

การวิเคราะห์จีอาร์เดีย แลมเบลีย ในระดับโมเลกุล จากตัวอย่าง
ที่ได้จากผู้ติดเชื้อในประเทศไทย



นางสาวรัตน์ทิพร โกสุรินทร์

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR ANALYSIS OF *Giardia lamblia* ISOLATED FROM INFECTED
INDIVIDUALS IN THAILAND



Miss Rattiporn Kosuwin

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

Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์จีอาร์เดีย แลมเบสีย ในระดับโมเลกุล จากตัวอย่าง
ที่ได้จากผู้ติดเชื้อในประเทศไทย

โดย

นางสาวรัตณิตพร โกสุวินทร์

สาขาวิชา

ปรสตีวิทยาทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์

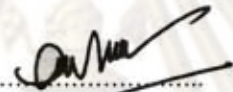
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

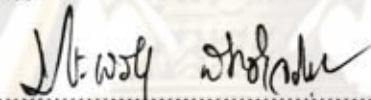
รองศาสตราจารย์ ณัฐรุต จันทชุม

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

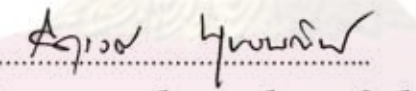

.....
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทรากุลย์)

คณบดีคณะแพทยศาสตร์

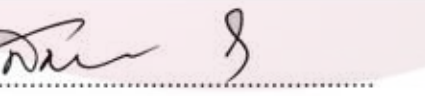
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย)

ประธานกรรมการ


.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์)

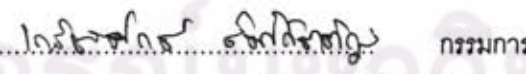
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก


.....
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม


.....
(รองศาสตราจารย์ ณัฐรุต จันทชุม)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม


.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงศักดิ์ สิมปิกิตติกุล)

กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รัตน์ดิพร โกลสูรินทร์ : การวิเคราะห์จีอาร์เดีย แลมเบเลีย ในระดับโมเลกุล จากตัวอย่าง
 ที่ได้จากผู้ติดเชื้อในประเทศไทย. (MOLECULAR ANALYSIS OF *GIARDIA LAMBLIA*
 ISOLATED FROM INFECTED INDIVIDUALS IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรพิทย, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม :
 ศ. นพ. สมชาย จงวุฒิเวศย์ : รศ. ณัฐรุต จันทุม 118 หน้า.

Giardia lamblia เป็นโปรโตซัวที่มีความสำคัญก่อให้เกิดโรคท้องเสียในคน รวมไปถึงในกลุ่มสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าอีกหลายชนิด โดยทั่วไปรูปลักษณ์ของ *G. lamblia* ในแต่ละไอโซเลตจะมีความคล้ายคลึงกัน แต่จากการวิเคราะห์ทางด้านอนุชีววิทยาสามารถจัดกลุ่มของตัวอย่างเหล่านี้ ได้เป็น 7 assemblage และอีกหลาย subassemblage ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีอยู่ 5 Assemblage ที่มีการแพร่กระจายเชื้อไปมาในกลุ่มของสัตว์ และเมื่อไม่นานมานี้มีการค้นพบว่า Assemblage A และ B ที่เป็นสาเหตุหลักของการก่อโรคนั้นสามารถพบการติดเชื้อได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกหลายชนิด เพื่อเป็นการศึกษาการแพร่กระจาย Assemblage ต่าง ๆ ของ *G. lamblia* ในคนของประเทศไทย คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้เทคนิค PCR-PFLP จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วนของบีตาร์ ไจอาร์ดินีนเพื่อศึกษาความหลากหลายดังกล่าว ในจำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ที่ได้เก็บรวบรวมจากเด็กนักเรียนของอำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก จำนวน 22 ราย และอีก 8 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มาเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผลการศึกษาพบว่าการติดเชื้อ Assemblage B ใน 18 ไอโซเลต ส่วนตัวอย่างที่เหลือจัดอยู่ใน Assemblage A2/A3 จากการทดสอบด้วยการนำผลผลิตพีซีอาร์มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaellI* และ *HhaI* ตามลำดับ ขณะที่วิธีการทำโคลนและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 756 เบส ของตัวอย่างเหล่านี้ให้ผลสอดคล้องกับวิธี PCR-RFLP ยกเว้นใน 1 ตัวอย่างจากจังหวัดตากที่พบว่าการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง Assemblage A2/A3 และ Assemblage B นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อปะปนร่วมกันมากกว่า 1 สายพันธุ์ใน 13 ตัวอย่าง โดยประกอบไปด้วยสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 3-5 รูปแบบในแต่ละไอโซเลต ดังนั้นความถูกต้องในการวินิจฉัย subassemblage จากตัวอย่างของผู้ป่วยจึงมีความสำคัญต่อการวางมาตรการการควบคุมโรคเนื่องจากมีความหลากหลายของสายพันธุ์ภายในตัวอย่างเชื้อเดียวกัน

ภาควิชา ..ปริสิตวิทยา.....

สาขาวิชา....ปริสิตวิทยาทางการแพทย์....

ปีการศึกษา....2552.....

ลายมือชื่อ นิสิต รัตน์ดิพร โกลสูรินทร์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5074821530 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORDS : Beta-giardin / PCR-RFLP

RATTIPORN KOSUWIN : MOLECULAR ANALYSIS OF *GIARDIA LAMBLIA* ISOLATED FROM INFECTED INDIVIDUALS IN THAILAND.

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHATURONG PUTAPORNTIP, Ph.D.,

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

ASSOC. PROF. NUTAROS CHANTACHUME, 118 pp.

Giardia lamblia is an important protozoan agent causing diarrheal illness in humans and capable of infecting a wide range of domestic and wild mammals. Despite morphological identity among *G. lamblia* isolates, molecular analysis has classified them into at least 7 Assemblages and several subassemblages. Although five of these Assemblages are known to circulate among animals, Assemblages A and B that usually cause human infections have recently been found to infect domestic mammals. To determine the distribution of Assemblages of *G. lamblia* in humans in Thailand, we used the PCR-RFLP method targeting the beta giardin locus to genotype 30 isolates collected from 22 children at Ta Song Yang District, Tak Province and 8 adults in Bangkok. Results have shown that 18 isolates belonged to Assemblage B and the remaining isolates could be assigned to Assemblage A2/A3 based on *HaeIII* and *HhaI* digestions of the PCR products, respectively. Meanwhile, subcloning and sequencing of the PCR-amplified 756 bp fragments of these isolates mostly gave concordant results with the PCR-RFLP method in assemblage assignment except that the co-existence of Assemblages A2/A3 and B was detected by subcloning and sequencing of an isolate from Tak Province. Furthermore, it is noteworthy that 13 isolates had clonal mixtures, comprising three to five distinct sequences per isolate. Therefore, accurate subassemblage assignment of clinical isolates that has practical consequence for disease control could be complicated by the presence of intra-isolate clonal diversity.

Department :.. Parasitology.....

Field of Study :.. Medical Parasitology.....

Academic Year : ..2009.....

Student's Signature Rattiporn Kosuwin

Advisor's Signature Chaturong Putaporn

Co-Advisor's Signature Somchai J.

Co-Advisor's Signature Nutaros Chantachum

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ข้อแนะนำในการแก้ปัญหาต่างๆ ในการศึกษาวิจัยและให้ความเมตตากรุณาต่อข้าพเจ้าเป็นอย่างดี ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์ รองศาสตราจารย์ณัฐรุส จันทชุม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ สนับสนุน ความคิดเห็นต่างๆ ในการศึกษาวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดียิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงศักดิ์ ลิ้มปิติติกุล ภาควิชากุมารเวชศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์สุนีย์ สิริรวมใจ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และคุณมาลี เจริญกร คุณอุรัสยา พัฒนวงศ์ คุณทวีศักดิ์ แซ่เตีย คุณธงชัย หงส์ศรีเมือง ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือต่างๆ ตลอดจนความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา พี่น้อง และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ คำปรึกษาและให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

ศูนย์วิจัยทรัพยากรชีวภาพและนิเวศวิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
อนุกรมวิธานของโปรโตซัว <i>Giardia lamblia</i>	6
การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์และที่มาของการแพร่กระจายของเชื้อ <i>Giardia lamblia</i>	7
วงจรชีวิตของ <i>Giardia lamblia</i>	10
สัณฐานวิทยาของ <i>Giardia lamblia</i>	11
กระบวนการเข้าซิสต์ของ <i>Giardia lamblia</i> (Encystation).....	17
กระบวนการออกจากซิสต์ของ <i>Giardia lamblia</i> (Excystation)	19
ลักษณะทางพันธุกรรมของ <i>Giardia lamblia</i>	22
กลไกการแพร่กระจายของเชื้อ <i>Giardia lamblia</i>	27
การก่อพยาธิสภาพ	34
อาการแสดงทางคลินิก.....	35
ระบบภูมิคุ้มกัน.....	36
การตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ.....	38
การรักษา.....	40
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
รูปแบบการวิจัย.....	41
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	41
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	41

บทที่	หน้า
ขนาดของกลุ่มประชากร.....	42
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	42
การเก็บตัวอย่างอุจจาระ.....	45
วิธีการนับจำนวนปรสิต <i>Giardia lamblia</i>	45
การสกัดดีเอ็นเอ.....	46
การออกแบบ oligonucleotides สำหรับใช้เป็น PCR Primer.....	47
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	48
การตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี gel electrophoresis	49
วิธีการทำโคลน (subclone)	50
การวิเคราะห์ลำดับเบสของ ดีเอ็นเอ.....	52
การจำแนกสายพันธุ์ <i>Giardia lamblia</i> โดยวิธี PCR-RFLP.....	53
4. ผลการทดลอง.....	54
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน beta-giardin gene.....	57
ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ <i>Giardia lamblia</i> โดยเทคนิค PCR-RFLP.....	58
การวิเคราะห์ลักษณะอัลลีลที่พบทั้งหมดของยีน beta-giardin gene.....	60
ผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของ <i>Giardia lamblia</i>	62
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin	65
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	79
รายการอ้างอิง.....	84
ภาคผนวก.....	100
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	118

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงอัตราการติดเชื้อ <i>G. lamblia</i> ในกลุ่มประเทศต่างๆ.....	9
2.	แสดง <i>G. lamblia</i> Assemblage and host range of isolate.....	24
3.	แสดงอัตราการติดเชื้อ <i>G. lamblia</i> Assemblage A และ B ในคน.....	31
4.	แสดงอัตราการติดเชื้อ <i>G. lamblia</i> subassemblage A และ B ในสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า.....	32
5.	แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง.....	56
6.	แสดงผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ <i>G. lamblia</i> โดยวิธี PCR-RFLP.....	58
7.	แสดงลักษณะอัลลีลที่พบทั้งหมดของยีน beta-giardin ใน Assemblage A	60
8.	แสดงลักษณะอัลลีลที่พบทั้งหมดของยีน beta-giardin ใน Assemblage B	61
9.	แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>G. lamblia</i>	67
10.	แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin ใน Assemblage A.....	68
11.	แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin ใน Assemblage B.....	70



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ <i>G. lamblia</i>	10
2. แสดงแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>G. lamblia</i> ในระยะโทรโฟซอยต์....	12
3. แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>G. lamblia</i> ในระยะซิสต์.....	13
4. แสดงองค์ประกอบของ ventral disk	15
5. แสดงกระบวนการออกจากซิสต์ (excystation) ของ <i>G. lamblia</i>	20
6. แสดงกระบวนการแบ่งตัวแบ่งตัวแบบ binary fission ของ <i>G. lamblia</i>	21
7. แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิตผล PCR.....	57
8. แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิตผล PCR-RFLP จากการตัดด้วยเอนไซม์ <i>HaeIII</i>	59
9. แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิตผล PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ <i>HhaI</i>	59
10. แสดงผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของ <i>G. lamblia</i>	64
11. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และการแทนที่ของลำดับกรดอะมิโน ใน Assemblage A.....	77
12. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และการแทนที่ของลำดับกรดอะมิโน ใน Assemblage B.....	78



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

Giardia sp. เป็นแฟลกเจลเลตโปรโตซัว ที่ดำรงชีวิตแบบปรสิตภายในลำไส้ของโฮสต์ เป็นสาเหตุของโรคท้องเสียในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีกและ สัตว์เลื้อยคลาน สามารถพบการแพร่กระจายของ *Giardia* sp. ได้ทั่วโลก *Giardia* sp. ถูกค้นพบ ครั้งแรกใน ค.ศ. 1681 โดย Van Leeuwenhoek ซึ่งพบปรสิตชนิดนี้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จาก อุจจาระของตนเอง (Dobell, 1920) แต่ผู้ที่นับว่าเป็นคนบรรยายลักษณะอย่างละเอียดของ โปรโตซัวชนิดนี้เป็นคนแรกในปี ค.ศ. 1859 คือ Vilem Lambi ต่อมาในปี ค.ศ. 1888 Kunstler ได้ ตั้งชื่อสกุล (genus) ชนิดนี้ว่า *Giardia* หลังจากนั้น Blanchard (1988) ได้เรียกชื่อสกุลใหม่ว่า *Lambli* *intestinalis* ภายหลังได้มีการเปลี่ยนชื่อมาเป็น *Giardia duodenalis*

จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1915 Stiles ได้เสนอให้ใช้ชื่อ *G. lamblia* เพื่อเป็นเกียรติแก่ ศาสตราจารย์ A. Giard ที่ปารีสและนายแพทย์ Lambi ที่กรุงปราก แต่ก็ยังคงมีบางกลุ่มที่ใช้ชื่อ *G. intestinalis* ในปัจจุบันพบว่าชื่อ *G. lamblia* ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายในทาง การแพทย์ จากการศึกษาในปี ค.ศ. 1978 พบว่า genus *Giardia* มีทั้งหมด 40 species โดยแยก ตามชนิดของโฮสต์เป็นหลัก (Meyer และ Radulescu, 1978)

Filice (1952) ได้จำแนก *Giardia* sp. ออกเป็น 3 species โดยอาศัยลักษณะรูปร่างของ โทรโฟซอยต์ (trophozoite) และมีเดียนบอดี (median body) โดยจำแนกได้เป็น 1). *G. lamblia* ในระยะ trophozoite มีรูปร่างคล้ายลูกแพร์ (pear-shape) หรือแมงดาทะเล มี 1-2 median bodies ลักษณะคล้ายสันค้อนตะปูมีง่าม (claw-shape) พบได้ในคนและสัตว์เลี้ยงลูก ด้วยนมหลายชนิด 2). *G. muris* ระยะ trophozoite มีรูปร่างอ้วนกลม median bodies มีขนาด เล็กและรูปร่างกลม พบในพวกสัตว์แทะ (rodent) และ 3). *G. agilis* ระยะ trophozoite มีรูปร่าง เรียวยาว (slender) median bodies คล้ายหยดน้ำตา (teardrop-shape) พบในพวกสัตว์ครึ่งบก ครึ่งน้ำ

ภายหลังจากที่กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) ได้ถูกพัฒนาขึ้นมา ทำให้สามารถศึกษาลักษณะรูปร่างของปรสิต *Giardia* sp. ในระยะ trophozoite ได้อย่างชัดเจน จึงสามารถจำแนกได้อีก 2 species ได้แก่ *G. psittaci* ในระยะ trophozoite มีรูปร่างคล้ายลูกแพร์ หรือแมงดาทะเลและมีเงี่ยงด้านข้างที่จานเกาะ (ventro-lateral flange) ที่ไม่สมบูรณ์และไม่มีส่วน ของ marginal groove พบปรสิตชนิดนี้ในนกแก้ว (parakeet) (Erlandsen และ Bemrick, 1987)

อีกชนิดหนึ่ง คือ *G. ardeae* ลักษณะของจานดูด (ventral disk หรือ adhesive disk) และ caudal flagellum คล้ายกับ *G. muris* พบได้ในพวกนกกระสา (heron) (Erlandsen et al., 1990) และ species สุดท้ายคือ *G. microti* ถูกจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของซิสต์ (cyst) จากการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าในระยะ cyst ของ *G. microti* จะมี ventral disk ที่สมบูรณ์แล้ว ขณะที่ cyst ของ *G. lamblia* ภายในจะไม่มีส่วนของ ventral disk (Feely, 1998) นอกจากนี้พบว่า *G. microti* สามารถจำแนกจาก *G. lamblia* ได้โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน small subunit rRNA (van Keulen et al., 1998) และมีโฮสต์จำเพาะเป็นพวกหนูนา (vole) และหนูที่มีขนาดใหญ่ (muskrats)

ตามที่ปรสิตร *Giardia* sp. สามารถจำแนกได้หลาย species พบว่า *G. lamblia* (ชื่อพ้อง *G. intestinalis*, *G. duodenalis*) เป็นเพียง species เดียวเท่านั้นที่พบว่าสามารถก่อโรคในคนได้ โดย *G. lamblia* ติดอันดับ 1 ใน 10 ของโรคปรสิตที่สำคัญในคน สามารถพบการแพร่กระจายไปทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตที่มีอากาศอบอุ่น เชื่อว่าในแต่ละปีจะมีผู้ติดเชื้อ *G. lamblia* ทั่วโลก ประมาณ 280 ล้านรายต่อปี (Lane และ Lloyd, 2002) ทั้งนี้พบการแพร่ระบาดได้บ่อยในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาโดยอาจพบอุบัติการณ์การติดเชื้อมากถึงร้อยละ 20-30 ในขณะที่ประเทศที่พัฒนาแล้วมีอัตราการติดเชื้อต่ำโดยพบประมาณร้อยละ 2-5 (Marshall et al., 1997) จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่าในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อในเอเชีย แอฟริกา และลาตินอเมริกา ถึง 200 ล้านคน และมีผู้ติดเชื้อรายใหม่ถึง 500,000 รายต่อปี (WHO, 1996) รวมถึงยังเป็นปรสิตที่พบการติดเชื้อได้บ่อยในกลุ่มสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข แมว และปศุสัตว์ต่างๆ เป็นต้น รวมถึงในสัตว์ป่าหลายชนิดอีกด้วย

เนื่องจาก *G. lamblia* สามารถก่อโรคได้ในโฮสต์หลายชนิด ลักษณะทางชีววิทยามีวงจรชีวิตเพียง 2 ระยะ คือ ระยะ trophozoite และระยะ cyst โดยไม่ต้องอาศัยโฮสต์ตัวกลาง (intermediate host) ระยะ cyst มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกได้เป็นอย่างดี จึงช่วยให้ *G. lamblia* สามารถที่จะแพร่กระจายหรือเกิดการติดต่อจากคนหนึ่งสู่อีกคนหนึ่งได้โดยตรง สำหรับบทบาทการก่อโรคของโปรโตซัว *Giardia* sp. จะไม่มีการลุกลามของเชื้อเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮสต์ (non-invasive) แต่จะอาศัยและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ อยู่บริเวณเยื่อบุผิวลำไส้เล็ก ส่วนดูโอเดนิมของโฮสต์ กลไกที่ทำให้เกิดโรคมักไม่ทราบแน่ชัด โดยผู้ที่ติดเชื้ออาจไม่แสดงอาการแต่สามารถแพร่กระจายเชื้อออกมาปนเปื้อนกับอุจจาระในรูปของ cyst และสามารถติดต่อกับบุคคลอื่นได้ ผู้ติดเชื้อบางรายอาจมีอาการท้องเสียเฉียบพลัน (acute diarrhea) หรือท้องเสียเรื้อรัง (chronic diarrhea) ซึ่งอาการของโรคจะเริ่มขึ้นภายใน 1-2 สัปดาห์ หลังจากกลืน cyst เข้าไป รวมทั้งอาจมีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน เกิดภาวะสูญเสียน้ำ (dehydration) และน้ำหนักลด (Thompson และ Meloni, 1993)

อย่างไรก็ตามมีการศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้ทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกในการก่อโรคของ *G. lamblia* มากขึ้น โดยพบว่าปรสิตชนิดนี้จะมีการปล่อยสารบางอย่างออกมากกระตุ้นการทำงานของเยื่อผิวที่บริเวณลำไส้เล็ก ทำให้เกิดภาวะการรั่วซึมของเยื่อผนังลำไส้บกพร่อง โดยพบว่า peripheral membrane protein และ zonula occludens -1 (ZO-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของเยื่อผิว จะถูกทำลายทำให้เกิดการอักเสบของเยื่อผิวในลำไส้เล็ก ส่งผลให้กระบวนการย่อยอาหารและดูดซึมสารอาหารเกิดความผิดปกติ (Chin et al., 2002)

ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ ภาวะด้านโภชนาการและภูมิคุ้มกันโรคของโฮสต์ (Chin et al., 2002) การมีกรดน้อยหรือไม่มีกรดในกระเพาะอาหาร (achlorhydria) รวมไปถึงการติดเชื้อปรสิตอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารร่วมด้วย เช่น พยาธิปากขอ (hookworm) หรือ *Hymenolepis* sp. เป็นต้น (Sackey, Weigel และ Armijos, 2003) ในเด็กเล็กมีส่วนทำให้พัฒนาการในการเจริญเติบโตต่ำกว่าในเด็กปกติ นอกจากนี้ปัจจัยดังกล่าวแล้ว สาเหตุที่ทำให้ปรสิต *G. lamblia* สามารถพบการแพร่กระจายไปทั่วโลกหรือมีความสามารถในการก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคได้นั้น เนื่องจาก cyst มีความทนทานต่อสภาวะสิ่งแวดล้อม สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้นานหลายสัปดาห์หรือนานเป็นเดือน รวมถึงมีความทนทานต่อคลอรีนในน้ำประปา การที่ cyst ของ *G. lamblia* สามารถเจริญเป็นระยะติดต่อได้ทันทีหลังจากที่ปนเปื้อนออกมาพร้อมกับอุจจาระ (Rendtorff, 1954) นับเป็นปัจจัยเอื้ออำนวยต่อการแพร่กระจายสู่โฮสต์อื่นได้รวดเร็วขึ้นและสามารถก่อโรคได้แม้ว่าโฮสต์จะได้รับ cyst จำนวนน้อยเพียง 10 cyst ก็ตาม (Rendtorff, 1954 ; Pickering, 1984)

การแพร่ระบาดของเชื้อสามารถติดต่อได้จากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของ cyst ระยะติดต่อ สาเหตุหลักของการแพร่ระบาดทางน้ำ (waterborne outbreak) มักเกิดจากการที่ไม่มีระบบการบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรม โรงพยาบาลหรือจากบ้านเรือนของประชาชนลงสู่แหล่งน้ำต่างๆ การบริโภคพืชผักผลไม้สดพบว่ามีความเสี่ยงในการติดเชื้อ giardia ได้ เนื่องจากมีการปนเปื้อนของ cyst ในแหล่งน้ำที่นำมาใช้ในด้านเกษตร ในปี ค.ศ. 2004 พบการแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อทางเดินอาหารในผู้ป่วยถึง 1,450 ราย ในมลรัฐโอไฮโอ สหรัฐอเมริกา โดยพบว่าสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อ *G. lamblia* ร่วมกับเชื้อชนิดอื่นๆ (O'Reilly, 2007) ต่อมาพบรายงานการระบาดครั้งใหญ่ในรัฐเวอร์มอนต์ พบอัตราการติดเชื้อถึง 30 รายต่อประชากร 100,000 ราย ซึ่งนับว่าเป็นอัตราการติดเชื้อสูงสุดในรอบ 3 ปี (Jonathan และ Michael, 2007) ในกลุ่มนักท่องเที่ยวธรรมชาติที่บริโภคน้ำในแม่น้ำลำธาร พบว่ามีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อด้วยเช่นกัน

นอกจากนี้ *Giardia* sp. ยังสามารถติดต่อได้จากคนหนึ่งสู่อีกคนหนึ่ง (person to person transmission) มักพบอัตราการติดเชื้อสูงในเด็ก อายุต่ำกว่า 15 ปี โดยเฉพาะในสถานที่ที่มีความเป็นอยู่อย่างแออัดที่มีสุขภิบาลไม่ดี เช่น ในสถานที่เลี้ยงเด็กอ่อน สถานรับเลี้ยงเด็กกำพร้าต่างๆ โดยมีรายงานความชุกในเด็กอายุ 1-5 ปี ที่ Mount Isa ประเทศออสเตรเลียโดยพบอัตราการติดเชื้อร้อยละ 8.5 และจากรายงานของ Harter และคณะ ที่ทำการสำรวจในรัฐวอชิงตันพบความชุกของปรสิต *G. lamblia* ในเด็กเล็ก 1-3 ปี ถึงร้อยละ 7 (Harter, Frost และ Jakubowski, 1982) เชื่อกันว่าการติดต่อจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อเป็นอย่างมากเนื่องจากสามารถที่จะแพร่กระจายเชื้อไปยังคนในครอบครัวหรือผู้ที่อยู่ใกล้ชิดได้ นอกจากนี้ในกลุ่มรักร่วมเพศชายพบที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *G. lamblia* โดยได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนมากับอุจจาระ

สำหรับในประเทศไทยโรคติดเชื้อ *Giardia* sp. หรือ giardiasis นับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข โดยจากการสำรวจความชุกในสถานเลี้ยงเด็กกำพร้า 25 แห่ง ในกรุงเทพฯ พบความชุกของปรสิต *G. lamblia* ร้อยละ 20 และพบว่ามี การติดเชื้อร่วมกับ *Cryptosporidium* อีก ร้อยละ 1 (Janoff, 1990a) และในสถานเลี้ยงเด็กกำพร้า จังหวัดเชียงใหม่ พบการติดเชื้อในเด็กเล็กร้อยละ 40 (นิमित มรกต และคณะ, 2533) ในปี ค.ศ. 2003 ได้มีการสำรวจความชุกในเด็กนักเรียนอายุ 5-7 ปี ที่อาศัยอยู่ในเขตชนบทของ จังหวัดสมุทรสาคร พบอัตราการติดเชื้อ *G. lamblia* ร้อยละ 6.5 โดยผู้ติดเชื้อทั้งหมดไม่แสดงอาการ (Wongjindanon et al., 2005) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2007 มีรายงานการติดเชื้อ *G. lamblia* ในเด็กอายุ 3 เดือน-5 ปี พบการติดเชื้อ *G. lamblia* ร้อยละ 13.6 และมีการติดเชื้อร่วมกับปรสิตในลำไส้ชนิดอื่นๆ อีกร้อยละ 3.8 (Wongstitwilairoong et al., 2007)

เนื่องจาก *G. lamblia* เป็นปรสิตที่มีโฮสต์หลายชนิด มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง บางชนิดมีความสามารถในการติดต่อระหว่างคนและสัตว์ได้ (zoonotic) ภายหลังจากที่มีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวโมเลกุล จึงได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคต่างๆ เช่น PCR, PCR-RFLP และ DNA sequencing เป็นต้น มาทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ *G. lamblia* กันอย่างแพร่หลาย โดยพบว่า *G. lamblia* มีลักษณะที่เป็น species complex สามารถจำแนกได้เป็น 7 กลุ่มหรือ Assemblage ได้แก่ Assemblage A, B, C, D, E, F และ G ซึ่งพบว่า Assemblage A และ B เท่านั้นที่สามารถก่อโรคในคนได้ รวมถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น สุนัข แมว และวัวควาย เป็นต้น

ปัจจุบันได้มีรายงานพบการติดเชื้อร่วมกันระหว่างคนและสัตว์เลี้ยง โดยเฉพาะในสุนัขซึ่งมีความใกล้ชิดกับคน ในปี ค.ศ. 2004 Traub และคณะ ได้ทำการศึกษายายพันธุ์ *G. lamblia* จากตัวอย่างที่พบในคนและสุนัข ในแถบชนบทแห่งหนึ่งของรัฐอัสสัม ประเทศอินเดีย พบการติดเชื้อ Assemblage A และ B ในคนและสุนัขที่อาศัยอยู่บริเวณใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับกับรายงานที่พบในประเทศไทย โดยจากการศึกษาตัวอย่างที่ได้จากสุนัขที่อาศัยอยู่ในบริเวณวัด 20 แห่งทั่วกรุงเทพฯ และตัวอย่างจากคนที่อาศัยอยู่บริเวณใกล้เคียง พบว่าสุนัขสามารถที่จะแพร่กระจายเชื้อ *G. lamblia* มาสู่คนได้ (Inpankaew et al., 2007) อย่างไรก็ตามพบว่าการศึกษาทางระดับพันธุกรรมของ *G. lamblia* ในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด เนื่องจากการศึกษาส่วนใหญ่ให้ความสำคัญในเรื่องของอัตราความชุกในการเกิดโรค ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของ *G. lamblia* ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการป้องกันและควบคุมโรค รวมถึงเพื่อให้เกิดเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่จะนำไปสู่การศึกษาที่มีประโยชน์ต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุกรมวิธานของโปรโตซัว *Giardia lamblia*

Giardia lamblia เป็นโปรโตซัวชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) ซึ่งมีองค์ประกอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) นับว่าเป็นปรสิตจำพวกโปรโตซัวของคนชนิดแรกที่มีการค้นพบ สามารถจัดหมวดหมู่ในอนุกรมวิธานจากคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีววิทยา ตลอดจนปรสิตวิทยา ได้ดังนี้

Kingdom Protista

Subkingdom Protozoa

Phylum Sarcomastigophora

Subphylum Mastigophora

Class Zoomastigophora

Order Diplomonadida

Family Hexamitidae

Genus *Giardia*

เชื้อโปรโตซัวใน genus *Giardia* ในอดีตเชื่อว่าประกอบด้วย species ประมาณ 40 ชนิด โดยแบ่งตามชนิดของโฮสต์ที่พบ ซึ่งมีทั้งชนิดที่พบในคน สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Thompson, 1990) ต่อมาจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ทางลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกได้เป็น 6 species ได้แก่ *G. muris*, *G. agilis*, *G. ardea*, *G. psittaci*, *G. microti* และ *G. lamblia* โดยพบว่า มีเพียง *G. lamblia* species เดียวเท่านั้นที่สามารถก่อโรคได้ในคน รวมถึงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกหลายชนิด เช่น สุนัข แมว สัตว์ในปศุสัตว์ และสัตว์ป่าบางชนิด เป็นต้น (Filice, 1952 ; Erlandsen และ Bemrick, 1987 ; Erlandsen et al., 1990 ; Feely, 1988 ; van Keulen et al., 1988)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การกระจายทางภูมิศาสตร์และที่มาของการแพร่กระจายของเชื้อ *Giardia lamblia*

G. lamblia เป็นแฟลกเจลเลตโปรโตซัวในลำไส้ของคนที่ได้รับการวินิจฉัยบ่อยที่สุด สามารถพบการแพร่กระจายได้ทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตที่มีอากาศอบอุ่น หรือพื้นที่บริเวณเส้นรุ้งที่ห่างออกจากเส้นศูนย์สูตรของโลก 23 องศา 27 ลิปดา ครอบคลุมไปถึงบริเวณขั้วโลกเหนือ มักพบการติดเชื้อในเด็กเล็กมากกว่าผู้ใหญ่ พบการติดเชื้อในเด็กเล็กทั่วโลกร้อยละ 1-36 หรืออาจสูงถึงร้อยละ 72 (Environmental Protection Agency, 1998) โดยอัตราการติดเชื้อขึ้นอยู่กับกลุ่มอายุ หรือพื้นที่การระบาดของโรค พบการติดเชื้อได้บ่อยในสถานรับเลี้ยงเด็กอ่อน หรือในสถานเลี้ยงเด็กกำพร้า รวมถึงในชุมชนแออัดที่มีการจัดการด้านสุขภิบาลไม่ดีนัก มีรายงานพบความชุกร้อยละ 2-5 จากการตรวจโรคปรสิตในอุจจาระในกลุ่มประเทศอุตสาหกรรม และร้อยละ 20-30 ในประเทศที่กำลังพัฒนา (Marshall et al., 1997)

การแพร่กระจายของเชื้อ *G. lamblia* เกิดจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของ cyst ระยะเวลาติดต่อ โดยสาเหตุเกิดจากหลายปัจจัย ซึ่งพบว่าเชื้อสามารถแพร่กระจายจากคนหนึ่งสู่อีกคนหนึ่งได้โดยตรง อัตราการติดเชื้อจะแตกต่างกันออกไปในแต่ละพื้นที่ (ดังแสดงในตารางที่ 1) เช่น สถานรับเลี้ยงเด็กกำพร้าในสหรัฐอเมริกา มีรายงานการติดเชื้อในเด็กเล็กอายุต่ำกว่า 5 ปี โดยมีอัตราความชุกร้อยละ 7- 54 จากข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าอาจมีเด็กเล็กในสถานเลี้ยงเด็กกำพร้าทั่วทั้งอเมริกาติดเชื้อ *G. lamblia* 155,000 ถึง 1,198,000 ราย ซึ่งเด็กที่ติดเชื้อส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการ (asymptomatic) อย่างไรก็ตามพบว่าเด็กเล็กที่แสดงอาการ (symptomatic) และไม่แสดงอาการสามารถที่จะแพร่กระจายเชื้อไปยังสมาชิกที่อยู่ในครอบครัว รวมถึงพี่เลี้ยงที่ดูแลเด็กได้ โดยพบอัตราการติดเชื้อในกลุ่มนี้สูงถึงร้อยละ 5-35 (Environmental Protection Agency, 1998) ปี ค.ศ. 1998 จากการตรวจวินิจฉัยของเหลวที่ได้จากลำไส้ผู้ป่วยที่เป็นเด็กเล็ก 112 ราย ในประเทศโปแลนด์ ซึ่งทุกรายมีอาการปวดช่องท้องเรื้อรังพบการติดเชื้อ 77 ราย หรือร้อยละ 68 (Skorochodski et al., 1988) จากการสำรวจความชุกในประเทศอังกฤษ พบอัตราการติดเชื้อในเด็กเล็กร้อยละ 23.7 และไม่แสดงอาการทางคลินิก โดยมีสาเหตุมาจากการได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำต่างๆ (Gray และ Rouse, 1992) พบอัตราการติดเชื้อสูงในกลุ่มเด็กเล็กอายุ 1-5 ปี ร้อยละ 2-46 ในประเทศออสเตรเลีย (Thompson, 1994) จากการศึกษาระบาดวิทยาโดยวิธีเซรุ่มวิทยา (seroprevalence study) ในกลุ่มเด็กเล็กอายุ 0-6 เดือน ของประเทศเปรู (Miotti et al., 1986) พบความชุกร้อยละ 40 และมีการติดเชื้อซ้ำ (reinfection) ขึ้นในผู้ป่วย แต่ในบางรายพบว่ามีอาการท้องเสียเรื้อรัง (chronic diarrhea) ในประเทศเยอรมัน ปี ค.ศ. 2006 พบผู้ติดเชื้อร้อยละ 62 โดยส่วนใหญ่เป็นเด็กเล็กอายุ 1-5 ปี (Sagebie et al., 2009) สำหรับรายงานความชุกของปรสิต *G. lamblia* ในประเทศไทยจากการสำรวจสถานเลี้ยงเด็กกำพร้าใน

