ที่ :50°C เป็นเวลา 1 นาที

การขยายสายดีเอ็นเอ(Extension)ที่ :72°C เป็นเวลา 1 นาที

หลังจากรอบสุดท้าย ขยายดีเอ็นเอเพิ่มเติมที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะถูกแยกด้วย electrophoresis ใน 1% agarose gel ในน้ำยา TAE และย้อมด้วย Safe-Green™ dye ใช้แรงดันไฟฟ้า 75 V/cm เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นส่องดูภายใต้แสงยูวีเพื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์กับ 100 bp marker

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาการตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp. จากผิวน้ำในบริเวณชุมชน อำเภอเสนาให้ จังหวัดสระบุรี โดยวิธีการตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเลี้ยงเชื้อ (*Acanthamoeba* spp. cultivation) และการตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ด้วยวิธีทางอนุวิทยา

4.1 การตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp. จากตัวอย่างน้ำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination)

4.1.1) ตัวอย่างน้ำจากบึงโง้ง ตำบลเมืองเก่า

ผลจากการตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp ในน้ำโดยการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากตัวอย่างน้ำที่เก็บมาทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ได้แก่ w1, w2, w3, w4, w5, w6, w7, w8, w9, w10, w11, w12, w13, w14, w15, w16, w17, w18, w19, w20, w21, w22, w23, w24, w25, w26, w27, w28, w29, w30 พบว่าไม่พบเชื้อ *Acanthamoeba* spp. รายงานผลเป็น ผลลบ (Negative) คิดเป็นร้อยละ 100.00

ตารางที่ 4.1 แสดงผลค่า สี ความขุ่น pH อุณหภูมิ และ Direct examination

ตำแหน่ง	Color	Turbidity	pH	Temperature(°C)	Result
w1	Pale yellow	1+	8.0	24.1	Negative
w2	Pale yellow	Few	8.0	24.3	Negative
w3	Pale yellow	Few	8.0	24.3	Negative
w4	Pale yellow	Few	8.0	25.1	Negative
w5	Pale yellow	Few	8.0	25.1	Negative
w6	Pale yellow	Few	8.1	24.9	Negative
w7	Pale yellow	Few	8.0	24.8	Negative
w8	Pale yellow	Few	8.0	24.6	Negative
w9	Pale yellow	Few	8.1	24.6	Negative
w10	Pale yellow	1+	8.1	24.4	Negative
w11	Pale yellow	Few	8.1	24.4	Negative

w12	Pale yellow	Few	8.1	24.5	Negative
w13	Pale yellow	Few	8.1	24.8	Negative
w14	Pale yellow	Few	8.1	25.0	Negative
w15	Pale yellow	Few	8.0	24.7	Negative
w16	Pale yellow	Few	8.0	25.4	Negative
w17	Pale yellow	1+	8.1	25.2	Negative
w18	Pale yellow	1+	8.1	25.3	Negative
w19	Pale yellow	Few	8.2	25.1	Negative
w20	Pale yellow	Few	8.3	25.3	Negative
w21	Pale yellow	Few	8.3	25.3	Negative
w22	Pale yellow	Few	8.3	25.5	Negative
w23	Pale yellow	1+	8.3	25.4	Negative
w24	Pale yellow	1+	8.2	25.4	Negative
w25	Pale yellow	Few	8.4	25.7	Negative
w26	Pale yellow	Few	8.4	25.8	Negative
w27	Pale yellow	Few	8.5	25.7	Negative
w28	Pale yellow	Few	8.2	25.2	Negative
w29	Pale yellow	Few	8.2	25.1	Negative
w30	Pale yellow	Few	8.2	25.1	Negative

Positive = พบเชื้อ *Acanthamoeba* spp.

Negative = ไม่พบเชื้อ *Acanthamoeba* spp.

