Research Article

THJPH

Prevalence of Entamoeba histolytica in Phayao Lake, Phayao Province, Thailand

Amanee Abu[1], Kritpaphat Tantiamornkul[1], Sudthiporn Somnet[2], Suwattana Kerdmuang[3], Sakdikorn Suwancharoen[3], Touchchapol Mataradchakul[1]

THJPH 2022; 52(2): 131-139

Correspondence:
Touchchapol Mataradchakul, Division of Microbiology and Parasitology, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao 56000, THAILAND
E-mail: touchchapol.ma@up.ac.th

[1] Division of Microbiology and Parasitology, School of Medical Sciences, University of Phayao, THAILAND
[2] Division of Anatomy, School of Medical Sciences, University of Phayao, THAILAND
[3] Sirindhorn College of Public Health Suphanburi, THAILAND

Received: December 2 2021;
Revised: February 21, April 5 2022;
Accepted: April 11 2022

Extended Abstract

Entamoeba histolytica is a parasitic protozoan that lives in the large intestine of humans and other primates causing amoebic dysentery or amoebiasis in infected people. In severe cases or immunocompromised people, *Entamoeba histolytica* leads to complications because this type of protozoa can cause intestinal perforation initiating liver or lung abscesses when protozoa spread to the brain, leading to death. The protozoa can contaminate the environment, water, natural water resources, and fresh vegetables throughout pandemic areas. This can spread due to consumption of contaminated food or drink and unhygienic behavior, especially in tropical regions with inadequate public health priorities. Phayao Lake is a large natural water reservoir in Phayao Province, Thailand, used as a water source and for agriculture, fishery, breeding of freshwater animals, and tourism. Farmers bring cattle to feed from the surrounding area. These activities support the growth of microorganisms in water sources, especially when temperatures increase during the summer. The microscope detection method is an important and standard technique for detection of protozoal parasites collected from clinical and environmental samples prior to the laboratory. This method is an easy and convenient technique but requires expertise to identify the type of protozoa, including rarely detectable mild infection. Molecular biology has been introduced to detect protozoal parasites. Real-time polymerase chain reaction (PCR) can detect *Entamoeba histolytica* with high sensitivity and specificity. However, molecular biology methods are costly and require several testing steps. The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique was developed and used in the diagnosis of diseases by increasing the amount of DNA under a single temperature. It does not require a thermocycler and takes less time compared to other molecular biology techniques. Therefore, LAMP can be used in field detection of protozoal parasites. Previous studies have shown that the LAMP technique is more sensitive than PCR and nested PCR. The present study aimed to determine the prevalence of *Entamoeba histolytica* in 70 water samples from Phayao Lake and compared protozoal detection using a standard microscopic method and a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. Prior to detection, water samples (5 liters per sampling point) were collected from surface water covering Phayao Lake. The physical quality of water, including dissolved oxygen (DO), pH, conductivity and temperature, by multimeter. All sample collection points were marked by GPS on the Google Map application. Water samples were centrifuged to sediment and concentrated with ethyl acetate before iodine staining with glass slides under the microscope. For the LAMP method, the sediment of all samples was extracted by QIAamp DNA Mini Kit before LAMP reaction with reagents including 10X DNA polymerase buffer, primers

and Ehd1-BIP), $MgSO_4$, dNTPs mix, Bst DNA polymerase, RNase free water and templates. Data were analyzed by SPSS version 20.0 and the concordance of Entamoeba histolytica detection was analyzed by Cohen's Kappa-coefficient. The proportion of positive results in detecting Entamoeba histolytica was 30.0% (21/70). 7.1% (5/70) and 30.0% (21/70) of Entamoeba histolytica detections were by microscope and LAMP methods, respectively. The LAMP method of identifying Entamoeba histolytica was more sensitive and specific than the microscopic method, at 100.0% and 75.4%, respectively. The concordance of Entamoeba histolytica detection was fair between the methods (Kappa coefficient = 0.30). The results of this study could be applied to detect protozoal contamination in water sources with suitable techniques in water-borne protozoal surveillance.

Keywords: Entamoeba histolytica, Protozoa, LAMP, Phayao Lake, Phayao Province

ความชุกของเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา ในแหล่งน้ำกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา ประเทศไทย

อามาณี อาบู[1], กฤตปภัช ตันติอมรกุล[1], สุทธิพร สมเนตร[2], สุวัฒนา เกิดม่วง[3], ศักดิกร สุวรรณเจริญ[3], ธัชพล เมธารัชกุล[1]

THJPH 2022; 52(2): 131-139

[1] สาขาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา
[2] สาขากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา
[3] วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดสุพรรณบุรี

บทคัดย่อ

เอนตามีบา ฮีสโตไลติคา เป็นโปรโตซัวที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ เป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของโรคบิดมีตัว ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม แหล่งน้ำ รวมถึงในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศเขตร้อนที่ยังมีการสาธารณสุขไม่ดีเพียงพอการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความชุกของเอนตามีบาฮีสโตไลติคาในตัวอย่างน้ำกว๊านพะเยา รวมทั้งสิ้น 70 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค LAMP ผลการศึกษาพบเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา ทั้งหมดร้อยละ 30 (21/70) ตรวจพบร้อยละ 7.1 (5/70) ด้วยเทคนิคการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และพบร้อยละ 30 (21/70) ด้วยเทคนิค LAMP การเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจทั้ง 2 วิธี พบว่าเทคนิค LAMP มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) มากกว่าเทคนิคการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร้อยละ 100 และ 75.3 ตามลำดับ เทคนิคการตรวจทั้ง 2 วิธีมีความสอดคล้องกันในระดับพอใช้ สัมประสิทธิ์แคปปา เท่ากับ 0.3 ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการตรวจหาการปนเปื้อนของโปรโตซัวในแหล่งน้ำ ด้วยเทคนิคที่เหมาะสม เพื่อเฝ้าระวังการติดต่อของโรคติดต่อจากแหล่งน้ำต่อไป

คำสำคัญ: เอนตามีบา ฮีสโตไลติคา, โปรโตซัว, ลูปมีดิเอทิดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน, กว๊านพะเยา, พะเยา

บทนำ

เอนตามีบา ฮีสโตไลติคา (*Entamoeba histolytica*) เป็นโปรโตซัวที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ของคนพบการปนเปื้อนจากอุจจาระของผู้ที่มีโปรโตซัวชนิดนี้ขับถ่ายลงสู่สิ่งแวดล้อม ทั้งในแหล่งดิน แหล่งน้ำตามธรรมชาติ หรือแม้กระทั่งผักสดที่สามารถตรวจพบได้[1] คนได้รับเอนตามีบา ฮีสโตไลติคาโดยการบริโภคอาหาร ดื่มน้ำ ที่มีการปนเปื้อนของซีสต์ซึ่งเป็นระยะติดต่อ[2] เป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของโรคบิดมีตัวทำให้เกิดอาการอักเสบ เป็นแผลที่ลำไส้ใหญ่ และโรคแทรกซ้อนเนื่องจากโปรโตซัวชนิดนี้สามารถทำให้ลำไส้เกิดการทะลุ และเข้าไปยังกระแสเลือดทำให้เกิดฝีที่ตับ ปอด หรือลุกลามไปที่สมองจนทำให้ผู้ติดเชื้อเสียชีวิตโดยเฉพาะคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง[3]

จังหวัดพะเยา มีแหล่งกักเก็บน้ำธรรมชาติขนาดใหญ่ คือกว๊านพะเยา ที่ใช้ในการอุปโภค บริโภค การเกษตร การประมงทั้งเพาะพันธุ์ ขยายพันธุ์ แหล่งศึกษาวิจัยสัตว์น้ำจืด และเป็นแหล่งท่องเที่ยว นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งรองรับน้ำตอนบนขนาดใหญ่ที่สามารถบรรเทาการเกิดอุทกภัยบริเวณพื้นที่ตอนล่างของกว๊านพะเยาได้[4] ซึ่งแหล่งน้ำตามธรรมชาตินี้อาจเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ทั้งแบคทีเรีย ไวรัส ปรสิต เนื่องจากแหล่งน้ำหลายบริเวณมีการไหลเวียนช้าหรือไม่มีการไหลเวียนประกอบกับในฤดูร้อน น้ำจะมีอุณหภูมิสูงขึ้น ส่งผลให้ดินบริเวณกว๊านพะเยาแห้งเป็นดินโคลนทำให้เกษตรกรนิยมนำสัตว์มาเลี้ยงบริเวณโดยรอบและมีการถ่ายมูลลงสู่แหล่งน้ำ ปัจจัยเหล่านี้เหมาะแก่การเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียและโปรโตซัว เช่น คริปโตสปอริเดียม และไกอาร์เดียรวมถึงเอนตามีบา ฮีสโตไลติคาด้วย[5-6]