จังหวัดนนทบุรี พบการติดเชื้อร้อยละ 6.4 (Jongwutiwes et al., 1990) ในปี ค.ศ. 2002 จากการสำรวจความชุกของการติดเชื้อปรสิตในลำไส้ของเด็กนักเรียนในจังหวัดน่าน จากตัวอย่างทั้งหมด 1,010 ราย พบการติดเชื้อ *G. lamblia* ร้อยละ 5.3 นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อร่วมกับปรสิตชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Ascaris lumbricoides*, hookworm และ *Trichuris trichiura* โดยพบการติดเชื้อร้อยละ 21.7, 18.5 และ 16.3 ตามลำดับ (Waikagul et al., 2002) นอกจากนี้ในกลุ่มชายรักร่วมเพศ พบว่ามีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อด้วยเช่นกัน เนื่องจากได้รับ cyst ที่ปนเปื้อนออกมากับอุจจาระ

การแพร่กระจายของเชื้อทางน้ำ ทั้งในน้ำที่ใช้ในการอุปโภคบริโภค น้ำเสีย ตลอดจนในสระว่ายน้ำ พบว่าเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อและก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขในประเทศอุตสาหกรรมหลายๆ ประเทศ เช่น ประเทศอังกฤษ สวีเดน แคนาดาและอเมริกา เป็นต้น (Ljungstrom และ Castor, 1992 ; Moore et al., 1993) โดยพบว่าของเสียที่ได้จากมนุษย์ เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน cyst ของ *G. lamblia* ในแหล่งน้ำต่างๆ ซึ่งจากการสำรวจแหล่งน้ำเสียในประเทศแคนาดาและอิตาลี พบความชุกของ *G. lamblia* สูงถึงร้อยละ 73-100 (Cacciò et al., 2008 ; Heitman et al., 2002 ; Wallis et al., 1996) ในปี ค.ศ. 2004-2005 พบการแพร่กระจายของเชื้อทางน้ำที่เมือง Bergen ประเทศนอร์เวย์ โดยพบว่ามีผู้ติดเชื้อถึง 1,500 ราย และทุกรายมีอาการท้องเสีย (Robertson et al., 2006) นอกจากนี้แล้วในกลุ่มนักท่องเที่ยวธรรมชาติที่นิยมดื่มน้ำจากแม่น้ำหรือลำธาร พบว่ามีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อด้วยเช่นกัน เนื่องจากอาจเกิดการปนเปื้อนของ cyst ในแหล่งน้ำจากสัตว์ป่าบางชนิดที่เป็นโฮสต์ เช่น muskrat บีเวอร์ และกวาง เป็นต้น ซึ่งจากการสำรวจในกลุ่มนักท่องเที่ยวใน รัฐเซนต์ปีเตอर्सเบิร์ก ประเทศรัสเซีย พบผู้ป่วยมีการติดเชื้อแบบแสดงอาการถึงร้อยละ 95 (Adam, 1991)

การแพร่ระบาดของเชื้อโดยการปนเปื้อนของ cyst ในอาหาร เช่น น้ำแข็ง ผักผลไม้ หรือสลัด ในอเมริกาพบว่าในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อถึง 225,000 ราย นอกจากนี้แล้ว การแพร่กระจายของเชื้อ *G. lamblia* ยังสามารถเกิดการติดต่อระหว่างสัตว์มาสู่คน (animal to human) ได้อีกด้วย เนื่องจากปรสิต *G. lamblia* มีความหลากหลายภายใน species โดยบางสายพันธุ์สามารถที่จะก่อโรคได้ในโฮสต์หลายชนิด เช่น ในคน สุนัขและแมว เป็นต้น ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงที่มีความใกล้ชิดกับคน จึงมีโอกาสที่คนจะได้รับเชื้อจากสัตว์เลี้ยงเหล่านี้ โดยมีรายงานพบการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเด็กเล็กและสุนัขที่เลี้ยงไว้

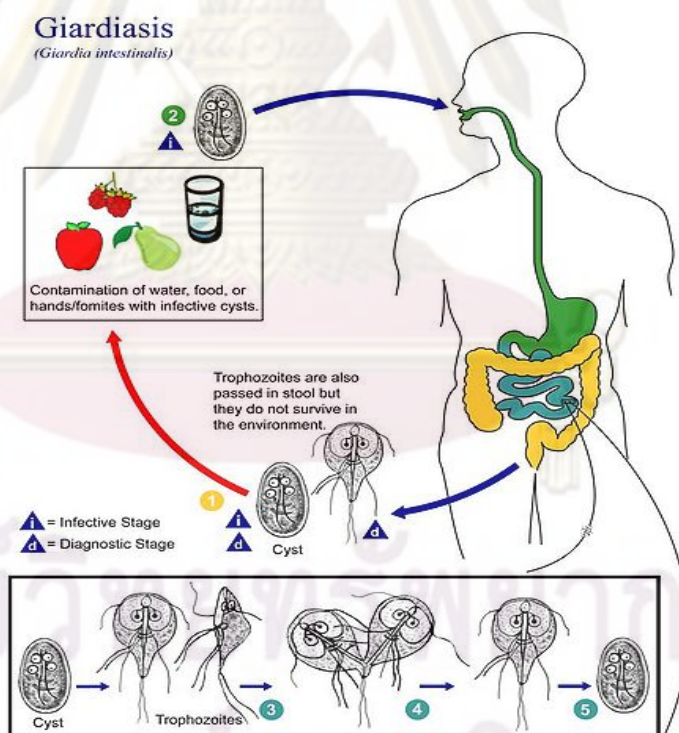
ตารางที่ 1 แสดงอัตราการติดเชื้อ *G. lamblia* ในกลุ่มประเทศต่างๆ

ประเทศ	กลุ่มประชากร	จำนวนประชากร	อายุ (ปี)	ความชุก (%)	อ้างอิงจาก
ประเทศที่พัฒนาแล้ว					
USA	Infants	676	0-3	11	Bartlett et al., 1991
USA	children	518	1-3	7.1	Haeter et al., 1982
Spain	children	1,917	6-10	5	Perez Armengol et al., 1997
Spain	children	144	0-2	4	Garcia et al., 1989
Canada	children	75	0-5	23	Varga และ Delage, 1990
England	preschool	-	-	24	Gray และ Rouse, 1992
Australia	children	178	1-6	10.8	Grimmond et al., 1988
ประเทศที่กำลังพัฒนา					
India	children	127	<14	11	Kaur et al., 2002
Pakistan	children	269	4-5	53.5	Mumtaz et al., 2009
Guatemala	children	10,586	5-15	10.9	Cook et al., 2009
Vietnam	households	526	-	3.2	Verle et al., 2003
Malaysia	children	281	2-15	24.9	Al-Mekhlafi et al., 2005
Thailand	children	656	5-7	6.5	Wongjindanon et al., 2005
Peru	Infants	26	<6 month	40	Miotti et al., 1986
Brazil	children	318	3-14	4	Pedraza Duenas et al., 1994
ประเทศที่ด้อยพัฒนา					
Cambodia	children	1,616	1,616	4.2	Chhakda et al., 2006
Nepal	pre-school	1,790	1,790	73.4	Easow et al., 2005
Zimbabwe	children	-	-	22	Rabbani et al., 1994
South Africa	children	-	-	24	Esrey et al., 1989
Bungladesh	children	-	-	21	Rabbani et al., 1994

วงจรชีวิตของ *Giardia lamblia*

G. lamblia มีวงจรชีวิตที่อาศัยโฮสต์เพียงโฮสต์เดียว ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโปรโตซัวชนิดนี้มี 2 ระยะ คือ ระยะ cyst และระยะ trophozoite วงจรชีวิตเริ่มต้นจากการที่โฮสต์รับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของ cyst ระยะติดต่อเข้าไปลงสู่กระเพาะอาหาร เมื่อผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม trophozoite จะออกจาก cyst โดยเฝือกที่ขั้วใดขั้วหนึ่งของ cyst และเริ่มแบ่งตัวขณะที่กำลังออกจาก cyst (excystation) (Meyer และ Radulescu, 1978 ; Al-Tukhi, Al-Ahdal และ Peters, 1991)

trophozoite จะเริ่มแบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 ตามแนวยาว (longitudinal binary fission) แล้วเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และอาศัยอยู่บริเวณเยื่อผิวของลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม กระบวนการเข้า cyst (encystation) จะเกิดขึ้นเมื่อ trophozoite เคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนล่าง หลังจากนั้น cyst จะปนเปื้อนออกมาทั้งบอุจจาระและแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมต่อไป



ภาพที่ 1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ *G. lamblia* (1www3.niaid.nih.gov/.../2007/giardia.htm)

สัณฐานวิทยาของ *Giardia lamblia*

1. สัณฐานวิทยาของโทรโฟซอยต์

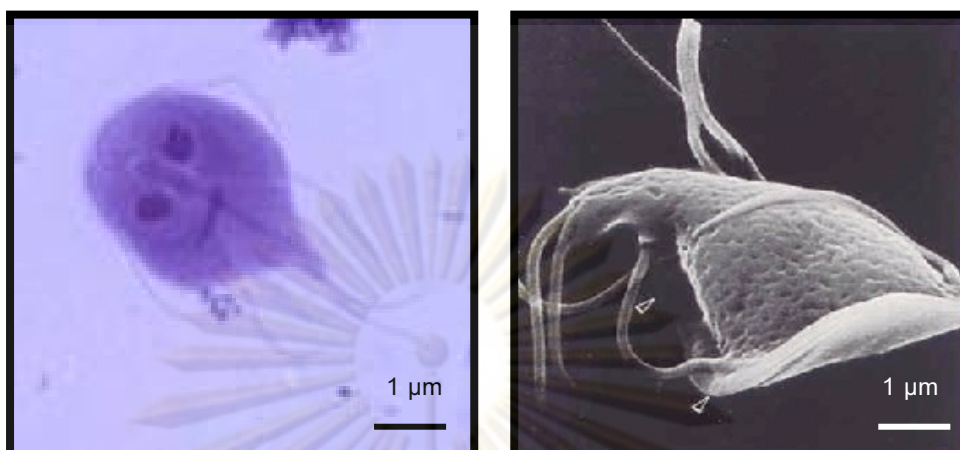
ระยะ trophozoite ของ *G. lamblia* เมื่อมองจากด้านท้องมีรูปร่างคล้ายลูกแพร์ (pear-shaped) หรือรูปหยดน้ำตา มีขนาดความยาว 12-15 ไมโครเมตร และความกว้างประมาณ 5-9 ไมโครเมตร โครงสร้างค้ำจุนร่างกาย (cytoskeleton) ประกอบด้วย median body แฟลเจลลลา (flagellar) จำนวน 4 คู่ และส่วนของ ventral disk

median body เป็นโครงสร้างที่อยู่กึ่งกลางลำตัวและอยู่บริเวณส่วนหลังของ caudal flagella ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของปรสิต *Giardia* sp. และเป็นโครงสร้างสำคัญในการใช้จำแนก species ของปรสิตชนิดนี้ (Filice, 1952) median body ในระยะ trophozoite ของ *G. lamblia* มี 2 อัน ลักษณะรูปร่างคล้ายค้อนถอนตะปู หน้าที่ของ median body ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าที่บริเวณนี้มี giardin (Crossley et al., 1986) และ tubulin (Feely, Schollmeyer และ Erlandsen, 1982) จึงมีความเป็นไปได้ว่า median body มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ ventral disk นอกจากนี้ภายใน median body ยังประกอบไปด้วยกลุ่มของไมโครทิวบูล (microtubules) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยเสริมแรงในการสับัดของ caudal flagella

trophozoite มีแฟลเจลลลาในการเคลื่อนที่จำนวน 4 คู่ (8 เส้น) โดยมี 2 คู่ ที่ตำแหน่งของ basal body ใกล้เคียงกับตำแหน่งกึ่งกลาง (midline) และที่ตำแหน่ง anteroventral ไปยังนิวเคลียส โดยจะโผล่ออกมาที่บริเวณส่วนหน้า ส่วนท้าย ส่วนหางและบริเวณด้านท้องของ trophozoite แฟลเจลลลามีหน้าที่สำคัญในการเคลื่อนไหว แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะกับผนังลำไส้เล็กของโฮสต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



A

B

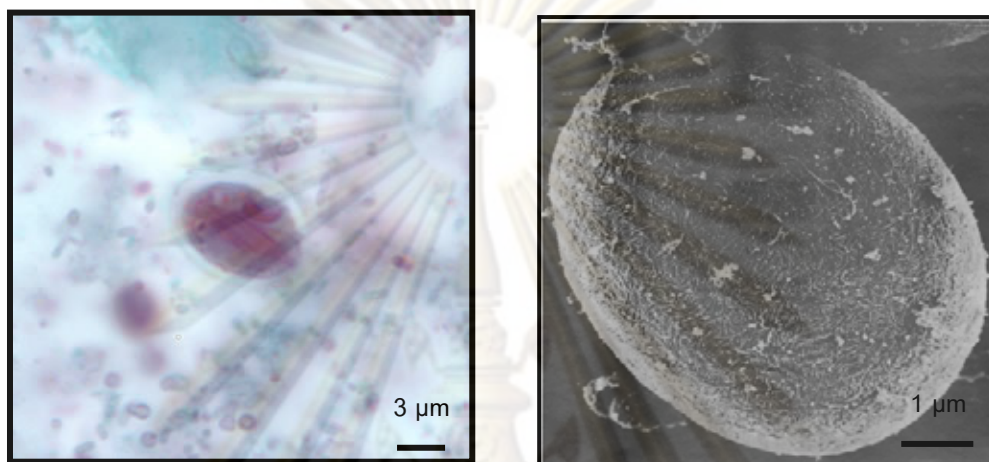
ภาพที่ 2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *G. lamblia* ในระยะ trophozoite ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (A) และภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องกราด (scanning electron microscopy) (B) ที่มา : (2www.bushwalking.org.au/FAQ/FAQ_Water.htm และ www.farmacia-gallardo.com.ar/images/enfermedades/G_lambliia2.jpg)

2. สัณฐานวิทยาของซิสต์

ระยะ cyst เป็นการเปลี่ยนรูปร่างมาจากระยะ trophozoite โดยมีการดึงแฟลเจลลากลบเข้าไปในไซโตพลาสซึม แล้วหลังสารออกมาห่อหุ้มตัวเองจนกลายเป็น cyst โดย cyst ของ *G. lamblia* รูปร่างกลมรี มีขนาดประมาณ 5 -10 ไมโครเมตร cyst อ่อนมี 2 นิวเคลียส และเมื่อเจริญเป็น cyst ระยะติดต่อกจะมี 4 นิวเคลียส สามารถสังเกตเห็นแอกโซนิม (axoneme) เป็นเส้นพาดกลาง cyst ตามแนวยาว median body ที่พบในระยะ trophozoite จะสลายและกระจัดกระจายกลายเป็นไมโครทิวบูลอยู่ในไซโตพลาสซึม ระยะ cyst จะพบ median body 2 อัน

cyst wall มีความหนาประมาณ 0.3-0.5 ไมโครเมตร ประกอบด้วย cyst wall ส่วนใน (inner membrane layer) และ cyst wall ส่วนนอก (outer filamentous layer) โดย cyst wall ส่วนนอกมีองค์ประกอบของเส้นใย (filament) 7-20 ไมโครเมตร (Erlandsen, Bemrick และ Pawley, 1989) สามารถพบโปรตีนในบริเวณนี้ 4 ชนิด มีขนาด 29, 75, 88 และ 102 kDa (Erlandsen et al., 1990) รวมถึงองค์ประกอบจำพวกน้ำตาล galactosamine ในรูปของ N-acetylgalactosamine (GalNAC) (Jarroll et al., 1989) พบว่าอัตราการเกิดเมตาบอลิซึมใน cyst มีเพียงร้อยละ 10 -20 ของที่พบในระยะ trophozoite (Paget et al., 1989) นอกจากนี้ยัง

พบว่ากระบวนการหายใจ (respiration) ของ cyst และ trophozoite สามารถถูกกระตุ้นได้โดย ethanol ในขณะที่กลูโคส (glucose) สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการนี้ได้ในระยะ trophozoite เท่านั้น



A

B

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Giardia* sp. ในระยะ cyst ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (A) และภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องกราด (scanning electron microscopy) (B) ที่มา : (Adam, 1991 และ http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/hTML/Frames/GL/Giardiasis/body_Giardiasis_mic1.htm)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงสร้างค้ำจุน (Cytoskeleton) และการเคลื่อนที่ของ *Giardia lamblia*

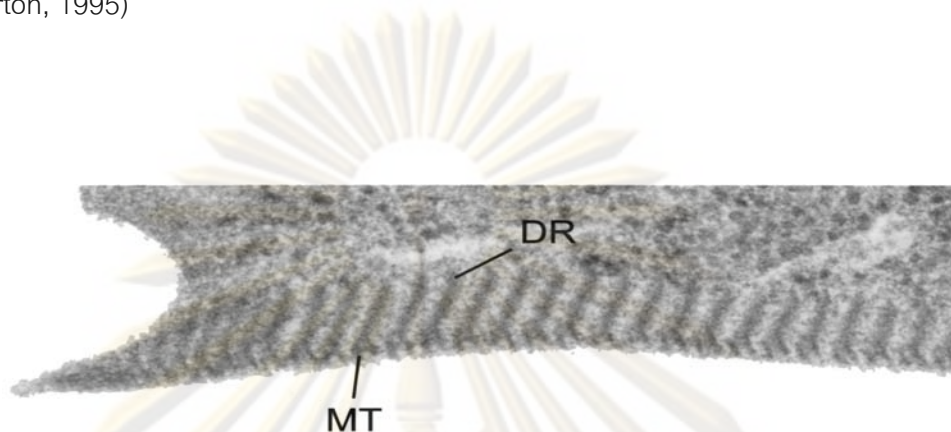
เนื่องจาก *G. lamblia* เป็นปรสิตที่ไม่มีการแพร่กระจายหรือลุกลามเข้าสู่เซลล์ รวมถึงยังไม่มีการศึกษาในเรื่องของการมีตัวรับ (receptor) เพื่อใช้ในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ของโฮสต์ อย่างไรก็ตามเชื่อว่า ventral disk เป็นส่วนที่สำคัญในการทำหน้าที่เป็นโครงสร้างค้ำจุนภายในเซลล์ ในระยะ trophozoite โปรโตซัว *G. lamblia* จะอาศัยและเพิ่มจำนวนอยู่บริเวณผนังลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม โดยจะใช้ส่วนของ ventral disk เกาะกับผนังลำไส้เล็กของโฮสต์และดูดสารอาหารที่จำเป็นจำพวกน้ำตาลกลูโคส

ventral disk เป็นโครงสร้างเฉพาะที่พบในปรสิต *G. lamblia* ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างค้ำจุนภายในไซโตพลาสซึม โดยพบว่าที่บริเวณผิวน้ำของ ventral disk จะมีลักษณะเป็นส่วนเว้า และมีความลึกประมาณ 0.4 ไมโครเมตร ที่ปลายของส่วนเว้าจะมี lateral crest และ ventral lateral flange อยู่บริเวณรอบๆ ventral disk (Erlandsen และ Chase, 1974)

ภายใน ventral disk ประกอบด้วยโปรตีนแอกติน (actin), แอลฟาแอกตินิน (α -actinin), ไมโอซิน (myosin) และ โทรโปไมโอซิน (tropomyosin) (Feely, Schollmeyer และ Erlandsen, 1982) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวเคมีในการหดตัวของ ventral disk ขณะที่ยึดเกาะกับผนังลำไส้โฮสต์ โดยความสามารถในการยึดเกาะของ *G. lamblia* ขึ้นอยู่กับกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งพบว่าสามารถถูกยับยั้งได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 37 องศา เมื่อมีระดับออกซิเจนสูงขึ้นหรือเมื่อความเข้มข้นของ cysteine ลดลง (Gillin และ Diamond, 1981 ; Gillin และ Reiner, 1982)

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงพบว่า ventral disk ประกอบไปด้วยกลุ่มของไมโครทิวบูล โดยประกอบไปด้วย 13 protofilaments ไมโครทิวบูลเหล่านี้เป็นส่วนฐานของไมโครริบบอน (microribbons) หรือ dorsal ribbons ซึ่งจะมีลักษณะตั้งฉากกับเมมเบรน โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไมโครริบบอน ได้แก่ โปรตีนในกลุ่มของ giardins ประกอบไปด้วย α 1-giardin, α 2-giardin, β -giardin และ γ -giardin โดยโปรตีนเหล่านี้จะเรียงตัวเป็นแนวยาวที่บริเวณขอบของไมโครริบบอน แต่จะไม่พบในไมโครทิวบูล (Peattie et al., 1989) จากการศึกษพบว่า α 1-giardin และ α 2-giardin มีลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเหมือนกันถึงร้อยละ 80 ส่วนโปรตีน β -giardin และ γ -giardin จะมีลักษณะที่เฉพาะแตกต่างกันออกไป (Alonso และ Peattie, 1992)

สำหรับโปรตีนที่คุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนคล้ายกับ β -giardin แต่มีขนาดใหญ่กว่า ได้ถูกจำแนกให้เป็นกลุ่มของ cytoskeleton protein (head stalk protein) โดยมีขนาด 183 kDa ซึ่งมีรูปร่างเป็น long coiled-coil stalk และ N-terminal hydrolytic domain (Marshall และ Holberton, 1995)



ภาพที่ 4 แสดงองค์ประกอบของ ventral disk ได้แก่ microtubules (MT) และ microribbons หรือ dorsal ribbons (DR).
ที่มา : (Adam, 2001)

tubulin จะไม่พบในไมโครริบบอนแต่จะพบในส่วนของไมโครทิวบูล โดยไมโครทิวบูลที่บริเวณ ventral disk และแฟลเจลลา ประกอบไปด้วย β -tubulin และ α -tubulin ในขั้นตอน posttranslation เพื่อทำการสังเคราะห์โปรตีน tubulins จะประกอบไปด้วยกระบวนการ acetylation และ กระบวนการ polyglycylation (Soltys และ Gupta, 1994 ; Weber, 1996) ทั้งนี้ benzimidazole เป็นสารประกอบที่สามารถยับยั้งกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ของ *G. lamblia* ได้ทั้งในหลอดทดลอง (in vitro) และในสัตว์ทดลอง (in vivo) (Chavez, Cedillo-Rivera และ Martinez-Palomo, 1992 ; Morgan, Reynoldson และ Thompson, 1993)

ในระยะ trophozoite เมื่อได้รับ albendazole ซึ่งเป็น benzimidazoles ชนิดหนึ่ง จะสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ของโฮสต์ (Edlind, Hang และ Chakraborty, 1990) แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของแฟลเจลลา จึงชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่าง tubulin ที่พบใน ventral disk กับแฟลเจลลา (Feely, Schollmeyer และ Erlandsen, 1982) โดยพบว่าความสามารถในการยึดเกาะเกิดขึ้นได้แม้จะปราศจากการทำงานของแฟลเจลลา ดังนั้น ventral disk จึงมีความสำคัญในการยึดเกาะกับพื้นผิว แต่แฟลเจลลาไม่ได้มีหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการดังกล่าว

เมื่อ trophozoite สัมผัสกับ albendazole เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ventral disk เริ่มที่จะแตกออกเป็นชั้นๆ มีการย้ายตำแหน่งของไมโครริบบอนและไมโครทิวบูล นอกจากนี้ยังพบความหนาแน่นของอเล็กตรอนเป็นจำนวนมากที่บริเวณไมโครทิวบูลและไมโครริบบอน แต่ในโครงสร้างอื่นๆ ที่มี tubulin จะพบว่ามีความหนาแน่นน้อยกว่า เช่น median body และแฟลเจลลา จะเห็นได้ว่า albendazole มีผลต่อไมโครริบบอนอย่างชัดเจน

vinculin เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ซึ่งรวมตัวกับ α -actinin ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่าง actin filaments กับ membrane site จะพบโปรตีนชนิดนี้ที่ตำแหน่งของ ventral disk ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการยึดเกาะกับพื้นผิวของโฮสต์ (Narcisi, Paulin และ Fechheimer, 1994)

กอลจิแอปพาราตัส (Golgi Apparatus)

จากการศึกษาทางด้าน Immunoelectron-microscopic พบว่าแอนติเจนที่จำเพาะต่อกระบวนการเข้าเกราะ (encystation-specific antigens) จะพบบริเวณ golgi apparatus เท่านั้น โดยแอนติเจนเหล่านี้จะถูกลำเลียงโดย encystation-specific vesicle (ESVs) เพื่อไปสร้างเป็นผนัง cyst

แวกคิวโอล (Vacuole)

แวกคิวโอลมีรูปร่างกลมรี ขนาด 0.1-0.4 ไมโครเมตร อยู่ติดกับพลาสมาเมมเบรน ในระยะ trophozoite จะพบแวกคิวโอลได้ที่บริเวณระหว่าง dorsal และ ventral surface แต่ไม่ใช่ที่ตำแหน่งของ ventral disk ภายในแวกคิวโอลประกอบไปด้วยกลุ่มของเอนไซม์ hydrolase ได้แก่ DNase, RNase, acid phosphatase และ Cysteine protease (thiol dependent) (Gillin และ Diamond, 1981 ; Marshall และ Holberton, 1993)

นิวเคลียส (Nucleus)

ระยะ trophozoite ของ *G. lamblia* มี 2 นิวเคลียสที่มีลักษณะสมมาตรกัน อยู่ระหว่างเส้นพาดกลางลำตัว โดยบริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียสจะปกคลุมไปด้วยไรโบโซม (ribosome) แต่จะไม่พบนิวคลีโอล (nucleoli) จากการศึกษาระบบการ nuclear replication พบว่าทำการย้อมดีเอ็นเอด้วย [3 H] thymidine และ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Le Blancq และ Adam, 1998) ทั้ง 2 นิวเคลียสของ *G. lamblia* จะเกิดกระบวนการ replication ในเวลาใกล้เคียงกันมาก หรืออาจเป็นเวลาเดียวกัน

กระบวนการเข้าสู่ซิสต์ของ *Giardia lamblia* (Encystation)

การเปลี่ยนรูปจากระยะ trophozoite มาเป็นระยะ cyst ของ *G. lamblia* เป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้ปรสิตชนิดนี้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อม โดยกระบวนการ encystation จะเกิดขึ้นหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการแบ่งนิวเคลียส (nuclear division) แต่จะเกิดขึ้นก่อนกระบวนการแบ่งตัวของไซโตพลาสซึม (cytokinesis) encystation ของ *G. lamblia* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรก (early phase of encystation) ภายหลังจากการกระตุ้นยีนที่จำเพาะให้มีการสร้าง cyst wall จะมีการสร้าง granule ที่เรียกว่า ESVs ขึ้นมา เพื่อทำหน้าที่ขนส่งสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่ใช้สร้าง cyst wall (cyst wall protein, CWP) ไปยังบริเวณผิวของผนังเซลล์เมมเบรน โดยในระยะนี้พบว่าโปรตีนที่มีความสำคัญในการสร้าง cyst wall มีอยู่ 2 ชนิด คือ CWP1 และ CWP2 ซึ่งมีขนาด 21-39 kDa กระบวนการดังกล่าวใช้ระยะเวลาประมาณ 10 ชั่วโมง

ระยะหลัง (late phase of encystation) ของกระบวนการ encystation จะเกิดการรวมตัวกันของผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรน สามารถพบกลุ่มของโปรตีนขนาดใหญ่มีขนาดหลากหลาย ตั้งแต่ 66, 78, 92 และ 103 kDa ที่บริเวณ cyst wall เมื่อ encystation เสร็จสมบูรณ์ ปรสิตจะไม่มี การเคลื่อนไหว รูปร่างเริ่มกลมขึ้น และไม่มีอวัยวะในการเกาะติดกับผนังลำไส้ของโฮสต์ ในระยะนี้ ESVs จะหายไปและเกิดกระบวนการแบ่งตัวของนิวเคลียส (karyokinesis) โดยที่ภายใน 1 cyst จะประกอบไปด้วย 2 trophozoite ซึ่งมี 4 นิวเคลียส แต่พบว่ากระบวนการแบ่งตัวของไซโตพลาสซึมยังไม่เสร็จสมบูรณ์ ในระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง (Erlandsen et al., 1996)

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกการขนส่งสารที่สำคัญในการสร้างผนัง cyst ไปยังผิวเซลล์เมมเบรนในระดับโมเลกุล ซึ่งยังคงเป็นปัญหาที่น่าสนใจที่ต้องค้นหาคำตอบต่อไป โดยหากทราบถึงกลไกดังกล่าว ก็จะสามารถสร้างสารที่ยับยั้งการเกิดกระบวนการนี้ได้ อันจะเป็นการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อได้อีกวิธีหนึ่ง

ศูนย์วิทยุทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบวนการกระตุ้นให้เกิดการเข้าซิสต์ (Encystation Stimuli)

ในร่างกายของโฮสต์ trophozoite จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่บริเวณเยื่อบุผิวของลำไส้เล็ก จากนั้นเมื่อเคลื่อนที่เข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนเจริญมจะมีการเปลี่ยนรูปเป็น cyst จากการศึกษเกี่ยวกับสารกระตุ้นในลำไส้ที่ทำให้เชื้อโปรโตซัวเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จากระยะ trophozoite มาเป็นระยะ cyst สารที่สำคัญชนิดหนึ่ง ได้แก่ น้ำดี ซึ่งต่อมาภายหลังพบว่าน้ำดีไม่ได้มีความจำเป็นต่อการเปลี่ยนแปลงจากระยะ trophozoite มาเป็นระยะ cyst ในหลอดทดลอง แต่พบว่าช่วยในการละลายสารไขมันพวกโคเลสเตอรอล และช่วยให้สารเหล่านี้เข้าสู่เซลล์ของ *G. lamblia* ได้ดีขึ้น

เป็นที่ทราบดีว่า *G. lamblia* ไม่สามารถสังเคราะห์ไขมันพวกโคเลสเตอรอลได้ จำเป็นต้องได้รับจากโฮสต์ ซึ่งในลำไส้ของโฮสต์จะมีการดูดซึมสารอาหารพวกไขมันได้ดีที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นและลำไส้เล็กส่วนกลาง ที่บริเวณนี้ trophozoite จะเจริญเติบโตและเกาะกับผนังเยื่อบุลำไส้ ดังนั้นเมื่อ trophozoite เคลื่อนที่มาถึงลำไส้เล็กส่วนปลายหรือลำไส้ใหญ่ ที่มีไขมันพวกโคเลสเตอรอลต่ำ ก็จะทำให้เกิดการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นระยะ cyst

เมื่อทราบแล้วว่าโคเลสเตอรอลมีส่วนสัมพันธ์กับกระบวนการสร้าง cyst ของ *G. lamblia* ดังนั้นจึงได้มีการทดลองเพื่อศึกษาว่า การขาดโคเลสเตอรอลส่งผลอย่างไรต่อการเปลี่ยนแปลงยีนของโปรโตซัวในระดับโมเลกุล ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ cyst โดยมีหลักฐานพบว่า อาจเป็นไปได้ 2 วิธี คือ โคเลสเตอรอลอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณพลาสมาเมมเบรน ส่งผลให้เกิดสัญญาณ (signal transduction) ไปที่ยีนในนิวเคลียส เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้าง cyst wall หรือโคเลสเตอรอลอาจควบคุมการสังเคราะห์ยีนที่ควบคุมการสร้าง cyst wall โดยตรง (จามรี พิสุทธิพันธุ์, 2547: 539-547)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบวนการออกจากซีสต์ของ *Giardia lamblia* (Excystation)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม กระบวนการ excystation ของ *G. lamblia* เกิดขึ้นเมื่อ cyst เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม หลังจากที่ผ่านมาสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร ภายในสภาวะที่เหมาะสม กระบวนการ excystation จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเสร็จสมบูรณ์ภายใน 10 นาที โดยในตอนต้นของกระบวนการ cytoplasmic protrusions (preventral flages) 1 หรือ 2 คู่ จะปรากฏขึ้นและพัฒนาไปเป็น ventral flange (Hetsko et al., 1998) จากนั้น peritrophic space และ preventral flange จะขยายตัวขึ้นเพื่อที่จะให้ trophozoite ดันตัวออกมาจาก cyst และเริ่มปรากฏแฟลเจลลลา จนกระทั่งเจริญเป็น trophozoite ที่สมบูรณ์

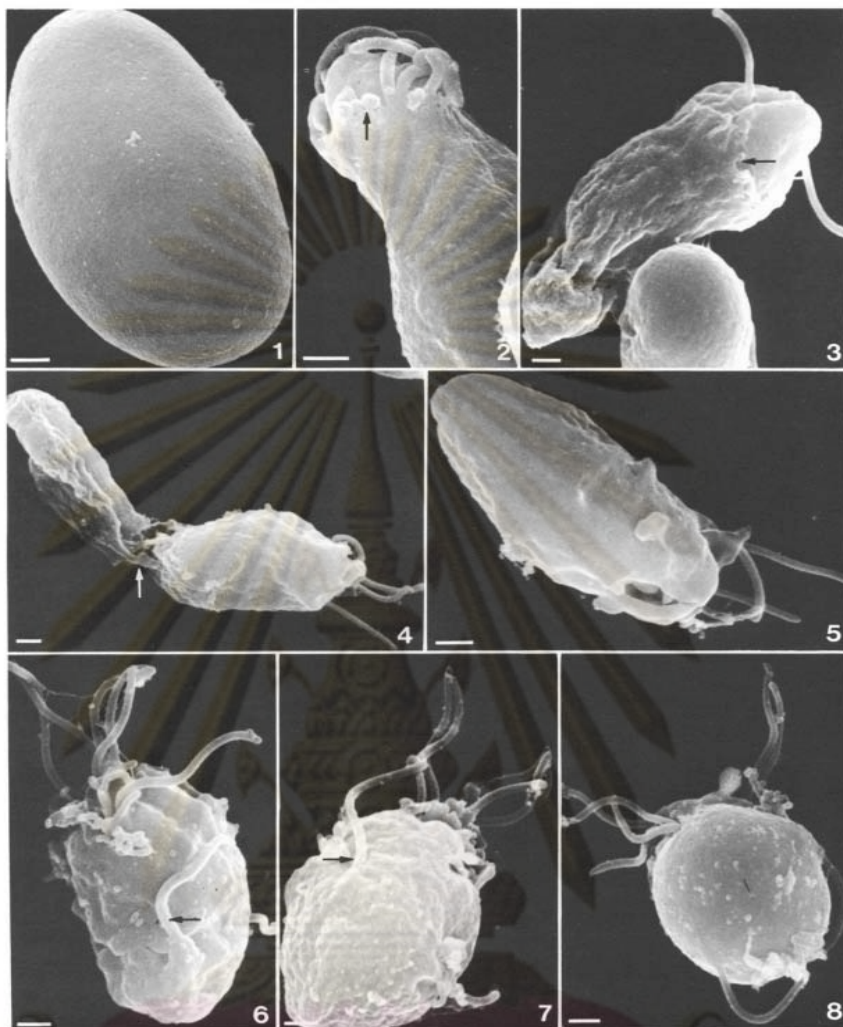
trophozoite จะเริ่มมีลักษณะค่อนข้างกลม และเกิดกระบวนการแบ่งไซโตพลาสซึมขึ้นภายใน 15-30 นาที ภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการ excystation แล้ว *G. lamblia* 1 cyst จะเจริญเป็น 2 trophozoite แต่ละ trophozoite มี 8 แฟลเจลลลา