4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ (*Acanthamoeba* spp. cultivation)

ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acanthamoeba* spp. จากแหล่งน้ำ บึงโจ้ง ตำบลเมืองเก่า อำเภอเสนาห์ จังหวัดสระบุรี ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Acanthamoeba*-like จำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30 รายงานผลเป็น ผลบวก (Positive) ไม่พบเชื้อจำนวน 21 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 70 รายงานผลเป็น ผลลบ (Negative)

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acanthamoeba* spp.

การอ่านผลจะเริ่มอ่านผล Positive ใน 7 วัน

No.	Result
w1	Negative
w2	Negative
w3	Negative

w4	Env. amoeba
w5	Negative
w6	Negative
w7	Env. amoeba
w8	Negative
w9	Negative
w10	Env. amoeba
w11	Negative
w12	Env. amoeba
w13	Env. amoeba
w14	Negative
w15	Negative
w16	Negative
w17	Env. amoeba
w18	Env. amoeba
w19	Negative
w20	Negative
w21	Env. amoeba
w22	Negative
w23	Env. amoeba
w24	Negative
w25	Negative
w26	Negative
w27	Negative
w28	Negative
w29	Negative
w30	Negative

*Env. Amoeba = Environmental amoeba

4.3 การตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ในน้ำโดยวิธีการทำ Conventional PCR

ผลจากการตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ในน้ำโดยวิธีการทำ Conventional PCR จากตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่าง พบว่าทั้งหมด 12 ตัวอย่างไม่พบเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ได้แก่ w4, w7,

w10, w13 ,w17 ,w18 ,w12 ,w21 ,w23, w4.3(1), w4.3(2), 4.3(s) คิดเป็นร้อยละ 100 และพบว่า positive control ให้ PCR product ที่ 450-470 bp.



รูปที่ 4.1 แสดงผล Conventional PCR

M: Marker, Lane1:w4, Lane2:w7, Lane3:w10, Lane4:w13, Lane5:w17, Lane6:w18, Lane7:w12, Lane8:w21, Lane9: w23, Lane10:312, Lane11:AC, Lane12:2009, Lane13:4.3(1), Lane14:4.3(2), Lane15:4.3(s), Lane16: Negative Control

4.4 ผลการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล (Tests of Normality)

จากการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnov และ Shapiro-Wilk พบว่าตัวแปรทั้งหมด ได้แก่ ผลการตรวจพบเชื้อด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง (culture), ค่า pH, อุณหภูมิของน้ำ (temperature) และความขุ่น (turbidity) มีค่า $Sig. < 0.05$ ซึ่งหมายความว่าข้อมูล ไม่เป็นไปตามการกระจายตัวแบบปกติ (non-normal distribution) ดังนั้นในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์จึงเลือกใช้สถิติแบบไม่อาศัยพารามิเตอร์ (non-parametric statistics) คือ *Spearman's Rank Correlation Coefficient*

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
culture	.440	30	<.001	.577	30	<.001
pH	.215	30	.001	.904	30	.011
Temp	.389	30	<.001	.624	30	<.001
Turbid	.488	30	<.001	.492	30	<.001

a. Lilliefors Significance Correction

รูปที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล (Tests of Normality)

4.5 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (Spearman's Rank Correlation)

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่า

1. ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และอุณหภูมิของน้ำ พบว่าค่า pH มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.625$, $p < 0.001$) หมายถึง เมื่อน้ำมีอุณหภูมิสูงขึ้น ค่า pH มีแนวโน้มสูงขึ้นตาม
2. ความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของน้ำและผลการตรวจพบเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยง พบว่าค่าความขุ่นมีความสัมพันธ์เชิงลบกับผลเพาะเลี้ยง ($r = -0.400$, $p = 0.028$) หมายความว่าความขุ่นของน้ำลดลงจะมีโอกาสตรวจพบเชื้อ *Acanthamoeba spp.* จากการเพาะเลี้ยงมากขึ้น
3. ตัวแปรคู่ที่เหลือไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าปัจจัยด้านคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำบางประการอาจมีอิทธิพลต่อการพบเชื้อ *Acanthamoeba spp.* ในแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยเฉพาะความขุ่นของน้ำที่สัมพันธ์กับอัตราการเพาะเลี้ยงเชื้อได้สำเร็จ