เทคนิคมาตรฐานในการตรวจหาเอนตามีบาฮีสโตไลติคาจากสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการคือเทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพราะเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ราคาถูก และสะดวกแต่ต้องใช้ความชำนาญในการตรวจของผู้ปฏิบัติการเพราะเชื้อมีขนาดเล็กมากมีการบดบังของสิ่งปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมรวมถึงหากเชื้อในตัวอย่างที่สนใจมีปริมาณน้อยอาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ [6-7] แต่ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว และความจำเพาะสูงมาใช้ในการตรวจหา โดยใช้เทคนิค real-time polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับ SYBR Green™ [8] รวมถึงเทคนิค PCR ในการตรวจหาเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา[9] อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวก็ยังคงมีค่าใช้จ่ายที่สูงและมีวิธีการทดสอบหลายขั้นตอนใช้ระยะเวลานาน สำหรับเทคนิค loop-mediated isothermal amplification(LAMP)เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาและนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้อุณหภูมิเดียวซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง thermocycler และใช้เวลาในการทดสอบไม่นานเมื่อเทียบกับเทคนิคทางอณูชีววิทยาอื่นๆ[10] จึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจภาคสนามเพื่อช่วยในการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อที่เป็นสาเหตุการก่อโรคได้จากงานวิจัยที่ผ่านมามีการศึกษาพบว่าเทคนิค LAMP ในการตรวจหาเชื้อโปรโตรซัวในแหล่งน้ำของเชื้อคริปโตสปอริเดียม และไกอาร์เดียซึ่งเป็นโปรโตซัวในลำไส้เช่นเดียวกับเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา ให้ผลการตรวจที่มีความไวและความจำเพาะกว่าเทคนิค PCR และ nested PCR อีกด้วย[11]

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหาความชุกของเอนตามีบาฮีสโตไลติคาในแหล่งน้ำกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการตรวจพบเชื้อโดยเปรียบเทียบเทคนิคตรวจภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค LAMP เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันและควบคุมเชื้อและหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อในสิ่งแวดล้อมต่อไป

วิธีการศึกษา

การศึกษารูปแบบเชิงสำรวจแบบภาคตัดขวาง(cross-sectional study) เพื่อดำเนินการศึกษาหาการแพร่กระจายของเชื้อเอนตามีบาฮีสโตไลติคา บริเวณรอบแหล่งน้ำกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา ประเทศไทย และมีการเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจด้วยเทคนิคตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานในห้องปฏิบัติการและเทคนิคLAMPซึ่งเป็นเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจภาคสนามได้โดยการเก็บตัวอย่างดำเนินการตั้งแต่เดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2562งานวิจัยนี้ได้รับการพิจารณาให้ได้รับการยกเว้นจริยธรรมการวิจัยจากหน่วยพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์กองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยพะเยา เนื่องจากดำเนินการและการเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำในสิ่งแวดล้อม

การคำนวณกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อทำการศึกษาการปนเปื้อนเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา บริเวณรอบแหล่งน้ำกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา ประเทศไทย ใช้วิธีการคำนวณบริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้โดยใช้สูตรหาความชุกแบบไม่

$$n = \frac{Z^2{}_{\alpha/2}PQ}{e^2}$$

โดย n = จำนวนตัวอย่างน้ำ บริเวณรอบแหล่งน้ำกว๊านพะเยา

α=ความคลาดเคลื่อนจากการสรุปคุณลักษณะพื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำ จากค่าสถิติตัวอย่าง

Z = Confidence coefficient ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด 90% (1-∞)

P = สัดส่วนอุบัติการณ์การตรวจพบจากงานวิจัยอ้างอิงของเชื้อเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา มีค่าเท่ากับ 34% คิดเป็น 0.34 [1]

Q = 1-P = (0.66)

e = ค่าของการยอมรับการตรวจผิดพลาดได้ ±10 ตัวอย่างจาก 100 ตัวอย่าง = 0.1

$$n = \frac{(1.645)^2(0.34)(0.66)}{0.1^2}$$

$$= 61.54$$

ผลการคำนวณตามสูตรขนาดพื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำบริเวณรอบแหล่งน้ำกว๊านพะเยาในงานวิจัยครั้งนี้ได้จำนวนพื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำ ที่ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา ทั้งหมดประมาณ 62 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากยังไม่ครอบคลุมพื้นที่บริเวณรอบแหล่งน้ำกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา ทั้งหมด งานวิจัยนี้จึงได้เพิ่มพื้นที่เก็บตัวอย่างให้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น จึงได้เลือกเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อทำการศึกษาวิจัยครั้งนี้ 70 ตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างน้ำ และวิธีการเตรียมตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อทำการศึกษาการปนเปื้อนเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา บริเวณริมตลิ่งกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา ประเทศไทย (Figure 1) ทำการวิเคราะห์ลักษณะคุณภาพน้ำเบื้องต้นทางกายภาพ ประกอบด้วยการวิเคราะห์อุณหภูมิ (Temperature) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณค่าออกซิเจนที่ละลายในแหล่งน้ำพื้นที่เก็บตัวอย่าง (Dissolved oxygen: DO) และค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) โดยใช้เครื่องมือการวิเคราะห์น้ำในพื้นที่เก็บตัวอย่างแบบพกพา Multimeter (PCD650)

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่ผิวน้ำพื้นที่ละ 20 ลิตร โดยทำการเก็บใส่ขวดพลาสติกใสที่ปราศจากเชื้อ นำตัวอย่างน้ำมาทดสอบหาการปนเปื้อนเชื้อเอนตามีบา ฮีสโตไลติคาภายในระยะเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง ที่ห้องปฏิบัติการสาขาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา โดยนำตัวอย่างน้ำที่เก็บมาได้นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อทำการตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง เหลือตะกอนด้านล่างที่คาดว่าจะพบการปนเปื้อนเอนตามีบาฮีสโตไลติคา ปริมาณ 1 มิลลิลิตร บรรจุไว้ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ขั้นต่อไป

Figure 1 Study sites for detection of Entamoeba histolytica in water samples from Phayao Lake, Phayao Province, Thailand.

เทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจหาเอนตามีบา ฮีสโตไลติคาโดยทำการเตรียมตัวอย่างน้ำให้เข้มข้นด้วยเทคนิคการตกตะกอนด้วยเอทิลอะซิเตท โดยการนำตัวอย่างน้ำกรองผ่านผ้าก๊อส 2 ชั้น ขนาดรูประมาณ 400 ไมโครเมตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 15 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เติมเอทิลอะซิเตท 3 มิลลิลิตร ปิดฝาและทำการเขย่าด้วยมือให้ส่วนผสมรวมกันเป็นเนื้อเดียวประมาณ 1 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ตัวอย่างจะแยกออกเป็นชั้นเทส่วนบนทิ้งให้เหลือตะกอนด้านล่าง เพื่อนำไปหยดบนสไลด์และทำการย้อมสีชั่วคราว (Temporary stain) ตรวจหาเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ยืนยัน 5 ซ้ำของแต่ละตัวอย่างน้ำโดยผู้วิจัยที่มีประสบการณ์การย้อมสีเพื่อตรวจหาเชื้อใช้เทคนิคการย้อมสีชั่วคราว โดยทำการหยดลูกอล์ไอโอดีน (Lugol's iodine) 2 หยดลงบนแผ่นสไลด์ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตรและใช้หลอดหยดเพื่อดูดตะกอน 1 หยดลงบริเวณที่ได้ทำการหยดลูกอล์ไอโอดีนไว้แล้วก่อนหน้า ทำการผสมให้เข้ากันปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทันทีเพื่อป้องกันสไลด์แห้ง

การตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค LAMP

ทำการแช่แข็งและหลอมละลายตะกอนตัวอย่าง 6 รอบ แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่าติดลบ100 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำแข็งแห้งผสมเอทานอลร้อยละ 90 เป็นเวลา 10 นาที หลอมละลายตะกอนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 10 นาที สลับขั้นตอนระหว่างแช่แข็ง และหลอมละลายตะกอนจนครบ 6 รอบเพื่อทำให้ผนังเซลล์ของเอนตามีบา ฮีสโตไลติคาระยะซีสต์แตก หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ขั้นตอนสุดท้ายในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอใช้ตะกอน200ไมโครลิตรเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini Kit ดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิติดลบ 20 องศาเซลเซียสตลอดการศึกษาวิจัย

นำดีเอ็นเอตัวอย่างมาตรวจหาการปนเปื้อนเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา ด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ส่วนผสมของสารเคมีต่าง ๆ ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ดังนี้ 10X DNA polymerase buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 2 ไพรเมอร์คู่นอก Ehd1-F3 (5'-AAAGATAATACTTGAG ACGATCC) และ Ehd1-B3 (5'-TCGTTATCCGTTATAATCTTGG)

และ 2 ไพรเมอร์คู่ใน Eh1-FIP (5'-GCATCCTAACTCACTTA GAATGTCAAGTACAAAATGGCCAATTCATTC) และ Ehd1-BIP (5'-CACGACAATTGTAGAAC ACACAGT-TCCTCGATACTACCAACTGAT) ปริมาตรชนิดละ 1 ไมโครลิตร[10], 100 mM $MgSO_4$ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร dNTPs mix (10mM each) ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ Bst DNA polymerase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase ปริมาตร 8.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอตัวอย่าง5ไมโครลิตร หลังจากนั้นผสมสารทั้งหมดในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดโดยใส่ลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ตั้งอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส 120 นาที จากนั้นปรับความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 1 นาที ตรวจสอบผลที่ได้โดยสังเกตจากความขุ่นของสารละลายในหลอดทดลองเปรียบเทียบกับผลควบคุมและทำการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (Agarose Gel) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ควบคุมผลบวกโดยใช้ตัวอย่างเชื้อเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่เทียบลำดับเบสจากฐานข้อมูลNCBIและควบคุมผลลบด้วยตัวอย่างน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเชิงพรรณนาเพื่อคำนวณหาค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 20.0 เปรียบเทียบความไว ความจำเพาะของเทคนิคการตรวจหาเอนตามีบา ฮีสโตไลติคาและหาความสอดคล้องกันของวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กับเทคนิค LAMP ด้วยสัมประสิทธิ์แคปปา (Cohen's Kappa-coefficient)

ผลการศึกษา

คุณลักษณะแหล่งน้ำทางกายภาพของกว๊านพะเยา

ตัวอย่างแหล่งน้ำที่ทำการเก็บตัวอย่างบริเวณรอบกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำด้วยเครื่องมือการวิเคราะห์น้ำในพื้นที่เก็บตัวอย่างแบบพกพา Multimeter (PCD650) พบว่าอุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 30.2 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเฉลี่ยเท่ากับ 8.5 ค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยเท่ากับ 165.2 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และค่าปริมาณออกซิเจนที่จุลชีพใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ เท่ากับ 2.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จัดอยู่ในระดับคุณภาพน้ำ (WQI) ประเภทที่ 3 คือพอใช้[12]

การปนเปื้อนของเอนตามีบา ฮีสโตไลติคาในแหล่งน้ำกว๊านพะเยา

ผลการศึกษาพบการปนเปื้อนของเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา บริเวณรอบกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยาจากจำนวนทั้งหมด 70 ตัวอย่าง ตรวจพบ 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.1) ด้วยเทคนิคการตรวจหาด้วยกล้องจุลทรรศน์และเทคนิค LAMP จากการสังเกตความขุ่นด้วยตาเปล่าพบว่าให้ผลบวก 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.3) และจากการถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลเจลให้ผลบวก 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30) โดยเฉพาะเทคนิค LAMP สามารถตรวจหาเอนตามีบา ฮีสโตไลติคาได้เพิ่มขึ้นอีก 16 ตัวอย่าง ในขณะที่เทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่สามารถตรวจพบได้ (Table 1)

การเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค LAMP ที่ใช้ในการตรวจการปนเปื้อนของเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา พบว่าเทคนิค LAMP มีความไว ร้อยละ 100 และความจำเพาะ ร้อยละ 75.3 มากกว่าเทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Table 1) ผลการศึกษาความสอดคล้องกันในเทคนิคการตรวจหาเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา พบว่า มีความสอดคล้องกันระดับพอใช้ ที่ค่าสัมประสิทธิ์แคปปาเท่ากับ 0.3 (Table 1)

Table 1 Comparison between LAMP and microscopic technique in identifying Entamoeba histolytica

Microscopic	LAMP	n (%)
Negative	Positive	0(0.0)
Positive	Negative	16(22.9)
Negative	Negative	49(0.0)
Positive	Positive	5(7.1)
Total		**70 (100.0)**
Concordance of results (%)		77.14
Kappa coefficient		0.30
Sensitivity % (95% CI)		100 (47.82 to 100)
Specificity % (95% CI)		75.38 (63.13 to 85.23)
Positive likelihood ratio (95% CI)		4.06 (2.65 to 6.22)
Negative likelihood ratio (95% CI)		0.00
Conclusion		Strength of agreement considered to be fair

Kappa coefficient; Strength of agreement (<0.00 poor, 0.00-0.20 slight, 0.21-0.40 fair, 0.41-0.60 moderate, 0.60-0.80 good, 0.81-1.00 almost perfect); CI, confidence interval

อภิปรายผล

เอนตามีบาฮีสโตไลติคาเป็นเชื้อโปรโตซัวในลำไส้ติดต่อจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีเชื้ออะมีบา ซึ่งเป็นสัตว์เซลล์เดียวหรือโปรโตซัวที่ติดต่อจากการปนเปื้อนมากับอุจจาระผู้ป่วยที่มีเชื้อทำให้เกิดอาการอักเสบของลำไส้ใหญ่หรือที่ทำให้เกิดอาการอักเสบบริเวณเชื้อฝังตัวอยู่ เช่น ตับ ปอด สมอง เอนตามีบา ฮีสโตไลติคา พบการติดเชื้อได้โดยการดูแลสุขาภิบาลไม่สะอาดทำให้มีการปนเปื้อนจากการขับถ่ายสู่สิ่งแวดล้อมในดินและแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ได้แก่ ลำธาร ลำคลอง หนองน้ำ บึง ทะเลสาบน้ำจืด[12-13] โดยเฉพาะแหล่งน้ำบริเวณรอบกว๊านพะเยาที่เอื้อต่อการปนเปื้อนของเชื้อสู่สิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาแหล่งน้ำโดยรอบกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา พบว่าพื้นที่แหล่งน้ำกว๊านพะเยาส่วนใหญ่มีการประกอบอาชีพเกษตรกรรมเลี้ยงสัตว์พื้นที่ท่องเที่ยวมีกิจกรรมสันทนาการและมีพื้นที่อยู่อาศัย (Fig. 1) มาตรฐานคุณภาพแหล่งน้ำ จัดอยู่ในมาตรฐานแหล่งน้ำระดับ 3 คุณภาพพอใช้ โดยให้ผลตรงกับการรายงานของสำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่2ลำปางประจำไตรมาสที่ 4 เดือนกรกฎาคม ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 ได้ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำกว๊านพะเยา รายงานว่าจัดอยู่ในมาตรฐานแหล่งน้ำประเภทที่3คือพอใช้[12]จากผลการศึกษาตรวจพบเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา ร้อยละ 30 สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาได้ทำการสำรวจเอนตามีบาฮีสโตไลติคาจากแหล่งน้ำโดยมีการวัดคุณภาพน้ำทั้งทางกายภาพและทางฟิสิกส์พบว่าสามารถตรวจพบการปนเปื้อนสูงในแหล่งน้ำผิวดินที่มีคุณภาพระดับ3ขึ้นไปอีกทั้งยังตรวจพบสูงที่สุดในบริเวณใกล้กับแหล่งที่อยู่อาศัยอย่างแออัด ร้อยละ 41.4[13]