กระบวนการกระตุ้นให้เกิดการออกจากซีสต์ (Excystation Stimuli)

กระบวนการชักนำให้เกิดกระบวนการ excystation ของ *G. lamblia* ในหลอดทดลองนั้น จากการทดลองนำ cyst ที่ได้จากคนและสัตว์มาบ่มในของเหลวที่มีสภาวะเป็นกรด (acidic pH) (Bingham และ Meyer, 1979) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิด excystation คือ สภาวะที่ pH 1.3-2.7 และสามารถถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นได้ด้วย pancreatic proteases เช่น cystein protease (CP2) ของ cathepsin B family และสามารถถูกยับยั้งได้โดย 4-4'-diisothiocyana-tostilbene-2-2'-disulfonic acid (DIDS) และ trypsin inhibitor, calmodolin antagonists (TEP และ W7) และ wheat germ agglutinin (WGA) (Meng, Hetsko และ Gillin, 1996)

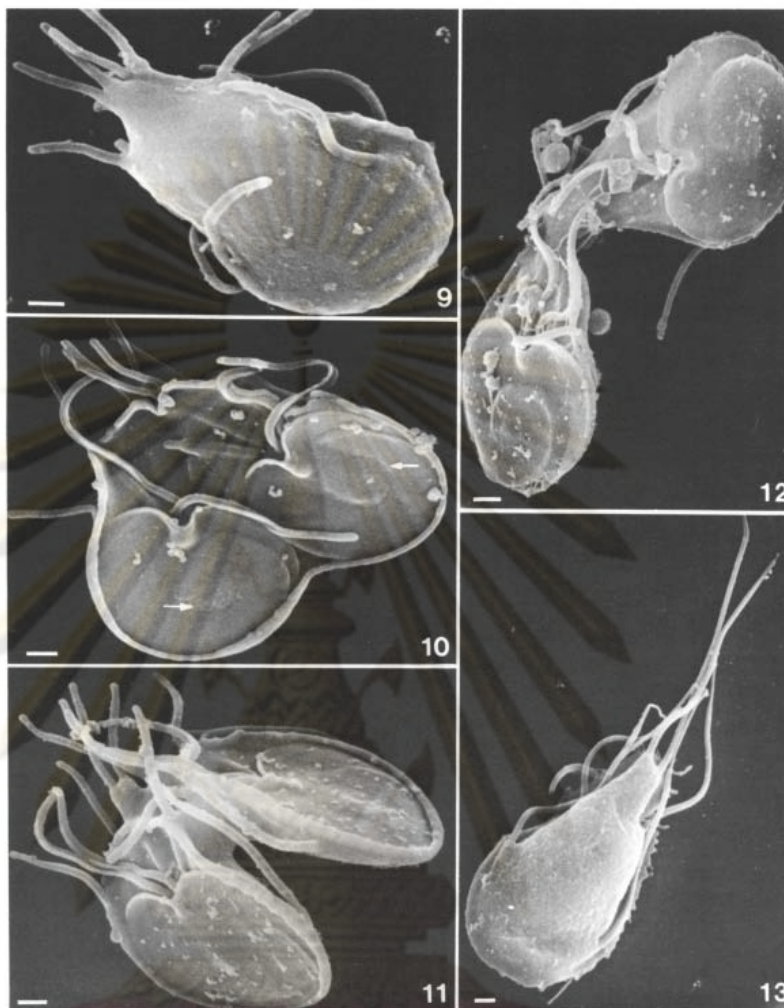
ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5 แสดงกระบวนการออกจากซีสต์ (excystation) ของ *G. lamblia* (scale bar= 1 μ m)

1) cyst ของ *G. lamblia* ในสภาวะปกติ 2) ขั้นตอนแรกของการกระบวนการ excystation เกิดการเปิดออกของผนัง cyst และมี flagella โผล่ออกมาเป็นครั้งแรก (ลูกศร) 3) เริ่มปรากฏผนังเซลล์ของ trophozoite มีลักษณะเรียบ มี flagella ยื่นออกมา สามารถมองเห็นบริเวณขอบแบ่งระหว่าง trophozoite และ cyst wall ได้ชัดเจน (ลูกศร) 4) มองเห็น trophozoite หลุดออกจากถุง cyst โดยยังเหลือ cyst wall เกาะกับ trophozoite เพียงเล็กน้อย (ลูกศร) 5) ตัวอ่อนของ trophozoite มีรูปร่างกลมรี (oval shape) มองเห็น flagella ได้ชัดเจน 6), 7) trophozoite เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยมีลักษณะกลมมากขึ้น สามารถมองเห็น lateral flagella ชัดเจน 8) trophozoite ตัวเต็มวัย มีรูปร่างกลมขึ้น มองเห็น flagella 8 เส้น



ภาพที่ 6 แสดงกระบวนการแบ่งตัวแบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 ตามแนวยาว (longitudinal binary fission) ของ *G. lamblia* (scale bar= 1 μ m) 9) trophozoite ยึดลำตัวให้ยาวออก มีรูปร่างแบนและเริ่มแบ่ง cytoplasm 10) daughter trophozoite เริ่มแบ่งตัวจากทางด้านหน้าตามตัวต้นแบบ มองเห็น ventral disk บริเวณผิวทางด้านท้องของ trophozoite (ลูกศร) 11), 12) กระบวนการแบ่งตัวในขั้นตอนสุดท้าย โดยแบ่งตัวจากทางส่วนหลัง แยกออกเป็น 2 ตัว แต่ละตัวมี 8 flagella 13) ลักษณะของ free trophozoite เกาะอยู่กับพื้นผิว จากรูปแสดงผิวบริเวณส่วนหลังของ trophozoite

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะทางพันธุกรรมของ *Giardia lamblia*

จากการศึกษาถึงองค์ประกอบทางพันธุกรรมของ *G. lamblia* โดยเทคนิค pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ในครั้งแรกพบว่าโปรโตซัว *G. lamblia* มี 5 โครโมโซม โดยมีขนาด 1.6, 1.6, 2.3, 3.0, และ 3.8 Mb. (Adam, Nash และ Wellems, 1988) จีโนมของ *G. lamblia* มีขนาดประมาณ 12 Mp มีองค์ประกอบของเบส GC ร้อยละ 46 (Smith et al., 1998) เป็นโพลีพลอยด์ (polyploid) ลักษณะโครงสร้างของโครโมโซมที่ปลายทั้งสองข้างประกอบด้วยทีโลเมียร์ (telomere) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส

ภายหลังจากที่มีการประยุกต์ใช้วิธีการทางอณูชีววิทยา การศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *G. lamblia* จึงมีความก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถจำแนกสายพันธุ์ที่มีรูปร่างเหมือนกันในกล้องจุลทรรศน์แต่แตกต่างกันในระดับโมเลกุลได้ การศึกษาในระดับโมเลกุลในระยะแรกเป็นการศึกษาด้านการวิเคราะห์เอนไซม์ (zymodeme analysis) จากสายพันธุ์ที่แยกได้และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยดูตำแหน่งการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ภายหลังจากการวัดขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นได้มีการเริ่มศึกษาโดยการใช้อิเล็กตรอนเอนไซม์ restriction endonuclease โดย Nash และ Keister (1985) ทำการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ *G. lamblia* โดยใช้ rabbit antisera ต่อ surface antigens ของ *G. lamblia* 10 สายพันธุ์ที่ต่างกัน พบว่าสามารถแยก *G. lamblia* ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ genotypes 1, 2 และ 3

ต่อมามีการศึกษาสายพันธุ์ *G. lamblia* จากตัวอย่างที่ได้จากคนและสัตว์ในแถบประเทศยุโรป โดยทำการวิเคราะห์ isoenzyme profiles จากเอนไซม์ malate dehydrogenase, malic enzyme, phosphoglucosmutase และ glucose phosphate isomerase พบความแตกต่าง 13 zymodemes สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ "Polish group" และ "Belgian group" (Homan et al., 1992) ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับการศึกษาตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยในประเทศออสเตรเลีย โดยอาศัยเทคนิคเดียวกัน พบว่าสามารถจำแนก *G. lamblia* ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม I, II, III และ IV โดยมีความแตกต่างกันร้อยละ 23-73 ใน 26 loci ที่ทำการศึกษา (Andrews et al., 1989) ซึ่งการศึกษานี้พบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Mayrhofer และคณะ (1995) ที่ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์ *G. lamblia* ที่พบในคนออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Assemblage A และ B โดยทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันของอัลลีล ร้อยละ 60 นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างที่ได้จากคนและแมว (Ad-23) มีความแตกต่างกันของอัลลีลร้อยละ 75 รวมถึงได้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ *G. lamblia* และ *G. muris* ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายกันพบว่าทั้งสองสปีชีส์นี้มีอัลลีลแตกต่างกันถึงร้อยละ 80

นับจากนั้นเป็นต้นมา ได้มีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ *G. lamblia* กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น เทคนิค PCR, PCR-RFLP และ DNA sequencing เป็นต้น โดยยีนเป้าหมายที่มีผู้สนใจศึกษา ส่วนใหญ่แล้วมุ่งเน้นไปที่การเปรียบเทียบลำดับเบสของกลุ่ม housekeeping gene ได้แก่ glutamate dehydrogenase (*gdh*) gene, triose phosphate isomerase (*tpi*) gene, elongation factor 1- α (*ef1-\alpha*) gene และ small subunit ribosomal RNA (*SSU-rRNA*) gene รวมถึงการศึกษาในยีนอื่นๆ เช่น beta-giardin gene, GLORF-C4 gene (Caccio และ Ryan, 2008) และ intergenic rRNA spacer region (IGS)

Monis และคณะ (1996) ได้ทำการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) ของ *G. lamblia* โดยทำการศึกษาในส่วนของ *gdh* gene ด้วยเทคนิค PCR-RFLP และการหาลำดับเบสของยีนดังกล่าว พบว่าสายพันธุ์ *G. lamblia* ที่พบในคนสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มคือ Assemblage A และ B และสามารถยืนยันได้ว่าทั้งสองสายพันธุ์นี้เป็นชนิดเดียวกันกับสายพันธุ์ "Polish" และ "Belgian" ของ Homan และกลุ่ม 1+2, 3 ของ Nash ตามลำดับ (Nash และ Keister, 1985 ; Nash และ Mowatt, 1999 ; Van Keulen et al., 1995 ; Baruch, Isaac-Renton และ Adam, 1996)

เนื่องจาก *G. lamblia* มีการแพร่กระจายไปทั่วโลกและมีโฮสต์หลายชนิด การศึกษาในแง่ของการติดต่อระหว่างคนและสัตว์ จึงมีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงที่มีความใกล้ชิดกับคน โดยการศึกษาของ Hopkins และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาสายพันธุ์ *G. lamblia* จากตัวอย่างที่ได้จากคนและสุนัขที่อาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกัน ในแถบชนบทของประเทศออสเตรเลีย ด้วยเทคนิค PCR โดยทำการศึกษา SSU rRNA gene พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ *G. lamblia* ได้เป็น 4 กลุ่ม โดยที่กลุ่ม 1 และ 2 พบการติดเชื้อในคน ส่วนกลุ่ม 3 และ 4 พบการติดเชื้อในสุนัขเท่านั้น ซึ่งเป็นการพบการติดเชื้อ *G. lamblia* ในสุนัขเป็นครั้งแรก นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อร่วมกันของกลุ่ม 2 และ 3 ในสุนัขอีกด้วย จึงเป็นการสนับสนุนว่าสามารถเกิดการติดเชื้อ *G. lamblia* ร่วมกันระหว่างคนและสัตว์ได้ ต่อมาพบว่ากลุ่ม 1 และ 2 เทียบเท่ากับ Assemblage A และ B ส่วนกลุ่ม 3 และ 4 เทียบเท่ากับ Assemblage C และ D (Monis et al. 1998)

หลังจากนั้นได้มีผู้ทำการศึกษาสายพันธุ์ *G. lamblia* จากตัวอย่างที่จากสุนัขในประเทศออสเตรเลีย พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของระยะ trophozoite มี median body รูปร่างคล้ายก้อนถั่ว ซึ่งเป็นลักษณะของ *G. lamblia* แต่ว่ารูปร่างและลักษณะของนิวเคลียสจะแตกต่างจากสายพันธุ์ที่ได้จากคนและสุนัขที่ได้ทำ axenic culture โดยจากการศึกษาด้วยวิธีการวิเคราะห์เอนไซม์ 26 loci และเทคนิค PCR ใน *gdh* gene พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ *G. lamblia* ที่ได้จากสุนัขออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Assemblage C และ D ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างจาก Assemblage A และ B รวมถึงต่างจาก *G. muris* อย่างชัดเจน (Monis et al., 1998) โดยจาก

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า *G. lamblia* ที่พบในสุนัข มีความสามารถในการก่อโรคที่เฉพาะเจาะจงกับโฮสต์ (host specific) หรือเป็น canine specie นอกจากนี้ Monis และคณะ (1999) ได้ทำการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของ *Giardia* sp. ได้แก่ *G. lamblia*, *G. ardea*, *G. muris* และ *G. microti* โดยทำการศึกษาใน *gdh* gene, *tpi* gene, *ef1- α* gene และ *SSU-rRNA* gene จากตัวอย่างที่ได้จากโฮสต์หลายชนิด และสามารถจำแนกสายพันธุ์ *G. lamblia* ได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ Assemblage A-G นอกจากนี้ยังพบว่า *G. ardea* และ *G. muris* สามารถจำแนกออกจาก *G. lamblia* ได้อย่างชัดเจน ส่วน *G. microti* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *G. lamblia* โดยได้จำแนกสายพันธุ์ที่ได้จากสัตว์ในปศุสัตว์เป็น Assemblage E ส่วนสายพันธุ์ที่พบในหนูและแมว จำแนกเป็น Assemblage F และ G ตามลำดับ (Hopkin et al., 1999) ข้อมูลตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดง *G. lamblia* Assemblage and host range of isolate

Assemblage (Genotype)	Host range	Reference
A	human, cat, dog, calf, horse, pig, deer, lemur, beaver, slow loris, guinea pig	Homan et al., 1992 ; Maryhofer et al., 1995 ; Meloni et al., 1995 ; Monis et al., 1996 ; Ey et al., 1997 ; Karanis and Eye, 1998 ; Monis et al., 1999 ; Trout et al., 2003 ; Sulaiman et al., 2003
B	human, dog, cat, monkey, beaver, muskrat, rabbit, chinchilla, guinea pig	Homan et al., 1992 ; Maryhofer et al., 1995 ; Meloni et al., 1995 ; Ey et al., 1997 ; Monis et al., 1999 ; Sulaiman et al., 2003
C, D	dog	Maryhofer et al., 1995 ; Hopkins et al., 1997 ; Monis et al., 1998 ; Monis et al., 1999 ; Sulaiman et al., 2003
E	livestock	Ey et al., 1997 ; Sulaiman et al., 2003
F	cat	Maryhofer et al., 1995 ; Meloni et al., 1995 ; Monis et al., 1999 ; Hopkins et al., 1999
G	rat	Monis et al., 1999 ; Sulaiman et al., 2003

การศึกษาสายพันธุ์ *G. lamblia* ที่พบในปศุสัตว์สอดคล้องกับการรายงานของ Ey และคณะ (1997) ที่ทำการศึกษาในส่วนของ *gdh* gene และทำการวิเคราะห์เอนไซม์ พบว่าตัวอย่างที่ได้จาก วัวควาย, แกะ, แพะและหมู ในประเทศออสเตรเลีย และประเทศทางแถบยุโรปมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากสายพันธุ์ที่พบในคนอย่างชัดเจน จึงจำแนกให้เป็น *G. lamblia* สายพันธุ์ “novel livestock” ซึ่งต่อมาคือ Assemblage E

หลังจากนั้นได้มีการศึกษาสายพันธุ์ของ *G. lamblia* กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยปัจจัยด้านการศึกษาในส่วนของยีนที่ทำหน้าที่สำคัญในการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตจากการวิเคราะห์สายพันธุ์ *G. lamblia* จากตัวอย่างจำนวนมากที่พบในคน จากหลายๆ พื้นที่ทั่วโลก โดยอาศัยเทคนิค PCR จากดีเอ็นเอที่สกัดโดยตรงจากอุจจาระ พบว่า *G. lamblia* Assemblage A และ B เท่านั้น ที่สามารถก่อโรคในคนได้ โดยความชุกของการติดเชื้อในแต่ละ Assemblage จะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่หรือประเทศที่มีการระบาด ดังแสดงในตารางที่ 3 Assemblage C-G มีโฮสต์ที่จำเพาะ โดย Assemblage C และ D สามารถก่อโรคได้ในสุนัข แมว coyotes และ สุนัขป่า, Assemblage E พบในพวกสัตว์ในปศุสัตว์ เช่น วัว ควาย แพะ แกะ และ หมู เป็นต้น Assemblage F และ G พบในแมวและหนู ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

การศึกษาสายพันธุ์ *G. lamblia* โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ส่วนใหญ่แล้วได้ทำการวิเคราะห์ยีน small subunit ribosomal RNA, beta-giardin, glutamate dehydrogenase, elongation factor 1-alpha, triose phosphate isomerase, GLORF-C4 genes และ inter-genomic rRNA spacer region ซึ่งยีนเหล่านี้จะอยู่บนโครโมโซมหรือ contig ดังต่อไปนี้ *tpi* gene อยู่ตำแหน่งที่ 95921–96694 บน 200 kb-long contig ctg02 19, beta-giardin gene อยู่ตำแหน่งที่ 55484–56302 บน 90 kb-long contig ctg02 35, *gdh* gene อยู่ตำแหน่งที่ 60579–61928 บน 231 kb long contig ctg02 15, *ef1-α* gene อยู่ตำแหน่งที่ 40230–41558 บน 61 kb-long contig ctg02 53, และ the GLORF-C4 gene อยู่ตำแหน่งที่ 68643–69239 บน 80 kb-long contig ctg02_44 (Caccio และ Ryan, 2008)

จากการศึกษาด้วยเทคนิค pulsed-field gel electrophoresis พบว่า *tpi* gene อยู่บนโครโมโซมที่ 5, *gdh* และ beta-giardin gene อยู่บนโครโมโซมที่ 4 และ SSU-rRNA gene อยู่บนโครโมโซมที่ 1 (Adam, 2001) การวิเคราะห์สายลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการศึกษาในยีนเหล่านี้ ตัวอย่างที่พบในคนและสัตว์ พบว่าในด้านของความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ในยีนต่างๆ มีความแตกต่างกัน โดย *tpi* และ *gdh* gene มีความหลากหลายสูง รองลงมาคือ beta-giardin และ GLORF-C4 gene ส่วน SSU-rRNA และ *ef1-α* gene พบว่ามีความหลากหลายต่ำ เนื่องจากมีบริเวณที่มีส่วนที่เหมือนกันสูง ดังนั้นการศึกษาในเรื่องของความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือ subgroup ในแต่ละยีนเป้าหมายจึงมีความแตกต่างกัน

นอกจากนี้ beta-giardin gene และ ef1- α gene ยังพบว่ามีลักษณะการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ แล้วทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดสูง หรือจัดเป็น non-synonymous substitution ขณะที่ tpi และ gdh gene มีลักษณะการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ยังคงชนิดของกรดอะมิโนเช่นเดิมหรือเรียกว่า synonymous substitution สูง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลไกการแพร่กระจายของเชื้อ *Giardia lamblia* (Cycle of transmission)

การแพร่กระจายของเชื้อในคน

การแพร่กระจายของเชื้อระหว่างคนมาสู่คน มีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของ cyst ระยะติดต่อ หรือการได้รับเชื้อที่มีการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยตรง โดยเฉพาะในสถานที่แออัดและมีการจัดการด้านสุขภิบาลไม่ดีนัก เช่น ในสถานรับเลี้ยงเด็กก่อน ในสถานรับเลี้ยงเด็กกำพร้าและในชุมชนแออัด เป็นต้น จากการศึกษาในประเทศอังกฤษ จากตัวอย่างผู้ป่วยเด็กในสถานรับเลี้ยงเด็กก่อนจำนวน 35 ราย โดยอาศัยเทคนิค PCR-RFLP และ DNA sequencing เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ tpi gene พบการติดเชื้อ Assemblage B ร้อยละ 64 และ Assemblage A2 ร้อยละ 27 นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อร่วมกัน ร้อยละ 9 ระหว่าง Assemblage A2 และ B (Amar et al., 2002) จากรายงานในประเทศออสเตรเลียพบการติดเชื้อ Assemblage B (ร้อยละ 70) สูงกว่า Assemblage A (ร้อยละ 30) (Read et al., 2004) ในแถบชนบทที่มีการปลูกชาของประเทศอินเดีย พบการติดเชื้อ Assemblage A ร้อยละ 61 และ Assemblage B ร้อยละ 39 ตามลำดับ (Traub et al., 2004) จากการศึกษาในสถานรับเลี้ยงเด็กก่อนในเมือง Perth ทางตะวันตกของออสเตรเลีย พบการติดเชื้อ Assemblage A และ B ในเด็กเล็ก โดยเด็กที่ติดเชื้อ Assemblage A จะมีอาการท้องเสียเรื้อรัง (Read et al., 2001)

การแพร่กระจายของเชื้อในปศุสัตว์

การศึกษานี้มุ่งความสนใจไปที่สัตว์ที่มีอายุน้อย (young livestock) โดยสามารถพบการติดเชื้อ *G. lamblia* ได้ทั้งในโคเนื้อและโคนม การติดเชื้อมีลักษณะเหมือนกันคือจะพบ cyst ปนเปื้อนอยู่กับอุจจาระเมื่อลูกวัวมีอายุได้ 4 สัปดาห์ โดยสามารถปลดปล่อย cyst ได้จำนวนสูงสุดถึง $10^5 - 10^6$ cyst /กรัม ของน้ำหนักอุจจาระ เมื่อมีอายุ 4-12 สัปดาห์ (O'Handley et al., 1999) การแพร่กระจายเชื้อเกิดขึ้นระหว่างลูกวัวและวัวที่โตเต็มที่ที่มีการติดเชื้อเรื้อรัง แต่อัตราความชุกของการติดเชื้อจะสูงในกลุ่มวัวนม การติดเชื้อ *Giardia* sp. ในกลุ่มวัวนมมีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ โดย *Giardia* sp. เป็นสาเหตุหนึ่งร่วมกับเชื้อปรสิตชนิดอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารในสัตว์กลุ่มนี้ ซึ่งส่งผลทำให้สัตว์มีการกินอาหารน้อยลง ทำให้น้ำหนักตัวลดลงและส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตน้ำนมจึงลดลงตามไปด้วย รวมถึงการติดเชื้อ *G. lamblia* ยังพบว่าส่งผลต่อการเจริญเติบโตของลูกแกะอีกด้วย จากการศึกษาพบว่า *Giardia* sp. ในสัตว์กลุ่มนี้มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ livestock genotypes หรือ Assemblage E ซึ่งพบการติดเชื้อได้บ่อยในพวกวัวควาย อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในประเทศแคนาดาและออสเตรเลีย พบการติดเชื้อ Assemblage E เพียงร้อยละ 20 โดยที่เหลือเป็น Assemblage A ซึ่งสามารถแพร่กระจายเชื้อมาสู่คนได้ (O'Handley et al., 2000) อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้ มีรายงานการติดเชื้อในฝูงวัวนมในออสเตรเลีย พบการติดเชื้อในลูกวัวอายุ 12 สัปดาห์ โดยพบว่าทั้งหมดเป็น *G. lamblia* สายพันธุ์ Assemblage E ทั้งหมด

การแพร่กระจายของเชื้อในสุนัขและแมว

G. lamblia เป็นปรสิตที่พบการติดเชื้อได้บ่อยในสุนัข โดยมักพบอัตราความชุกร้อยละ 10 ในสุนัขที่โตเต็มวัย และร้อยละ 30-50 ในลูกสุนัข จากการศึกษาสายพันธุ์ *G. lamblia* พบว่าสามารถเกิดการติดเชื้อสายพันธุ์ที่มีลักษณะ dog-specific รวมถึงสายพันธุ์ที่สามารถแพร่กระจายเชื้อไปสู่คนได้ แต่การศึกษาถึงวงจรของการแพร่กระจายเชื้อที่สนับสนุนการเกิด zoonotic ยังไม่มีความชัดเจน แต่พบว่ามีรายงานการติดเชื้อ *G. lamblia* ร่วมกันในคนและสุนัขที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกัน (Traub et al., 2004 ; Inpankaew et al., 2007)

การศึกษาที่เมือง Perth ทางตะวันตกของออสเตรเลีย พบการติดเชื้อ Assemblage A, C และ D ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน (Thompson et al., 1999) โดยอาจมีการแพร่กระจายเชื้อของ Assemblage A ระหว่างสุนัขด้วยกันเองและจากสุนัขมาสู่คน โดยจากการศึกษาของ Bugg และคณะ (1999) พบว่าสุนัขที่เลี้ยงไว้ในแหล่งชุมชนมักพบการติดเชื้อได้บ่อยกว่าสุนัขที่เลี้ยงไว้ในบ้านที่ห่างไกลจากแหล่งชุมชน จากการศึกษาในเม็กซิโก บราซิล ญี่ปุ่น และอิตาลี พบการติดเชื้อ Assemblage A ในสุนัข (Lalle et al., 2007 ; Eligio-Garcia et al., 2005 ; Volotao et al., 2007) โดยมีบางรายงานพบว่าสุนัขที่ติดเชื้อสายพันธุ์ zoonotic อาศัยอยู่บริเวณเดียวกันเด็กเล็กที่พบการติดเชื้อ *Giardia* sp. เช่นเดียวกันกับการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น อิตาลี และโปแลนด์ พบการติดเชื้อ *G. lamblia* Assemblage A ในสุนัขร้อยละ 51.85, 76.47 และ 18.75 ตามลำดับ (Itagaki, Kinoshita และ Aoki, 2005 ; Berilli et al., 2004 ; Zygnier et al., 2006) มีบางรายงานพบการติดเชื้อ *G. lamblia* สายพันธุ์ dog-specific เท่านั้น (Abe et al., 2003 ; Sulaiman et al., 2007) จากการศึกษาสายพันธุ์ *G. lamblia* ที่พบในแมวพบการติดเชื้อ Assemblage A และ B (Thompson et al., 2000 ; van Kenlen et al., 2002) และสายพันธุ์ที่เป็น cat-specific หรือ Assemblage F (Monis et al., 1999) ใน ค.ศ. 2007 Vasilopoulos และคณะ ทำการศึกษาตัวอย่างอุจจาระแมวจำนวน 250 ตัวอย่าง ในเมือง Mississipi และ Alabam ในสหรัฐอเมริกา พบการติดเชื้อ *G. lamblia* จำนวน 17 ตัวอย่าง โดยเป็น subssemblage A1 6 ตัวอย่าง และ 11 ตัวอย่าง เป็น Assemblage F

การติดต่อของ *Giardia lamblia* จากสัตว์สู่คนโดยการปนเปื้อนกับแหล่งน้ำ

ปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง และสัตว์ป่าอาจเป็นแหล่งของการแพร่กระจายเชื้อ *G. lamblia* มาสู่คน โดยสามารถพบการติดเชื้อที่เป็น zoonotic genotypes (Assemblage A และ B) รวมถึงสายพันธุ์ที่เป็นโฮสต์เฉพาะ อย่างไรก็ตามองค์การอนามัยโลกได้พิจารณาให้ *G. lamblia* เป็นปรสิตที่สามารถติดต่อระหว่างคนและสัตว์ได้มาเป็นเวลา 20 กว่าปีแล้ว (WHO, 1979) โดยการแพร่กระจายของเชื้อเกิดจากการได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารหรือน้ำดื่ม (direct fecal-oral) และการปนเปื้อนของเชื้อในแหล่งน้ำต่างๆ (Thompson et al., 1998)

สาเหตุหลักของการแพร่กระจายทางน้ำเกิดจากการไม่มีการบำบัดน้ำเสียโดยการกรองก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำต่างๆ (Jaknbowski and Grann et al., 2002) การทำชลประทานเพื่อนำน้ำมาใช้ในการเกษตรก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ *G. lamblia* ในกลุ่มผู้ที่รับประทานผักผลไม้สดพบว่ามีความเสี่ยงเช่นเดียวกัน (Thurston-Eurignes et al., 2002) การปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมหรือในระบบน้ำดื่มน้ำใช้ อาจเกิดการปนเปื้อนมาจากคน เกษตรกรรมและจากสัตว์ป่า จากการสำรวจพบการแพร่กระจายของเชื้อในน้ำเสีย แต่พบเชื้อในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับเชื้อที่พบในอุจจาระวัว ซึ่งมักจะปลดปล่อยเชื้อออกมาในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามพบว่าในสัตว์ป่ามักมีความชุกของเชื้อ *Giardia* sp. ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับที่พบในสัตว์เลี้ยง แต่พบความชุกสูงในสัตว์จำพวก aquatic mammals เช่น บีเวอร์ และ muskrat จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า *G. lamblia* สายพันธุ์ที่พบว่ามีความสามารถในการติดต่อกับสัตว์ สุนัขสูงที่สุด คือ Assemblage A (A1) รองลงมาคือ Assemblage B ในทางตรงกันข้าม animal-specific genotypes มักจะจำเพาะอยู่ในกลุ่มปศุสัตว์ สุนัข แมวและสัตว์ฟันแทะ ยังไม่พบรายงานการติดเชื้อ animal-specific genotypes นี้ในคน

การแพร่กระจายเชื้อในกลุ่มวัวควาย ส่วนใหญ่พบว่าเป็นการติดเชื้อ Assemblage E (O'Handley., 2002 ; Hoar., 2001) ในสัตว์ในกลุ่มนี้มักมีความไวต่อการติดเชื้อสายพันธุ์ zoonotic genotypes และพบว่าในวัวที่ติดเชื้อจะปลดปล่อย cyst ออกมาจำนวนมาก ดังนั้นเพียงวัวไม่กี่ตัวที่ติดเชื้อ Assemblage A ก็จะสามารถแพร่กระจายเชื้อไปสู่สิ่งแวดล้อมได้ อย่างไรก็ตามจากรายงานในออสเตรเลียชี้ให้เห็นว่า zoonotic genotypes จะเกิดขึ้นแค่เพียงชั่วคราวเท่านั้น นอกจากนี้ในการศึกษาตัวอย่างอุจจาระของบีเวอร์ที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นที่ริมแม่น้ำต่างๆ ในทางตอนใต้ของเมืองอัลเบอร์ตา ประเทศแคนาดา จำนวนทั้งหมด 113 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อ *G. lamblia* 12 ตัวอย่าง โดยทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ Assemblage A (Appelbee., 2002)

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการติดเชื้อ *G. lamblia* Assemblage A และ B ในคน

Country	Gene	Assemblage			Reference
		A	B	A+B	
อังกฤษ (21)	<i>tpi</i>		21 (100%)		Caccio et al., 2005
เนเธอร์แลนด์ (18)	<i>gdh</i>	9(50%)	9 (50%)		Caccio et al., 2005
เนเธอร์แลนด์ (98)	<i>ssu-rRNA, gdh</i>	34 (35%)	64 (65%)		van der Giessen, 2006
สเปน (108)	<i>tpi</i>	43 (39.8%)	61 (56.5%)	4(3.7%)	Sahagun et al. 2007
นอร์เวย์ (21)	<i>bg, gdh</i>		21 (100%)		Robertson et al., 2006
นอร์เวย์ (63)	<i>bg, gdh, tpi</i>	3 (5%)	60 (95%)		Robertson et al., 2007
อิตาลี (120)	<i>ssu-rRNA, bg</i>	65 (54%)	39 (32.5%)	6 (13.5%)	Giargaspero, Berrilli และ Brandonisio, 2007
ฝรั่งเศส (25)	<i>tpi</i>	9 (36%)	16 (64%)		Bertrand, Albertini และ Schwartzbrod, 2005
อัลบาเนีย (22)	<i>ssu-rRNA</i>	10 (45%)	12 (55%)		Berrilli et al., 2006
ยูกันดา (3)	<i>ssu-rRNA</i>	3 (100%)			Caccio et al., 2005
เอธิโอเปีย (59)	<i>bg, gdh</i>	31 (52%)	13 (22%)	15 (25%)	Gelanew et al., 2007
เปรู (25)	<i>tpi</i>	6 (24%)	19 (76%)		Caccio et al., 2005
บราซิล (37)	<i>gdh</i>	29 (78%)	8 (22%)		Gelanew et al., 2007
บราซิล (62)	<i>bg</i>	62 (100%)			Volotao et al., 2007
อเมริกา (14)	<i>ssu-rRNA</i>	14 (100%)			Caccio et al., 2005
เม็กซิโก (9)	<i>bg</i>	9 (100%)			Lalle et al., 2005
แคนาดา (6)	<i>ssu-rRNA</i>	6 (100%)			Caccio et al., 2005
ออสเตรเลีย (8)	<i>ssu-rRNA, gdh</i>	2 (25%)	6 (75%)		Caccio et al., 2005
ออสเตรเลีย (23)	<i>ssu-rRNA</i>	7 (30%)	16 (70%)		Caccio et al., 2005
ตุรกี (44)	<i>tpi</i>	19 (43%)	25 (57%)		Caccio et al., 2005
บังกลาเทศ (267)	<i>tpi</i>	20 (7.5%)	231 (86.5%)	16 (6%)	Haque et al., 2005
อินเดีย (10)	<i>tpi</i>		10 (100%)		Caccio et al., 2005
อินเดีย (19)	<i>tpi, ef1-α</i>	6 (32%)	9 (47%)	4 (21%)	Caccio et al., 2005
อินเดีย (12)	<i>gdh</i>	5 (42%)	7 (58%)		Paintlia et al., 1998
ลาว (5)	<i>C4</i>		5(100%)		Caccio et al., 2005
จีน (8)	<i>ssu-rRNA</i>	4 (50%)	4 (50%)		Caccio et al., 2005
เกาหลี (5)	<i>ssu-rRNA</i>	5 (100%)			Caccio et al., 2005
ไทย (12)	<i>gdh</i>	5(41.66%)	7(58.34%)		Ratanapo et al., 2008
รวม		406 (36%)	663 (60%)	45 (4%)	

ตารางนี้ดัดแปลงจาก (Caccio และ Ryan, 2008) * ตัวเลขในวงเล็บคือ จำนวนตัวอย่าง

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการติดเชื้อ *G. lamblia* Subassemblage A และ B
ในสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า

โฮสต์	Assemblage	ยีน	วิธีการวิเคราะห์	อ้างอิง
Wildlife				
Fallow deer	A ^b	<i>tpi, bg</i>	Sequencing	Lalle, 2007
Ferret	A1	<i>gdh, bg</i>	Sequencing	Abe et al., 2005
Fox	A1, A ^a , B3	<i>bg</i>	Sequencing	Hamnes et al., 2007
Moose and reindeer	A ^a	<i>gdh, bg</i>	Sequencing, RFLP	Robertson et al., 2007
Water buffalo	A1	<i>bg</i>	Sequencing	Caccio et al., 2007
Deer	A1 and A ^a	<i>tpi, bg</i>	Sequencing	Trout, Santin และ Fayer, 2003
Beaver	B	<i>tpi, bg</i>	Sequencing	Fayer et al., 2006
Beaver, muskrat	B (various subtypes)	<i>tpi</i>	Sequencing	Sulaiman et al., 2003
Monkey	B4	<i>gdh</i>	Sequencing	Itagaki, Kinoshita และ Aoki, 2005
Domestic animals				
Cat	A1	<i>gdh</i>	Sequencing	Vasilopoulos et al., 2007
Cat	A1	<i>gdh</i>	Sequencing	Gelanew et al., 2007
Cat	B4	<i>gdh</i>	Sequencing, RFLP	Read, Monis และ Thompson, 2004
Dog	A1	<i>gdh</i>	Sequencing	Leonhard et al., 2007
Dog	A1, A2, B3/ 4	<i>tpi</i>	Sequencing	Traub et al., 2004
Dog	A1 and A3	<i>bg</i>	Sequencing	Lalle et al., 2005
Dog	A1–A4 and B3	<i>bg</i>	Sequencing	Lalle et al., 2005
Dog	B4	<i>gdh</i>		Read, Monis และ Thompson, 2004
Dog	A1	<i>gdh</i>	Sequencing	Itagaki, Kinoshita และ Aoki, 2005

หมายเหตุ a คือ Sequences similar but not identical to A1, A2 and A3 were identified.

b คือ A new assemblage A subgroup.