Confidence Intervals of Spearman's rho

	Spearman's rho	Significance (2-tailed)	95% Confidence Intervals (2-tailed) ^{b,c}	
			Lower	Upper
direct - culture	. ^a	.	.	.
direct - pH	. ^a	.	.	.
direct - Temp	. ^a	.	.	.
direct - Turbid	. ^a	.	.	.
culture - pH	.151	.426	-.232	.493
culture - Temp	.059	.755	-.318	.420
culture - Turbid	-.400	.028	-.671	-.035
pH - Temp	.625	<.001	.332	.808
pH - Turbid	-.094	.622	-.448	.286
Temp - Turbid	.068	.721	-.310	.427

a. Cannot be computed because at least one of the variables is constant.

b. Estimation is based on Fisher's r-to-z transformation.

c. Estimation of standard error is based on the formula proposed by Fieller, Hartley, and Pearson.

รูปที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (Spearman's Rank Correlation)

4.6 ช่วงความเชื่อมั่นของค่าสหสัมพันธ์ (Confidence Interval of Spearman's rho)

ผลการคำนวณช่วงความเชื่อมั่นที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่า

- ค่า pH และอุณหภูมิของน้ำมีช่วงความเชื่อมั่น 0.332 ถึง 0.808 สอดคล้องกับผลการทดสอบที่พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
- ค่า Turbidity และ Culture มีช่วงความเชื่อมั่นระหว่าง -0.671 ถึง -0.035 ซึ่งสอดคล้องกับผลที่พบความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญ

ผลดังกล่าวสนับสนุนว่าความสัมพันธ์ที่พบมีความน่าเชื่อถือและมีความสอดคล้องกันทั้งค่าความสัมพันธ์และช่วงความเชื่อมั่นทางสถิติ

Correlations

			direct	culture	pH	Temp	Turbid
Spearman's rho	direct	Correlation Coefficient	.	.	.	.	.
		Sig. (2-tailed)	.	.	.	.	.
		N	30	30	30	30	30
	culture	Correlation Coefficient	.	1.000	.151	.059	-.400*
		Sig. (2-tailed)	.	.	.426	.755	.028
		N	30	30	30	30	30
	pH	Correlation Coefficient	.	.151	1.000	.625**	-.094
		Sig. (2-tailed)	.	.426	.	<.001	.622
		N	30	30	30	30	30
	Temp	Correlation Coefficient	.	.059	.625**	1.000	.068
		Sig. (2-tailed)	.	.755	<.001	.	.721
		N	30	30	30	30	30
	Turbid	Correlation Coefficient	.	-.400*	-.094	.068	1.000
		Sig. (2-tailed)	.	.028	.622	.721	.
		N	30	30	30	30	30

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

รูปที่4.4 ช่วงความเชื่อมั่นของค่าสหสัมพันธ์ (Confidence Interval of Spearman's rho)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 บทสรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจการเก็บตัวอย่างน้ำ 30 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างน้ำที่เก็บบริเวณชุมชนในตำบลเมืองเก่า อำเภอเสนาห์ จังหวัดสระบุรี มีอุณหภูมิเฉลี่ย 25.8 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เฉลี่ยของน้ำมีค่าเท่ากับ 8.1 เมื่อนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่พบเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ร้อยละ 0 ซึ่งทั้งอุณหภูมิเฉลี่ยและค่าความเป็นกรดเบสอยู่ในช่วงที่พบในแหล่งน้ำจืดธรรมชาติที่ใช้ในชุมชนหรือสวนสาธารณะในประเทศไทย (กรมควบคุมมลพิษ, 2020) ซึ่งเป็นช่วงที่ *Acanthamoeba* spp. สามารถอาศัยและเจริญเติบโตได้ตามรายงานการสำรวน้ำสวนสาธารณะในประเทศไทย (ภัทรกร บุปผัน และคณะ, 2018) และการวิเคราะห์ *Acanthamoeba* spp. จากแหล่งน้ำจืดทั่วประเทศ (Putaporn et al., 2011)

ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจากแหล่งน้ำ บึงโง้ง ตำบลเมืองเก่า อำเภอเสนาห์ จังหวัดสระบุรีพบเชื้อ ร้อยละ 30 มีอุณหภูมิเฉลี่ย 24.9 องศาเซลเซียส ค่า pH 8.1 โดยการสำรวนี้ พบลักษณะของ Environmental amoeba โดยลักษณะที่พบมีผนังชั้นนอกหนา ผนังชั้นในมีรูปร่างเหลี่ยมคล้ายดาว หากเปรียบเทียบกับกรจำแนกลักษณะของซิสต์ออกเป็น 3 กลุ่ม ตามหลักของ Pussard and Pons (1977) พบว่าใกล้เคียง กลุ่มที่ 1 (*Astronyxis*) และ กลุ่มที่ 2 (*Polyphagid*) ซึ่งไม่สามารถแยกกันได้ด้วยวิธี culture และยังสอดคล้องกับการรายงานพบ *Acanthamoeba* spp. กลุ่มที่ 2 ในสิ่งแวดล้อมมากที่สุด และพบการติดเชื้อในคนมากที่สุด (Khan, 2009) นอกจากนี้ผลการศึกษายังสอดคล้องกันกับการสำรวจอะแคนทามีบาในตัวอย่างน้ำสวนสาธารณะในประเทศไทย (ภัทรกร บุปผันและคณะ, 2018)

การตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยวิธี Conventional PCR พบว่า Positive control ให้ผลเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Acanthamoeba* spp. ขนาดประมาณ 450 bp ขณะที่ Negative control ไม่พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ แสดงให้เห็นว่าชุดสกัดดีเอ็นเอ วิธีการสกัด และเทคนิคที่ใช้ในกระบวนการ PCR มีประสิทธิภาพและสามารถใช้งานได้ถูกต้อง

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาพบว่าไม่สามารถตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Acanthamoeba* spp. จากสิ่งตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้ ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ ปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อในสิ่งตัวอย่างมีน้อยเกินไป ระดับความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอไม่เพียงพอ หรือมีสารยับยั้งปฏิกิริยา (PCR inhibitors) อยู่ในตัวอย่าง ทำให้ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นในระดับต่ำหรือไม่เกิดขึ้นเลย ส่งผลให้ไม่สามารถตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Acanthamoeba* spp. ได้จากสิ่งตัวอย่างดังกล่าว

สำหรับเชื้อ environmental amoeba ที่พบในครั้งนี้ ลักษณะของ cyst มีทั้ง สองแบบ ขนาดเล็ก และ ขนาดใหญ่ ซึ่งขนาดใหญ่ มีผนังสองชั้น ชั้นนอกมีผิวขรุขระ ทรงกลม สำหรับระยะ cyst ขนาดเล็ก มีผนังทรงกลม ทำให้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *Acanthamoeba* spp. จากการ ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการตรวจด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา จึงมีความจำเป็น ซึ่งพบว่าเมื่อใช้เทคนิค PCR เปรียบเทียบกับ Real time PCR พบว่าการตรวจ จะมีความไวและจำเพาะกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับผลการเพาะเลี้ยง เชื้ออาจจะยังไม่สามารถเปรียบเทียบได้ เนื่องจากหากมีปริมาณเชื้อน้อย หรือมี inhibitor ในตัวอย่าง จะทำให้ผล มีความไวต่ำกว่า สรุปได้ว่าการตรวจสิ่งส่งตรวจจากน้ำผิวดินในแหล่งน้ำ ทำการ ตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคต่างๆที่เกี่ยวข้องทางการแพทย์ได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