ผลการศึกษาการปนเปื้อนในแหล่งน้ำบริเวณรอบกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา พบความชุกของเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา ด้วยเทคนิคการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ตรวจพบ5ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.1) และที่สำคัญ คือการตรวจด้วยเทคนิค LAMP จากการถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลเจลพบมากถึง 21 ตัวอย่าง(ร้อยละ30)ซึ่งพบว่ามีอัตราความชุกสูงกว่างานวิจัยที่ผ่านมาจากการสำรวจชุมชนที่ทำการเกษตรเมืองฮานัมประเทศเวียดนาม[14]ที่พบร้อยละ 5.7 และงานวิจัยที่สำรวจในโรงพยาบาลชุมชนนายานซา ประเทศรวันดา[15] ที่พบร้อยละ 15.9 รวมถึงในประเทศไทย ในการสำรวจตัวอย่างอุจจาระประชาชนบริเวณชายแดนไทย-พม่า ที่ตรวจพบเพียงร้อยละ 7.6[16] ในขณะที่การสำรวจที่เมืองอาบิล ประเทศอิรัก[12] พบสูงถึงร้อยละ 41.4 ในการศึกษาครั้งนี้มีการตรวจพบอัตราความชุกที่สูง อาจเนื่องมาจากวิธีการตรวจและปัจจัยที่แตกต่างกันเช่นสภาพแวดล้อมภูมิประเทศในการสำรวจกิจกรรมทางน้ำชุมชนบริเวณโดยรอบรวมถึงการปนเปื้อนของมูลสัตว์ที่เกษตรกรนำมาเลี้ยงรอบๆ แหล่งน้ำ[17-19] กิจกรรมเหล่านี้ส่งผลต่อการแพร่กระจายเชื้อเอนตามีบาฮีสโตไลติคาในสิ่งแวดล้อมที่สามารถติดต่อสู่คนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำ

การตรวจตัวอย่างสิ่งแวดล้อมด้วยเทคนิคการตรวจกล้องจุลทรรศน์เป็นเทคนิคมาตรฐานในการวินิจฉัยโปรโตซัวรวมถึงเอนตามีบาฮีสโตไลติคาถือเป็นที่นิยมใช้ แต่อย่างไรก็ตามหากบุคลากรขาดการฝึกฝนอบรมทักษะให้มีความเชี่ยวชาญอย่างชำนาญในการใช้กล้องจุลทรรศน์ผลลัพธ์การตรวจที่ได้อาจจะไม่แน่นอน และผิดพลาดได้เพราะเชื้อมีขนาด รูปร่างเล็กยิ่งไปกว่านั้นอาจถูกบดบังจากการปนเปื้อนของตัวอย่างสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ได้[20] ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้นำตัวอย่างน้ำบริเวณรอบกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยาที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนเอนตามีบาฮีสโตไลติคาทำการเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กับเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลด้วยเทคนิคLAMP ซึ่งผลการทดลองพบว่าการตรวจด้วยเทคนิค LAMPให้ผลการตรวจที่สูงกว่าที่ร้อยละ 30 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่สำรวจหาคริพโตสปอริเดียมและไกอาร์เดียในแหล่งน้ำกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา ที่ให้ผลที่ดีกว่า[11] รวมถึงผลการทดลองใกล้เคียงกับ Z Koloren และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 ที่ได้ทำการตรวจเชื้อคริพโตสปอริเดียม จากแม่น้ำ น้ำพุ และน้ำบาดาล เปรียบเทียบเทคนิคทางชีวโมเลกุล 2 เทคนิค คือ nested PCR และ เทคนิค LAMP พบว่าnestedPCRตรวจไม่พบเชื้อ ผลการทดลองยังคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Lindemann และคณะ ในปี ค.ศ. 2016 และ Zeynep Koloren ในปี ค.ศ. 2013 ที่ได้ทำการตรวจเชื้อคริพโตสปอริเดียมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ พบว่าเทคนิค LAMP ให้ผลบวกได้มากที่สุด แล้วมีความไวในการตรวจเชื้อมากกว่าเทคนิค nested PCR และเทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์[21] รวมถึงข้อดีที่สำคัญที่สุดของเทคนิคLAMPก็คือถึงแม้ว่ากระบวนการทางPCRสามารถถูกยับยั้งจากสารบางอย่างที่ปนเปื้อนมาจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติได้ โดยงานวิจัยของ Loge et al., 2002 พบว่าเป็นสารประเภท Humic เป็นสารจากธรรมชาติ มีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการ PCR โดยเข้าไปจับกับ Taq polymerase ทำให้ได้ PCR product ลดลง ซึ่งเทคนิค LAMP เป็นกระบวนการที่ไม่สามารถถูกยับยั้งจากสารจากธรรมชาติได้[22]ถึงแม้ว่าเทคนิคLAMPมีข้อจำกัดเรื่องการอ่านผลจากความขุ่นของสารละลายในหลอดทดลองด้วยตาเปล่าหากเชื้อมีปริมาณน้อยมีค่าใช้จ่ายและใช้เวลาที่มากกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ อย่างไรก็ตามผลของเทคนิค LAMP มีความไวและความจำเพาะมากกว่ากล้องจุลทรรศน์และ PCR อีกทั้งค่าใช้จ่ายและอุปกรณ์น้อยกว่าPCRจึงสะดวกต่อการประยุกต์ใช้ในการตรวจโปรโตซัวในสิ่งแวดล้อมพื้นที่ภาคสนามได้

อย่างไรก็ตาม การวินิจฉัยการปนเปื้อนเอนตามีบา ฮีสโตไลติคาควรทำการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานโดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ควบคู่ไปกับเทคนิคขั้นสูงทางอณูชีวโมเลกุลอื่นๆ เพื่อผลลัพธ์ที่น่าเชื่อถือ อาทิเช่น LAMP, PCR, Real-Time PCRรวมถึงเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันที่เป็นวิธีมาตราฐานการตรวจหาโปรโตซัวในสิ่งแวดล้อมของประเทศสหรัฐอเมริกา เช่น Immunofluorescence assay[7] เพื่อจะทำให้สามารถวินิจฉัยควบคุม และป้องกันโรคที่เกิดจากเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา ที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา สามารถมีการติดต่อได้โดยการรับประทานอาหาร และน้ำที่ไม่ถูกสุขลักษณะในระยะซีสต์เข้าไป ซึ่งปัจจัยที่อาจมีผลต่อวงจรชีวิตคือการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมเช่นในดินและแหล่งน้ำรวมถึงบริเวณรอบแหล่งน้ำกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา ที่เป็นบึงน้ำจืดขนาดใหญ่มีการตั้งถิ่นฐานบ้านเรือนของประชาชนการเลี้ยงสัตว์ และกิจกรรมสันทนาการ โดยรอบแหล่งน้ำที่เอื้อต่อการปนเปื้อนของเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา จากการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด

70 ตัวอย่างพบว่ามีการปนเปื้อนของเอนตามีบา ฮีสโตไลติคาสูงถึงร้อยละ30ด้วยเทคนิคการตรวจทางอณูชีวโมเลกุลจากเทคนิค LAMPซึ่งตรวจพบได้มากกว่าเทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ตรวจพบได้เพียงร้อยละ 7.1 การเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจทั้ง 2 วิธี แสดงให้เห็นว่าการตรวจหาเชื้อเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา ด้วยเทคนิค LAMP ให้ผลบวกมากกว่า เทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์และยังมีความไวและความจำเพาะมากกว่าเทคนิคการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร้อยละ 100 และ 75.3 ตามลำดับ โดยที่ผลการตรวจด้วยเทคนิคทั้ง 2 วิธีมีความสอดคล้องกันในระดับพอใช้ สัมประสิทธิ์แคปปา เท่ากับ 0.3ผลการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องรวมถึงการประยุกต์ใช้เทคนิคLAMPในการตรวจภาคสนามเพื่อเป็นแนวทางการวางแผนควบคุมป้องกันปัญหาทางด้านสาธารณสุข และใช้เป็นข้อมูลในงานศึกษาวิจัยอื่นต่อไป

Author Contributions

AA, KT and TM conceived and designed the study, contributed to the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. SS, SK and SS advised on the protocol and the manuscript. All authors read and approved the final submitted version of the manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. Nanticha Khampithum and Mr. Anon Meungkaew for assistance in the field and laboratory; the Microbiology and Parasitology Division, School of Medical Science, University of Phayao, Thailand, for facilitating the study.