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการติดเชื้อ *G. lamblia* Subassemblage A และ B
ในสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า (ต่อ)

โฮสต์	Assemblage	ยีน	วิธีการวิเคราะห์	อ้างอิง
Cattle	B	<i>ssu-rRNA</i>	Sequencing	Coklin et al., 2007
Cattle	A2, A3	<i>bg</i>	Sequencing	Geurden et al., 2007
Cattle	A	<i>bg</i>	Sequencing	Hsu, Wun and Hsu, 2007
Cattle and pig	A ^a	<i>gdh</i>	Sequencing	Langkjaer et al., 2007
Cattle	A2 and B	<i>gdh, bg</i>	Sequencing	Mendonca et al., 2007
Cattle	A1	<i>gdh</i>	Sequencing	Gelanev et al., 2007
Cattle	A1	<i>gdh</i>	Sequencing	Robertson et al., 2007
Calf	A1–A4 and B3	<i>bg</i>	Sequencing	Lalle et al., 2005
Cattle	A	<i>tpi, bg</i>	Sequencing	Trout et al., 2004
Horse	A1, A2, B4	<i>tpi</i>	Sequencing	Traub et al., 2005
Lamb	B4	<i>tpi</i>	Sequencing	Aloisio et al., 2006
Sheep	B	<i>gdh, bg</i>	Sequencing	Castro-Hermida et al., 2007
Sheep	A1	<i>bg</i>	Sequencing, RFLP	Gianguaspero, Berrilli and Brandonisio, 2007

หมายเหตุ a คือ Sequences similar but not identical to A1, A2 and A3 were identified.

b คือ A new assemblage A subgroup.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การก่อพยาธิสภาพ

ในผู้ป่วยที่มีอาการไม่มากอาจไม่พบความผิดปกติทางพยาธิสภาพของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ แต่ในบางรายจากการตรวจดูชิ้นเนื้อเยื่อจากบริเวณเนื้อเยื่อส่วนกลางที่ตัดมาพบว่า เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้มีลักษณะสั้นทู่ มีการฝ่อของ villi ที่เยื่อบุผนังลำไส้ (villi atrophy) ต่อม้ำเหลืองและ crypt เจริญเติบโตผิดปกติ (nodular lymphoid, crypt hyperplasia) มีเซลล์เม็ดเลือดขาวมาล้อมรอบที่ lamina propria (Saha และ Ghosh, 1977 ; Ward et al., 1983) ซึ่งลักษณะพยาธิสภาพดังกล่าวไม่จำเพาะและสามารถหายเป็นปกติได้ถ้าได้รับการรักษา การที่ trophozoite ใช้ sucking disk เกาะที่บริเวณเยื่อบุผิวลำไส้จะทำให้เกิดการทำลายเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ โดยมีหลักฐานจาก scanning electron microscopy แสดงให้เห็นถึงร่องรอยที่โปรโตซัวเกาะ (Klima et al., 1997 ; Erlandsen และ Chase, 1974) การเกาะเยื่อบุผิวของ trophozoite นอกจากจะทำลายเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้แล้วยังไปขัดขวางการดูดซึมสารอาหารในลำไส้ อันเป็นสาเหตุหนึ่งที่ผู้ป่วยมีอาการดูดซึมสารอาหารบกพร่อง (malabsorption) ดังนั้นเมื่อผู้ป่วยไม่สามารถดูดซึมสารอาหารได้จึงมีไขมันปนออกมากับอุจจาระ ที่เรียกว่า steatorrhea นอกจากนี้การที่ไม่พบเลือดในอุจจาระของผู้ป่วยแสดงว่า trophozoite ไม่ได้ลุกลามเข้าไปในเซลล์ของโฮสต์ หรือทำให้เซลล์ของโฮสต์แตก ถึงแม้จะมีหลักฐานว่ามีการลุกลามเยื่อบุผนังลำไส้ที่เกิดจาก trophozoite ในหนู (Owen, Allen และ Stevens, 1981) แต่ปัจจุบันยังไม่พบหลักฐานในคน อย่างไรก็ตามกลไกที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีผู้ศึกษาว่าการทำลายเยื่อบุผิวของผนังลำไส้โดยตรงทำให้เกิดการขาดเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารจำพวกไดแซ็กคาไรด์ ได้แก่ sucrase และ maltase โดยมีหลักฐานการศึกษาในหนูที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติ ภายหลังจากการติดเชื้อ *Giardia* sp. จะมีลักษณะพยาธิสภาพที่สำคัญคือ การสูญเสียบริเวณผิวของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ sucrase และ maltase ในขณะที่หนูที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในส่วนของ T-cell ไม่พบว่ามี ความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ เมื่อได้รับการติดเชื้อด้วย *Giardia* sp.

ศูนย์วิทยุทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาการแสดงทางคลินิก

ลักษณะอาการของการติดเชื้อ *G. lamblia* พบได้ตั้งแต่ท้องเสียเล็กน้อยจนถึงมาก ท้องอืดปวดท้อง น้ำหนักลด มีไขมันและเมือกในอุจจาระ ถ้าเป็นมากผู้ป่วยจะมีภาวะดูดซึมสารอาหารบกพร่องทำให้เกิดภาวะทุพโภชนาการได้ในภายหลัง จะเห็นได้ว่าลักษณะอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ *Giardia* sp. นี้ ไม่จำเพาะ กล่าวคือมีลักษณะคล้ายที่เกิดจากเชื้อในระบบทางเดินอาหารชนิดอื่น ในกรณีที่เป็น trophozoite ไปที่ถุงน้ำดีก็อาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการดีซ่าน (Goldstein et al., 1978) หรืออาจพบ trophozoite ในระบบทางเดินปัสสาวะได้

ลักษณะอาการทางคลินิกสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ลักษณะดังนี้ คือ ผู้ป่วยไม่มีอาการแสดง ผู้ป่วยมีอาการท้องเสียเฉียบพลันและผู้ป่วยมีอาการท้องเสียเรื้อรัง โดยส่วนใหญ่แล้วประมาณร้อยละ 50 ของคนที่ติดเชื้อโปรโตซัว จะแสดงอาการและสามารถหายได้เอง แม้ว่าจะไม่ได้รับการรักษา ซึ่งจากรายงานพบว่าปัจจัยของโฮสต์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดโปรโตซัวคือระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แต่อย่างไรก็ตามระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่ได้ป้องกันโฮสต์จากการติดเชื้อซ้ำ (reinfection) ในขณะที่อีกครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยมีอาการผิดปกติอย่างรุนแรง เนื่องจากไม่สามารถดูดซึมสารอาหารได้ตามปกติ (severe malabsorption syndrome) โดยพบว่าผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสียเรื้อรัง น้ำหนักลด อุจจาระมีไขมัน ซึ่งหากเกิดขึ้นเป็นระยะเวลาสั้น ก็อาจจะทำให้เกิดภาวะทุพโภชนาการและมีการเจริญเติบโตผิดปกติ ดังนั้นการที่มีความแตกต่างในลักษณะอาการที่แสดงออกนี้ พบว่าน่าจะมีสาเหตุมาจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้คือ ความรุนแรงของสายพันธุ์ของ *Giardia* sp. (Nash et al., 1987) ปริมาณของ cyst ที่ได้รับ อายุของโฮสต์และภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายในขณะที่ได้รับเชื้อ

ในกลุ่มที่เกิดอาการท้องเสียเฉียบพลัน พบได้บ่อยในนักท่องเที่ยวที่เดินทางมาจากพื้นที่ที่ไม่มีการติดเชื้อมายังพื้นที่ที่มีการติดเชื้อ โดยพบว่าในผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอาการท้องเสียร้อยละ 90 น้ำหนักลดร้อยละ 60-70 และอาจมีอาการทางระบบทางเดินอาหารได้เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องอืด อ่อนเพลีย อุจจาระมีไขมัน โดยที่ส่วนใหญ่อาการจะหายได้เองภายใน 2-4 สัปดาห์ แต่ผู้ป่วยประมาณร้อยละ 30-50 ถ้าไม่ได้รับการรักษาจะก่อให้เกิดอาการท้องเสียเรื้อรัง น้ำหนักลด การดูดซึมอาหารจำพวกไขมันและวิตามิน B₁₂, folate, lactose ผิดปกติ ส่งผลให้การเจริญเติบโตของร่างกายผิดปกติไปด้วย ซึ่งมักพบในผู้ป่วยเด็ก (Walzer, Wolfe และ Schultz, 1971)

ระบบภูมิคุ้มกัน

การติดเชื้อ *G. lamblia* ก่อให้เกิดลักษณะอาการที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ไม่มีอาการจนกระทั่งมีอาการรุนแรงและเรื้อรังในผู้ป่วย ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วนั้น ถ้าพิจารณากันอย่างละเอียด ในเรื่องของกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย พบว่าน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการติดเชื้อ *Giardia* sp. ในลำไส้

การศึกษาถึงกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีผลต่อการกำจัดเชื้อ *G. lamblia* ในลำไส้พบว่าในน้ำนมของคนมีสารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *G. lamblia* ได้ เช่น conjugate bile salt, unsaturated fatty acid และ free fatty acid เป็นต้น (Gillin, 1987 ; Rohrer et al., 1986 ; Reiner, Wang และ Gillin, 1986) โดยที่สารจำพวก triglycerides ที่มีอยู่ในน้ำมนั้น จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ lipase ที่มีอยู่ในลำไส้ ทำให้ได้สาร free fatty acid ซึ่งมีผลทำลายเซลล์เมมเบรนของโปรโตซัว นอกจากนี้ในน้ำนมยังมี IgA แอนติบอดี ซึ่งเป็นกลไกของระบบภูมิคุ้มกันที่มีส่วนในการกำจัดเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป แต่อย่างไรก็ตามมีหลักฐานว่าเชื้อโปรโตซัวสามารถป้องกันไม่ให้ถูกทำลายโดยสารเหล่านี้ได้ ถ้าเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสาร mucus จากลำไส้ของคน (Zenian และ Gollin, 1987) แสดงว่า innate immunity ป้องกัน trophozoite จากการถูกทำลายในลำไส้ได้ นอกจากนี้การทดสอบในหลอดทดลองพบว่า สารอาหารตามธรรมชาติ ได้แก่ lectin มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *G. lamblia* ในระยะ trophozoite และมีผลทำให้การติดเชื้อ *G. muris* ในหนูทดลองลดลง (Ortega-Barria et al., 1994) จากหลักฐานดังกล่าวแสดงว่า กลไกที่ไม่ใช่ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของเรามีส่วนในการทำลายเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้ในลำไส้

ในเรื่องของกลไกทางระบบภูมิคุ้มกันก็มีส่วนสำคัญในการกำจัดเชื้อ *G. lamblia* ในลำไส้ โดยมีหลักฐานพบว่าทั้ง B-cell และ T-cell มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคและพยาธิสภาพที่เกิดจากการติดเชื้อ *G. lamblia* ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เนื่องจากมีการสร้างแกมมาโกลบูลินลดลง (hypogammaglobulinemia) หรือในผู้ป่วยที่มีการสร้างอิมโนโกลบูลิน A (secretory IgA) หรือในผู้ป่วย common variable immunodeficiency (CVID) ที่มีความบกพร่องทั้ง B-cell และ T-cell ผู้ป่วยเหล่านี้จะมีอุบัติการณ์การติดเชื้อ *G. lamblia* เพิ่มขึ้น (Lai Ping So และ Mayer, 1997) และมีการทำลายเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้มากกว่าในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติ (Ferguson, Gillon และ Manro, 1990) โดยที่ผู้ป่วย CVID ที่มีความบกพร่องทั้ง B-cell และ T-cell จะมีการติดเชื้อได้ง่ายกว่าผู้ป่วยที่บกพร่องในการสร้าง IgA อย่างเดียว นอกจากนี้ในการทดลองในหนูที่มีการพร่องทั้ง CD4+ T-Cell และ B-Cell พบว่ามีการติดเชื้อ *Giardia* sp. แบบเรื้อรัง

สำหรับการศึกษาในส่วนของ B-Cell เพียงอย่างเดียวที่มีผลต่อการกำจัดเชื้อ *Giardia* sp. นั้น มีหลักฐานเดียวที่สนับสนุนการศึกษา โดยพบว่าในหนูที่มีการเอาเยื่อที่ควบคุมการสร้าง IgA ออก และทำให้ไม่สามารถสร้าง IgA ได้ นั้น เมื่อเกิดการติดเชื้อ *Giardia* sp. จะไม่สามารถกำจัดเชื้อให้หมดออกไปจากลำไส้ได้ (Eckmann และ Gillin, 2001) ส่วนแอนติบอดี isotype อื่นๆ ที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการกำจัดเชื้อ เช่น IgG, IgM ก็สามารถตรวจพบในซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อได้เช่นกัน โดยจากหลักฐานในผู้ป่วยเด็กที่มีการติดเชื้อชนิดขับปล้น ตรวจพบ IgG และ IgA ต่อแอนติเจนที่ผิว ซึ่งแอนติเจนชนิดนี้ภายหลังได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น สาร immunogenic ในขณะที่เด็กที่มีการติดเชื้อเรื้อรัง และมีภาวะทุพโภชนา จะตรวจพบ IgG และ IgM แต่ไม่พบ IgA จึงเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้ ไม่สามารถที่จะ switch immunoglobulin class จาก IgM และ IgA ได้ (Char et al., 1993) ดังนั้นจากหลักฐานดังกล่าวแสดงว่า IgA น่าจะมีส่วนสำคัญต่อการป้องกันการติดเชื้อของโปรโตซัวชนิดนี้

ในด้านความสำคัญของ T-cell ที่มีผลต่อการติดเชื้อ *Giardia* sp. จากการศึกษาในหนูทดลองพบว่า T-cell มีส่วนสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อ *Giardia* sp. เนื่องจากในหนูมีความบกพร่องในการสร้าง CD4+ T-cell ลดลงอย่างเดียว แต่มีการสร้าง CD8+ cell และ macrophage ที่เป็นปกติจะก่อให้เกิดการติดเชื้อ *Giardia* sp. ชนิดเรื้อรัง แสดงว่า CD4+ T-cell มีส่วนสำคัญในการกำจัดเชื้อชนิดนี้ในหนู และอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน immunoglobulin จาก IgM เป็น IgA แต่อย่างไรก็ตามในผู้ป่วย acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) ที่มีการติดเชื้อพบว่าไม่ได้ทำให้เกิดอาการท้องเสียรุนแรงเหมือนในผู้ป่วย AIDS ที่มีการติดเชื้อร่วมกับโปรโตซัวชนิดอื่น ได้แก่ *Cryptosporidium* sp., *Microsporidium* sp. และ *Cyclospora* sp. นอกจากนี้ในผู้ป่วย AIDS พบว่าพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นต่างไปจากผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติ และถึงแม้ว่าผู้ป่วย AIDS จะมีความผิดปกติที่ CD4+ T-cell แต่ก็ไม่ได้ติดเชื้อได้ง่ายกว่าคนปกติ ดังนั้นการติดเชื้อในผู้ป่วยกลุ่มนี้จึงไม่ใช่ปัญหาสำคัญ

จากหลักฐานดังกล่าวข้างต้นแสดงว่าระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์มีส่วนเกี่ยวข้องในการกำจัดเชื้อ *Giardia* sp. ในลำไส้ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเชื้อ *Giardia* sp. สามารถที่จะหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายได้ โดยมีหลักฐานการเกิด antigenic variation ได้ใน *Giardia* sp. ทั้งจากในสัตว์และในคน โดยที่บริเวณผิวของเมมเบรนในระยะ trophozoite จะมีแอนติเจนที่เรียกว่า variant surface protein (VSPs) (Zhang et al., 1993) แอนติเจนชนิดนี้ประกอบด้วยโปรตีนที่มีกรดอะมิโนชนิด cysteine อยู่เป็นจำนวนมาก และมีเยื่อที่ควบคุมแอนติเจนชนิดนี้อยู่ประมาณ 20 ถึง 184 ยีน โดยที่มีความถี่ในการเปลี่ยนแปลง VSPs ประมาณ 10^{-3} ถึง 10^{-4} ต่อ generation (Nash and Mowatt, 1992) การเกิด antigenic variation นี้พบได้ทั้งในระหว่างที่มีการเกิด encystation และ excystation เข้าใจว่าเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกัน

ของโฮสต์ และเป็นการเปลี่ยนแปลงเพื่อให้โปรโตซัวสามารถที่จะมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันในโฮสต์ นอกจากนี้ยังพบว่า VSPs นี้มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อและความรุนแรงของโรคอีกด้วย

การตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยที่ถือว่าเป็น definite diagnosis คือ การตรวจหาเชื้อโปรโตซัวในอุจจาระโดยตรง โดยที่ลักษณะอุจจาระที่ต่างกันจะพบระยะของโปรโตซัวแตกต่างกันได้ เช่น ในอุจจาระที่แข็ง (formed stool) มักจะพบโปรโตซัวระยะ cyst มากกว่า ส่วนระยะ trophozoite มักพบในอุจจาระที่เหลว (loose stool) หรืออุจจาระที่เป็นน้ำ (watery stool) การตรวจอุจจาระโดยวิธี simple smear หรือ concentration technique จากตัวอย่างเพียงครั้งเดียวของผู้ป่วยนั้นไม่เพียงพอ เนื่องจากมีรายงานพบว่าการปล่อย cyst หรือ trophozoite ออกมากับอุจจาระนั้นไม่แน่นอนและไม่สม่ำเสมอ กล่าวคืออาจพบระยะ cyst ในอุจจาระเป็นจำนวนมาก หรืออาจพบในจำนวนน้อย หรือพบจำนวนมากเป็นช่วงๆ เช่น ในช่วง 1-3 สัปดาห์แรก หรือพบจำนวนมากสลับกับพบจำนวนน้อย ดังนั้นถ้าตรวจครั้งแรกไม่พบเชื้อโปรโตซัว จึงควรจะมีการตรวจตัวอย่างอุจจาระซ้ำอย่างน้อยอีก 2 ครั้ง มีผู้ศึกษาพบว่าการตรวจอุจจาระจากตัวอย่างหนึ่งเพียงครั้งเดียวทำให้มีโอกาสพบโปรโตซัวร์้อยละ 76 การตรวจอุจจาระซ้ำในครั้งที่ 2 มีโอกาสพบเชื้อโปรโตซัวมากขึ้นเป็นร้อยละ 90 และเมื่อทำการตรวจซ้ำเป็นครั้งที่ 3 ทำให้มีโอกาสพบเชื้อมากที่สุดร้อยละ 97 (Wolfe, 1978) ดังนั้นการตรวจอุจจาระอย่างน้อย 3 ครั้ง จึงเป็นสิ่งจำเป็นในการตรวจวินิจฉัยโปรโตซัวชนิดนี้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีการย้อมสีเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อ *G. lamblia* ที่พบในอุจจาระได้โดยการย้อมด้วยน้ำยาไอโอดีนในอุจจาระสด เพื่อดูลักษณะของนิวเคลียส หรือการย้อมแบบถาวรด้วยวิธี trichrome, iron-hematoxylin หรือ giemsa ในกรณีที่การตรวจอุจจาระทั้ง 3 ครั้ง แล้วไม่พบเชื้อโปรโตซัว อาจจะต้องใช้วิธีทาง immunology มาช่วยวินิจฉัยได้แก่ indirect immunofluorescence assay (IFA) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ glycoprotein หรือโปรตีนที่อยู่บริเวณ cyst wall ซึ่งจากการศึกษาเปรียบเทียบพบว่า การตรวจโดยวิธีนี้ทำให้มีโอกาสตรวจพบโปรโตซัวได้มากกว่าการตรวจโดยวิธีย้อมสีเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังมีวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยการใช้ monoclonal และ polyclonal แอนติบอดีเพื่อตรวจหา *G. lamblia* แอนติเจนที่อยู่ในอุจจาระซึ่งจากการประเมินผลการตรวจด้วยวิธีนี้จากหลายๆ commercial kit พบว่ามีความไวร้อยละ 88.6-100 และความจำเพาะร้อยละ 99.3-100 ซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือใช้ระยะเวลาในการตรวจน้อย บาง kit ใช้เวลาเพียง 1-2 นาที ต่อ 1 ตัวอย่าง แต่พบว่ามีราคายังค่อนข้างสูงคือ ประมาณ 200-600 บาทต่อตัวอย่าง (Addiss, 1991) สำหรับการ

ตรวจวินิจฉัยทาง immunology อื่นๆ เช่น การตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *G. lamblia* ในซีรัม เหมาะสำหรับศึกษาในด้านของระบาดวิทยามากกว่า เนื่องจากสามารถตรวจตัวอย่างได้ที่ละจำนวน มากๆ แต่มีประโยชน์น้อยในด้านการรักษา เพราะไม่สามารถจำแนกกลุ่มอาการท้องเสียอย่าง เฉียบพลันได้ กล่าวคือ ถ้าตรวจ IgG แอนติบอดีจะสามารถพบได้ในผู้ป่วยทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติด เชื้อที่อาศัยอยู่บริเวณที่มีการระบาด แต่ถ้าการตรวจแบบ IgM แอนติบอดี มีประโยชน์ในด้านการ วินิจฉัยการติดเชื้อแบบเฉียบพลันได้ดีกว่า เนื่องจาก IgM แอนติบอดีในซีรัมจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกที่ เริ่มมีการติดเชื้อและคงอยู่ประมาณ 2-3 สัปดาห์

ต่อมาเมื่อวิธีการทางอณูชีววิทยาได้ถูกพัฒนาขึ้น จึงได้มีการนำเอาเทคนิค PCR มาใช้ในการ ช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อ *G. lamblia* โดยส่วนใหญ่แล้วทำการศึกษาใน *gdh*, *beta-giardin*, *tpi*, *SSU rRNA gene* และ *trophozoite surface protein genes (tsa, tsp)* เป็นต้น ซึ่งจากการ เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจจุลจากระโดยวิธี PCR ที่ขยายในส่วนของ *intergenic spacer region* ของ *ribosomal RNA* วิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์และการใช้เทคนิคทาง immunology ได้แก่ ELISA, counter immunoelectrophoresis (CIEP) พบว่าการตรวจจุลจากระ โดยวิธี PCR นั้นมีความไวและความจำเพาะมากกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์และการตรวจ โดยวิธี immunology นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจาก *G. lamblia* ในระยะ trophozoite ในปริมาณเพียง 2 picogram ได้โดยใช้วิธี nested PCR เพื่อเพิ่มความไว และความจำเพาะ พบว่าสามารถตรวจตัวอย่างที่มีโปรโตซัวเพียง 10 cyst ต่อจุลจากระ 100 μ l ได้ (Ghosh, 2000)

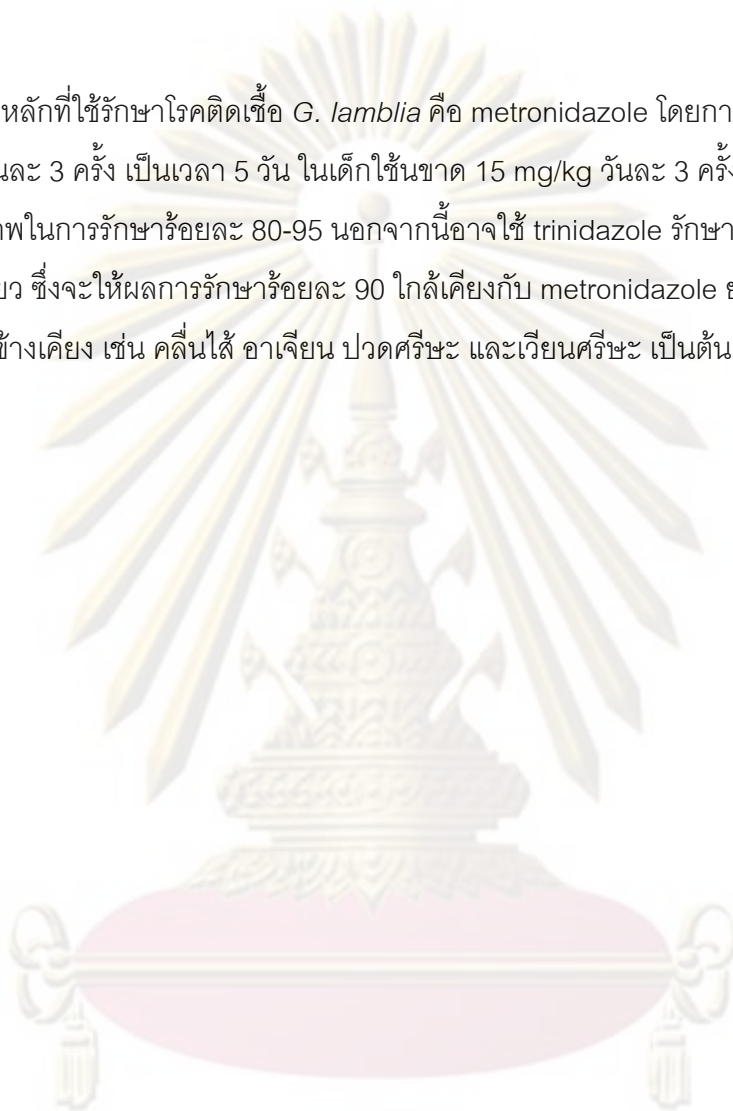
นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค PCR และการวิเคราะห์โดยใช้ RFLP เพื่อแยกความแตกต่าง ทางจีโนไทป์ของ *G. lamblia* จากการทดลองขยายในส่วน *tpi gene* จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก ตัวอย่างจุลจากระที่มีระยะ cyst และวิเคราะห์โดยวิธี RFLP พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของ ดีจีโนไทป์ของ *G. lamblia* ได้ ถึงแม้ว่าการตรวจวินิจฉัยโดยการวิธีการทางอณูชีววิทยาจะมีความ ไวและคงความจำเพาะสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์และการตรวจ ทาง immunology แต่เนื่องจากยังมีข้อจำกัดที่ว่า เครื่องมือและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยนั้น มี ราคาแพงจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจในห้องปฏิบัติการแบบทั่วไป แต่เหมาะสำหรับ การศึกษาด้านระบาดวิทยามากกว่าเพื่อศึกษาในแง่การแพร่กระจายของเชื้อ

การตรวจของเหลวที่ดูดได้จากลำไส้ส่วนดูโอดีนัม เช่น การดูดโดยสอดหลอดเข้าในลำไส้ (duodenal intubation) หรือการใช้ enterotest capsule แคปซูลนี้ประกอบด้วยเส้นด้ายไนลอน ยาว 1 เมตร ส่วนปลายติดไว้ด้วยตุ่มน้ำหนัก ทั้งหมดเก็บม้วนไว้ในแคปซูลเจลลาตินและมีปลาย สายยาวออกมา เมื่อกลืนแคปซูลลงไปเจลลาตินจะละลาย ด้ายจะคลายตัวลงไปถึงเจจูนัม *Giardia sp.* จะเกาะตามด้าย เมื่อสาวด้ายขึ้นมาก็ำนำของเหลวที่ติดด้ายไปตรวจดูด้วยกล้อง

จุลทรรศน์ (Wolfe, 1992) หรือการตรวจชิ้นเนื้อเยื่อมาตรวจเพื่อดูระยะ trophozoite โดยตรงก็นำมาใช้ในกรณีที่ไม่สามารถวินิจฉัยได้โดยการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีอื่น

การรักษา

ยาหลักที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อ *G. lamblia* คือ metronidazole โดยการรักษาในผู้ใหญ่จะให้ 250 mg วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 5 วัน ในเด็กให้ขนาด 15 mg/kg วันละ 3 ครั้งเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการรักษาร้อยละ 80-95 นอกจากนี้อาจใช้ trinitadazole รักษาในผู้ใหญ่โดยจะให้ 2 g ครั้งเดียว ซึ่งจะให้ผลการรักษาร้อยละ 90 ใกล้เคียงกับ metronidazole ยาทั้ง 2 ชนิดนี้ ก่อให้เกิดอาการข้างเคียง เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ และเวียนศีรษะ เป็นต้น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงการทดลอง (Experimental research) โดยทำการศึกษาในหลอดทดลอง (In vitro study)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *G. lamblia* จากตัวอย่างผู้ติดเชื้อที่พบในประเทศไทย

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือ ผู้ที่ติดเชื้อ *G. lamblia* จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอนไซม์จำเพาะเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขนาดของกลุ่มประชากร

จากการศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่าง จากผู้ที่ตรวจพบ *G. lamblia* เป็นตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 8 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากเด็กนักเรียน ตำบลท่าสองยาง อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก จำนวน 22 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการศึกษา 30 ตัวอย่าง

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิและเวลาได้ (high speed refrigerated microcentrifuge, Tomy)

เครื่องปั่นความเร็วสูงขนาดเล็ก

เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียดอ่านค่าได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Bosh)

ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Hitachi)

ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Puffer Hubbard)

ตู้เย็น -40 องศาเซลเซียส (Haier)

ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส (Forma Scientific)

ปิเปตต์ทิพ (pipette tip) ขนาด 10, 100, 1000 ไมโครลิตร (Eppendorf)

เครื่อง laminar flow

กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)

เครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (PCR cycle, Automatic thermal cyclers, Takara)

เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอโดยกระแสไฟฟ้า (Mupid-II)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Cyberscan 500)

เครื่องอ่านผลแถบดีเอ็นเอจากเจล (Bio Rad)

ตู้ปลอดเชื้อ (Nunre)

ตู้เลี้ยงเชื้อพร้อมเครื่องเขย่า (Taitec)

ตู้อบสำหรับเพาะเชื้อ (P-Selecta)

ตู้อบแห้ง (Memmert)

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง (Hirayama)

หน้ากากกันแสงอุลตราไวโอเล็ต
 แห่่งกำเน็ดแสงอุลตราไวโอเล็ต
 เครื่องยงกระแสไฟฟา (E.coli pulser)
 นาฬิกาจับเวลา
 อ่างน้ำรับอุณหภูมิ (Memmert)
 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟา (Bio Rad)
 เครื่องไมโครเวฟ
 เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
 เครื่อง incubate
 Hemacytometer
 Vortex mixer (Scientific Industries)

วัสดุ

เพลทเลียงเชื้อ
 กระบอกตวง ขนาด 10, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร
 กลองโพนใส่น้ำแข็ง
 กระดาษติดฉลาก
 กลองพลาสติก
 ขวดสำหรับใส่สารเคมี
 ถุงมือยาง (Latex gloves)
 ถุงพลาสติก
 ที่วางหลอดทดลอง สำหรับหลอดขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
 แ่่งแก้วสำหรับคนสาร
 ปีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100, 200, 500, 1000 มิลลิลิตร
 พาราฟิล์ม (Parafilm)
 ไม้จิ้มฟัน
 หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิด (microtube) ขนาด 0.1, 0.5, 1.5 มิลลิลิตร
 cryo tube (nunc)
 แผ่นพลาสติกอย่างบาง
 สำลี
 หน้งยาง

สารเคมี

1. สารเคมีทั่วไป

absolute ethanol (Merck)

agarose, low gelling temperature (CAMBREX)

agarose (1 st BASE)

boric acid (Sigma)

cleaning solution (ICN Biomedicals)

disodium ethylenediamine tetracetic acid (EDTA, Promega)

double distilled water

ethidium bromide (Bio Rad)

glycerol

TE Buffer (Promega)

Tris Base (Promega)

LB (Merck)

2. สารเคมีที่เป็น Reagent Kit

QIAGEN Stool Extraction Kit

QIAGEN DNA Purification Kit

QIAGEN DNA Plasmid Mini Kit

QIAGEN Gel Extraction Kit

Cloning Kit (Promega)

PCR reagent Kit

ABI3100 Prism Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

3. เอนไซม์

proteinase K

Ex *Taq* polymerase

rTaq polymerase

T4 DNA ligase

4. Oligonucleotides

GBGDF0 : 5'-ACCCGTACGCTCACCCAGAC-3'

GBGDF1 : 5'-ACCCAGACGATGGACAAGC-3'

G376 : 5'- CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3'

GBGDR0 : 5'-GATCTTCGAGACGACGTCCT-3'

5. ดีเอ็นเอมาตรฐาน

Ladder 50 bp marker

การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

ตัวอย่างอุจจาระที่นำมาใช้ในการศึกษาค้างนี้ เป็นตัวอย่างที่ได้จากการเก็บอุจจาระผู้ป่วย จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งทำการตรวจวินิจฉัย ณ ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา ชั้น 4 ตึก ภปร. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเป็นตัวอย่างที่ตรวจพบปรสิต *G. lamblia* และตัวอย่างบางส่วนได้จากการเก็บตัวอย่างในแหล่งชุมชนบ้านท่าสองยาง จังหวัดตาก

ขั้นตอนการเก็บอุจจาระนักเรียนเริ่มจากการเก็บอุจจาระสดลงในกระปุกสำหรับเก็บอุจจาระ พร้อมทั้งบันทึกประวัติ ซึ่งประกอบด้วย เพศ อายุ ชั้นเรียน จากนั้นแบ่งอุจจาระสดส่วนหนึ่งผสมกับ 10% formaldehyde แล้วคนให้เข้ากันเพื่อรักษาสภาพของเชื้อปรสิตในอุจจาระ นำอุจจาระที่คนจนเข้ากันดีแล้วใส่กระปุก ปิดฝาให้แน่นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยอุจจาระส่วนนี้จะใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อปรสิตขั้นต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ สำหรับอุจจาระอีกส่วนหนึ่งที่เหลือจะเก็บโดยคงสภาพอุจจาระสดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาระหว่างนำสู่ห้องปฏิบัติการ โดยเมื่อถึงห้องปฏิบัติการแล้วจะนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในกระบวนการทางอณูชีววิทยาต่อไป