บึงโง้งอยู่ที่ตำบลเมืองเก่า อำเภอเตาไห จังหวัดสระบุรีเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติ เป็นแหล่งเก็บกักน้ำตลอดปี มีชุมชนรอบ ๆ ใช้ประโยชน์ เช่น อุปโภค บริโภค การเกษตร และประมง การตรวจหา *Acanthamoeba* หรือ free-living amoebae ที่ปะปนอยู่ในแหล่งน้ำที่คนสามารถสัมผัสหรือใช้ประโยชน์จึงมีความสำคัญเชิงสาธารณสุขและจะมีผลทางอ้อมต่อการแพร่ของเชื้อแบคทีเรียที่มี free-living amoeba เช่น *Acanthamoeba* spp. เป็น reservoir หรือ host ที่ทำให้เกิดโรคเช่น *Legionella*, *Mycobacterium* spp. (Rayamajhee et al., 2022)

ในการทดสอบ *Acanthamoeba* spp. cultivation ครั้งนี้พบระยะชีสต์มากกว่าระยะโทรโฟซอยต์ซึ่งปัญหาเกิดจากสภาพสิ่งแวดล้อมที่มีปัจจัยไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิทำให้เชื้ออะแคนทามีบามีการเปลี่ยนจากระยะดังกล่าวเพื่อความอยู่รอดทั้งนี้ หากต้องการทราบสายพันธุ์ของเชื้ออะแคนทามีบา ทางผู้วิจัยเสนอให้ทำการทดสอบด้วยเทคนิคระดับชีวโมเลกุล เช่น DNA sequencing ซึ่งจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาต่อไป

บรรณานุกรม

- Vogt T, McClelland M, Jung B, Pedroso JL, Barsottini OG, Duberstein SA, et al. Translation and adaptation of the Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Self-assessment and clinimetric testing of the Hindi version. *Mov Disord Clin Pract*. 2016;3(4):376–81. doi:10.1002/mdc3.12268.
- Khan NA. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30(4):564-95.
- Prevention by CDC - Acanthamoeba Infection - Biology [Internet]. [cited 2013 Nov 18]. Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/biology.html>
- อัญชลี วรรณสาร, อะแคนทามีบา (Acanthamoeba). วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่. 2553;43(1):20-9.
- Lck-Uthai U, Passara R, Roongruangchai K, Buddhirakkul P, Thammapalerd N. Rapid identification of Acanthamoeba from contact lens case using loop-mediated isothermal amplification method. *Exp Parasitol*. 2009;121(4):342-5.
- Newsome AL, Scott TM, Benson RF, Fields BS. Isolation of an amoeba naturally hantoring a distinctive Legionella species. *Appl Environ Microbiol*. 1998 May;64(5):1688-93.
- ระพีพร ไพบูลย์เจริญ. การสำรวจทำ Acanthamoeba spp. ในฝุ่นจากกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล. วารสารเทคนิคเชียงใหม่. 2550;40:46-53.
- Putaporntip, C., Kuamsab, N., Nuprasert, W., Rojrung, R., Pattanawong, U., Tia, T., Yanmanee, S., & Jongwutiwes, S. (2021). Analysis of acanthamoeba genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 Acanthamoeba Bangkokensis sp. nov.. *Nature News*. <https://www.nature.com/articles/s41598-021-96690-0>
- ภัทธร บุปผัน, ชลาลัย มีบุญ, จิตินันท์ กล่ำศิริ, วรากร พรหมยุทธนา, วสุมดี ก่ออมรทรัพย์, รัตน์ดิพร โกสุวินทร์, และปะการัง ศรีมี. (2560). การสำรวจอะแคนทามีบาในตัวอย่างน้ำสวนสาธารณะในประเทศไทย. [วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้]. <https://ejournals.swu.ac.th/index.php/JSTEL/article/view/10190>
- Wannasan A. (2010). Acanthamoeba. *Journal of Associated Medical Sciences* 43(1): 20–29.

จิตรกุล สุวรรณเจริญ,และวัชรพงษ์ ศรีชุม.(2017).การสำรวจหาอะแคนตามีบาในแหล่งน้ำ
ธรรมชาติจากชุมชนรอบมหาวิทยาลัยพะเยาจังหวัดพะเยาประเทศไทย.[วารสารสาธิต
ศาสตร์]. <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jph/article/view/82281>.