Source of Funding

The work presented in this article was self-funded.

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Tantiamornkul K, Mataradchakul T. Detection of insecticide contamination and prevalence of protozoa in fresh vegetables from fresh markets, Muang Phayao, Phayao Province. Journal of Public Health 2019; 49(1): 118-29. (In Thai)
2. Saidin S, Abu Bakar A, Mohd Zain BM. Prevalence and associated risk factors of E*ntamoeba histolytica, E. dispar* and *E. moshkovskii* infection among Orang Asli communities in Slim River, Perak. JSML 2020; 8(2): 22-35.
3. Bercu TE, Petri WA, Behm JW. Amebic colitis: New insights into pathogenesis and treatment. Curr Gastroenterol Rep 2007; 9(5): 429-33.
4. Kaewsri K, Traichaiyaporn S. Monitoring on water quality and algae diversity of Kwan Phayao, Phayao Province, Thailand. IJAT 2012; 8(2): 537-50.
5. Junaidi J, Cahyaningsih U, Purnawarman T, Latif H, Sudarnika E, Hayati Z, et al. *Entamoeba histolytica* neglected tropical diseases (NTDs) agents that infect humans and some other mammals: A review. The 1st International Conference on Veterinary, Animal, and Environmental Sciences (ICVAES 2019). E3S Web of Conferences 151,010192020.
6. Mataradchakul T, Tantiamornkul K. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Kwan Phayao Lake, Phayao Province, Thailand using a microscopic technique comparing direct wet mount, temporary stain, and permanent stain. Journal of Public Health 2018; 48(3): 406-17. (In Thai)
7. International Organization for Standardization. ISO 15553: Water quality-isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water, 2006.
8. Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IK, Petri WA, Haque R. Real - time - PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J Clin Microbiol 2005; 43(5):2168-72.
9. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. J Clin Microbiol 2007; 45(3): 1035-7.
10. Liang SY, Chan YH, Hsia KT, Lee JL, Kuo MC, Hwa KY, et al. Development of loop - mediated isothermal amplification assay for detection of *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 2009; 47(6): 1892-5.
11. Tantiamornkul K, Mataradchakul T. Comparison of nested - polymerase chain reaction and loop - mediated isothermal amplification in detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* from water sources in Phayao Province, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2019; 50(1): 13-24.
12. Wongphan N, Junsiri A, Promson J, Saipang N, Sridang S. The report of the situation of water re-sources in Phayao province, Lampang: Regional Environmental Office 2 Lampang; 2018. (In Thai)
13. Mahmood SAF, Mustafa HB. Molecular identification and prevalence of *Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* in Erbil city, northern Iraq. Pol J Microbiol 2020; 69(3):1-10.

14. Duc PP, Nguyen-Viet H, Hattendorf J, Zinsstag J, Cam PD, Odermatt P. Risk factors for *Entamoeba histolytica* infection in an agricultural community in Hanam province, Vietnam. Parasit Vectors 2011; 4: 102.
15. Callixte C, Ayubu A, Lestari P, Daniel N, Budhy TI. Epidemiological prevalence of *Entamoeba histolytica* infections among the patients attending Nyanza district hospital, Rwanda in 2018. Int J Epidemiol Res 2019; 6(4):149-53.
16. Intarapuk A, Kalambaheti T, Thammapalerd N, Mahannop P, Kaewsatien P, Bhumiratana A, Nit yasuddhi D. Identification of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by PCR assay of fecal specimens obtained from Thai/ Myanmar border region. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2009; 40 (3): 425-34.
17. Ferguson C, Husman AMDR, Altavilla N, Deere D, Ashbolt N. Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. Crit Rev Environ Sci Technol 2003; 33 (3): 299-361.
18. Pachepsky YA, Sadeghi AM, Bradford SA, Shelton DR, Guber AK, Dao T. Transport and fate of manure-borne pathogens: Modeling perspective. Agric Water Manag 2006; 86 (1–2): 81-92.
19. Tyrrel SF, Quinton JN. Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. J Appl Microbiol 2003; 94(Suppl):87S-93S.
20. Utzinger J, Botero-Kleiven S, Castelli F, Chiodini PL, Edwards H, Kohler N, et al. Microscopic diagnosis of sodium acetate - acetic acid - formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: A comparison among European reference laboratories. Clin Microbiol Infect 2010; 16(3): 267-73.
21. Koloren Z, Delioglu BK, Tas B. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by loop mediated isothermal amplification (lamp) in surface water from river yesilirmak and stream tersakan (samsun-amasya). AUJS 2017; 6(1): 31-7.
22. Loge FJ, Thompson DE, Call DR. PCR detection of specific pathogens in water: A risk-based analysis. Environ Sci Technol 2002; 36(12): 2754-9.