วิธีการนับจำนวนปรสิต *Giardia lamblia*

ทำการตรวจวินิจฉัยหาปรสิต *G. lamblia* จากตัวอย่างอุจจาระ โดยการใช้เครื่องมือตรวจนับจำนวน cyst หรือ Hematocytometer และทำการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย objective lens 10x ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา ชั้น 18 ตึก อปร. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

การทำให้ cyst ของ *G. lamblia* แยกตัว (Freeze Thaw)

1. นำอุจจาระ 500 ไมโครลิตร มาปั่นล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS 500 ไมโครลิตร ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง
2. เติมบัฟเฟอร์ ASL 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ cryo tub สำหรับทำ Freeze thaw
3. นำตัวอย่างอุจจาระที่อยู่ในหลอด cryo tube แช่ในไนโตรเจนเหลว 1 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดทันทีเป็นเวลา 1 นาที ทำเช่นนี้ 6 รอบ

การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอของ QIAGEN DNA Stool Mini kit

1. ดูดตัวอย่างอุจจาระที่ผ่านการทำ Freeze Thaw แล้ว ใสลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ ASL 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูดสารละลายใส่ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่ แล้วเติม Inhibit Ex tablet นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที
3. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm 3 นาที แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่ ปั่นที่ 13000 rpm 3 นาที อีกครั้ง
4. ดูดสารละลายที่ได้มา 200 ไมโครลิตร ใสลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Proteinase K 15 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ AL 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. เติม ethanol (95%) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. ดูดสารละลายในหลอด ใสลงใน QIAamp Spin Column แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่
7. เติม บัฟเฟอร์ AW1 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่
8. เติม บัฟเฟอร์ AW2 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่ นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

9. นำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่ เติม บัฟเฟอร์ AE แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
10. ดูดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดกลาง 0.5 มิลลิลิตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำ PCR ต่อไป

การออกแบบ oligonucleotides สำหรับใช้เป็น PCR Primer

ทำการออกแบบไพรเมอร์จากดีเอ็นเอต้นแบบของ *G. lamblia* สายพันธุ์ Portland1 จาก Genbank Database accesses number X85958 คัดเลือกบริเวณที่เหมาะสม ทำการออกแบบ primer โดยคำนวณจากสูตรอุณหภูมิหลอมตัว (Melting temperature, T_m) ของ primer

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

ข้อควรระวังในการออกแบบ primer คือ

1. ต้องคำนึงถึงความยาวของ primer ซึ่งควรมีความยาว 20-30 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยเบสชนิด guanine และ cytosine ประมาณร้อยละ 50-60 ขึ้นไป และมีการกระจายตัวของเบสต่างๆ เหมือนกันกับลำดับเบสที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน
2. ควรหลีกเลี่ยงการใช้ primer ที่มี polypurines หรือ polypyrimidine
3. ในส่วนบริเวณปลาย 3' ของ primer ไม่ควรมีลำดับเบสที่เป็น complementary กัน เพื่อป้องกันการจับคู่กันเองของ primer (primer-dimer)
4. การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer แต่ละส่วนไม่ควรมีลำดับเบสที่เหมือนกันเมื่ออ่านจากทิศทาง 5' ไปทาง 3' และ 3' ไปทาง 5' เพื่อป้องกันปลาย 3' งอมาจับกับ primer สายเดียวกันเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure)
5. ค่า T_m ของ primer ควรใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วง 50-80 องศาเซลเซียส

- GBGDF0 5'- ACCCGTACGCTCACCCAGAC-3'
(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 791-810 ของสายพันธุ์ Portland1
accesses number X85958)
- GBGDF1 5'- ACCCAGACGATGGACAAGC-3'
(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 803-821 ของ สายพันธุ์ Portland1
accesses number X85958)
- G376 5'- CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3'
(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1187-1215 ของสายพันธุ์ Portland1
accesses number X85958)
- GBGDR0 5'- GATCTTCGAGACGACGTCCT-3'
(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1539-1558 ของสายพันธุ์ Portland1
accesses number X85958)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองจะทำสองรอบ (nested PCR) โดยรอบแรกนำดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับทำ PCR โดยจะต้องใช้องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ประกอบด้วยดีเอ็นเอที่สกัดไว้ 5 ไมโครลิตร, primer ทั้ง forward และ reverse ความเข้มข้น 30 พิโคโมล primer ละ 0.14 ไมโครลิตร, 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1.6 ไมโครลิตร เพื่อเป็นสารตั้งต้นของการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์, Ex Taq DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา และน้ำกลั่น 11.02 ไมโครลิตร นำหลอดที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสายที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที, ขั้นตอนการทำให้ primer จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 0.3 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที ซึ่งทำปฏิกิริยาทั้งหมด 40 รอบ

2. พีซีอาร์รอบที่ 2 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากรอบแรกมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับทำ PCR ในรอบที่ 2 โดยใช้พีซีอาร์โปรโตคอลรอบแรก 2 ไมโครลิตร, primer ทั้ง forward และ reverse อย่างละ 0.14 ไมโครลิตร, 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1.6 ไมโครลิตร เพื่อเป็นสารตั้งต้นของการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์, Ex Taq DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยา และน้ำกลั่น 14.02 ไมโครลิตร นำหลอดที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วย ขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสายที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที, ขั้นตอนการทำให้ primer จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 3 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ซึ่งทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ

การตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี gel electrophoresis

1. เตรียมอะกาโรสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน 1 X TBE 100 มิลลิลิตร ภายหลังจากการหลอม gel ด้วยความร้อนแล้วปล่อยให้แข็งตัวในถาดเตรียม gel แล้ว นำ gel มาใส่ใน electrophoresis chamber
2. นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมของ 2 % อะกาโรสเจล ซึ่งใช้ Ladder 50 bp เป็นดีเอ็นเอบอกขนาด (DNA marker) เพื่อใช้เปรียบเทียบขนาดกับผลิตภัณฑ์ PCR
3. เดินกระแสไฟฟ้าภายใต้กระแสขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำอะกาโรสเจลไปย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide 15 นาที
4. นำไปดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต และถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาด

วิธีการทำโคลน (subclone)

1. การคัดแยกดีเอ็นเอที่ใช้ QIAGEN Gel extraction kit

- 1.1 นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำ gel electrophoresis โดยใช้เจลแบบ low melting จากนั้นตัดชิ้นส่วนของอะกาโรสเจลบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วบันทึกน้ำหนักของชิ้นเจลที่ได้
- 1.2 เติม QG-buffer 3 ส่วน ต่อปริมาณเจล 1 ส่วน (1 มิลลิกรัม = 1 ไมโครลิตร)
- 1.3 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 10 นาที จนชิ้นเจลละลาย
- 1.4 ถ่ายสารละลายใส่ spin column ที่ประกอบกับ collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm 1 นาที
- 1.5 ทิ้งสารละลายใน collection tube จากนั้นเติม QG-buffer 500 ไมโครลิตร ลงใน spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm 1 นาที
- 1.6 ทิ้งสารละลายใน collection tube จากนั้นเติม PE-buffer 750 ไมโครลิตร ลงใน spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm 1 นาที
- 1.7 ทิ้งสารละลายใน collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm 1 นาที
- 1.8 เติม EB-buffer 30 ไมโครลิตรลงใน spin column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm 1 นาที
- 1.9 คัดดีเอ็นเอที่ได้ใส่ในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปเชื่อมเข้าสู่พลาสมิดในขั้นตอนต่อไป

2. การเชื่อมชิ้นส่วนเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด (Ligation)

- 2.1 เติม 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase ลงในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2.2 เติม pGEM[®]-T Easy Vector ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
- 2.3 เติมดีเอ็นเอที่คัดแยกออกจากอะกาโรสเจลปริมาณ 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 2.4 เติม T4 DNA Ligase ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
- 2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง

3. การตกตะกอนดีเอ็นเอลูกผสม

3.1 เติม 100% ethanol + 3 M sodium acetate ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ลงในดีเอ็นเอที่ทำกรเชื่อมต่อกับพลาสติก ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

3.2 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที

3.3 ดูดของเหลวทิ้งอย่างเบามือโดยระวังไม่ให้ดีเอ็นเอที่ติดกันหลุดหลุดออก

3.4 เติม cold 70% ethanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.5 ดูดของเหลวทิ้งโดยเหลือไว้ประมาณ 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2 นาที

3.6 ดูดของเหลวทิ้งจนหมดโดยไม่ให้ดีเอ็นเอที่ติดกันหลุดหลุดออก

3.7 ตากดีเอ็นเอบริเวณกันหลุดให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ต้องปิดฝาหลอด

3.8 เติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การจำลองดีเอ็นเอลูกผสมและการคัดเลือก

4.1 นำดีเอ็นเอลูกผสมปริมาณ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ *Escherichia coli* ที่ผ่านกระบวนการทำให้เป็น competent cell ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ถ่ายลงสู่ cuvette ที่แช่ในน้ำแข็งจนเย็นจัด

4.2 ผ่านกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 1.8 กิโลโวลต์ สู่ cuvette

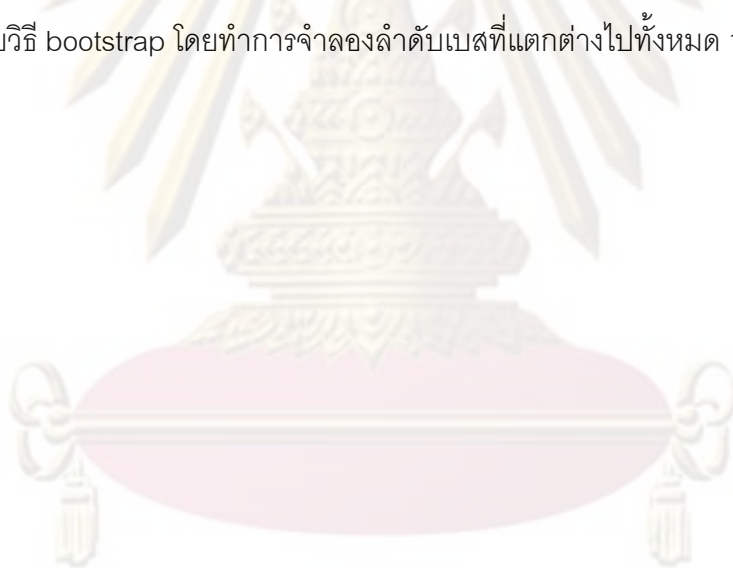
4.3 ดูดเชื้อทั้งหมดใน cuvette ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเชื้อภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.4 นำเชื้อที่ได้ประมาณ 200-300 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงบนเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ผสม ampicillin ปั่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.5 คัดเลือกโคโลนีของเชื้อด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GBGDF1 และ GBGDR0 จากนั้นตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาด้วยวิธี gel electrophoresis

การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

เป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (automated DNA sequencing) เป็นวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการของ dideoxy chain termination แตกต่างกันตรงที่การติดฉลากดีเอ็นเอ จะใช้สารเรืองแสง เช่น dRhodamine dye terminator แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี โดยอาศัยการติดตามการเรืองแสงของสีต่างๆ กัน 4 ชนิด สำหรับเบส 4 ตัว คือ A C G T สีที่ใช้ในการติดฉลากแต่ละตัว เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ จะเรืองแสงในช่วงความยาวคลื่นแตกต่างกัน และแสงที่ปรากฏจะแตกต่างกัน โดยจะเห็นเป็นสีเขียว สีดำ สีน้ำเงิน และสีแดง ตามลำดับ ด้วยเครื่อง ABI3100 Genetic Analyzer เมื่อได้ผลของลำดับเบสทั้งหมดของยีน beta-girardin gene นำมาศึกษาลำดับเบสโดยการทำให้ alignment ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Bioedit และ Clustal X เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับเบสที่เกิดขึ้นใน beta-girardin gene สำหรับการสร้าง phylogenetic tree อาศัยหลักการ neighbor-joining และใช้ parameter ของ Juke และ Cantor ระดับความเชื่อมั่นของการแยกสายพันธุกรรมทดสอบโดยวิธี bootstrap โดยทำการจำลองลำดับเบสที่แตกต่างไปทั้งหมด 1,000 ครั้ง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การจำแนกสายพันธุ์ *Giardia lamblia* โดยวิธี PCR-RFLP

1. การจำแนกสายพันธุ์ *G. lamblia* ในแต่ละ Assemblage

1.1 นำผลิตภัณฑ์ซีอาร์โปรดักต์ที่ได้จากไพรเมอร์ GBGDF0 และ GBGDR0 มาทำ semi-nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GBGDF1 และ GBGDR0 โดยองค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ประกอบด้วยดีเอ็นเอที่สกัดไว้ 2 ไมโครลิตร, primer ทั้ง forward และ reverse ความเข้มข้น 30 พิโคโมล primer ละ 0.14 ไมโครลิตร, 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1.6 ไมโครลิตร เพื่อเป็นสารตั้งต้นของการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์, Ex Taq DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยา และน้ำกลั่น 14.02 ไมโครลิตร นำหลอดที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสายที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที, ขั้นตอนการทำให้ primer จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 0.3 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที ซึ่งทำปฏิกิริยาทั้งหมด 40 รอบ

1.2 นำผลิตภัณฑ์ซีอาร์โปรดักต์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

1.3 จากนั้นทำการตรวจผลผลิต PCR โดยวิธี gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3 ใน 1 X TBE 100 มิลลิลิตร

1.4 นำผลผลิต PCR ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมของ 3 % อะกาโรสเจล ซึ่งใช้ marker Ladder 50 bp เป็นดีเอ็นเอบอกขนาด (DNA marker) เพื่อให้เปรียบเทียบขนาดกับผลผลิต PCR

1.5 เดินกระแสไฟฟ้าภายใต้กระแสขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 100 นาที หลังจากนั้นนำอะกาโรสเจลไปย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide 15 นาที

1.6 นำไปดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต และถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอผลผลิต โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาด

2. การจำแนกสายพันธุ์ *Giardia lamblia* ภายใน Assemblage A

2.1 นำตัวอย่างที่ทำการทดสอบด้วยเอนไซม์ *HaeIII* แล้วพบว่าเป็น Assemblage A มาทำการทดสอบ โดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้จากรอบแรก (ไพรเมอร์ GBGDF1 และ GBGDR0) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับทำ PCR ในรอบที่ 2 โดยใช้พีซีอาร์โปรดัคต์รอบแรก 3 ไมโครลิตร, primer (G376 และ GBGDR0) ทั้ง forward และ reverse อย่างละ 0.14 ไมโครลิตร, 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1.6 ไมโครลิตร เพื่อเป็นสารตั้งต้นของการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์, *Ex Taq* DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยา และน้ำกลั่น 13.02 ไมโครลิตร นำหลอดที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสายที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที, ขั้นตอนการทำให้ primer จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 3 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ซึ่งทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ

2.2 นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โปรดัคต์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ *Hha I* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.3 จากนั้นทำการตรวจผลผลิต PCR โดยวิธี gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3 ใน 1 X TBE 100 มิลลิลิตร

2.4 นำผลผลิต PCR ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมของ 3 % อะกาโรสเจล ซึ่งใช้ marker Ladder 50 bp เป็นดีเอ็นเอบอกขนาด (DNA marker) เพื่อให้เปรียบเทียบขนาดกับผลผลิต PCR

2.5 เดินกระแสไฟฟ้าภายใต้กระแสขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 100 นาที หลังจากนั้นนำอะกาโรสเจลไปย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide 15 นาที

2.6 นำไปดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต และถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอผลผลิต โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาด

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ตัวอย่างอุจจาระที่พบเชื้อ *G. lamblia* และนำมาศึกษาในครั้งนี้จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยมีจำนวน 22 ตัวอย่างที่ทำการเก็บรวบรวมระหว่างปี ค.ศ. 2550 จากพื้นที่ อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก ได้แก่ ตัวอย่าง GL5, GL25, GL34, GL44, GL88, GL107, GL110, GL121, GL144, GL158, GL253, GL279, GL308, GL309, GL402, GL448, GL518, GL719, GL724, GL751, GL773 และ GL784 นอกจากนี้ ยังมีตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยที่พบเชื้อที่มารับการตรวจรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2549-2550 จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่าง GLA2, GLA9, GLA20, GLH13, GLH15, GLH20, GLT1 และ GLT2

ในส่วนของตัวอย่างที่ได้จาก จ.ตาก เป็นตัวอย่างจากเด็กนักเรียน เพศชาย 10 คนและเพศหญิง 12 คน อายุเฉลี่ย 9 ปี สำหรับตัวอย่างที่ได้จาก รพ.จุฬาลงกรณ์ ได้จากผู้ป่วยที่เป็นผู้ใหญ่ทั้งหมด อายุเฉลี่ย 36 ปี เป็นเพศชาย 4 คน และ เพศหญิง 4 คน โดยตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่างเป็นสัญชาติไทย 17 คน และสัญชาติกะเหรี่ยง 13 คน พบว่าผู้ป่วยทั้งหมดมีอาการท้องเสีย 1 ครั้ง หรือมากกว่านี้ แต่ไม่มีอาการท้องเสียเรื้อรัง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

Sample	ต.ย. จาก	เพศ	อายุ	สัญชาติ	ส่วนสูง	น้ำหนัก
GLA2	รพ.จุฬาราช	ช.	39	ไทย	165	62
GLA9	รพ.จุฬาราช	ญ.	44	ไทย	155	49
GLA20	รพ.จุฬาราช	ญ.	31	ไทย	163	52
GLH13	รพ.จุฬาราช	ช.	28	ไทย	175	69
GLH15	รพ.จุฬาราช	ช.	35	ไทย	168	64
GLH21	รพ.จุฬาราช	ญ.	42	ไทย	156	53
GLT1	รพ.จุฬาราช	ช.	22	ไทย	178	62
GLT2	รพ.จุฬาราช	ญ.	48	ไทย	164	54
GL5	บ้านแม่จวาง	ญ.	7	กระเหรี่ยง	113	14
GL25	บ้านที่ซอแม	ช.	7	กระเหรี่ยง	110	16
GL34	บ้านที่ซอแม	ญ.	7	ไทย	113	16
GL44	บ้านที่ซอแม	ญ.	7	กระเหรี่ยง	116	17
GL88	บ้านที่ซอแม	ช.	10	กระเหรี่ยง	131	28
GL253	บ้านที่ซอแม	ญ.	10	กระเหรี่ยง	125	24
GL107	บ้านที่ซอแม	ญ.	8	ไทย	121	22
GL110	บ้านที่ซอแม	ญ.	10	ไทย	124	27
GL121	บ้านที่ซอแม	ช.	8	กระเหรี่ยง	125	21
GL144	บ้านที่ซอแม	ช.	10	กระเหรี่ยง	130.5	27
GL158	บ้านที่ซอแม	ญ.	9	กระเหรี่ยง	116	21
GL279	บ้านที่ซอแม	ญ.	12	ไทย	146	41
GL308	บ้านที่ซอแม	ช.	13	กระเหรี่ยง	139	32
GL309	บ้านที่ซอแม	ช.	13	ไทย	140	35
GL402	บ้านที่ซอแม	ญ.	14	กระเหรี่ยง	152	50
GL448	บ้านที่ซอแม	ญ.	15	ไทย	148	52
GL518	บ้านที่ซอแม	ญ.	11	ไทย	144	35
GL719	บ้านที่ซอแม	ช.	8	กระเหรี่ยง	119	23
GL724	บ้านแม่จวาง	ช.	7	กระเหรี่ยง	120	23
GL751	บ้านที่ซอแม	ช.	8	ไทย	125	20
GL773	บ้านแม่จวาง	ญ.	11	กระเหรี่ยง	132	28
GL784	บ้านแม่จวาง	ช.	5	ไทย	100	14

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน beta-giardin gene โดยอาศัยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน beta-giardin โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จากการทำ nested PCR โดยใช้ primer GBGDF0, GBGDR0 และ primer GBGDF1, GBGDR0 ซึ่งครอบคลุมยีน beta-giardin จากการวิเคราะห์ผลผลิต PCR จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 2 และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดคือ Ladder 50 bp พบว่าผลผลิตที่นำมาวิเคราะห์มีขนาดประมาณ 756 bp ซึ่งเป็นขนาดที่อยู่ในช่วงที่ต้องการศึกษา



ภาพที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เรียงตามหมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 คือ ตัวอย่าง GL110, GL253, GL308, GLA9, GLH13 และ GLH20 ตามลำดับ และตัวอักษร M คือดีเอ็นเอบอกขนาด (Ladder 50 bp)

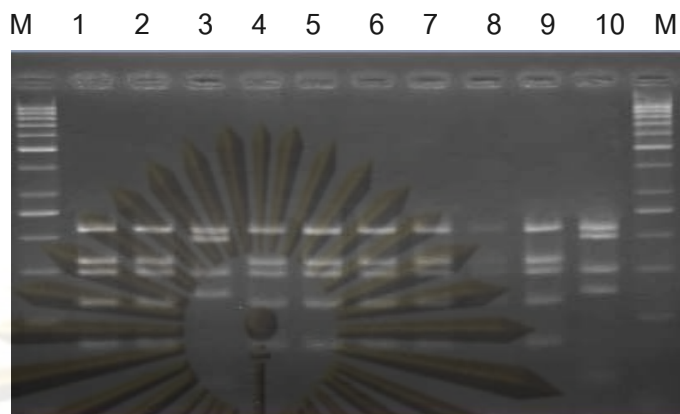
ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ *Giardia lamblia* โดยเทคนิค PCR-RFLP

การจำแนกสายพันธุ์ *G. lamblia* ในแต่ละ Assemblage พบว่าเมื่อนำผลผลิต PCR 756 bp. จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง มาทำการตัดด้วย restriction enzyme *HaeIII* พบว่า 12 ตัวอย่าง เป็น Assemblage A โดยมีขนาดของดีเอ็นเอที่ถูกตัด 217, 201, 150, 126 และ 62 bp. ได้แก่ตัวอย่างจาก จ.ตาก 14 ตัวอย่าง คือ GL5, GL25, GL34, GL44, GL88, GL107, GL121, GL144, GL253, GL279, GL518, GL719, GL773 และ GL751 และ 4 ตัวอย่างได้จาก รพ.จุฬาฯ คือ GLA20, GLH15, GLH21 และ GLT1 โดยมีขนาดของดีเอ็นเอที่ถูกตัด 217, 164, 150, 117, 84 และ 24 bp

การจำแนกสายพันธุ์ *G. lamblia* ในแต่ละ subassemblage พบว่าเมื่อนำผลผลิต PCR 372 bp. จาก Assemblage A ทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ได้แก่ GL110, GL158, GL308, GL309, GL402, GL448, GL724, GL784, GLA20, GLH15, GLH21 และ GLT1 มาตัดด้วย restriction enzyme *HhaI* พบว่าทุกตัวอย่างสามารถจำแนกได้เป็น subassemblage A2/A3 โดยมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 210, 70, 55 และ 37 bp. ข้อมูลสรุปแล้วใน ตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ *G. lamblia* โดยวิธี PCR-RFLP

Method	Assemblage	No. isolate/clone	isolate/clone code
<i>HaeIII</i> digested	A	12	GL110, GL158, GL308, GL309, GL402, GL448, GL724, GL784, GLA20, GLH15, GLH21 and GLT1
	B	18	GL5, GL25, GL34, GL44, GL88, GL107, GL121, GL144, GL253, GL279, GL518, GL719, GL751, GL773, GLA2, GLA9, GLH13 and GLT2
<i>HhaI</i> digested	A2/A3	12	All isolates in Assemblage A



ภาพที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP จากการตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII* โดยวิธี agarose gel electrophoresis เรียงตามหมายเลข 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 คือ ตัวอย่าง GL121, GL253, GL110, GL88, GL144, GL44, GL751, GL25, GL5 และ GL309 ตามลำดับ และตัวอักษร M คือดีเอ็นเอบอกขนาด (Ladder 50 bp)



ภาพที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ *HhaI* โดยวิธี agarose gel electrophoresis หมายเลข 1, 2, 3, 4 และ 5 คือ ตัวอย่าง GL448, GL158, GL724, GLH15 และ GLH21 ตามลำดับและตัวอักษร M คือดีเอ็นเอบอกขนาด (Ladder 50 bp)

การวิเคราะห์ลักษณะอัลลีลที่พบทั้งหมดของยีน beta-giardin gene

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง โดยทำการศึกษาตัวอย่างละ 10 โคลน พบว่าใน Assemblage A จำนวนทั้งหมด 17 โคลน มีความแตกต่างกัน 8 อัลลีล โดยอัลลีลที่ 1 และ 2 พบได้มากที่สุดคือ 7 โคลน ได้แก่ GL88 (clone a), GL110, GL158, GL308, GL309, GLH15 และ GLH21 และ 4 โคลน ได้แก่ GL402, GL448, GL724, GL784 (clone e) คิดเป็นร้อยละ 41.17 และ 23.53 ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

สำหรับใน Assemblage B พบความแตกต่างของอัลลีล 56 แบบ ในจำนวน 62 โคลน ตามตารางที่ 8 โดยอัลลีลที่ 1 พบได้มากที่สุด 3 โคลน คือ GL121 (clone e), GL518 (clone b) และ GL773 (clone d) รองลงมา มี 2 โคลน ได้แก่ อัลลีลที่ 2 ได้แก่ GL107 (clone c) และ GL719 (clone c) อัลลีลที่ 3 ได้แก่ GL25 (clone c) และ GL121 (clone d) และอัลลีลที่ 4 ได้แก่ GL144 (clone e) และ GL518 (clone e) คิดเป็นร้อยละ 4.83 และ 3.22 ตามลำดับ

ตารางที่ 7 แสดงลักษณะอัลลีลที่พบทั้งหมดของยีน beta-giardin ใน Assemblage A

อัลลีล	ตัวอย่าง
1	GLH15, GLH21, GL88 (clone a), GL110, GL158, GL308 และ GL309
2	GL402, GL448, GL724, GL784 (clone e)
3	GLA20
4	GLT1
5	GL784 (clone a)
6	GL784 (clone b)
7	GL784 (clone c)
8	GL784 (clone d)

ตารางที่ 8 แสดงลักษณะอัลลีลที่พบทั้งหมดของยีน beta-giardin ใน Assemblage B

อัลลีล	ตัวอย่าง	อัลลีล	ตัวอย่าง
1	GL773 (clone d), GL121 (clone e), GL518 (clone b)	29	GL121 (clone c)
2	GL719 (clone c), GL107 (clone c)	30	GL518 (clone a)
3	GL121 (clone d), GL25 (clone c)	31	GL518 (clone c)
4	GL144 (clone e), GL518 (clone e)	32	GL518 (clone d)
5	GL5, GL44	33	GL34 (clone a)
6	GLA20	34	GL34 (clone b)
7	GLH13	35	GL34 (clone c)
8	GLT2	36	GL34 (clone d)
9	GL279	37	GL34 (clone e)
10	GL773 (clone a)	38	GL719 (clone a)
11	GL773 (clone b)	39	GL719 (clone b)
12	GL773 (clone c)	40	GL719 (clone d)
13	GL773 (clone e)	41	GL144 (clone a)
14	GL253 (clone a)	42	GL144 (clone b)
15	GL253 (clone b)	43	GL144 (clone c)
16	GL253 (clone c)	44	GL144 (clone d)
17	GL253 (clone d)	45	GL88 (clone b)
18	GL253 (clone e)	46	GL88 (clone c)
19	GL25 (clone a)	47	GL88 (clone d)
20	GL25 (clone b)	48	GL88 (clone e)
21	GL25 (clone d)	49	GL751 (clone a)
22	GL25 (clone e)	50	GL751 (clone b)
23	GL107 (clone a)	51	GL751 (clone c)
24	GL107 (clone b)	52	GLA9 (clone a)
25	GL107 (clone c)	53	GLA9 (clone b)
26	GL107 (clone d)	54	GLA9 (clone c)
27	GL121 (clone a)	55	GLA9 (clone d)
28	GL121 (clone b)	56	GLA9 (clone e)

การจำแนก Assemblage โดยอาศัยการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของ *G. lamblia*
(Phylogenetic analysis of *G. lamblia*)

ในการวิเคราะห์ทางด้านสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของ *G. lamblia* โดยทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นที่อยู่ใน Genbank ซึ่งเป็นตัวแทนของสายพันธุ์ Assemblage A และ B สำหรับการสร้าง phylogenetic tree ของยีน beta-girdin โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining บนพื้นฐาน parameter ของ Juke และ Cantor ระดับความเชื่อมั่นของการแยกสายพันธุ์กรรมทดสอบโดยวิธี bootstrap โดยทำการจำลองลำดับเบสที่แตกต่างกันไปทั้งหมด 1,000 ครั้ง พบว่าตัวอย่างที่ทำการศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

จากรูปที่ 10 แสดงให้เห็นถึงผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของ *G. lamblia* ของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด จะเห็นได้ว่าแขนงของ phylogenetic tree ทางด้านบนสุดเป็นของ cluster subassemblage B6 (AY647265) ซึ่งประกอบไปด้วย 14 ตัวอย่าง ดังนี้ GL34 (clone c), GL518 (clone c), GL25 (clone a), GL34 (clone e), GL25 (clone d), GL144 (clone d), GL34 (clone a), GL144 (clone a), GLA2, GL34 (clone b), GL25 (clone c), GL121 (clone d), GL144 (clone e) และ GL518 (clone e) อย่างไรก็ตามพบว่ามีกลุ่มตัวอย่างที่อยู่ใกล้เคียงกับ subassemblage B6 แต่ว่ามีแขนงแตกย่อยออกมา ประกอบด้วย 6 ตัวอย่าง ดังนี้ GL88 (clone b), GL88 (clone e), GL88 (clone c), GL88 (clone d), GL144 (clone c) และ GL144 (clone b)

แขนงถัดมาจัดอยู่ใน cluster assemblage B1(AY072725) จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่าง GL253 (clone b), GL34 (clone d), GLT2, GL279, GL5 และ GL44 นอกจากนี้ยังพบว่ามีกลุ่มที่แตกแขนงออกมาจาก subassemblage B1 อีก 8 ตัวอย่าง ได้แก่ GL25 (clone e), GL253 (clone d), GL253 (clone a), GL253 (clone e), GL518 (clone d), GL773 (clone e), GL773 (clone c) และ GL773 (clone b) สำหรับใน cluster subassemblage B2 (AY072726) พบตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ 3 ตัวอย่าง คือ GL751 (clone a), GL751 (clone c) และ GL751 (clone b)

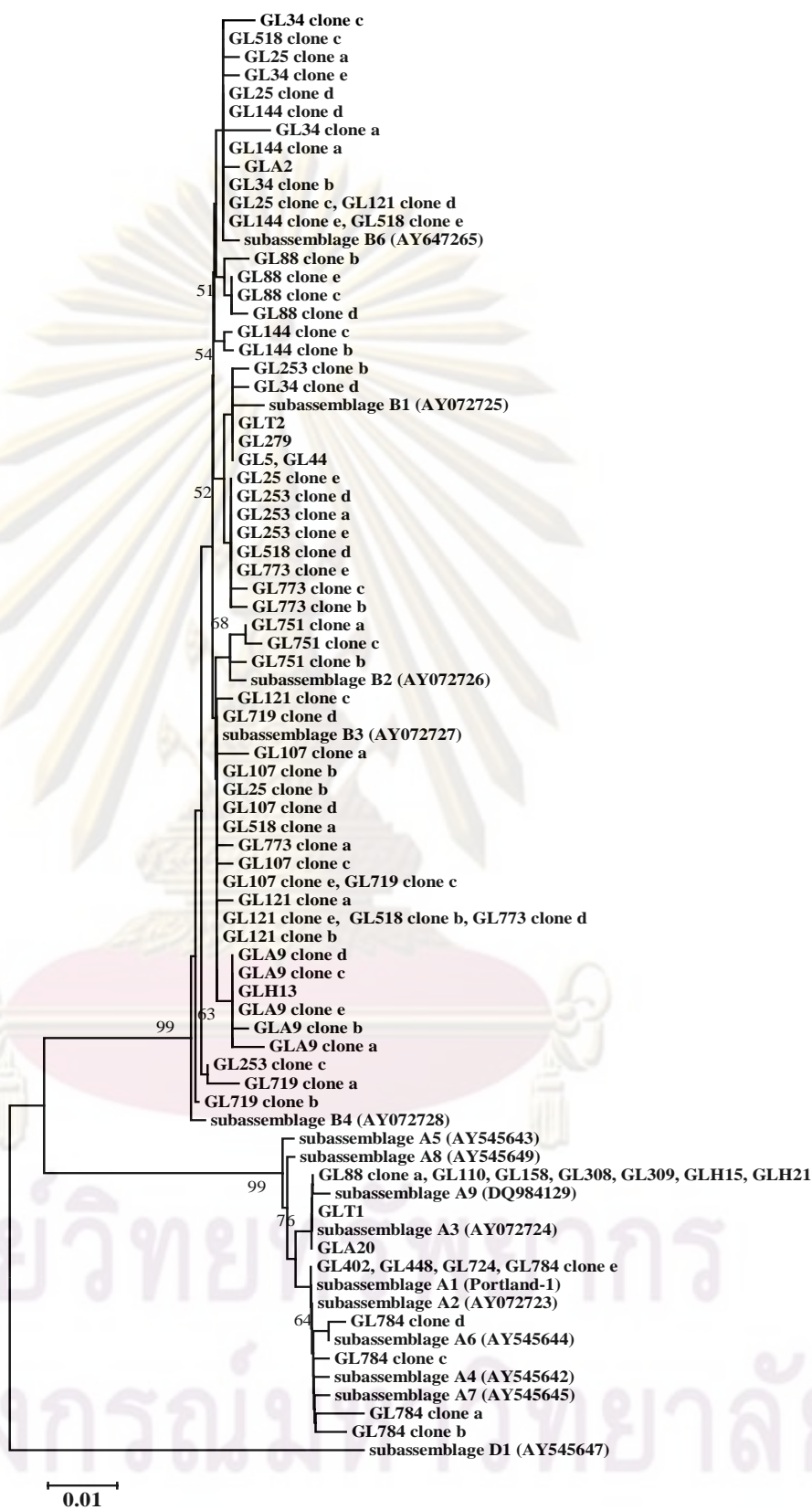
ส่วน cluster subassemblage B3 (AY072727) ถือว่ามีความใกล้เคียงกับ subassemblage B2 มากที่สุด รวมถึงยังพบว่าเป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและพบจำนวนตัวอย่างมากที่สุดในการศึกษานี้ โดยประกอบไปด้วยทั้งหมด 22 ตัวอย่าง ได้แก่ GL121 (clone c), GL719 (clone d), GL107 (clone a), GL107 (clone b), GL25 (clone b), GL107 (clone d), GL518 (clone a), GL773 (clone a), GL107 (clone c), GL107 (clone e), GL719 (clone c), GL121 (clone a), GL121 (clone e), GL518 (clone b), GL773 (clone d), GL121 (clone b), GLA9 (clone d), GLA9 (clone c), GLH13, GLA9 (clone e), GLA9 (clone b) และ