จารุวรรณ สายรุ่งเรืองศิลป์ ,ณัฐพงศ์ ปารีแก้ว,ธีรวัรา กริชแก้ว,สุไมญา เบ็ญนัย,และอรวรรณกลิ้ง
เทศ.23

(2556). การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้ออะแคนตามีบาในตลับคอนแทกเลนส์ของนักศึกษา

วิทยาศาสตร์สุขภาพมหาวิทยาลัยรังสิต.[ปริญญานิพนธ์].มหาวิทยาลัยรังสิต

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ภาคผนวก ก
รายละเอียดการเตรียมสารเคมี

การเตรียมน้ำยาและสารเคมี

สารเคมี

- 1) NaCl :BRIGHTCHEM SDN BHD/New Zealand
- 2) KH₂PO₄ :MALLINCKRODT CHEMICAL WORKS/USA
- 3) Na₂HPO₄ :SIGMA-ALORICH/Germany
- 4) CaCl₂.6H₂O :MERCK/Germany
- 5) MgSO₂.7H₂O : MERCK/Germany

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) Non-active Escherichia coli ATCC 25922 (Turbidity = 0.5 McFarland standards)
- 2) Agar powder :HIMEDIA/India
- 3) Proteose-Yeast extract-Glucose (PYG) medium
- 4) Non-nutrient agar

การเตรียม Page's amoeba saline (PAS)

1. ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ดังต่อไปนี้
 - KH₂PO₄ 0.136 g.
 - Na₂HPO₄ 0.142 g.
 - CaCl₂.6H₂O 0.004 g.
 - MgSO₂.7H₂O 0.004 g.
 - DW 1000 ml
2. สารละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่นให้ส่วนประกอบละลายโดยใช้ความร้อนช่วย แล้วปรับปริมาตรให้ครบตามสูตรด้วยน้ำกลั่น
3. ปรับ pH 6.8 - 7.0
4. Autoclave 15 นาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ใน Page amoeba saline

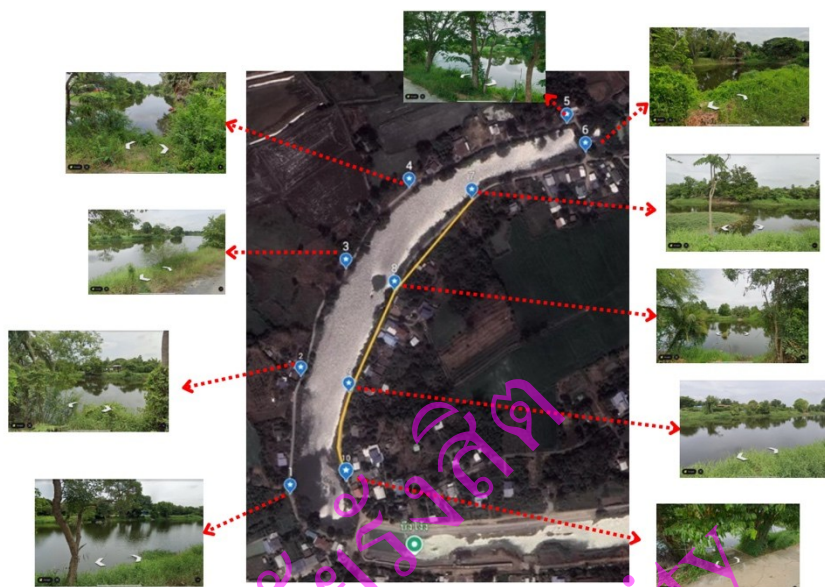
การเตรียม 1.5 % Non nutrient agar

1. น้ำ Page's amoeba saline ที่เตรียมไว้ 100 ml
2. ผสมกับผงวุ้น 1.5 g ผสมละลายด้วยความร้อน
3. 1.5 % Non nutrient agar ที่เตรียมไว้เข้า Autoclave 15 นาที
4. 1.5 % Non nutrient agar ลงใน petri dish

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ภาคผนวก ข
การเก็บตัวอย่าง



การเก็บตัวอย่างน้ำ

1. วัดระยะห่างจากขอบแหล่งน้ำ 20 ถึง 50 ซม. และ ลึกประมาณ 10 ถึง 20 ซม.



2. ใช้กระป๋องเก็บตัวอย่างขนาด 500 ml เก็บตัวอย่างน้ำมาใส่กระป๋องเก็บตัวอย่าง



3. วัดอุนภูมิและจذب้นทีก



มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ภาคผนวก ค
วิธีการตรวจตัวอย่าง

การตรวจหาเชื้อในน้ำโดยวิธีการอย่างง่าย ((Direct examination)

1. นำมาผ่านวิธีการตกตะกอน โดยนำใส่ในหลอดปั่นตกตะกอน แล้วปั่นด้วยความเร็วที่ 2,000g เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนบนทิ้ง แล้วนำส่วนตะกอนมาตรวจหาด้วยวิธีต่างๆ



2. นำตัวอย่างน้ำที่ได้มาหยดลงบนสไลด์ปริมาตร 20 μL จากนั้นปิด coverslip



3. ตรวจหาเชื้อได้กล้องจุลทรรศน์



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	อภิญญา เวทส์เตอร์
วัน เดือน ปีเกิด	17 พฤษภาคม 2545
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	300/133 หมู่ 6 ตำบลบางเสา อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2560 จากโรงเรียนสิงห์สมุทร จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2563 จากโรงเรียนสิงห์สมุทร จังหวัดชลบุรี
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ปฎิภาณ เพชรน้อย
วัน เดือน ปีเกิด	11 ตุลาคม 2545
สถานที่เกิด	เพชรบูรณ์
ที่อยู่ปัจจุบัน	21 / สอง หมู่ 3 ตำบลห้วยสะแก อำเภอเมืองจังหวัดเพชรบูรณ์
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ. 2560 จากโรงเรียนองค์การบริหารส่วนจังหวัดเพชรบูรณ์วังชมภูวิทยาคม จังหวัดเพชรบูรณ์ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ. 2563 จากโรงเรียนเพชรพิทยาคม จังหวัดเพชรบูรณ์
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 5 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	พรชิตา สว่างศรี
วัน เดือน ปีเกิด	8 สิงหาคม 2546
สถานที่เกิด	นครสวรรค์
ที่อยู่ปัจจุบัน	310/1 หมู่9 ตำบลแม่เป็น อำเภอแม่เป็น จังหวัดนครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2561 จากโรงเรียนเซนโยเซฟนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2564 จากโรงเรียนโพธิสารศึกษา จังหวัดนครสวรรค์
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	อัจจิมา ทิตตเมธา
วัน เดือน ปีเกิด	18 กันยายน 2546
สถานที่เกิด	จังหวัดปราจีนบุรี
ที่อยู่ ปัจจุบัน	8/8 หมู่8 ตำบลรอบเมือง อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2561 จากโรงเรียน โรงเรียนปราจีนราษฎร์บำรุง จังหวัดปราจีนบุรี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2564 จากโรงเรียน โรงเรียนปราจีนราษฎร์บำรุง จังหวัดปราจีนบุรี
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	อโนมา เรืองจำเนียร
วัน เดือน ปีเกิด	19 กันยายน 2546
สถานที่เกิด	ราชบุรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	41/1 หมู่ 4 ตำบลเบิกไพร อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ. 2561 จากโรงเรียนสารสาสน์ วิเทศนครปฐม สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ. 2564 จากโรงเรียนสารสาสน์วิเทศ นครปฐม
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	สิริวิชญ์ อภินันท์ธนากร
วัน เดือน ปีเกิด	25 ธันวาคม 2546
สถานที่เกิด	นครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	483 ถนนสวนตะไคร้ ตำบลสนามจันทร์ อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2561 จากโรงเรียนสุคนธ์วิทย์ จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2564 จากโรงเรียนสุคนธ์วิทย์ จังหวัดนครปฐม
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่4 มหาวิทยาลัยรังสิต