GLA9 (clone a) นอกจากนี้ยังพบแขนงกลุ่มย่อย 3 ตัวอย่าง คือ GL253 (clone c), GL719 (clone a) และ GL719 (clone b) ที่แตกแขนงออกมาและอยู่ใกล้ชิดกับ subassemblage B4 (AY072728)

สำหรับในกลุ่มตัวอย่างที่พบว่ามีความแตกต่างกับ subassemblage ต่างๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว เนื่องจาก phylogenetic tree มีแขนงแยกออกมาอย่างชัดเจน ได้แก่ assemblage A โดยการศึกษาในครั้งนี้ ไม่พบตัวอย่างที่จัดว่าอยู่ในกลุ่ม subassemblage A5 (AY545643) และ subassemblage A8 (AY545649) ส่วนใน subassemblage A9 (DQ984129) นั้น พบตัวอย่างที่จัดได้ว่าอยู่ในกลุ่มนี้ 7 ตัวอย่าง ได้แก่ GL88 (clone a), GL110, GL158, GL308, GL309, GLH15 และ GLH21 ส่วนตัวอย่าง GLT1 และ GLA20 พบว่ามีความใกล้ชิดกับ subassemblage A3 (AY072724) แขนงถัดมาประกอบด้วย subassemblage A1, A2, A4, A6 และ A7 พบว่าในกลุ่มเหล่านี้มีความใกล้ชิดกันทางด้านสายวิวัฒนาการสูงมาก สามารถจำแนกออกจากกันได้ยาก โดยพบว่าตัวอย่างที่สามารถจัดให้อยู่ในกลุ่มเหล่านี้ดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น ประกอบด้วย GL402, GL448, GL724, GL784 (clone e), GL784 (clone d), GL784 (clone c), GL784 (clone a) และ GL784 (clone b)

สำหรับ subassemblage D1 (AY545647) จากการศึกษาในตัวอย่างทั้งหมด ไม่พบว่ามีตัวอย่างที่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้เลย โดยกลุ่มดังกล่าวจะถูกแยกไว้ที่แขนงด้านล่างสุด ดังแสดงในรูปที่ 10

จะเห็นได้ว่าจากการศึกษาโดยการวิเคราะห์ทางด้านสายวิวัฒนาการจากตัวอย่างที่ได้จากประเทศไทยจำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง หรือจำนวน 79 clones/isolates แล้วนั้น พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ของ *G. lamblia* ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ assemblage A และ assemblage B ซึ่งตัวอย่างส่วนใหญ่พบว่าเป็น assemblage B โดยมีจำนวนทั้งหมด 62 clones/isolates และพบว่ามีจำนวน 17 isolates/clones เป็น assemblage A คิดเป็นร้อยละ 78.5 และ 21.5 ตามลำดับ



ภาพที่ 10 แสดงผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของ *G. lambia*

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง จำนวน 79 โคลน เปรียบเทียบกับยีน beta-giardin จาก X85958 และ AY072725 ซึ่งเป็นต้นแบบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *G. lamblia* Assemblage A และ B ตามลำดับ ที่เคยมีการศึกษา พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ในทุกตัวอย่างมีความยาว 756 bp เทียบเท่ากับกรดอะมิโน 252 ตัว จากการศึกษาพบว่าในตัวอย่างทั้งหมด 79 โคลน เป็น *G. lamblia* Assemblage A 17 โคลน ได้แก่ isolates/clones GL88 (clone a), GL110, GL158, GL308, GL309, GL402, GL448, GL724, GL784 (clone a, b, c, d and e), GLA20, GLH15, GLH21 และ GLT1 สำหรับ Assemblage B พบทั้งหมด 62 โคลน ได้แก่ isolates/clones GL5, GL44, GL25 (clone a, b, c, d and e), GL34 (clone a, b, c, d and e), GL88 (clone b, c, d and e), GL107 (clone a, b, c, d and e), GL121 (clone a, b, c, d and e), GL144 (clone a, b, c, d and e), GL253 (clone a, b, c, d and e), GL279, GL518 (clone a, b, c, d and e), GL719 (clone a, b, c, and d), GL751 (clone a, b and c), GL773 (clone a, b, c, d and e), GLA2, GLA9 (clone a, b, c, d and e), GLH13 และ GLT2 ดังตารางที่ 9

จากตารางที่ 10 แสดงตำแหน่งที่มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน beta-giardin พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน Assemblage A ทั้งหมด 17 ตำแหน่ง จำนวน 16 codon การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ อาจเปลี่ยนจากเบสชนิดพิวรีน (purine) คือ A และ G เป็นพิวรีนหรือชนิดไพริมิดีน (pyrimidin) คือ C และ T เป็นไพริมิดีน เรียกการแทนที่แบบนี้ว่า transition สำหรับการแทนที่โดยเปลี่ยนจากนิวคลีโอไทด์ชนิดพิวรีนไปเป็นไพริมิดีนหรือในทางตรงข้าม เรียกว่า transversion จากการวิเคราะห์การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว พบ transition 16 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 94.12 และ transversion 1 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 5.88 พบว่าในตำแหน่งที่ 576 และ 699 มีจำนวนตัวอย่างที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวถึง 17 ตัวอย่าง โดยที่ตำแหน่ง 576 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก T เป็น C ส่งผลให้ codon เปลี่ยนจาก AGT เป็น AGC โดย codon ทั้งสองชนิดนี้เป็นรหัสที่ใช้ในการสร้างกรดอะมิโน serine เหมือนกัน ดังนั้นเมื่อมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ตามลำดับดังกล่าว จึงไม่ทำให้ชนิดของกรดอะมิโนเปลี่ยนไป ที่ตำแหน่ง 699 เกิดการเปลี่ยนแปลงของ codon จาก GAA เป็น GAG โดยเกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน เนื่องจากทั้งสอง codon เป็นรหัสที่ใช้ในการสร้างกรดอะมิโน glutamic acid เหมือนกัน การเปลี่ยนแปลงของทั้งสองตำแหน่งนี้ พบในตัวอย่าง GLA20, GLH15, GLH21, GLT1, GL88 (clone a), GL110, GL158, GL308, GL309, GL402, GL448, GL724, GL784 (clone a), GL784 (clone b), GL784 (clone c), GL784 (clone d) และ GL784 (clone e)

การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไป (nonsynonymous) มีทั้งหมด 10 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 58.82 และการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนไม่เปลี่ยนแปลง (synonymous) มีทั้งหมด 7 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 41.18 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ชนิด transistion ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 มากกว่าตำแหน่งที่ 2 ของ codon ส่วนชนิด transversion พบที่ตำแหน่งที่ 2 เพียง codon เดียว (ตามภาพที่ 11)

สำหรับใน Assemblage B พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในทั้งหมด 72 ตำแหน่ง จำนวน 30 codon การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวพบ transition 68 ตำแหน่ง และ transversion 4 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 94.44 และร้อยละ 5.55 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ที่ตำแหน่ง 15, 30, 297 และ 408 เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในทุกตัวอย่างหรือในจำนวนทั้งหมด 62 isolates/clones ซึ่งในตำแหน่งที่ 15 พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ C เป็น T ส่วนอีกสามตำแหน่งที่เหลือเป็นการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ T เป็น C โดยทั้ง 4 ตำแหน่งดังกล่าวไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (ตามภาพที่ 12)

การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปมีทั้งหมด 40 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 55.6 และการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนไม่เปลี่ยนแปลง มีทั้งหมด 32 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 44.4 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ชนิด transistion ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 มากกว่าตำแหน่งที่ 2 ของ codon เช่นเดียวกับกับ Assemblage A ส่วนชนิด transversion พบทั้งหมด 4 codon และเป็นตำแหน่งที่ 2 ดังตารางที่ 11

ในการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ พบว่าการเกิด transversion ณ ตำแหน่งใดก็ตามของ codon จะพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนร่วมด้วยเสมอ สำหรับ transistion นั้นเมื่อเกิดขึ้นในตำแหน่งที่ 2 ของ codon จะมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเสมอ แต่ถ้าเกิดในตำแหน่งที่ 1 และ 3 จะไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงเสมอไป

ตารางที่ 9 แสดงผลการการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *G. lamblia*

Assemblage	No. isolate/clone	isolate/clone code
A	17	GL88 (clone a), GL110, GL158, GL308, GL309, GL402, GL448, GL724, GL784 (clone a, b, c, d and e), GLA20, GLH15, GLH21 and GLT1
B	62	GL5, GL44, GL25 (clone a, b, c, d and e), GL34 (clone a, b, c, d and e), GL88 (clone b, c, d and e), GL107 (clone a, b, c, d and e), GL121 (clone a, b, c, d and e), GL144 (clone a, b, c, d and e), GL253 (clone a, b, c, d and e), GL279, GL518 (clone a, b, c, d and e), GL719 (clone a, b, c and d), GL751 (clone a, b and c), GL773 (clone a, b, c, d and e), GLA2, GLA9 (clone a, b, c, d and e), GLH13 and GLT2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin ใน Assemblage A

Isolates	nucleotide position	codon	amino acid	type of nucleotide substitution	
GLT1	69	AG <u>I</u> AG <u>C</u>	Ser Ser	synonymous	transition
GL784 (clone c)	91	<u>C</u> TC I <u>T</u> C	Leu Phe	nonsynonymous	transition
GL784 (clone b)	103	<u>A</u> AC <u>G</u> AC	Asn Asp	nonsynonymous	transition
GLA20	113	G <u>I</u> C G <u>A</u> C	Val Asp	nonsynonymous	transversion
GL784 (clone a)	165	G <u>A</u> C G <u>A</u> I	Asp Asp	synonymous	transition
GL784 (clone b)	194	G <u>A</u> C G <u>G</u> C	Asp Gly	nonsynonymous	transition
GL784 (clone c)	304	<u>A</u> CG <u>G</u> CG	Thr Ala	nonsynonymous	transition
GL784 (clone d)	349	I <u>C</u> C <u>C</u> CC	Ser Pro	nonsynonymous	transition
GL784 (clone a)	386	G <u>A</u> G G <u>G</u> G	Glu Gly	nonsynonymous	transition
GL784 (clone a)	388	<u>A</u> CA <u>G</u> CA	Thr Ala	nonsynonymous	transition
GL308, GL158, GLH15, GLH21, GL309, GLT1, GL110, GLA20, GL88 (clone a)	460	<u>C</u> TG I <u>T</u> G	Leu Leu	synonymous	transition
GL308, GL158, GLH15, GLH21, GL309, GL110, GLT1, GLA20, GL88 (clone a)	468	G <u>A</u> I G <u>A</u> C	Asp Asp	synonymous	transition

ตารางที่ 10 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin ใน Assemblage A (ต่อ)

Isolates	nucleotide position	codon	amino acid	type of nucleotide substitution	
GL784 (clone b)	502	<u>A</u> GG <u>G</u> GG	Arg Gly	nonsynonymous	transition
GL784 (clone d)	536	<u>G</u> IC <u>G</u> CC	Val Ala	nonsynonymous	transition
GL308, GL158, GLH15, GLH21, GL309, GL110, GLA20, GLT1, GL448, GL724, GL402, GL784 (clone b), GL784 (clone a), GL784 (clone c), GL784 (clone d), GL784 (clone e), GL88 (clone a)	606	<u>A</u> GI <u>A</u> GC	Ser Ser	synonymous	transition
GL784 (clone a)	639	<u>A</u> AG <u>A</u> AA	Lys Lys	synonymous	transition
GL308, GL158, GLH15, GLH21, GL309, GL110, GL88 (clone a), GLA20, GLT1, GL448, GL724, GL402, GL784 (clone b), GL784 (clone a), GL784 (clone c), GL784 (clone d), GL784 (clone e)	729	<u>G</u> AA <u>G</u> AG	Glu Glu	synonymous	transition

* ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์นับจาก start codon ของ coding region gene ใน reference strain

X85958

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin ใน

Assemblage B

Isolate	nucleotide position	codon	amino acid	type of nucleotide substitution	
GL518 (clone a)	50	<u>CCC</u> <u>CIC</u>	Pro Leu	nonsynonymous	transition
All isolates in Assemblage B	54	<u>GAC</u> <u>GAT</u>	Asp Asp	synonymous	transition
GL5, GL44, GLT2, GLH13, GLA2, GL279, GL88 (clone b and e) GL773 (clones a, b, c, d and e) GL253 (clones a, b, c, d and e) GL25 (clones a, b, c, d and e) GLA9 (clones a, b, c, d and e) GL751 (clones a, b and c) GL121 (clones b, c, d and e) GL719 (clones a, b and d) GL34 (clones a, d and e)	63	<u>ACC</u> <u>ACI</u>	Thr Thr	synonymous	transition
All isolates in Assemblage B	69	<u>AGI</u> <u>AGC</u>	Ser Ser	synonymous	transition
GL107 (clone d)	73	<u>ACT</u> <u>GCT</u>	Thr Ala	nonsynonymous	transition
GL773 (clone b)	75	<u>ACI</u> <u>ACC</u>	Thr Thr	synonymous	transition
GLA9 (clone e)	81	<u>ACG</u> <u>ACA</u>	Thr Thr	synonymous	transition
GLA9 (clone c)	95	<u>AGC</u> <u>AAC</u>	Ser Asn	nonsynonymous	transition
GL751 (clone a)	100	<u>ATG</u> <u>GTG</u>	Met Val	nonsynonymous	transition
GL773 (clone a)	107	<u>CAG</u> <u>CGG</u>	Gln Arg	nonsynonymous	transition

ตารางที่ 11 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin ใน Assemblage B (ต่อ)

Isolate	nucleotide position	codon	amino acid	type of nucleotide substitution	
GL107 (clone b), GL719 (clone d)	118	<u>A</u> GG GG <u>G</u>	Arg Gly	nonsynonymous	transition
GL773 (clones a, b, c and e) GL253 (clones a, b and d) GLA9 (clones a, b, c, d and e) GLH13	129	G <u>A</u> C GAT <u>I</u>	Asp Asp	synonymous	transition
GL518 (clone d)	135	AT <u>G</u> ATA	Met Ile	nonsynonymous	transition
GL121 (clone b)	137	G <u>A</u> G GGG	Glu Gly	nonsynonymous	transition
GLA9 (clone d)	145	<u>A</u> TC GTC	Ile Val	nonsynonymous	transition
GL88 (clone e)	149	G <u>A</u> G GGG	Glu Gly	nonsynonymous	transition
GL715 (clones a and c)	162	G <u>T</u> C GT <u>I</u>	Val Val	synonymous	transition
GL34 (clone c)	164	G <u>A</u> C G <u>T</u> C	Asp Val	nonsynonymous	transversion
GL121 (clone c)	177	CG <u>I</u> CG <u>C</u>	Arg Arg	synonymous	transition
GLA2	180	GT <u>G</u> GT <u>A</u>	Val Val	synonymous	transition
GL107 (clone c)	194	G <u>A</u> C GG <u>C</u>	Asp Gly	nonsynonymous	transition
GL719 (clone a)	198	G <u>C</u> C G <u>C</u> I	Ala Ala	synonymous	transition
GL88 (clone b, c, d and e)	201	AT <u>C</u> AT <u>I</u>	Ile Ile	synonymous	transition

ตารางที่ 11 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin ใน Assemblage B (ต่อ)

Isolate	nucleotide position	codon	amino acid	type of nucleotide substitution	
GL751 (clone b)	207	<u>CAC</u> CAI	His His	synonymous	transition
GLH13, GLA2, GL253 (clone c), GL773 (clone a and d) GL751 (clone a, b and c) GL88 (clone b, c, d and e) GL25 (clone a, b, c and d) GL121 (clone a, b, c and d) GL518 (clone a, b, c and e) GL719 (clone a, b, c and d) GLA9 (clone a, b, c, d and e) GL107 (clone a, b, c, d and e)	210	<u>CTI</u> CTC	Leu Leu	synonymous	transition
GL773 (clone a)	224	<u>CAG</u> CCG	Gln Pro	nonsynonymous	transversion
GL253 (clone c) GL719 (clone a and b)	228	<u>ACA</u> ACG	Thr Thr	synonymous	transition
GL715 (clones a, b and c)	273	<u>GAA</u> GAG	Glu Glu	synonymous	transition
GLA9 (clone a)	275	<u>GIC</u> GCC	Val Ala	nonsynonymous	transition
GL34 (clone a)	290	<u>GAC</u> GGC	Asp Gly	nonsynonymous	transition
GL121 (clone a)	296	<u>AIG</u> ACG	Met Thr	nonsynonymous	transition
GL34 (clone a)	318	<u>GAG</u> GAA	Glu Glu	synonymous	transition

ตารางที่ 11 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin ใน Assemblage B (ต่อ)

Isolate	nucleotide position	codon	amino acid	type of nucleotide substitution	
All isolates in Assemblage B	327	AC <u>I</u> AC <u>C</u>	Thr Thr	synonymous	transition
GL144 (clone b and c)	328	A <u>T</u> G G <u>T</u> G	Met Val	nonsynonymous	transition
GLH13, GL144 (clone c) GL25 (clone b and e) GL88 (clone c, d and e) GL518 (clone a, b and d) GL719 (clone a, c and d) GL121 (clone a, b, c and e) GL773 (clone a, b, c and e) GL751 (clone a, b, c and d) GL523 (clone a, c, d and e) GLA9 (clone a, b, c, d and e) GL107 (clone a, b, c, d and e)	354	CT <u>I</u> CT <u>C</u>	Leu Leu	synonymous	transition
GL25 (clone a)	355	G <u>C</u> T A <u>C</u> T	Ala Thr	nonsynonymous	transition
GL751 (clone c)	365	G <u>G</u> C G <u>A</u> C	Gly Asy	nonsynonymous	transition
GL753 (clone b)	366	G <u>G</u> C G <u>G</u> I	Gly Gly	synonymous	transition
GL88 (clone b)	373	C <u>T</u> C I <u>T</u> C	Leu Phe	nonsynonymous	transition
GLA9 (clone b)	385	G <u>A</u> G A <u>A</u> G	Glu Lys	nonsynonymous	transition
GL34 (clone e)	394	C <u>T</u> C I <u>T</u> C	Leu Phe	nonsynonymous	transition

ตารางที่ 11 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin ใน Assemblage B (ต่อ)

Isolate	nucleotide position	codon	amino acid	type of nucleotide substitution	
All isolates in Assemblage B	438	CT <u>I</u> CT <u>C</u>	Leu Leu	synonymous	transition
GL719 (clone a)	453	CT <u>C</u> CT <u>I</u>	Leu Leu	synonymous	transition
GL107 clone a)	464	A <u>A</u> C A <u>G</u> C	Asn Ser	nonsynonymous	transition
GL88 (clone d)	481	A <u>T</u> C G <u>T</u> C	Ile Val	nonsynonymous	transition
GL34 (clone a)	483	A <u>T</u> C A <u>T</u> I	Ile Ile	synonymous	transition
GLA9 (clone a)	491	G <u>A</u> G G <u>G</u> G	Glu Gly	nonsynonymous	transition
GLH13, GLA9 (clone a, b, c, d and e)	495	A <u>A</u> C A <u>A</u> I	Asn Asn	synonymous	transition
GL34 (clone d)	496	G <u>C</u> C A <u>C</u> C	Ala Thr	nonsynonymous	transition
GL107 (clone a)	532	A <u>A</u> A G <u>A</u> A	Lys Glu	nonsynonymous	transition
GL773 (clone c)	538	G <u>C</u> A A <u>C</u> A	Ala Thr	nonsynonymous	transition
GL34 (clone c)	574	A <u>A</u> G G <u>A</u> G	Lys Glu	nonsynonymous	transition
GL253 (clone b)	588	G <u>C</u> C G <u>C</u> I	Ala Ala	synonymous	transition
GL773 (clone e)	610	A <u>C</u> A G <u>C</u> A	Ala Thr	nonsynonymous	transition
GL144 (clone c and d), GLA9 (clone d)	628	A <u>C</u> A G <u>C</u> A	Alc Thr	nonsynonymous	transition

ตารางที่ 11 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin ใน Assemblage B (ต่อ)

Isolate	nucleotide position	codon	amino acid	type of nucleotide substitution	
GL518 (clone c)	644	<u>G</u> IC G <u>A</u> C	Val Asp	nonsynonymous	transversion
GL253 (clone c, d and e)	645	G <u>T</u> C GT <u>I</u>	Val Val	synonymous	transition
GL5, GL44, GLA2, GLH13, GL279, GLT2, GL719 (clones a, b, c and d), GL107 (clones a, b, c, d and e), GL121 (clones a, b, c, d and e), GL25 (clones a, b, c, d and e), GL144 (clones b, c and d), GL518 (clones a, b, c, d and e), GL773 (clones a, b, c, d and e), GL253 (clones a, b, c, d and e), GL34 (clones a, b, c, d and e), GL88 (clones b, c, d and e), GL751 (clones b and c), GLA9 (clones a, b, c, d and e)	648	<u>G</u> AA G <u>A</u> G	Glu Glu	synonymous	transition
GL253 (clone c and d)	654	T <u>G</u> C T <u>G</u> I	Cys Cys	synonymous	transition
GL107 (clone c)	658	<u>A</u> AC G <u>A</u> C	Asn Asp	nonsynonymous	transition
GL773 (clone e)	659	<u>A</u> AC A <u>G</u> C	Asn Ser	nonsynonymous	transition
GL107 (clone d)	668	C <u>I</u> C C <u>A</u> C	Leu His	nonsynonymous	transversion
GLT2	684	T <u>C</u> G T <u>C</u> A	Ser Ser	synonymous	transition

ตารางที่ 11 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-giardin ใน Assemblage B (ต่อ)

Isolate	nucleotide position	codon	amino acid	type of nucleotide substitution	
GL25 (clone d)	693	CGC CGI	Arg Arg	synonymous	transition
GL279, GL25 (clone b and d), GL34 (clone b, d and e)	705	CGC CGI	Arg Arg	synonymous	transition
GL719 (clone a)	707	GAG GGG	Glu Gly	nonsynonymous	transition
GL751(clone a)	723	AAG AAA	Lys Lys	synonymous	transition
GL34 (clone c)	731	CGC CAC	Arg Gln	nonsynonymous	transition
GL144 (clone d)	734	AAG AGG	Lys Arg	nonsynonymous	transition
GL88 (clone c)	737	GAG GGG	Glu Gly	nonsynonymous	transition
GLA9 (clone a), GL34 (clone a)	757	AAC GAC	Asn Asp	nonsynonymous	transition
GLA9 (clone a and e)	762	ACA ACG	Thr Thr	synonymous	transition

* ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์นับจาก start codon ของ coding region gene ใน reference strain X85958

ภาพที่ 11 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และการแทนที่ของลำดับกรดอะมิโน
ใน Assemblage A

	111133334455667
Isolate/clone	69016904886603032 91335449680826699
X85958	TCATCAATAACTATCGA
GL88 clone aTC..T.G
GL110TC..T.G
GL158TC..T.G
GL308TC..T.G
GL309TC..T.G
GLH15TC..T.G
GLH21TC..T.G
GL402T.G
GL448T.G
GL724T.G
GL784 clone eT.G
GLT1	C.....TC..T.G
GLA20	...A.....TC..T.G
GL784 clone a	...T...GG...TAG
GL784 clone b	..G..G.....G.T.G
GL784 clone c	.T....G.....T.G
GL784 clone dC.....CT.G
Amino acid	SLNVDDTSETLDRVSKE .FDD.GAPGA..GA...
Position in codon	31123211211312333
Transition	+++ ++++++
Transversion	+

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และการแทนที่ของลำดับกรดอะมิโน ใน Assemblage B

1111111111111111222222222333333333334444444455556666666677777777	
556677890012334466789900122779912255667893568899933781244455568900233356	
043935150789575924704817048350687845563548341315628480845848984357314772	
AY072725	CCCTATGGAACGAAACATGACCOCTAAATATGTATGGCCGCTCAACACGAGACGATCACAATGCCAGGAAAA
GL121 clone e	.TTC.....C.....C.C.....C.....G.....
GL518 clone b	.TTC.....C.....C.C.....C.....G.....
GL773 clone d	.TTC.....C.....C.C.....C.....G.....
GL107 clone e	.T.C.....C.....C.C.....C.....G.....
GL144 clone e	.T.C.....C.....C.....C.....G.....
GL518 clone e	.T.C.....C.....C.....C.....G.....
GL25 clone c	.TTC.....C.....C.....C.....G.....
GL121 clone d	.TTC.....C.....C.....C.....G.....
GL5	.TTC.....C.....C.....G.....
GL44	.TTC.....C.....C.....G.....
GL25 clone a	.TTC.....C.....C.A.....C.....G.....
GL25 clone b	.TTC.....C.....C.C.....C.....G.....
GL25 clone d	.TTC.....C.....C.....C.....G.....TA.....
GL25 clone e	.TTC.....C.....C.....C.....G.....T.....
GL34 clone d	.TTC.....C.....C.....A.....G.....A.....
GL34 clone e	.TTC.....C.....C.....TC.....G.....A.....
GL34 clone a	.TTC.....C.....G.AC.....C.....T.....G.....G.....
GL34 clone b	.T.C.....C.....C.....C.....G.....A.....
GL34 clone c	.T.C.....T.....C.....C.....G.....A.....
GL88 clone b	.TTC.....T.C.....C.....T.C.....G.....
GL88 clone e	.TTC.....G.....T.C.....C.C.....G.....
GL88 clone c	.T.C.....T.C.....C.C.....G.....G.....
GL88 clone d	.T.C.....T.C.....C.C.....C.G.....G.....
GL107 clone a	.T.C.....C.....C.C.....C.G.....G.....G.....
GL107 clone b	.T.C.....G.....C.....C.C.....C.....G.....
GL107 clone c	.T.C.....G.....C.....C.C.....C.....G.G.....
GL107 clone d	.T.CG.....C.....C.C.....C.....G.....A.....
GL121 clone b	.TTC.....G.....C.....C.C.....C.....G.....
GL121 clone c	.TTC.....C.....C.....C.C.....C.....G.....
GL144 clone c	.T.C.....C.....CG.....C.....G.....
GL144 clone d	.T.C.....C.....C.....C.....G.....G.....
GL144 clone a	.T.C.....C.....C.....C.....
GL144 clone b	.T.C.....C.....CG.....C.....G.....
GL121 clone a	.T.C.....C.....C.C.C.....C.....G.....
GL253 clone a	.TTC.....T.....C.C.....C.....G.....
GL253 clone b	.TTC.....T.....C.....C.....T.....G.....
GL253 clone d	.TTC.....T.....C.C.....C.....TGT.....
GL253 clone e	.TTC.....C.C.....C.....TGT.....
GL253 clone c	.T.C.....C.G.....C.C.....TGT.....
GL279	.TTC.....C.....C.....G.....A.....
GL518 clone a	TT.C.....C.....C.C.....C.....G.....
GL518 clone c	.T.C.....C.....C.....C.....A.G.....
GL518 clone d	.TTC.....A.....C.....C.....G.....
GL719 clone a	.TTC.....T.C.G.....C.C.....CT.....G.....G.....
GL719 clone b	.TTC.....C.G.....C.....C.....G.....
GL719 clone d	.TTC.....G.....C.....C.C.....G.....
GL751 clone a	.TTC.....G.....T.....C.G.....C.C.....A.....
GL751 clone c	.TTC.....T.....C.G.....C.C.A.....G.....
GL751 clone b	.TTC.....TC.G.....C.C.....G.....
GL773 clone e	.TTC.....T.....C.C.....C.....A.G.G.....
GL773 clone c	.TTC.....T.....C.C.....C.....A.....G.....
GL773 clone b	.TTC.C.....T.....C.C.....T.....G.....
GL773 clone a	.TTC.....G.T.....CC.....C.C.....G.....
GLA2	.TTC.....A.....C.....C.....G.....
GLA9 clone b	.TTC.....T.....C.....C.C.....A.C.....T.....G.....
GLA9 clone c	.TTC.....A.....T.....C.....C.C.....C.....T.....G.....A.....
GLA9 clone a	.TTC.....T.....C.....C.C.....C.....GT.....G.....GG.....
GLA9 clone e	.TTC.....A.....T.....C.....C.C.....C.....T.....G.....G.....
GLA9 clone d	.TTC.....T.G.....C.....C.C.....C.....T.....G.....G.....
GLH13	.TTC.....T.....C.....C.C.....C.....T.....G.....
GLT2	.TTC.....C.....C.....C.....G.....A.....
Amino acid	PDISTTTSMDMEIEVDRVDAIHLQTEVDMETMLACGLELLINIENAKAKAAIVVECNLSREEKREKENT
Position in codon	L...A..NVRG.IGVG.V..G...P..AGT..V.TD.FKF..SV.G.TETE.TAD...DSH...G.HRGD.
Transition	2333133212133212323323332332233131231113321332311113112333122332322213
Transversion	+++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++
	+ + + +

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

Giardia lamblia เป็นปรสิตภายในลำไส้ที่ก่อให้เกิดโรคท้องเสียในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด พบการแพร่กระจายได้มากในเขตที่มีอากาศอบอุ่น โรคที่เกิดจากเชื้อ *G. lamblia* นับได้ว่าเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลกมีอัตราความชุกของโรคสูงในท้องถิ่นที่มีการสุขาภิบาลไม่ดี การติดเชื้อส่วนใหญ่พบในเด็กเล็กและเด็กนักเรียน บางครั้งอาจพบการแพร่ระบาดของผู้ก่อโรคที่ดื่ม น้ำในแม่น้ำ ลำธาร ปัจจุบันโรค giardiasis พบการระบาดมากขึ้นในกลุ่มชายรักร่วมเพศ และผู้ป่วยที่มี ภูมิคุ้มกันต่ำ โดยความรุนแรงของอาการทางคลินิกขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ ภาวะทางด้านโภชนาการรวมถึงภูมิคุ้มกันโรคของโฮสต์และปริมาณของเชื้อที่ได้รับ เป็นต้น ในเด็กเล็กที่ติดเชื้อมักพบว่ามีการพัฒนาการในการเจริญเติบโตต่ำกว่าเด็กปกติ ในผู้ติดเชื้อบางรายอาจมีอาการท้องเสียเรื้อรังหรือมีอาการท้องเสียอย่างเฉียบพลัน อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานผู้เสียชีวิตจากการป่วยด้วยโรค giardiasis การแพร่กระจายของเชื้อพบได้บ่อยในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาสูงกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว จากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่ส่งผลให้มีการติดเชื้อสูงในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาคือการมีระบบสุขาภิบาลที่ไม่ดี การอยู่ในชุมชนแออัด การปนเปื้อนของเชื้อในระบบการส่งน้ำดื่มมาใช้ และในแหล่งน้ำต่าง ๆ รวมถึงมีการแพร่กระจายของเชื้อจากสัตว์มาสู่คน เป็นต้น เนื่องจากความหลากหลายในระดับความรุนแรงในการก่อโรคตลอดจนการตรวจพบว่า *G. lamblia* สามารถตรวจพบได้ในโฮสต์หลายชนิด ดังนั้นจึงมีผู้ทำการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ของโปรโตซัวดังกล่าว โดยจำแนกเป็น 7 Assemblage จากการวิเคราะห์ยีนชนิดต่าง ๆ อาทิ *tpi* gene, *gdh* gene และ *beta-giardin* gene เป็นต้น

beta-giardin gene ของ *Giardia* sp. จัดอยู่ในกลุ่มของยีนโครงสร้าง มีขนาดประมาณ 29-38 kDa ลักษณะเป็น alpha-coiled-helix protein พบได้ที่บริเวณขอบของไมโครริบบอนซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของ ventral disk ในระยะ trophozoite จึงมีประโยชน์สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายในการศึกษาทางอณูชีววิทยา เนื่องจากมีลักษณะที่จำเพาะต่อปรสิตชนิดนี้ รวมถึงเป็นยีนที่มีทั้งส่วนที่เหมือนกันและแตกต่างกัน จึงเหมาะสำหรับการใช้ในการ ศึกษาเพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และจำแนกสายพันธุ์ของ *G. lamblia* โดยพบว่าประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์จากการวิเคราะห์ยีนในยีนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้แล้วยังขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ทำการศึกษา จากการทดสอบโดยอาศัยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าในจำนวนตัวอย่างที่ติดเชื้อทั้งหมด 30 ตัวอย่าง มีอัตราความชุกของ Assemblage A และ B ร้อยละ 40 และ 60 ตามลำดับ

ไม่พบการติดเชื่อร่วมกันของทั้งสอง Assemblage ขณะทำการศึกษาโดยวิธี subcloning และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื่อร่วมกัน 1 ตัวอย่าง คือ GL88 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้จากเด็กนักเรียนในจังหวัดตาก โดยจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 10 clone พบว่าเป็น *G. lamblia* Assemblage A 1 clone ส่วนที่เหลือเป็น Assemblage B ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในสภาวะที่มีการปะปนของ Assemblage ต่างๆ ในปริมาณที่ไม่เท่ากัน ร่วมกับความจำเพาะของความไวของ PCR primer ในการเพิ่มปริมาณของ beta-giardin gene อาจไม่เท่ากัน ทำให้ผลิตภัณฑ์ได้มีความแตกต่างกันในปริมาณอย่างมาก และปริมาณผลิตภัณฑ์ของ beta-giardin gene ของ Assemblage ที่น้อยกว่า อาจไม่สามารถตรวจพบได้จากการวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis อย่างไรก็ตามวิธีการ subclone โดยทั่วไป ไม่ใช่วิธีที่น่าจะให้ผลการตรวจการปะปนของ DNA template ได้ไว้ในสภาวะเดียวกัน การตรวจพบการปะปนกันของ Assemblage A และ B ในแต่ละตัวอย่าง จึงมีความเป็นไปได้น้อยมากเมื่อทำการคัดเลือก recombinant subclone จากตัวอย่างดังกล่าว

จากการศึกษาพบการติดเชื่อ *G. lamblia* Assemblage B มีความชุกสูงกว่า Assemblage A ซึ่งสอดคล้องกับหลายๆ การศึกษาก่อนหน้านี้ จากรายงานของ Haque และคณะ (2005) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์สายพันธุ์ของ *G. lamblia* ในผู้ป่วยชาวบังกลาเทศจำนวนทั้งหมด 322 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น Assemblage A และ B โดยพบอัตราการติดเชื่อของ Assemblage B และ Assemblage A คิดเป็นร้อยละ 86.5 และ 7.5 ตามลำดับ และพบการติดเชื่อร่วมกันในทั้งสองสายพันธุ์ร้อยละ 6 ในปี ค.ศ. 2006 มีรายงานการศึกษาสายพันธุ์ของ *G. lamblia* ที่พบในผู้ป่วยประเทศเนเธอร์แลนด์ โดยทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ SSU rRNA gene และ gdh gene จากตัวอย่างทั้งหมด 98 ตัวอย่าง พบการติดเชื่อ Assemblage A ร้อยละ 35 และ Assemblage B ร้อยละ 65 (Van der Giessen et al., 2006) เช่นเดียวกับรายงานของ Bertrand และคณะ (2005) ที่ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *G. lamblia* โดยวิธี PCR และ PCR-RFLP พบการติดเชื่อ Assemblage A ร้อยละ 36 และ Assemblage B ร้อยละ 64 ในทางตรงข้าม การศึกษาโดยใช้ตัวอย่างจากประเทศอิตาลีและบราซิล (Giangaspero, Berrilli และ Brandonisio, 2007; Souza et al., 2007) พบอัตราความชุกของ Assemblage A มากกว่า Assemblage B ดังนั้นการแพร่กระจายของเชื้อในแต่ละ Assemblage จึงมีความผันแปรไปตามแต่ละภูมิภาคและไม่มีความสัมพันธ์กับสภาวะของการเป็นประเทศที่พัฒนาแล้วหรือประเทศที่กำลังพัฒนา

หากกล่าวถึงความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมในตัวอย่างที่ทำการศึกษาจากจำนวนทั้งหมด 79 clones พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งและทำให้เกิดความ

แตกต่างของอัลลีลถึง 64 แบบ โดยพบว่า Assemblage A มีความแตกต่างกัน 8 อัลลีล ส่วน Assemblage B มีความหลากหลายถึง 56 อัลลีล ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับการศึกษา ก่อนหน้านี้ที่จำแนกสายพันธุ์ *G. lamblia* เป็น subassemblage A1-A11 และ subassemblage B1-B6 จะเห็นได้ว่า *G. lamblia* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าที่เคยมีรายงาน อาจเนื่องมาจากการศึกษาด้วยจำนวนตัวอย่างที่มากกว่า และการใช้วิธีการ subcloning ทำให้สามารถศึกษาได้มากถึง 79 clones ซึ่งจำนวนตัวอย่างที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พบความหลากหลายมากขึ้น ดังนั้นการจำแนกสายพันธุ์ *G. lamblia* โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ beta-giardin gene ในระดับ subassemblage จึงควรมีการพิจารณาใหม่อีกครั้งถึง หลักเกณฑ์ที่ใช้ในการกำหนดความหลากหลายของสายพันธุ์ที่พบ

จากการศึกษาในครั้งนี้พบการติดเชื้อ *G. lamblia* Assemblage A และ B เท่านั้น ซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวนอกจากจะพบการติดเชื้อในคนแล้ว ยังสามารถพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกหลายชนิด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยอาจได้รับเชื้อมาจากสัตว์เลี้ยง ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในเรื่องของการศึกษาสายพันธุ์ *G. lamblia* จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ SSU rRNA gene จากตัวอย่างในประเทศไทย ซึ่งพบการติดเชื้อ Assemblage A และ subassemblage B1 ร่วมกันในคนและสุนัขที่อาศัยอยู่ในบริเวณวัดหรือในบริเวณใกล้เคียง ทำให้ทราบว่าสุนัขที่อาศัยอยู่ตามวัดในเขตกรุงเทพมหานครสามารถที่จะเป็นตัวแพร่กระจายเชื้อมาสู่คนได้ (Inpankaew et al., 2007) เช่นเดียวกับพื้นที่ในเขตชนบทที่ห่างไกล ประชาชนส่วนใหญ่เป็นชาวไทยภูเขาและมีสภาพความเป็นอยู่ที่ไม่ดี รวมถึงไม่มีระบบการจัดการด้านสุขาภิบาล เช่น ห้องน้ำ ห้องส้วม หรือแหล่งน้ำดื่ม น้ำใช้ที่สะอาด เป็นต้น ประกอบกับประชาชนส่วนใหญ่มีอาชีพทำการเกษตร จึงมีโอกาสเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมหรืออาจได้รับเชื้อโดยตรงจากการสัมผัสผู้ติดเชื้อโดยเฉพาะในกลุ่มของเด็กเล็ก

ดังที่ทราบแล้วว่า beta-giardin gene พบได้ที่บริเวณขอบของ microribbons ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ ventral disk ในระยะ trophozoite การที่ ventral disk เป็นโครงสร้างที่สำคัญในการดำรงชีวิตอยู่ภายในโฮสต์ของโปรโตซัวชนิดนี้ โดยทำหน้าที่ในการยึดเกาะส่วนของเยื่อผนังลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum ดังนั้นเมื่อหน้าที่ของโปรตีน beta-giardin gene ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของกรดอะมิโนในลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงคาดการณ์ได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสดังกล่าวอยู่ภายใต้เงื่อนไขของ purifying selection คือ การพยายามที่จะคงรูปแบบเดิมของลำดับกรดอะมิโนเพื่อให้สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงจากเดิมไม่มาก ซึ่งอาจมีความสำคัญต่อการคงหน้าที่ต่างๆ ไว้ การศึกษานี้ นับเป็นการศึกษาแรกในประเทศไทยเกี่ยวกับความหลากหลายในระดับนิวคลีโอไทด์ของ beta-giardin gene โดยพบอัตราการติดเชื้อ *G. lamblia* Assemblage B สูง ในชุมชนอำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก นอกจากนี้ยังพบการ

ติดเชื่อมปะปนกันระหว่าง Assemblage และระหว่างสายพันธุ์ภายใน Assemblage เดียวกัน ซึ่งควรมีการศึกษาโดยใช้ประชากรตัวอย่างที่มากขึ้นและในชุมชนอื่นๆ ต่อไป เพื่อให้เห็นภาพรวมของการกระจายตัวของ Assemblage ต่างๆ ได้ชัดเจนขึ้น อันน่าจะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าติดตามรวมทั้งการควบคุมโรคต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาโดยใช้จำนวนตัวอย่างเชื้อมากขึ้นและการใช้ตัวอย่างในหลายๆ พื้นที่ทั่วประเทศ อาจทำให้พบความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของ *G. lamblia* ได้มากยิ่งขึ้น หรือทำให้ทราบขอบเขตของความหลากหลายและความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละ Assemblage ได้ดียิ่งขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ในการเข้าใจกลไกทางพันธุกรรมที่จะก่อให้เกิดความหลากหลายดังกล่าวต่อไป
2. การศึกษาตัวอย่างที่ได้จากคนและสัตว์เลี้ยง อาจทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของ *G. lamblia* ตลอดจนทราบถึงกลไกในการแพร่กระจายเชื้อจากสัตว์มาสู่มนุษย์ อันจะเป็นประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันโรคต่อไป
3. การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของอาการ ความรุนแรงของโรค กับสายพันธุ์ของเชื้อที่พบจะเป็นประโยชน์ในการรักษาและควบคุมโรคต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จามรี พิสุทธิพันธุ์. 2547. Giardiasis. ใน สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล, เกศรา อัสตามงคล, มาเรียว วิกันตี, สมชาย สันติวัฒนกุล, ภาวะติดเชื้อ : Molecular/Cellular and Clinical Basic, 539-547. กรุงเทพฯ: เม็ดทรายพริ้นติ้ง.
- นิมิต มรกต, จุไรรัตน์ จันทร์ประเสริฐ, สมพงษ์ ศรีแก้ว, ลำดวน วงศ์สวัสดิ์. 2533 *Cryptosporidium* and *Giardia* infections among orphans in the home for boys, Chiang Mai. เชียงใหม่วารสาร 29: 41-4.

ภาษาอังกฤษ

- Abe, N.; Read, C.; Thompson, R. C.; and Iseki, M. 2005. Zoonotic genotype of *Giardia intestinalis* detected in a ferret. *J Parasitol* 91: 179–182.
- Adam, R. D. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev* 55: 706-732.
- Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14: 447–475.
- Adam, R. D. 2001. The *Giardia lamblia* genome. *Int J Parasitol* 30: 475-84.
- Adam, R. D.; Nash, T. E.; and Wellems, T. E. 1988. The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. *Nucleic Acids Res* 16: 4555-4567.
- Addiss, D. G.; Mathews, H. M.; Stewart, J. M.; Wahlquist, S. P.; Williams, R. M.; and Finton, R. J. 1991. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. *J Clin Microbiol* 36(5): 1338-1340.
- Al-Mekhlafi, M. S. et al. 2005. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 686–691.
- Aloisio, F., et al. 2006. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. *Vet Parasitol* 142: 154–158.
- Alonso, R. A.; and Peattie, D. A. 1992. Nucleotide sequence of a second alpha giardin gene and molecular analysis of the alpha giardin genes and transcripts in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 50: 95-104.
- Al-Tukhi, M. H.; Al-Ahdal, M. N.; and Peters, W. 1991. A simple method for excystation of *Giardia lamblia* cyst. *Ann Trop Med Parasitol* 85: 427-431.

- Amar, C. F.; Dear, P. H.; Pedraza-Diazet, S.; Looker, N.; Linnane, E.; and McLauchlin, J. 2002. Sensitivity PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human faeces. **J Clin Microbol** 40: 446-452.
- Andrews, R. H.; Adams, M.; Boreham, P. F.; Mayrhofer, G.; and Meloni, B. P. 1989. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. **Int J Parasitol** 19: 183-190.
- Appelbee, A.; Thorakson, C.; and Olson, M. E. 2002. Genotypic characterization of *Giardia* cysts isolated from wild beaver in southern Alberta, Canada. In: Olson, M. E.; and Wallis, P. M. (eds.), *Giardia: The cosmopolitan parasite*. pp. 299-300. Wallingford, UK: CAB International.
- Bartlett, A. V.; Englander, S. J.; Jarvis, B. A.; Ludwig, L.; Carlson, J. F.; and Topping, J. P. 1991. Controlled trial of *Giardia lamblia*: control strategies in day care centers. **Am J Public Health** 81(6): 1001-1006.
- Baruch, A. C.; Isaac-Renton, J. L.; and Adam, R. D. 1996. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. **J Infect Dis** 174: 233-236.
- Berrilli, F., et al. 2006. Prevalence and genotyping of human isolates of *Giardia duodenalis* from Albania. **Parasitol Int** 55: 295-297.
- Bertrand, I.; Albertini, L.; and Schwartzbrod, J. 2005. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR restriction fragment length polymorphism. **J Clin Microbiol** 43: 5940-4944.
- Bingham, A. K. and Meyer, E. A. 1979. *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. **Nature** 277: 301-302.
- Blanchard, R. 1988. Remarques sur le megastome intestinal. **Bull Soc Zool Fr** 13: 18.
- Caccio, S. M., et al. 2003. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. **Appl Environ Microbiol**. 69: 3393-3398.
- Caccio, S. M.; Rinaldi, L.; Cringoli, G.; Condoleo, R.; and Pozio, E. 2007. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in the Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Vet Parasitol** 150: 146-149.

- Caccio, S. M.; and Ryan, U. 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 160: 75-80.
- Caccio, S. M.; Thompson, R. C.; McLauchlin, J.; and Smith, H. V. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21: 430–437.
- Castro-Hermida, J. A.; Almeida, A.; Gonzalez-Warleta, M.; Correia da Costa, J. M.; Rumbo-Lorenzo, C.; and Mezo, M. 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitol Res* 101: 1443–1448.
- Char, S.; Cevallos, A. M.; Yamson, P.; Sullivan, P. B.; Neale, G. and Farthing, M. J. 1993. Impaired IgA response to *Giardia* heat shock antigen in children with persistent diarrhea and giardiasis. *Gut* 34(1): 38-40.
- Chavez, B.; Cedillo-Rivera, R.; and Martinez-Palomo, A. 1992. *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. *J Protozool* 39: 510-515.
- Chin, A. C.; Teoh, D. A.; Scott, K. G. E.; Meddings, J. B.; Macnaughton W. K.; and Buret, A. G. 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun* 70: 3673–3680.
- Chhakda, T.; Muth, S.; Socheat, D.; and Odermatt, P. 2006. Intestinal parasites in school-aged children in villages bordering Tonle Sap Lake, Cambodia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37: 859–864.
- Coklin, T.; Farber, J.; Parrington, L.; and Dixon, B. 2007. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol* 150: 297–305.
- Cook, D. M.; Swanson, R. C.; Eggett, D. L.; and Booth, G. M. 2009. A retrospective analysis of prevalence of gastrointestinal parasites among school children in the Palajunoj Valley of Guatemala. *J Health Popul Nutr* 27(1): 31-40.
- Crossley, R.; Marshall, J.; Clark, J. T.; and Holberton, D. V. 1986. Immunocytochemical differentiation of microtubules in the cytoskeleton of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies to alpha-tubulin and polyclonal antibodies to associated low molecular weight proteins. *J Cell Sci* 80: 233–252.

- Dobell, C. 1920. The discovery of the intestinal protozoa of man. **Proc R Soc Med** 13: 1-15.
- Easow, J. M.; Mukhopadhyay, C.; Wilson, G.; Guha, S.; Jalan, B. Y.; and Shivananda, P. G. 2005. Emerging opportunistic protozoa and intestinal pathogenic protozoal infestation profile in children of western Nepal. **Nepal Med Coll J** 7: 134–137.
- Eckmann, L.; and Gillin, F. D. 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interaction I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 280(1): G1-6.
- Edlind, T. D.; Hang, T. L.; and Chakraborty, P. R. 1990. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* in vitro. **J Infect Dis** 162: 1408-1411.
- Environmental Protection Agency, *Giardia: Risk for Infants and Children* ; Washington, DC 1998.
- Erlandsen, S. L., et al. 1990. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). **J Parasitol** 76: 717-724.
- Erlandsen, S. L., et al. 1990. High-resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. **J Histochem Cytochem** 38: 625-632.
- Erlandsen, S. L.; and Bemrick, W. J. 1987. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. **J Parasitol** 73: 623-629.
- Erlandsen, S. L.; Bemrick, W. J.; and Pawley, J. 1989. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. **J Parasitol** 75: 787-797.
- Erlandsen, S. L.; and Chase, D. G. 1974. Morphological alterations in the microvillous border of villous epithelial cells produced by intestinal microorganisms. **Am J Clin Nutr** 27: 1277-1286.
- Erlandsen, S. L.; Macechko, P. T.; van Keulen, H.; and Jarroll, E. L. 1996. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. **J Eukaryot Microbiol** 43: 416-429.

- Esrey, S. A.; Collett, J.; Miliotis, M. M.; Koornhof, J.; and Makhale, P. 1989. The risk of infection from *Giardia lamblia* due to drinking water supply, use of water, and latrines among preschool children in rural Lesotho. *Int J Epidemiol* 18(1): 248-253.
- Ey, P. L., et al. 1997. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukaryot Microbiol* 44: 626-635.
- Fayer, R.; Santin, M.; Trout, J. M.; DeStefano, S.; Koenen, K.; and Kaur, T. 2006. Prevalence of Microsporidia, *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in beavers (*Castor canadensis*) in Massachusetts. *J Zoo Wildl Med* 37: 492-497.
- Ferguson A.; Gillon, J.; and Manro, G. 1990. Pathology and pathogenesis of the intestinal mucous damage in giardiasis. New York: Elsevier Publishing.
- Filice, F. P. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ Calif Publ Zool* 57: 53-146.
- Feely, D. E. 1988. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. *J Parasitol* 35: 52-54.
- Feely, D. E.; Schollmeyer, J. V.; and Erlandsen, S. L. 1982. *Giardia* spp.: Distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol* 53(1): 145-154.
- Gelanew, T.; Lalle, M.; Hailu, A.; Pozio, E.; and Caccio, S. M. 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop* 102: 92-99.
- Geurden, T., et al. 2007. Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Int J Parasitol* 38: 259-264.
- Ghosh, S.; Debnath, A.; Sil, S.; De, D.; Chattopadhyay, J.; and Das, P. 2000. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. *Mol Cell Probes* 14:181-189.
- Giangaspero, A.; Berrilli, F.; and Brandonisio, O. 2007. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol Res* 101: 1169-1182.

- Gillin, F. D.; and Diamond, L. S. 1981. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. **Exp Parasitol** 52: 9-17.
- Gillin, F. D.; and Reiner, D. S. 1982. Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*: role of reducing agents, serum, temperature, and ionic composition. **Mol Cell Biol** 2: 369-377.
- Gillin, F. D. 1987. *Giardia lamblia*: the role of conjugated and unconjugated bile salt in killing by human milk. **Exp Parasitol** 63(1): 74-83.
- Gray, S. F.; and Rouse, A. R. 1992. Giardiasis a cause of travellers' diarrhoea. Communicable Disease Report. **CDR Review** 2(4): 45-7.
- Grimmond, T. R., et al. 1988. *Giardia* carriage in aboriginal and non-aboriginal children attending urban day-care centres in South Australia. **Aust Paediatr J** 24: 304-305.
- Goldstein, F.; Thornton, J. J.; Szydlowski, T. 1978. Biliary tract dysfunction in giardiasis. **Am J Dig Dis** 23(6): 559-560.
- Hannes, I. S.; Gjerde, B. K.; Forberg, T.; and Robertson, L. J. 2007. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). **Vet Parasitol** 143: 347-353.
- Haque, R.; Roy, S.; Kabir, M.; Stroup, S.E.; Mondal, D.; and Houpt, E. R. 2005. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. **J Infect Dis** 192: 2171-2173.
- Harter, L.; Frost, P.; and Jakubowski, W. 1982. *Giardia* prevalence among 1-to-3-year-old children in two Washington State counties. **Am J Public Health** 72(4): 386-388.
- Heitman, T.L., et al. 2002. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. **Can J Microbiol** 48: 530-541.
- Hetsko, M. L.; McCaffery, J. M.; Svard, S. G.; Meng, T. C.; Que, X.; and Gillin, F. D. 1998. Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* in vitro. **Exp Parasitol** 88: 172-183.

- Hoar, B. R.; Atwill, E. R.; Elmi, C.; and Farver, T.B. 2001. An examination of risk factors associated with beef cattle shedding pathogens of potential zoonotic concern. *Epidemiol Infect* 127: 147–155.
- Homan, W. L., et al. 1992. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Res* 78: 316-323.
- Hopkins, R. M.; Constantine, C. C.; Groth, D. A.; Wetherall, J. D.; Reynoldson, J. A.; and Thompson, R. C. A. 1999. PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitology* 118: 531–539.
- Hopkins, R. M.; Meloni, B. P.; Groth, D. M.; Wetherall, J. D.; Reynoldson, J. A.; and Thompson, R. C. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* 83: 44–51.
- Hsu, B. M.; Wun, H. Y.; and Hsu, P.C. 2007. Prevalence and genotyping of *Giardia* in husbandry systems in Taiwan. *Parasitol Res* 101: 275–280.
- Itagaki, T., et al. 2005. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Vet Parasitol* 133: 283–287.
- Inpankaew, R. Traub, R.C. Thompson and Y. Sukthana 2007 Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38: 247–255.
- Jakubowski, W.; and Graun, G.F. 2002. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: Olson, M. E.; and Wallis, P. M. (eds.), *Giardia: The cosmopolitan parasite*. pp. 217–238. Wallingford, UK: CAB International.
- Janoff, E. N., et al. 1990a. Endemic *Cryptosporidium* and *Giardia lamblia* infections in a Thai orphanage. *Am J Trop Med Hyg* 43(3): 248-56.
- Jarroll, E. L.; Manning, P.; Lindmark, D. G.; Coggins, J. R.; and Erlandsen, S. L. 1989. *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Mol Biochem Parasitol* 32: 121-131.
- Jonathan S. Y.; and Michael J. B. 2007. Giardiasis Surveillance United States, 2003-2005 Surveillance. 56: 11-18.

- Jongwutiwes, S.; Kraivichian, P.; Kulkumthorn, M.; Sitthichareonchai, P.; and Jaroenkorn, M. 1990. Cryptosporidiosis among orphanage children in Thailand: a one year prospective study. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 21: 458–464.
- Karanis, P.; and Ey, P. L. 1998. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. *Parasitol Res* 84: 442–449.
- Kaur, R.; Rawat, D.; Kakkar, M.; Uppal, B.; and Sharma, V. K. 2002. Intestinal parasites in children with diarrhea in Delhi, India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 33: 725–729.
- Klima, M.; Gyorkey, P.; Min, K. W.; Gyorkey, F. 1997. Electron microscopy in diagnosis of giardiasis. *Arch Pathol Lab Med* 101(3): 133-135.
- Lai Ping So, A.; Mayer, L. 1997. Gastrointestinal manifestation of primary immunodeficiency disorders. *Semin Gastrointest Dis* 8(1): 22-32.
- Lalle, M., et al. 2007. A novel *Giardia duodenalis* assemblage A subtype in fallow deer. *J Parasitol* 93: 426–468.
- Lalle, M.; Jimenez, E.; Caccio, S. M.; and Pozio, E. 2005. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using (*beta-giardin*) nested PCR assay. *J Parasitol* 91: 203–205.
- Lalle, M.; Pozio, R.; Capelli, G.; Bruschi, F.; Crotti, D.; and Caccio, S.M. 2005. Genetic heterogeneity at the *Beta-giardin* locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic sub-genotypes. *Int J Parasitol* 35: 207-213.
- Lane, S.; and Lloyd, D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* 28: 123–147.
- Langkjaer, R. B.; Vigre, H.; Enemark, H. L.; and Maddox-Hyttel, C. 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology* 134: 339–350.
- Le Blancq, S. M.; and Adam, R. D. 1998. Structural basis of karyotype heterogeneity in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 97: 199-208.

- Leonhard, S.; Pfister, K.; Beelitz, P.; Wielinga, C.; and Thompson, R. C. 2007. The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. **Vet Parasitol** 150: 33–38.
- Ljungstrom, I.; and Castor, B. 1992. Immune response to *Giardia lamblia* in water-borne outbreak of giardiasis in Sweden. **J Med Microbiol** 36: 347-352.
- Marshall, J.; and Holberton, D. V. 1993. Sequence and structure of a new coiled coil protein from a microtubule bundle in *Giardia*. **J Mol Biol** 231: 521-530.
- Marshall, J.; and Holberton, D. V. 1995. *Giardia* gene predicts a 183 kDa nucleotide-binding head-stalk protein. **J Cell Sci** 108: 2683-2692.
- Marshall, M.; Naumovitz, D.; Ortega, C.; and Sterling, R. 1997. Waterborne protozoan pathogens. **Clin Microbiol Rev** 10: 67–85.
- Mayrhofer, G.; Andrews, R. H.; Ey, P. L.; and Chilton, N. B. 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. **Parasitology** 111: 11-17.
- Meloni, B. P.; Lymbery A. J.; and Thompson, R.C. 1995. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. **J Parasitol** 81: 368–383.
- Mendonca, C., et al. 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. **Vet Parasitol** 147: 47–50.
- Meng, T. C.; Hetsko, M. L.; and Gillin, F. D. 1996. Inhibition of *Giardia lamblia* excystation by antibodies against cyst walls and by wheat germ agglutinin. **Infect. Immun** 64: 2151-2157.
- Meyer, E. A.; and Radulescu, S. 1978. *Giardia* and giardiasis. **Adv Parasitol** 17: 1-48.
- Miotti, P. G.; Gilman, R. H.; Santosham, M.; Ryder, R. W.; and Yolken, R. H. 1986. Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. **J Clin Microbiol** 24(6): 972-975.
- Moore, A. C.; Herwaldt, B. L.; Craun, G. F.; Calderon, R. L.; Highsmith, A. K.; and Juranek, D. D. 1993. Surveillance for water-borne disease outbreaks United States, 1991-1992. **MMWR CDC Surveill Summ** 42:1-22.

- Monis, P. T.; Andrews, R. H.; Mayrhofer, G.; and Ey, P. L. 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. **Mol Biol Evol** 16: 1135–1144.
- Monis, P. T.; Andrews, R. H.; Mayrhofer, G.; Kulda, J.; Isaac-Renton, J. L.; and Ey, P. L. 1998. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. **Parasitology** 116:7–119.
- Monis, P. T.; Mayrhofer, G.; Andrews, R. H.; Homan, W. L.; Limper, L.; and Ey, P. L. 1996. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. **Parasitology** 112: 1-12.
- Morgan, U. M.; Reynoldson, J. A.; and Thompson, R. C. 1993. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro. **Antimicrob Agents Chemother** 37: 328-331.
- Mumtaz, S.; Siddiqui, H.; and Ashfaq, T. 2009. Frequency and risk factors for intestinal parasitic infection in children under five years age at a tertiary care hospital in Karachi. **J Pak Med Assoc** 59(4): 216-219.
- Narcisi, E. M.; Paulin, J. J.; and Fechheimer, M. 1994. Presence and localization of vinculin in *Giardia*. **J Parasitol** 80: 468-473.
- Nash, T. E.; and Keister, D. B. 1985. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. **J Infect Dis** 152: 1166-1171.
- Nash, T. E.; Herrington D. A.; Losonsky, G. A.; Levine, M. M. 1987. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. **J Infect Dis** 156(6): 978-984.
- Nash, T. E.; and Mowatt, M. R. 1992. Characterization of *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M and estimation of VSP gene repertoire size. **Mol Biochem Parasitol** 51 (2): 219-227.
- Nash, T. E.; and Mowatt, M. R. 1999. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group-specific gene. **Exp Parasitol** 75: 369-378.
- O'Handley, R. M.; Cockwill, C.; McAllister, T. A.; Buret, A. G.; Jelinski M.; and Olson, M. E. 1999. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. **J Am Vet Med Assoc** 214: 391–396.

- O'Handley, R. M.; Olson, M. E.; Fraser, D.; Adams, P.; and Thompson, R. C. A. 2000. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. **Vet Parasitol** 90: 193–200.
- O'Handley, R. M. 2002. *Giardia* in farm animals. In: Olson, B.E.; Olson M.E.; and Wallis, P.M. (eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*, pp.97-105. Wallingford, UK: CAB International.
- O'Reilly, C. E., et al. 2007. Outbreak Working Group. A waterborne outbreak of gastroenteritis with multiple etiologies among resort island visitors and residents: Ohio, 2004. **Clin Infect Dis** 44: 506-12.
- Ortega-Barria, E.; Ward, H. D.; Keusch, G. T.; and Keusch, M. E. 1994. Growth inhibition of the intestinal parasite *Giardia lamblia* by a dietary lectin is associated with arrest of the cell cycle. **J Clin Invest** 94(6): 2283-2288.
- Owen, R.L.; Allen, C. L.; and Stevens, D. P. 1981. Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium in mice. **Infect Immun** 33(2): 591-6.
- Paget, T. A.; Jarroll, E. L.; Manning, P.; Lindmark, D. G.; and Lloyd, D. 1989. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. **J Gen Microbiol** 135: 145-154.
- Paintlia, A. S., et al. 1998. *Giardia lamblia* groups A and B among young adults in India. **Clin Infect Dis** 26: 190–191.
- Peattie, D. A.; Alonso, R. A.; Hein, A.; and Caulfield, J. P. 1989. Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giarida lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. **J Cell Biol** 109: 2323-2335.
- Pedraza Duenas, A.; Ripoll Lozano, M. A.; and Sahagun Salcedo, B. 1994. Infestation by *Giardia lamblia* of children in the basic health area of East Rural Avila. **Rev Sanid Hig Publica (Madr)** 68(3): 399-404.
- Perez Armengol, C.; Ariza Astolfi, C.; Ubeda Ontiveros, J.M.; Guevara Benitez, D.C.; de Rojas Alvarez, M.; and Lozano Serrano, C. 1997. Epidemiology of children's intestinal parasitism in the Guadalquivir Valley. **Rev Esp Salud Publica** 71(6): 547-552.
- Peterson, J.M. 1957. Intestinal changes in Giardiasis. **N Engl J Med** 77: 670-677.

- Pickering, L.K.; Woodward, W.E.; DuPont, H.L.; and Sullivan, P. 1984. Occurrence of *Giardia lamblia* in children in day care centers. **J Pediatr** 104: 522-6.
- Rabbani, G.H.; and Islam, A. 1994. Giardiasis in humans: Populations most at risk and prospects for control. In: Thompson R.C.A.; Reynoldson, J.A. and Lymbery, A.J. (eds.), Giardia: From Molecules to Disease. pp. 83-97. Wallingford, U.K: CAB INTERNATIONAL.
- Ratanapo, S., et al. 2008. Multiple modes of transmission of giardiasis in primary schoolchildren of a rural community, Thailand. **Am J Trop Med Hyg** 78: 611–615.
- Read, C.; Walters, J.; Robertson, I.D.; and Thompson, R.C.A. 2001. Correlation between genotypes of *Giardia duodenalis* and diarrhea. **Int J Parasitol** 32: 229–231.
- Read, C. M.; Monis, P. T.; and Thompson, R. C. 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infect Genet Evol** 4: 125–130.
- Reiner, D. S.; Wang, C. S.; and Gillin, F. D. 1986. Human Milk Kills *Giardia lamblia* by Generating Toxic Lipolytic Products. **J Infect Dis** 154(5): 825-832.
- Rendtorff, R. C. 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. **Am J Hyg** 59(2): 209–220.
- Robertson, L. J.; Forberg, T.; Hermansen, L.; Gjerde, B. K.; and Langeland, N. 2007. Molecular characterization of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. **J Infect** 55: 79–88.
- Robertson, L. J.; Forberg, T.; Hermansen, L.; Hamnes, I. S.; and Gjerde, B. 2007. *Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic characterization by PCR-RFLP and sequence analysis at two genes. **J Wildl Dis**. 43: 576–585.
- Robertson, L. J.; Hermansen, L.; Gjerde, B. K.; Strand, E.; Alvsvag, J. O.; and Langeland, N. 2006. Application of Genotyping during an Extensive Outbreak of Waterborne Giardiasis in Bergen, Norway, during Autumn and Winter 2004. **Appl Environ Microbiol** 72(3): 2212–2217.

- Rohrer, L.; Winterhalter, K. H.; Eckert, J.; Kohler, P. 1986. Killing of *Giardia lamblia* by heman milk is mediated by unsaturated fatty acids. **Antimicrob Agents Chemother** 30(2): 254-257.
- Sackey, M. E.; Weigel M. M.; and Armijos, R. X. 2003. Predictors and nutritional consequences of intestinal parasitic infections in rural Ecuadorian children, **J Trop ediatr** 49: 17–23.
- Sagebie, D.; Weitzel T.; Stark, K.; and Leitmeyer, K. 2009. Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany, 2006. **Parasitol Res** : 681-687.
- Saha, T. K.; Ghosh, T. K. 1977. Invasion of small intestinal mucosa by *Giardia lamblia* in man. **Gastroenterology** 72(3): 402-405.
- Sahagun, J., et al. 2007. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 27: 81–83.
- Skorochodzki, J., et al. 1998. Frequency of giardiasis in children with chronic abdominal pain coming from North-East Poland. **Przegląd Epidemiologiczny** 52(3): 309-15.
- Smith, M.W.; Aley, S.B.; Sogin, M.; Gillin, F.D.; and Evans, G.A. 1998. Sequence survey of the *Giardia lamblia* genome. **Mol Biochem Parasitol** 95: 267–280.
- Soltys, B. J.; and Gupta, R. S. 1994. Immunoelectron microscopy of *Giardia lamblia* cytoskeleton using antibody to acetylated alpha-tubulin. **J Eukaryot Microbiol** 41: 625-632.
- Souza et al., 2007 Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. **Veterinary Parasitology** 149: 258-264 .
- Steven, W.J.; and Vermeire, P.A. 1981. *Giardia lamblia* in bronchoalveology larvae fluid. **Thorax** 36: 875.
- Sulaiman, I. M., et al. 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerg Infect Dis** 9: 1444–1452.

- Thompson, S. C. 1994. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: a review of the literature. **J. Pediatr. Child Health** 30: 202-209.
- Thompson, R.C.A. 1998. *Giardia* infections. In: Palmer, S. R.; Soulsby, E. J. L.; and Simpson, D. I. H. (eds.), Zoonoses: Biology, Clinical Practice and Public Health Control, pp. 545-561. Oxford University Press, Oxford.
- Thompson, R. C. A. 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **Int J Parasitol** 30: 1259–1267.
- Thompson, R. C. A.; and Meloni, B. P. 1993. Molecular variation in *Giardia* and its implications. **Acta Trop** 53: 67–184.
- Traub, R. J.; Monis, P.; Robertson, I.; Irwin, P.; Mencke, N.; and Thompson, R. C. A. 2004. Epidemiological and molecular evidence support the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. **Parasitology** 128: 53–62.
- Traub, R.; Wade, S.; Read, C.; Thompson, A.; and Mohammed, H. 2005. Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of *Giardia duodenalis* in horses. **Vet Parasitol** 130: 317–321.
- Trout, J. M.; Santin, M.; and Fayer, R. 2003. Identification of assemblage A *Giardia* in whitetailed deer. **J Parasitol** 89: 1254–1255.
- Trout, J. M.; Santin, M.; Greiner, E.; and Fayer, R. 2004. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. **Vet Parasitol** 124: 179–186.
- Thurston-Enriquez, J. A.; Watt, P.; Dowd, S. E.; Enriquez, R.; Pepper I. L.; and Gerba, C. P. 2002. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. **J Food Prot** 65: 378–382.
- Van der Giessen, J. W.; De Vries, A.; Roos, M.; Wielinga, P.; Kortbeek, L. M.; and Mank, T. G. 2006. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. **Int J Parasitol** 36: 849-858.
- van Keulen, H.; Feely D. E.; Macechko P. T.; Jarroll E. L.; and Erlandsen S. L. 1988. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. **J Parasitol** 84: 294-300.

- Van Keulen, H.; Homan, W.L.; Erlandsen, S.L.; and Jarroll, E.L. 1995. A three nucleotide signature sequence in small subunit rRNA divides human *Giardia* in two different genotypes. **J Eukar Microbiol** 42: 392–394.
- Van Keulen H.; Macechko, P. T.; Wade, S.; Schaaf, S.; Wallis, P. M.; and Erlandsen, S. L. 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. **Vet Parasitol** 108(2): 97-107.
- Varga, L.; and Delage, G. 1990. *Giardia lamblia* infestation at child day care centers. Nutritional impact in infested children. **Archives Francaises de Pediatrie** 47(1): 5-8.
- Vasilopoulos, R. J.; Rickard, L. G.; Mackin, A. J.; Pharr, G. T.; and Huston, C. L. 2007. Genotypic analysis of *Giardia duodenalis* in domestic cats. **J Vet Intern Med** 21: 352–355.
- Verle, P.; Kongs, A.; De, N. V.; Thieu, N. Q.; Depraetere, K.; Kim, H. T.; and Dorny, P. 2003. Prevalence of intestinal parasitic infections in northern Vietnam. **Trop Med Int Health** 8: 961–964.
- Volotao, A. C.; Costa-Macedo, L. M.; Haddad, F. S.; Brandão, A.; Peralta, J. M.; and Fernandes, O. 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. **Acta Trop** 102: 10–19.
- Wallis, P. M.; Erlandsen, S. L.; Isaac-Renton, J. L.; Olson, M. E.; Robertson, W. J.; and van Keulen, H. 1996. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolated from drinking water in Canada. **Appl Environ Microbiol** 62: 2789–2797.
- Walzer P. D.; Wolfe M. S.; and Schultz M. G. 1971. Giardiasis in travelers. **J Infect Dis** 124(2): 235-237.
- Waikagul, J., et al., 2002. A cross sectional study of intestinal parasite infection among school children in Nan. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 33: 218–223.
- Ward, H.; Jalan, K. N.; Maitra T. K. ; Agrawal S. K.; Mahalanabis, D. 1983. Small intestinal nodular lymphoid hyperplasia in patients with giardiasis and normal serum immunoglobulins. **Gut** 24(2): 120-126.

- Wongjindanon, N.; Suksrichavalit, T.; Subsutti, W.; Sarachart, T.; Worapisuttiwong, U.; Norramatha, P. 2005. Current infection rate of *Giardia lamblia* in two provinces of Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. 4: 21-5.
- Wongstitwilairoong, B.; Srijan, A.; Serichantalergs, O.; Fukuda, D. C.; Mcdaniel, P.; and Bodhidatta, L. 2007. Intestinal parasitic infections among pre-school children in sangkhlaburi, Thailand. **Am J Trop Med Hyg** 76: 345-50.
- World Health Organization. 1979. Parasitic Zoonoses. Report of a WHO Expert Committee with the participation of FAO. Technical Report Series No. 637. **Geneva: World Health Organization.**
- World Health Organization. The World Health Report. 1996. **Geneva: World Health Organization.**
- Wolfe, M. S., 1978. Giardiasis. **N Engl J Med** 298(6): 319-321.
- Zenian A. J.; and Gollin, F. D. 1987. Intestinalis mucus protects *Giardia lamblia* from killing by human milk. **J Protozool** 34(1): 22-26.
- Zhang, Y. Y.; Aley, S. B.; Stanley, S. L. Jr.; and Gillin, F. D. 1993. Cysteine-dependent zinc binding by membrane proteins of *Giardia lamblia*. **Infect Immun** 61(2): 520-524.
- Zygner, W.; Jaros, D.; Skowronska, M.; Bogdanowicz-Kamirska, M.; Wedrychowicz, H. 2006. Prevalence of *Giardia intestinalis* in domestic dogs in Warsaw. **Wiad Parazytol** 52: 311-315.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

แสดงรหัสพันธุกรรม (genetics code)

Second Position

	U	C	A	G	
U	UUU UUC Phe UUA Leu UUG	UCU UCC Ser UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA* Stop UAG* Stop	UGU Cys UGC UGA* Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU CUC Leu CUA CUG	CCU CCC Pro CCA CCG	CAU CAC His CAA Gln CAG	CGU CGC Arg CGA CGG	U C A G
A	AUU AUC Ile AUA AUG ⁺	ACU ACC Thr ACA ACG	AAU AAC Asn AAA Lys AAG	AGU AGC Ser AGA Arg AGG	U C A G
G	GUU GUC Val GUA GUG	GCU GCC Ala GCA GCG	GAU GAC Asp GAA Glu GAG	GGU GGC Gly GGA GGG	U C A G

* chain termination, or "nonsense," codon

⁺ the initiator codon

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

แสดงรหัสและตัวย่อสำหรับกรดอะมิโน

Amino acid	Three-letter abbreviation	One-letter symbol
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 0.5 EDTA (pH 8.0)

EDTA	186.1 g.
double distilled water	800 ml.

นำส่วนผสมทั้ง 2 อย่างนี้มากวนด้วย magnetic stirrer จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้มีค่า pH = 8 และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อ*

การเตรียม TBE buffer (10x)

Tris base	108 g.
Boric acid	55 g.
EDTA	7.4 g.

ปรับค่า pH และปริมาตรให้เท่ากับ 8.3 และ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน*

การเตรียม marker

DNA marker	20 μ l.
Dye	80 μ l.
TE buffer	360 μ l.

การเตรียม TE buffer (10x)

1 M Tris	800 ml.
0.5 M EDTA	200 ml.

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อก่อนที่จะใช้*

การเตรียม 1 M Tris (pH 7.8)

Tris base	121.1 g.
-----------	----------

น้ำกลั่น	800 ml.
----------	---------

นำส่วนผสมทั้ง 2 มาละลายให้เป็นเนื้อเดียวด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl ให้มีค่า pH เท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร โดยใช้น้ำกลั่น และนำไปนิ่งด้วยหม้อปอลอดเชื้อก่อนที่จะนำไปใช้*

* ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

การเตรียม gel-loading buffers

bromophenol blue	0.25 g.
------------------	---------

xylene cyanol FF	0.25 g.
------------------	---------

glycerol in water	30 g.
-------------------	-------

ละลายในน้ำกลั่น โดยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Assemblage A Nucleotide alignment

```

#X85958 ACC CAG ACG ATG GAC AAG CCC GAC GAC CTC ACC CGC AGT GCG ACC GAG ACG GCG GTC AAG CTC AGC AAC ATG AAC CAG CGC GTC AGC AGG [ 90]
#GL308 ..... [ 90]
#GL158 ..... [ 90]
#GLA20 ..... [ 90]
#GLH15 ..... [ 90]
#GLH21 ..... [ 90]
#GL309 ..... [ 90]
#GL110 ..... [ 90]
#GL448 ..... [ 90]
#GL724 ..... [ 90]
#GL402 ..... [ 90]
#GL784_A ..... [ 90]
#GL784_B ..... [ 90]
#GL784_C ..... [ 90]
#GL784_D ..... [ 90]
#GL784_E ..... [ 90]
#GL88_A ..... [ 90]
#GLT1 ..... [ 90]

#X85958 TTC CAC GAC AAG ATG GAG AAC GAG ATC GAG GTC CGC CGC GTC GAC GAC GAC ACG CGC GTG AAG ATG ATC AAG GAC GCC ATC GCA CAC CTC [180]
#GL308 ..... [180]
#GL158 ..... [180]
#GLA20 ..... [180]
#GLH15 ..... [180]
#GLH21 ..... [180]
#GL309 ..... [180]
#GL110 ..... [180]
#GL448 ..... [180]
#GL724 ..... [180]
#GL402 ..... [180]
#GL784_A ..... [180]
#GL784_B ..... [180]
#GL784_C ..... [180]
#GL784_D ..... [180]
#GL784_E ..... [180]
#GL88_A ..... [180]
#GLT1 ..... [180]

#X85958 GAC AGG CTC ATC CAG ACG GAG TCG AGG AAG CGC CAG GCC TCG TTC GAG GAC ATC CGC GAG GAG GTC AAG AAG TCC GCC GAC AAC ATG TAC [270]
#GL308 ..... [270]
#GL158 ..... [270]
#GLA20 ..... [270]
#GLH15 ..... [270]
#GLH21 ..... [270]
#GL309 ..... [270]
#GL110 ..... [270]
#GL448 ..... [270]
#GL724 ..... [270]
#GL402 ..... [270]
#GL784_A ..... [270]
#GL784_B ..... [270]
#GL784_C ..... [270]
#GL784_D ..... [270]
#GL784_E ..... [270]
#GL88_A ..... [270]
#GLT1 ..... [270]

#X85958 CTA ACG ATC AAG GAG GAG ATC GAC ACC ATG GCT GCA AAC TTC CGC AAG TCC CTT GCG GAG ATG GGC GAC ACA CTC AAC AAC GTT GAG ACA [360]
#GL308 ..... [360]
#GL158 ..... [360]
#GLA20 ..... [360]
#GLH15 ..... [360]
#GLH21 ..... [360]
#GL309 ..... [360]
#GL110 ..... [360]
#GL448 ..... [360]
#GL724 ..... [360]
#GL402 ..... [360]
#GL784_A ..... [360]
#GL784_B ..... [360]
#GL784_C ..... [360]
#GL784_D ..... [360]
#GL784_E ..... [360]
#GL88_A ..... [360]
#GLT1 ..... [360]

#X85958 AAT CTC CAG AAC CAG ATC GCC ATC CAT AAC GAC GCC ATC GCG GCT CTC AGG AAG GAG GCC CTC AAG AGC CTG AAC GAT CTC GAG ACG GGC [450]
#GL308 ..... [450]
#GL158 ..... [450]
#GLA20 ..... [450]
#GLH15 ..... [450]
#GLH21 ..... [450]
#GL309 ..... [450]
#GL110 ..... [450]
#GL448 ..... [450]
#GL724 ..... [450]
#GL402 ..... [450]
#GL784_A ..... [450]
#GL784_B ..... [450]
#GL784_C ..... [450]
#GL784_D ..... [450]
#GL784_E ..... [450]
#GL88_A ..... [450]
#GLT1 ..... [450]

```

```

#X85958 ATT GCC ACG GAG AAC GCA GAA AGG AAG AAG ATG TAC GAC CAG CTC AAC GAG AAG GTC GCA GAG GGC TTC GCC CGC ATC TCC GCC GCG ATC [540]
#GL308 ..... [540]
#GL158 ..... [540]
#GLA20 ..... [540]
#GLH15 ..... [540]
#GLH21 ..... [540]
#GL309 ..... [540]
#GL110 ..... [540]
#GL448 ..... [540]
#GL724 ..... [540]
#GL402 ..... [540]
#GL784_A ..... [540]
#GL784_B ..... [540]
#GL784_C ..... [540]
#GL784_D ..... [540]
#GL784_E ..... [540]
#GL88_A ..... [540]
#GLT1 ..... [540]

#X85958 GAG AAG GAG ACG ATC GCC CGC GAG AGG GCC GTT AGC GCT GCC ACG ACA GAA GCG CTC ACA AAC ACG AAG CTC GTC GAG AAG TGC GTC AAC [630]
#GL308 .....T ..... [630]
#GL158 .....T ..... [630]
#GLA20 .....T ..... [630]
#GLH15 .....T ..... [630]
#GLH21 .....T ..... [630]
#GL309 .....T ..... [630]
#GL110 .....T ..... [630]
#GL448 .....T ..... [630]
#GL724 .....T ..... [630]
#GL402 .....T ..... [630]
#GL784_A .....T ..... [630]
#GL784_B .....T ..... [630]
#GL784_C .....T ..... [630]
#GL784_D .....T ..... [630]
#GL784_E .....T ..... [630]
#GL88_A .....T ..... [630]
#GLT1 .....T ..... [630]

#X85958 GAG CAG CTC GAG AAC GTC GCC TCG GAG ATC CGC GCT ATC CAG GAG GAG ATC GAC CGC GAG AAG GCC GAA CGC AAG GAG GCA GAG GAC AAG [720]
#GL308 .....G ..... [720]
#GL158 .....G ..... [720]
#GLA20 .....G ..... [720]
#GLH15 .....G ..... [720]
#GLH21 .....G ..... [720]
#GL309 .....G ..... [720]
#GL110 .....G ..... [720]
#GL448 .....G ..... [720]
#GL724 .....G ..... [720]
#GL402 .....G ..... [720]
#GL784_A .....G ..... [720]
#GL784_B .....G ..... [720]
#GL784_C .....G ..... [720]
#GL784_D .....G ..... [720]
#GL784_E .....G ..... [720]
#GL88_A .....G ..... [720]
#GLT1 .....G ..... [720]

#X85958 ATC GTC AAC ACT CTC GAG GAC GTC GTC TCG AAG ATC [756]
#GL308 ..... [756]
#GL158 ..... [756]
#GLA20 ..... [756]
#GLH15 ..... [756]
#GLH21 ..... [756]
#GL309 ..... [756]
#GL110 ..... [756]
#GL448 ..... [756]
#GL724 ..... [756]
#GL402 ..... [756]
#GL784_A ..... [756]
#GL784_B ..... [756]
#GL784_C ..... [756]
#GL784_D ..... [756]
#GL784_E ..... [756]
#GL88_A ..... [756]
#GLT1 ..... [756]

```

Assemblage A Amino acid alignment

#X85958	TQTMDKPDLL	TRSATETAVK	LSNMNQRVSR	FHDKMENEIE	VRRVDDTRV	KMIKDIAIHL	DRLIQTESRK	RQASFEDIRE	EVKKSADNMY	[90]
#GL308	[90]
#GL158	[90]
#GLA20D.....	[90]
#GLH15	[90]
#GLH21	[90]
#GL309	[90]
#GL110	[90]
#GL448	[90]
#GL724	[90]
#GL402	[90]
#GL784_A	[90]
#GL784_BD.....G.....	[90]
#GL784_C	F.....	[90]
#GL784_D	[90]
#GL784_E	[90]
#GL88_A	[90]
#GLT1	[90]
#X85958	LTIKBEIDTM	AANFRKSLAE	MGDTLNNVET	NLQNQIAIHN	DATAALRKEA	LKSLNDLETG	IATENAERKK	MYDQLNEKVA	EGFARISAAI	[180]
#GL308	[180]
#GL158	[180]
#GLA20	[180]
#GLH15	[180]
#GLH21	[180]
#GL309	[180]
#GL110	[180]
#GL448	[180]
#GL724	[180]
#GL402	[180]
#GL784_AGA.....	[180]
#GL784_BG.....	[180]
#GL784_CA.....	[180]
#GL784_DP.....A.....	[180]
#GL784_E	[180]
#GL88_A	[180]
#GLT1	[180]
#X85958	EKETIARERA	VSAATTEALT	NTKLVEKCVN	EQLENVASEI	RAIQEEIDRE	KAERKEAEDK	IVNTLEDVVS	KI		[252]
#GL308	[252]
#GL158	[252]
#GLA20	[252]
#GLH15	[252]
#GLH21	[252]
#GL309	[252]
#GL110	[252]
#GL448	[252]
#GL724	[252]
#GL402	[252]
#GL784_A	[252]
#GL784_B	[252]
#GL784_C	[252]
#GL784_D	[252]
#GL784_E	[252]
#GL88_A	[252]
#GLT1	[252]

* ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์นับจาก start codon ของ coding region gene ใน reference strain X85958

Assemblage B Nucleotide alignment

```

#AY072725 ACC CAG ACG ATG GAC AAG CCC GAC GAC CTC ACC CGC AGT GCG ACT GAG ACG GCA GTC AAG CTC AGC AAC ATG AAC CAG CGC GTC AGC AGG [ 90]
#GL5 .....T .....C ..... [ 90]
#GL44 .....T .....C ..... [ 90]
#GL253_A .....T .....C ..... [ 90]
#GL253_B .....T .....C ..... [ 90]
#GL253_C .....T .....C ..... [ 90]
#GL253_D .....T .....C ..... [ 90]
#GL253_E .....T .....C ..... [ 90]
#GL751_A .....T .....C ..... [ 90]
#GL751_B .....T .....C ..... [ 90]
#GL751_C .....T .....C ..... [ 90]
#GL773_A .....T .....C ..... [ 90]
#GL773_B .....T .....C ..... [ 90]
#GL773_C .....T .....C ..... [ 90]
#GL773_D .....T .....C ..... [ 90]
#GL773_E .....T .....C ..... [ 90]
#GL107_A .....T .....C ..... [ 90]
#GL107_B .....T .....C ..... [ 90]
#GL107_C .....T .....C ..... [ 90]
#GL107_D .....T .....C ..... [ 90]
#GL107_E .....T .....C ..... [ 90]
#GL121_A .....T .....C ..... [ 90]
#GL121_B .....T .....C ..... [ 90]
#GL121_C .....T .....C ..... [ 90]
#GL121_D .....T .....C ..... [ 90]
#GL121_E .....T .....C ..... [ 90]
#GL144_A .....T .....C ..... [ 90]
#GL144_B .....T .....C ..... [ 90]
#GL144_C .....T .....C ..... [ 90]
#GL144_D .....T .....C ..... [ 90]
#GL144_E .....T .....C ..... [ 90]
#GL25_A .....T .....C ..... [ 90]
#GL25_B .....T .....C ..... [ 90]
#GL25_C .....T .....C ..... [ 90]
#GL25_D .....T .....C ..... [ 90]
#GL25_E .....T .....C ..... [ 90]
#GL88_B .....T .....C ..... [ 90]
#GL88_C .....T .....C ..... [ 90]
#GL88_D .....T .....C ..... [ 90]
#GL88_E .....T .....C ..... [ 90]
#GL34_A .....T .....C ..... [ 90]
#GL34_B .....T .....C ..... [ 90]
#GL34_C .....T .....C ..... [ 90]
#GL34_D .....T .....C ..... [ 90]
#GL34_E .....T .....C ..... [ 90]
#GL518_A .....T .....C ..... [ 90]
#GL518_B .....T .....C ..... [ 90]
#GL518_C .....T .....C ..... [ 90]
#GL518_D .....T .....C ..... [ 90]
#GL518_E .....T .....C ..... [ 90]
#GL279 .....T .....C ..... [ 90]
#GL719_A .....T .....C ..... [ 90]
#GL719_B .....T .....C ..... [ 90]
#GL719_C .....T .....C ..... [ 90]
#GL719_D .....T .....C ..... [ 90]
#GLT2 .....T .....C ..... [ 90]
#GLH13 .....T .....C ..... [ 90]
#GLA2 .....T .....C ..... [ 90]
#GLA9_A .....T .....C ..... [ 90]
#GLA9_B .....T .....C ..... [ 90]
#GLA9_C .....T .....C ..... [ 90]
#GLA9_D .....T .....C ..... [ 90]
#GLA9_E .....T .....C ..... [ 90]

#AY072725 TTC CAC GAC AAG ATG GAG AAC GAG ATC GAG GTC CGC CGC GTC GAC GAC GAC ACG CGT GTG AAG ATG ATC AAG GAC GCC ATC GCG CAC CTT [180]
#GL5 ..... [180]
#GL44 ..... [180]
#GL253_A .....T ..... [180]
#GL253_B .....T ..... [180]
#GL253_C .....T ..... [180]
#GL253_D .....T ..... [180]
#GL253_E .....T ..... [180]
#GL751_A .....T ..... [180]
#GL751_B .....T ..... [180]
#GL751_C .....T ..... [180]
#GL773_A .....T ..... [180]
#GL773_B .....T ..... [180]
#GL773_C .....T ..... [180]
#GL773_D .....T ..... [180]
#GL773_E .....T ..... [180]
#GL107_A .....T ..... [180]
#GL107_B .....T ..... [180]
#GL107_C .....T ..... [180]
#GL107_D .....T ..... [180]
#GL107_E .....T ..... [180]
#GL121_A .....T ..... [180]
#GL121_B .....T ..... [180]
#GL121_C .....T ..... [180]
#GL121_D .....T ..... [180]
#GL121_E .....T ..... [180]
#GL144_A .....T ..... [180]
#GL144_B .....T ..... [180]
#GL144_C .....T ..... [180]
#GL144_D .....T ..... [180]
#GL144_E .....T ..... [180]
#GL25_A ..... [180]
#GL25_B ..... [180]
#GL25_C ..... [180]
#GL25_D ..... [180]
#GL25_E ..... [180]

```

```

#GL88_B      ... ..T ... ..C [180]
#GL88_C      ... ..T ... ..C [180]
#GL88_D      ... ..T ... ..C [180]
#GL88_E      ... ..G ... ..C [180]
#GL34_A      ... ..T ... ..C [180]
#GL34_B      ... ..T ... ..C [180]
#GL34_C      ... ..T ... ..C [180]
#GL34_D      ... ..T ... ..C [180]
#GL34_E      ... ..T ... ..C [180]
#GL518_A     ... ..T ... ..C [180]
#GL518_B     ... ..T ... ..C [180]
#GL518_C     ... ..T ... ..C [180]
#GL518_D     ... ..A ... ..C [180]
#GL518_E     ... ..T ... ..C [180]
#GL279       ... ..T ... ..C [180]
#GL719_A     ... ..T ... ..C [180]
#GL719_B     ... ..T ... ..C [180]
#GL719_C     ... ..T ... ..C [180]
#GL719_D     ... ..T ... ..C [180]
#GLT2        ... ..T ... ..C [180]
#GLH13       ... ..T ... ..C [180]
#GLA2        ... ..A ... ..C [180]
#GLA9_A      ... ..T ... ..C [180]
#GLA9_B      ... ..T ... ..C [180]
#GLA9_C      ... ..T ... ..C [180]
#GLA9_D      ... ..T ... ..C [180]
#GLA9_E      ... ..T ... ..C [180]

#AY072725   GAC AGA CTC ATC CAG ACA GAG TCG AGG AAG CGC CAG GCC TCG TTC GAG GAC ATC CGC GAG GAA GTC AAG AAG TCT GCC GAC AAC ATG TAC [270]
#GL5         ... ..T ... ..C [270]
#GL44        ... ..T ... ..C [270]
#GL253_A     ... ..T ... ..C [270]
#GL253_B     ... ..T ... ..C [270]
#GL253_C     ... ..G ... ..C [270]
#GL253_D     ... ..T ... ..C [270]
#GL253_E     ... ..T ... ..C [270]
#GL751_A     ... ..G ... ..C [270]
#GL751_B     ... ..G ... ..C [270]
#GL751_C     ... ..G ... ..C [270]
#GL773_A     ... ..C ... ..C [270]
#GL773_B     ... ..T ... ..C [270]
#GL773_C     ... ..T ... ..C [270]
#GL773_D     ... ..T ... ..C [270]
#GL773_E     ... ..T ... ..C [270]
#GL107_A     ... ..T ... ..C [270]
#GL107_B     ... ..T ... ..C [270]
#GL107_C     ... ..T ... ..C [270]
#GL107_D     ... ..T ... ..C [270]
#GL107_E     ... ..T ... ..C [270]
#GL121_A     ... ..C ... ..C [270]
#GL121_B     ... ..T ... ..C [270]
#GL121_C     ... ..T ... ..C [270]
#GL121_D     ... ..T ... ..C [270]
#GL121_E     ... ..T ... ..C [270]
#GL144_A     ... ..T ... ..C [270]
#GL144_B     ... ..T ... ..C [270]
#GL144_C     ... ..T ... ..C [270]
#GL144_D     ... ..T ... ..C [270]
#GL144_E     ... ..T ... ..C [270]
#GL25_A      ... ..T ... ..C [270]
#GL25_B      ... ..T ... ..C [270]
#GL25_C      ... ..T ... ..C [270]
#GL25_D      ... ..T ... ..C [270]
#GL25_E      ... ..T ... ..C [270]
#GL88_B      ... ..T ... ..C [270]
#GL88_C      ... ..T ... ..C [270]
#GL88_D      ... ..T ... ..C [270]
#GL88_E      ... ..T ... ..C [270]
#GL34_A      ... ..G ... ..C [270]
#GL34_B      ... ..T ... ..C [270]
#GL34_C      ... ..T ... ..C [270]
#GL34_D      ... ..T ... ..C [270]
#GL34_E      ... ..T ... ..C [270]
#GL518_A     ... ..T ... ..C [270]
#GL518_B     ... ..T ... ..C [270]
#GL518_C     ... ..T ... ..C [270]
#GL518_D     ... ..T ... ..C [270]
#GL518_E     ... ..T ... ..C [270]
#GL279       ... ..T ... ..C [270]
#GL719_A     ... ..G ... ..C [270]
#GL719_B     ... ..G ... ..C [270]
#GL719_C     ... ..T ... ..C [270]
#GL719_D     ... ..T ... ..C [270]
#GLT2        ... ..T ... ..C [270]
#GLH13       ... ..T ... ..C [270]
#GLA2        ... ..T ... ..C [270]
#GLA9_A      ... ..C ... ..C [270]
#GLA9_B      ... ..T ... ..C [270]
#GLA9_C      ... ..T ... ..C [270]
#GLA9_D      ... ..T ... ..C [270]
#GLA9_E      ... ..T ... ..C [270]

```


Assemblage B (nucleotide substitution only)

	11	1111111111	1122222222	2333333333	3444444445	5556666666	6666777777	77
	5566778900	1233446678	9900122779	9122556678	9356889993	3781244455	5689002333	56
	0439351507	8957592470	4817048350	6878455635	4834131562	8480845848	9843573147	72
#AY072725	CCCTATGGAA	ACGAAACATG	ACCCTAAATA	TGTATGGCCG	CTCAACACGA	GACGATCACA	ATGCGAGGAA	AA
#GL5	.TTC.....C.....	.C.....G..
#GL44	.TTC.....C.....	.C.....G..
#GL253_A	.TTC.....	.T.....C.C....	.C.....G..
#GL253_B	.TTC.....	.T.....C.C....	.C.....	..T...G..
#GL253_C	.T.C.....C.G...	..C.C....	.C.....TGT.
#GL253_D	.TTC.....	.T.....C.C....	.C.....TGT.
#GL253_E	.TTC.....C.C....	.C.....TGT.
#GL751_A	.TTC....G.T...	..C.G...	..C.C....	.C.....A..
#GL751_B	.TTC.....TC.G...	..C.C....	.C.....G..
#GL751_C	.TTC.....T...	..C.G...	..C.C.A...	.C.....G..
#GL773_A	.TTC....G.	.T.....	..CC....	..C.C....	.C.....G..
#GL773_B	.TTC.C....	.T.....C.C.T...	.C.....G..
#GL773_C	.TTC.....	.T.....C.C....	.C.....	A.....G..
#GL773_D	.TTC.....C.....	..C.C....	.C.....G..
#GL773_E	.TTC.....	.T.....C.C....	.C.....	..A...G..	G.....	..
#GL107_A	.T.C.....C.....	..C.C....	.C.G....GG..
#GL107_B	.T.C.....	G.....	..C.....	..C.C....	.C.....G..
#GL107_C	.T.C.....	G..C....	..C.C....	.C.....G.G
#GL107_D	.T.CG....C.....	..C.C....	.C.....G..	A.....	..
#GL107_E	.T.C.....C.....	..C.C....	.C.....G..
#GL121_A	.T.C.....C.....	C.C.C....	.C.....G..
#GL121_B	.TTC.....	..G....	..C.....	..C.C....	.C.....G..
#GL121_C	.TTC.....	..C....	..C.....	..C.C....	.C.....G..
#GL121_D	.TTC.....C.....	..C.C....	.C.....G..
#GL121_E	.TTC.....C.....	..C.C....	.C.....G..
#GL144_A	.T.C.....C.....	..C.....	.C.....G..
#GL144_B	.T.C.....C.....	..CG....	.C.....G..
#GL144_C	.T.C.....C.....	..CGC....	.C.....	..G....
#GL144_D	.T.C.....C.....	..C.....	.C.....	..G....G..	..
#GL144_E	.T.C.....C.....	..C.....	.C.....G..
#GL25_A	.TTC.....C.....	..C.A....	.C.....G..
#GL25_B	.TTC.....C.....	..C.C....	.C.....G..	..A....	..
#GL25_C	.TTC.....C.....	..C.....	.C.....G..
#GL25_D	.TTC.....C.....	..C.....	.C.....G..	..TA....	..
#GL25_E	.TTC.....C.....	..C.C....	.C.....G..	..T....	..
#GL88_B	.TTC.....T.C....	..C...T...	.C.....G..
#GL88_C	.T.C.....T.C....	..C.C....	.C.....G..G..	..
#GL88_D	.T.C.....T.C....	..C.C....	.C.G....G..
#GL88_E	.TTC.....	..G....	..T.C....	..C.C....	.C.....G..
#GL34_A	.TTC.....C...G	AC....	.C.T....G..	G..
#GL34_B	.T.C.....C.....	..C.....	.C.....G..	..A....	..
#GL34_C	.T.C.....	..T....	..C.....	..C.....	.C.....	..G...G..	..A....	..
#GL34_D	.TTC.....C.....	..C.....	.C.A....G..	..A....	..
#GL34_E	.TTC.....C.....	..C.....	TC.....G..	..A....	..
#GL518_A	TT.C.....C.....	..C.C....	.C.....G..
#GL518_B	.TTC.....C.....	..C.C....	.C.....G..
#GL518_C	.T.C.....C.....	..C.....	.C.A....G..
#GL518_D	.TTC.....	..A....	..C.....	..C.C....	.C.....G..
#GL518_E	.T.C.....C.....	..C.....	.C.....G..
#GL279	.TTC.....C.....	..C.....	.C.....G..	..A....	..
#GL719_A	.TTC.....T.C.G...	..C.C....	.CT.....G..	G..
#GL719_B	.TTC.....C.G....	..C.....	.C.....G..
#GL719_C	.T.C.....C.....	..C.C....	.C.....G..
#GL719_D	.TTC.....	G....	..C.....	..C.C....	.C.....G..
#GLT2	.TTC.....C.....	..C.....	.C.....G..	..A....	..
#GLH13	.TTC.....	.T.....	..C.....	..C.C....	.C...T...G..
#GLA2	.TTC.....	..A....	..C.....	..C.....	.C.....G..
#GLA9_A	.TTC.....	.T.....	..C...C	..C.C....	.C...GT..G..	GG
#GLA9_B	.TTC.....	.T.....	..C.....	..C.C...A	.C...T...G..
#GLA9_C	.TTC...A..	.T.....	..C.....	..C.C....	.C...T...G..	..A....	..
#GLA9_D	.TTC.....	.T.G....	..C.....	..C.C....	.C...T...	..G...G..
#GLA9_E	.TTC...A..	.T.....	..C.....	..C.C....	.C...T...G..G

* ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์นับจาก start codon ของ coding region gene ใน reference strain X85958

Assemblage B Amino acid alignment

```

#AY072725 TQTMDKPDLL TRSATETAVK LSNMNRVSR FHKMENEIE VRRVDDTRV KMIKDAIAHL DRLIQTESRK RQASFEDIRE EVKKSADNMY [ 90]
#GL5 ..... [ 90]
#GL44 ..... [ 90]
#GL253_A ..... [ 90]
#GL253_B ..... [ 90]
#GL253_C ..... [ 90]
#GL253_D ..... [ 90]
#GL253_E ..... [ 90]
#GL751_A ..... V ..... [ 90]
#GL751_B ..... [ 90]
#GL751_C ..... [ 90]
#GL773_A ..... R ..... P ..... [ 90]
#GL773_B ..... [ 90]
#GL773_C ..... [ 90]
#GL773_D ..... [ 90]
#GL773_E ..... [ 90]
#GL107_A ..... [ 90]
#GL107_B ..... G ..... [ 90]
#GL107_C ..... G ..... [ 90]
#GL107_D ..... A ..... [ 90]
#GL107_E ..... [ 90]
#GL121_A ..... [ 90]
#GL121_B ..... G ..... T ..... [ 90]
#GL121_C ..... [ 90]
#GL121_D ..... [ 90]
#GL121_E ..... [ 90]
#GL144_A ..... [ 90]
#GL144_B ..... [ 90]
#GL144_C ..... [ 90]
#GL144_D ..... [ 90]
#GL144_E ..... [ 90]
#GL25_A ..... [ 90]
#GL25_B ..... [ 90]
#GL25_C ..... [ 90]
#GL25_D ..... [ 90]
#GL25_E ..... [ 90]
#GL88_B ..... [ 90]
#GL88_C ..... [ 90]
#GL88_D ..... [ 90]
#GL88_E ..... G ..... [ 90]
#GL34_A ..... G ..... [ 90]
#GL34_B ..... [ 90]
#GL34_C ..... V ..... [ 90]
#GL34_D ..... [ 90]
#GL34_E ..... [ 90]
#GL518_A ..... L ..... [ 90]
#GL518_B ..... [ 90]
#GL518_C ..... [ 90]
#GL518_D ..... I ..... [ 90]
#GL518_E ..... [ 90]
#GL279 ..... [ 90]
#GL719_A ..... [ 90]
#GL719_B ..... [ 90]
#GL719_C ..... [ 90]
#GL719_D ..... G ..... [ 90]
#GLT2 ..... [ 90]
#GLH13 ..... [ 90]
#GLA2 ..... [ 90]
#GLA9_A ..... A ..... [ 90]
#GLA9_B ..... [ 90]
#GLA9_C ..... N ..... [ 90]
#GLA9_D ..... V ..... [ 90]
#GLA9_E ..... [ 90]

#AY072725 LTIKEEIDTM AANFRKSLAE MGDTLNNVET NLQNQIAIHN DAIAALRKEA LKSLNDLETG IATENAERKK MYDQNEKVA EGFARISAAI [180]
#GL5 ..... [180]
#GL44 ..... [180]
#GL253_A ..... [180]
#GL253_B ..... [180]
#GL253_C ..... [180]
#GL253_D ..... [180]
#GL253_E ..... [180]
#GL751_A ..... [180]
#GL751_B ..... [180]
#GL751_C ..... D ..... [180]
#GL773_A ..... [180]
#GL773_B ..... [180]
#GL773_C ..... T ..... [180]
#GL773_D ..... [180]
#GL773_E ..... [180]
#GL107_A ..... S ..... E ..... [180]
#GL107_B ..... [180]
#GL107_C ..... [180]
#GL107_D ..... [180]
#GL107_E ..... [180]
#GL121_A ..... [180]
#GL121_B ..... [180]
#GL121_C ..... [180]
#GL121_D ..... [180]
#GL121_E ..... [180]
#GL144_A ..... [180]
#GL144_B ..... V ..... [180]
#GL144_C ..... V ..... [180]
#GL144_D ..... [180]
#GL144_E ..... [180]
#GL25_A ..... T ..... [180]
#GL25_B ..... [180]
#GL25_C ..... [180]
#GL25_D ..... [180]

```


Assemblage B Amino acid substitution only

	1111111	1122223333	3344445556	6666677777
	5790013344	6927992567	8968993371	2455603335
	0350785759	4445068553	5441162840	8589871477
#AY072725	PTSMQRMEIE	DDQVDMAGL	ELNIEAKAKA	TVNLERKEN
#GL5
#GL44
#GL253_A
#GL253_B
#GL253_C
#GL253_D
#GL253_E
#GL751_A	...V.....
#GL751_B
#GL751_CD.....
#GL773_A	...R.....	...P.....
#GL773_B
#GL773_CT.....
#GL773_D
#GL773_ET.....	...S.....
#GL107_AS...E...
#GL107_B	...G.....
#GL107_CG.....D.....
#GL107_D	.A.....	...G.....H.....
#GL107_E
#GL121_AT.....
#GL121_B	...G.....
#GL121_C
#GL121_D
#GL121_E
#GL144_A
#GL144_BV.....
#GL144_CV.....A.....
#GL144_DA...R...
#GL144_E
#GL25_AT.....
#GL25_B
#GL25_C
#GL25_D
#GL25_E
#GL88_BF.....
#GL88_CG.....
#GL88_DV.....
#GL88_E	...G.....
#GL34_AG.....D.....
#GL34_B
#GL34_CV.....E...H...
#GL34_DT.....
#GL34_EF.....
#GL518_A	L.....
#GL518_B
#GL518_CD.....
#GL518_D	...I.....
#GL518_E
#GL279
#GL719_AG.....
#GL719_B
#GL719_C
#GL719_D	...G.....
#GLT2
#GLH13
#GLA2
#GLA9_AA.....	...G.....	...D.....
#GLA9_BK.....
#GLA9_C	...N.....
#GLA9_D	...V.....A.....
#GLA9_E

* ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์นับจาก start codon ของ coding region gene ใน reference strain X85958

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรัตน์ดิพร โกสุวรินทร์ เกิดเมื่อวันที่ 14 กันยายน 2526 จังหวัดตาก สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย