สังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในทางเดินอาหารของหนอนพยาธิตัวกลม (*Ascaris lumbricoides*)
ในผู้ป่วยไทย

นายปวิช กลมเกลียว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววสารสนเทศศาสตร์และชีววิทยาเชิงคอมพิวเตอร์ (สหสาขาวิชา) สหสาขาวิชาชีวสารสน
เทศศาสตร์และชีววิทยาทางคอมพิวเตอร์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Gut Bacteriome and Metabolome of Large roundworm (*Ascaris lumbricoides*) in Thai patients

Mr. Pavit Klomkliew

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Bioinformatics and Computational Biology
Inter-Department of Bioinformatics and Computational Biology
GRADUATE SCHOOL
Chulalongkorn University
Academic Year 2021
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในทางเดินอาหารของหนอนพยาธิตัวกลม (*Ascaris lumbricoides*) ในผู้ป่วยไทย
โดย	นายปวิช กลมเกลียว
สาขาวิชา	ชีวสารสนเทศศาสตร์และชีววิทยาเชิงคอมพิวเตอร์ (สหสาขาวิชา)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สัญชัย พยุงภร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ยุทธนา ฉัพพรรณรัตน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัญชัย พยุงภร)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นราพร สมบูรณ์นะ)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรภัค เรี่ยมทอง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ปวิช กลมเกลียว : สังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในทางเดินอาหารของหนอนพยาธิตัวกลม (*Ascaris lumbricoides*) ในผู้ป่วยไทย. (Gut Bacteriome and Metabolome of Large roundworm (*Ascaris lumbricoides*) in Thai patients) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.สัญชัย พยุงภร

โรคพยาธิไส้เดือน (Ascariasis) คือ การติดเชื้อพยาธิในลำไส้อันเกิดจากพยาธิไส้เดือน (*Ascaris lumbricoides*) ที่พบมากในประเทศกำลังพัฒนา และมีแนวโน้มต่อการดื้อยาต้านพยาธิในมนุษย์มากยิ่งขึ้น จากองค์ความรู้ในปัจจุบันพบว่าสังคมแบคทีเรียในลำไส้มีบทบาทสำคัญต่อสรีรวิทยา และภูมิคุ้มกันของมนุษย์ อย่างไรก็ตามพยาธิ และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ที่สภาพแวดล้อมเดียวกันกลับไม่พบรายงานปฏิสัมพันธ์อย่างชัดเจน เพื่อให้เข้าใจความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนเหล่านี้จึงทำการศึกษาสังคมแบคทีเรียในลำไส้ของพยาธิ และอุจจาระของมนุษย์ด้วยเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ (NGS; Next-generation sequencing) ผลการศึกษาพบว่าสถานะการติดเชื้อโรคพยาธิสัมพันธ์กับรูปแบบของสังคมแบคทีเรียในลำไส้หนอนพยาธิ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเมตาโบโลมในลำไส้พยาธิผ่านการระบุชนิด และโครงสร้างของสารเมแทบอไลต์ด้วยเทคโนโลยีวิเคราะห์อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี (UHPLC-MS; Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry) พบระดับของสารชีวโมเลกุลที่จำเป็นอาทิ กรดอะมิโน ไขมัน และสารตั้งต้นของนิวคลีโอไทด์เพิ่มมากขึ้นในพยาธิที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อรุนแรง ซึ่งสรุปได้ว่าสารเมแทบอไลต์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไข่พยาธิและการเกิดโรคพยาธิไส้เดือน จึงเป็นที่น่าสนใจว่าการค้นพบนี้จะช่วยสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานของแบคทีเรียในลำไส้หนอนพยาธิ รวมถึงช่วยให้ค้นพบแนวทางในการรักษาโรคปรสิตแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

สาขาวิชา	ชีวสารสนเทศศาสตร์และชีววิทยาเชิงคอมพิวเตอร์ (สหสาขาวิชา)	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา	2564	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....

6282026020 : MAJOR BIOINFORMATICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY

KEYWORD: Ascaris lumbricoides, Gut bacteriome, Metabolome, Next-generation sequencing (NGS), Ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS)

Pavit Klomkliew : Gut Bacteriome and Metabolome of Large roundworm (*Ascaris lumbricoides*) in Thai patients. Advisor: Assoc. Prof. SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D.

Ascariasis is an intestinal helminth infection caused by large roundworms (*Ascaris lumbricoides*), which is commonly found in developing countries and tends to increase resistance against anthelmintic treatment in humans. With current knowledge, the gut bacteriome contributes a fundamental role in host physiology and immunity. However, helminths and bacteria in guts share the same environment, and it is unclear how they interact. To further understand these complex interactions, the bacteriome in the gut of helminths and fecal samples of participants were analyzed by next-generation sequencing (NGS). Results showed that the ascariasis status was associated with the bacterial composition in the gut of helminths. Moreover, the metabolomes in the gut of helminths were characterized as metabolites based on ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS). Increasing levels of essential biomolecules including amino acids, lipids, and nucleotide precursors were observed in the helminths isolated from heavy infected patients, implying that these metabolites might be related to the production of helminth eggs and ascariasis pathogenicity. Interestingly, our findings are the first step to a better understanding of mechanisms by which bacteriome in the gut helminths may reveal novel and more effective approaches to the therapy of parasite disease.

Field of Study:	Bioinformatics and Computational Biology	Student's Signature ....
Academic Year:	2021	Advisor's Signature ....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยแรงกาย แรงใจ และความอนุเคราะห์จากผู้มีอุปการะคุณหลายฝ่ายที่คอยช่วยพลักดันให้เกิดความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัญชัย พยุงภร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้ และคำปรึกษาในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนเป็นแรงผลักดันตลอดการศึกษานี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นราพร สมบูรณ์นะ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในหลักสูตร และ รองศาสตราจารย์ ดร.อรภัค เรี่ยมทอง กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ครบถ้วน

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นผู้มอบทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ซึ่งเป็นผู้สนับสนุนทุนการศึกษา และค่าใช้จ่ายในการเรียนระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยจุลชีววิทยาเชิงระบบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเครื่องมือ และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการจากภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ดำเนินการเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครในจังหวัดตาก

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจและเป็นแรงผลักดันที่ดี รวมถึงให้ความรัก ความเข้าใจ และคอยสนับสนุนตลอดการศึกษา

ปวิช กลมเกลียว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	1
บทที่ 1 บทนำ	3
ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย (Background and Rationale)	3
คำถามงานวิจัย (Research Questions)	4
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)	4
สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)	4
ขอบเขตของงานวิจัย	4
วิธีดำเนินการวิจัย (Research workflow)	5
คำสำคัญ	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
โรคพยาธิไส้เดือน	7
รูปร่างลักษณะของพยาธิไส้เดือน	7
ชนิดและลักษณะของพยาธิไส้เดือน	8
วงจรชีวิตของพยาธิไส้เดือน	9
พยาธิสภาพและอาการของโรคพยาธิไส้เดือน	10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การวินิจฉัยโรคพยาธิไส้เดือน 11
การรักษาโรคพยาธิไส้เดือน 11
การศึกษาสังคมจุลชีพในปัจจุบัน 12
การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสต่อการศึกษาสังคมแบคทีเรีย 13
หลักการและทฤษฎีของเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ด้วยเครื่องอิลลูมินา 13
การศึกษาเมแทบอโลมในปัจจุบัน 15
หลักการและทฤษฎีของเทคโนโลยีวิเคราะห์อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี 16
เทคนิคแยกสารอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี 17
เทคนิควิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคแมสส์สเปกโทรเมตรี 17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 20
รูปแบบการวิจัย (Research Design) 20
เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย 20
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 21
แหล่งที่มาของตัวอย่างในงานวิจัย 22
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ 23
1. การศึกษาสังคมแบคทีเรียด้วยวิธีเมตาจีโนมิกส์ 23
2. การศึกษาเมแทบอโลมด้วยวิธีเมแทโบโลมิกส์ 31
3. การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้ของหนอนพยาธิ .. 34
บทที่ 4 ผลการศึกษา 35
ข้อมูลจากการหาลำดับเบสด้วยเครื่องอิลลูมินา 35
ชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์ 36
ชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียในพยาธิไส้เดือน 38
เปรียบเทียบชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียระหว่างมนุษย์กับพยาธิไส้เดือน 38

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ความแตกต่างทางความชุกของสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิต่อสถานะการติดเชื้อ 42
เมแทบอโลมในตัวอย่างลำไส้พยาธิที่ระดับสถานะการติดเชื้อรุนแรงมากและน้อย....................... 43
วิถีเมแทบอลิซึมในลำไส้ของพยาธิไส้เดือนที่สถานะการติดเชื้อรุนแรงมากและน้อย..................... 46
ปฏิสัมพันธ์แบบเครือข่ายระหว่างสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้ของหนอนพยาธิ 47
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง 49
การศึกษาชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์และพยาธิไส้เดือน.......... 49
การศึกษาชนิดและวิถีเมแทบอลิซึมของเมแทบอโลมในลำไส้พยาธิไส้เดือน 50
การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้ของพยาธิ........................ 51
ข้อเสนอแนะ 52
ภาคผนวก.. 53
บรรณานุกรม.. 63
ประวัติผู้เขียน.. 69

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดทางการแพทย์ของอาสาสมัครในจังหวัดตากที่มีการระบาดโรคพยาธิไส้เดือน 23

ตารางที่ 2 แสดงลำดับไพร์เมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสบริเวณ V4 บนยีน 16S rRNA...... 25

ตารางที่ 3 แสดงสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสบริเวณ V4 บนยีน 16S rRNA................ 26

ตารางที่ 4 แสดงสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสบริเวณ V4 บนยีน 16S rRNA................. 26

ตารางที่ 5 แสดงสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสต่อการเชื่อมปลายด้วยอะแดปเตอร์ 27

ตารางที่ 6 แสดงสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสต่อการเชื่อมปลายด้วยอะแดปเตอร์ 27

ตารางที่ 7 แสดงลำดับไพร์เมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลังดีเอ็นเอต้นแบบ 29

ตารางที่ 8 แสดงสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์... 29

ตารางที่ 9 แสดงสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์... 30

ตารางที่ 10 แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด 32

ตารางที่ 11 แสดงอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลา.. 33

ตารางที่ 12 แสดงรายละเอียดในเชิงปริมาณของข้อมูลสายลำดับเบส 35

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะภายนอกของพยาธิไส้เดือนตัวเต็มวัยเพศผู้และเมีย 8

ภาพที่ 2 แสดงชนิดและลักษณะของไข่พยาธิ 9

ภาพที่ 3 แสดงวงจรชีวิตของพยาธิไส้เดือน 10

ภาพที่ 4 แสดงการเตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบด้วยวิธีสะพานโค้งเชื่อมต่อ 14

ภาพที่ 5 แสดงการหาลำดับเบสโดยอาศัยหลักการการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอร่วมกับคุณสมบัติการคืนสภาพกลับโดยการตัดหมู่เคมี 15

ภาพที่ 6 แสดงระบบทำงานของเทคโนโลยีวิเคราะห์อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี 16

ภาพที่ 7 แสดงส่วนประกอบของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์แบบควอดรูโพล-ไทม์ออฟไฟล์ท 19

ภาพที่ 8 แสดงจำนวนชุดข้อมูลดิบของสายลำดับเบสในแต่ละตัวอย่างด้วยสีที่แตกต่างกัน โดยสายลำดับเบสดังกล่าวสามารถจัดกลุ่มเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียในระดับอนุกรมวิธาน 35

ภาพที่ 9 แสดงชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์ 37

ภาพที่ 10 แสดงชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิและมนุษย์ 40

ภาพที่ 11 กราฟแท่งแสดงชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในระดับไฟลัมและสกุลที่โดดเด่นในลำไส้ของพยาธิไส้เดือนบริเวณส่วนต้นและส่วนปลาย 41

ภาพที่ 12 แสดงความแตกต่างทางความชุกของสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิเทียบกับสถานะการติดเชื้อโรคพยาธิไส้เดือนด้วยการวิเคราะห์ผลกระทบในการจำแนกกลุ่มเชิงเส้น 42

ภาพที่ 13 แสดงผลวิเคราะห์เมแทบอโลมประจุบวกในตัวอย่างลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อโรครุนแรงมากและน้อย 44

ภาพที่ 14 แสดงผลวิเคราะห์เมแทบอโลมประจุลบในตัวอย่างลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อโรครุนแรงมากและน้อย 45

ภาพที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์วิถีเมแทบอลิซึมในลำไส้ของพยาธิไส้เดือน 46

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 16 แสดงปฏิสัมพันธ์แบบเครือข่ายระหว่างสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้ของพยาธิ 48

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
16S rRNA	16S ribosomal RNA
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization source
bp	Base pair
CEM	Channel electron multiplier
cm	Centimeter
ESI	Electrospray ionization source
HVR	Hypervariable regions
Hz	Hertz
kg	Kilogram
LC	Liquid chromatography
LDA score	Linear discrimination analysis score
LEfSe	Linear discriminant analysis effect size
mg	Milligram
min	minutes
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Mass spectrometry
m/z	Mass-to-charge ratio
NGS	Next-generation sequencing
nM	Nanomolar
OTUs	Operational taxonomic units
PCR	Polymerase chain reaction
PCoA	Principal coordinate analysis
PLS-DA	Partial least squares-discriminant analysis
pM	Picomolar
ppm	Part Per Million
Q30	Quality score
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

sec	seconds
SGSTs	Second generation sequencing technologies
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
STHs	Soil-transmitted helminths
TGSTs	Third generation sequencing technologies
tRNA	transfer RNA
V4	Fourth hypervariable region
U	Unit
UHPLC-MS	Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry
µg	Microgram
µL	Microliter
µM	Micromolar
%v/v	Percent by volume
°C	Celsius

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย (Background and Rationale)

โรคพยาธิไส้เดือน (Ascariasis) เกิดจากการติดเชื้อด้วยพยาธิไส้เดือน (*Ascaris lumbricoides*) บริเวณลำไส้ จากรายงานการติดเชื้อพยาธิในลำไส้ขององค์การอนามัยโลก (1) พบผู้ติดเชื้อมากถึง 1 พันล้านคนทั่วโลกคิดเป็นร้อยละ 10 ของผู้ติดเชื้อที่พบในประเทศกำลังพัฒนา เนื่องจากขาดการจัดการสุขาภิบาลและสุขอนามัยที่ได้มาตราฐาน ในปัจจุบันการรักษาโรคพยาธิไส้เดือนนิยมให้ผู้ป่วยรับประทานยาต้านพยาธิ (Anthelmintic drug) เพื่อบรรเทาอาการของโรคผ่านการลดจำนวนไข่และตัวพยาธิในลำไส้ (2) รวมไปถึงการศึกษาอิทธิพลต่อการยับยั้งด้วยยาต้านพยาธิของโรคพยาธิไส้เดือนในประเทศรวันดา (3) และระยะเวลาที่ใช้ในการรักษาด้วยยา (4) ให้เห็นถึงแนวโน้มต่อการดื้อยาที่เพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดข้อสงสัยต่อประสิทธิภาพของยาต้านพยาธิในการรักษาโรคพยาธิไส้เดือน

ปัจจุบันการศึกษาสังคมแบคทีเรียด้วยวิธีเมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics) ที่ศึกษาดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้งหมดในระบบชีวภาพตามธรรมชาติ เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียผ่านยีน 16S rRNA อย่างจำเพาะ โดยจะนำส่วนของยีนที่เพิ่มขึ้นดังกล่าวมาวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่พบในระดับอนุกรมวิธานด้วยเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ (NGS; Next-generation sequencing) ผลการศึกษาสามารถอธิบายความสัมพันธ์ของแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี โดยการประยุกต์ใช้วิธีเมตาจีโนมิกส์สามารถนำมาอธิบายภาวะสุขภาพของมนุษย์ กับชนิดของแบคทีเรียที่พบในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (5) รวมถึงประยุกต์ใช้เพื่อรักษาโรคอ้วนชนิดเรื้อรังในมนุษย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (6) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธีดังกล่าวสามารถใช้ต่อยอดความรู้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสังคมแบคทีเรียกับวิถีเมแทบอลิซึม (Metabolic pathway) ผ่านการศึกษาด้วยวิธีเมแทโบโลมิกส์ (Metabolomics) ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดและปริมาณของสารเมแทบอไลต์ (Metabolite) ด้วยเทคโนโลยีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี (UHPLC-MS; Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry) (7) โดยเทคนิคประยุกต์ร่วมระหว่างวิธีเมตาจีโนมิกส์และเมแทโบโลมิกส์ ได้รับการยอมรับและตีพิมพ์ผลงานในระดับนานาชาติอย่างกว้างขว้าง อาทิ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสังคมแบคทีเรีย และสารเมแทบอไลต์ในตัวอย่างน้ำลายและอุจจาระของมนุษย์ (8) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามเมื่อนำข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับการดื้อยาต้านพยาธิในโรคพยาธิไส้เดือนผนวกกับองค์ความรู้เกี่ยวกับชนิดและสัดส่วนของแบคทีเรียที่พบในลำไส้มนุษย์สัมพันธ์กับภาวะสุขภาพที่อาจนำไปสู่โรคเรื้อรังชนิดต่าง ๆ (9, 10) รวมไปถึงแนวคิดที่ได้จากการผนวกวิธีศึกษาระหว่างเมตาจีโน

มิกส์และเมแทโบโลมิกส์ดังที่กล่าวไปข้างต้น นำไปสู่ข้อสมมติฐานในการหาความสัมพันธ์ระหว่างสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้ของมนุษย์และพยาธิไส้เดือน เพื่อในอนาคตจะนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้รักษาโรคทางพยาธิต่อไป

คำถามงานวิจัย (Research Questions)

1. แบคทีเรียในลำไส้ของมนุษย์และพยาธิไส้เดือนมีความสัมพันธ์กับสถานะการติดเชื้อโรคพยาธิอย่างไร

2. เมแทบอโลมในลำไส้ของพยาธิไส้เดือนมีความสัมพันธ์กับสถานะการติดเชื้อโรคพยาธิอย่างไร

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

1. เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียในลำไส้ของมนุษย์และพยาธิไส้เดือนผ่านการศึกษาชนิดและรูปแบบสังคมแบคทีเรียด้วยเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่

2. เพื่อแสดงวิถีเมแทบอลิซึมในลำไส้ของพยาธิไส้เดือนผ่านการศึกษาชนิดและปริมาณของสารเมแทบอไลต์ด้วยเทคโนโลยีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี

สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

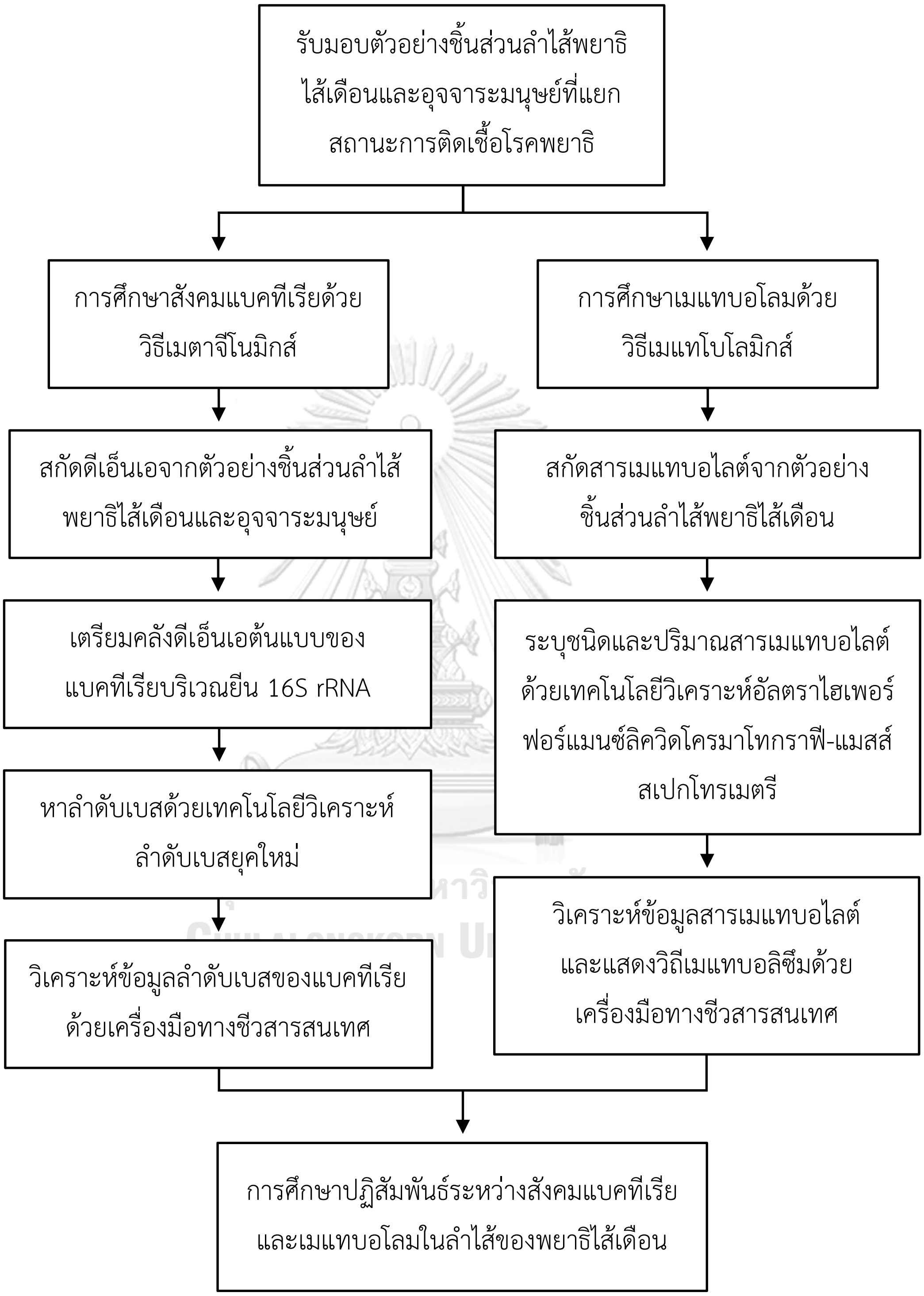
สังคมแบคทีเรียและเมตาบอโลมในลำไส้ของพยาธิไส้เดือนมีความสัมพันธ์กับสถานะการติดเชื้อโรคพยาธิ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยชิ้นนี้ศึกษาสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้ของมนุษย์และพยาธิไส้เดือนที่สถานะการติดเชื้อโรคพยาธิแตกต่างกัน โดยใช้เทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ ร่วมกับอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรีตามลำดับ

วิธีดำเนินการวิจัย (Research workflow)



คำสำคัญ

- *Ascaris lumbricoides*
- Gut bacteriome
- Metabolome
- Next-generation sequencing (NGS)
- Ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคพยาธิไส้เดือน

โรคพยาธิไส้เดือน คือภาวะที่ลำไส้เกิดการติดเชื้อจากพยาธิไส้เดือน ปัจจุบันสถานการณ์ของโรคพยาธิยังเป็นปัญหาที่น่ากังวล จากการสำรวจขององค์การอนามัยโลกพบผู้ป่วยติดเชื้อพยาธิในลำไส้มากถึง 1 ใน 4 ของประชากรโลก โดยพบมากในประเทศแถบร้อนชื้น หรือแหล่งชุมชนที่มีระบบจัดการสุขาภิบาลไม่ได้มาตราฐาน อาทิ การบริโภคผักหรือผลไม้สดที่มีไข่พยาธิปะปนอยู่ในดิน อันเกิดจากอุปนิสัยการถ่ายอุจจาระลงดิน หรือการนำอุจจาระไปทำปุ๋ยทางการเกษตร โดยสภาพแวดล้อมของดินจะเอื้อให้เกิดการเจริญเติบโตของพยาธิไส้เดือนในระยะแรก สามารถพบการระบาดดังกล่าวได้เช่นเดียวกับพยาธิที่ติดต่อผ่านดินชนิดอื่น ๆ (STHs; Soil-transmitted helminths) (11) ดังนั้นการรับประทานพืชผลทางการเกษตรจึงควรล้าง หรือปรุงด้วยความร้อนให้ถูกสุขอนามัยเสียก่อน

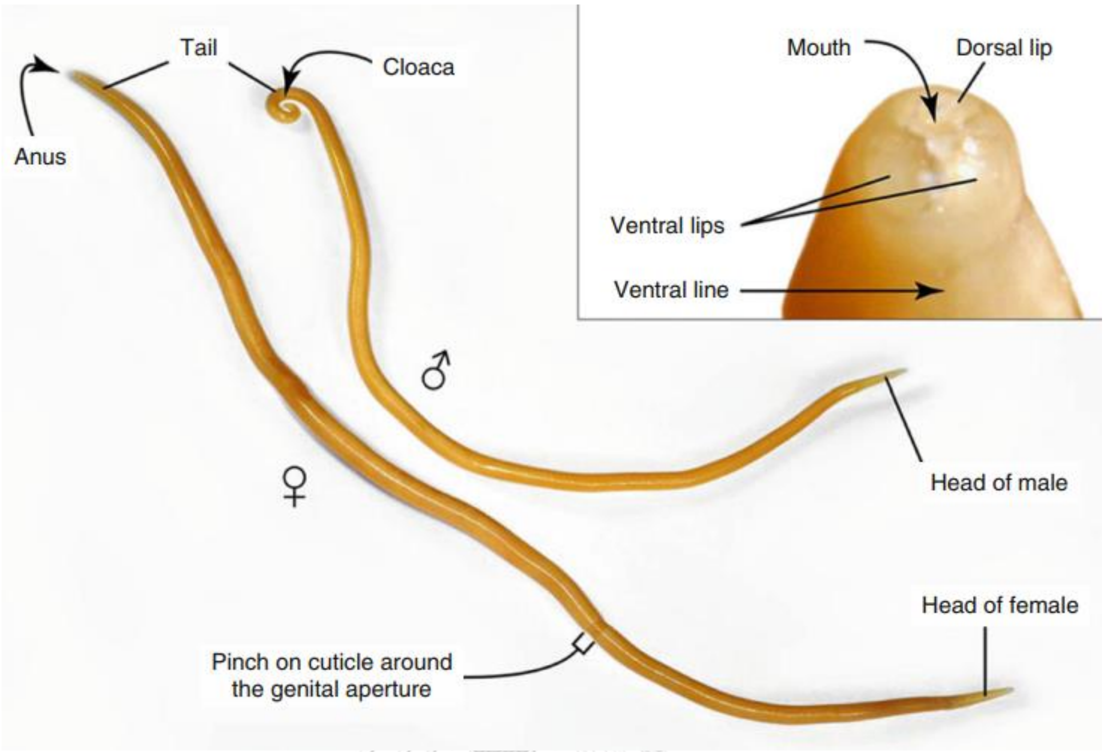
สำหรับประเทศไทยพบการติดเชื้อพยาธิไส้เดือนมากในเด็ก และสามารถพบได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานแสดงอัตราการติดเชื้อที่ครอบคลุมทั้งประเทศ ในการศึกษาล่าสุดที่ทำการสำรวจความชุกของโรคพยาธิไส้เดือนในจังหวัดนราธิวาสและน่าน พบการระบาดในประชากรร้อยละ 38.72 (12) และ 21.7 (13) ตามลำดับ ซึ่งถือว่าเป็นโรคจากพยาธิที่พบมากในภาคใต้เป็นอันดับ 4 รองจาก พยาธิปากขอ พยาธิแส้ม้า และพยาธิเข็มหมุด

รูปร่างลักษณะของพยาธิไส้เดือน

พยาธิไส้เดือนเป็นพยาธิตัวกลมที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีลำตัวกลมยาวคล้ายไส้เดือนดิน ผิวลำตัวเรียบ สีขาวนวลปนเหลืองชมพู ที่บริเวณปลายหัวที่เรียวกลมมีริมฝีปาก 3 อัน ประกอบด้วยริมฝีปากตรงกลาง (Dorsal lip) และริมฝีปากล่าง (Ventral lips) 1 คู่ ประกบรอบช่องปากเป็นรูปสามเหลี่ยมต่อกับลำตัวเรียบยาวไปจนถึงลำไส้ที่มีระบบทางเดินอาหารสมบูรณ์ และทวารหนักบริเวณปลายหาง

เมื่อโตเต็มวัยพยาธิตัวผู้จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 2-4 mm และมีขนาดยาว 15-30 cm ลักษณะที่บ่งชี้เพศสามารถสังเกตได้จากปลายหางที่โค้งงอไปด้านท้อง รวมไปถึงระบบสืบพันธุ์ 1 ชุด ประกอบด้วยอัณฑะ ท่อนำอสุจิ ต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิ และท่อหลั่งน้ำอสุจิ ที่ขดเป็นเกลียวอยู่บริเวณปลายหางติดกับทวารรวม (Cloaca) โดยบริเวณนี้จะพบแท่งอวัยวะสืบพันธุ์ 1 คู่ขนาด 2-3.5 mm

ในขณะที่พยาธิตัวเต็มวัยเพศเมียจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-6 mm และมีขนาดยาวเฉลี่ย 22-35 cm บริเวณปลายหางทู่ตรงไม่เหมือนเพศผู้ มีระบบอวัยวะสืบพันธุ์ 2 ชุดประกอบด้วยรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูก ซึ่งมดลูกทั้งสองจะบรรจบกันที่ช่องคลอดสืบพันธุ์ ขดพับไปมาบริเวณตอนกลางลำตัวทำให้พยาธิตัวเมียสามารถออกไข่ได้มากถึง 200,000 ฟองต่อวัน (ภาพที่ 1) (11, 14, 15)



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะภายนอกของพยาธิไส้เดือนตัวเต็มวัยเพศผู้และเมีย (14)

ชนิดและลักษณะของพยาธิไส้เดือน

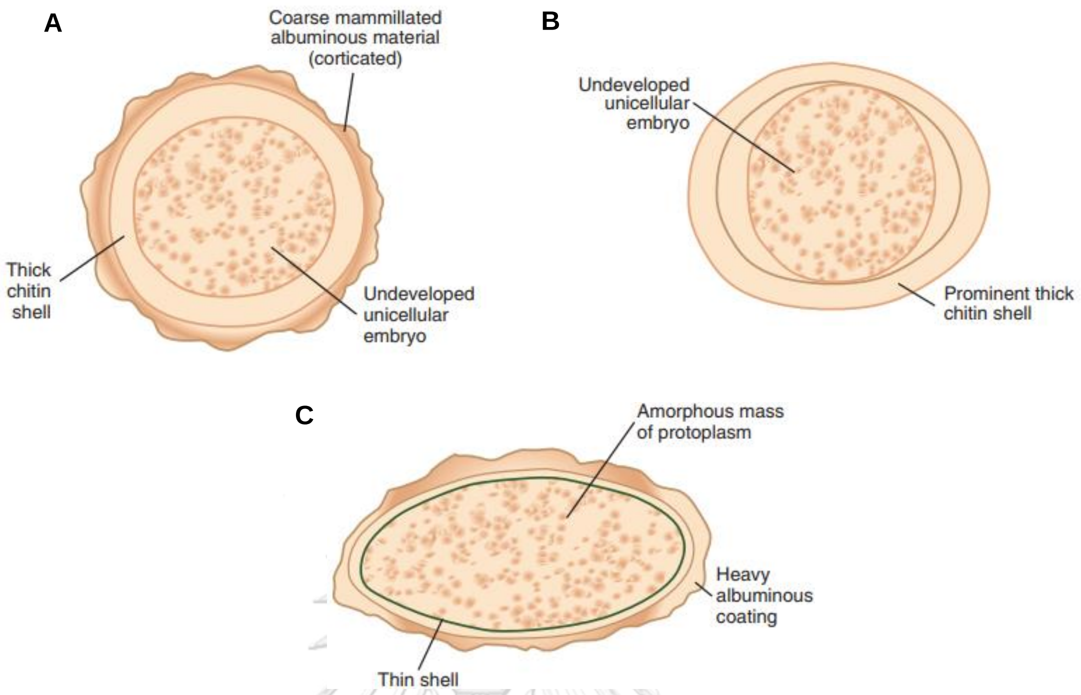
ลักษณะของไข่พยาธิสามารถแบ่งได้ 3 ชนิด โดยขึ้นอยู่กับสภาวะการผสมพันธุ์หรือสภาพของเปลือกหุ้มเซลล์ไข่ (15) อันสังเกตได้จากอุจจาระที่ปนเปื้อนไข่พยาธิดังนี้ (ภาพที่ 2)

1. ไข่ที่ผสมพันธุ์แล้ว (Fertilized egg) ลักษณะภายนอกทรงกลมรี (ขนาด 40-75 x 30-50 μm^2) ผิวหนาขรุขระ และมีสีเหลืองน้ำตาลอันเกิดจากการย้อมด้วยน้ำดีภายในลำไส้มนุษย์ โดยเปลือกไข่ประกอบด้วย 3 ชั้น คือ เปลือกชั้นนอกทำหน้าที่ปกป้องไข่จากสภาพแวดล้อมภายนอก เปลือกชั้นกลางทำหน้าที่เสริมความแข็งแรงและรักษารูปร่างของไข่พยาธิ และสุดท้ายเปลือกชั้นในทำหน้าที่ห่อหุ้มสารจำพวกไขมันและตัวอ่อนพยาธิ

2. ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ (Unfertilized egg) ลักษณะภายนอกกลมเรียว (ขนาด 85-95 x 38-45 μm^2) และมีสีเหลืองน้ำตาล โดยเปลือกไข่ประกอบด้วย 2 ชั้น คือ เปลือกชั้นนอกที่เป็นชั้นโปรตีนอัลบูมิน และเปลือกชั้นกลางที่ห่อหุ้มของเหลวภายในเซลล์ไข่พยาธิ

3. ไข่ที่เปลือกชั้นนอกหลุดออก (Decorticated egg) จะเห็นเปลือกนอกเรียบใสไม่มีสี สามารถพบได้ทั้งไข่ผสมพันธุ์แล้วและไม่ได้ผสมพันธุ์ เนื่องจากชั้นโปรตีนอัลบูมินหลุดลอกไปนั้นทำให้ไข่ชนิดนี้ถูกทำลายได้ง่ายส่งผลต่อโอกาสที่ไข่จะเจริญเป็นพยาธิเต็มวัยลดลงด้วย

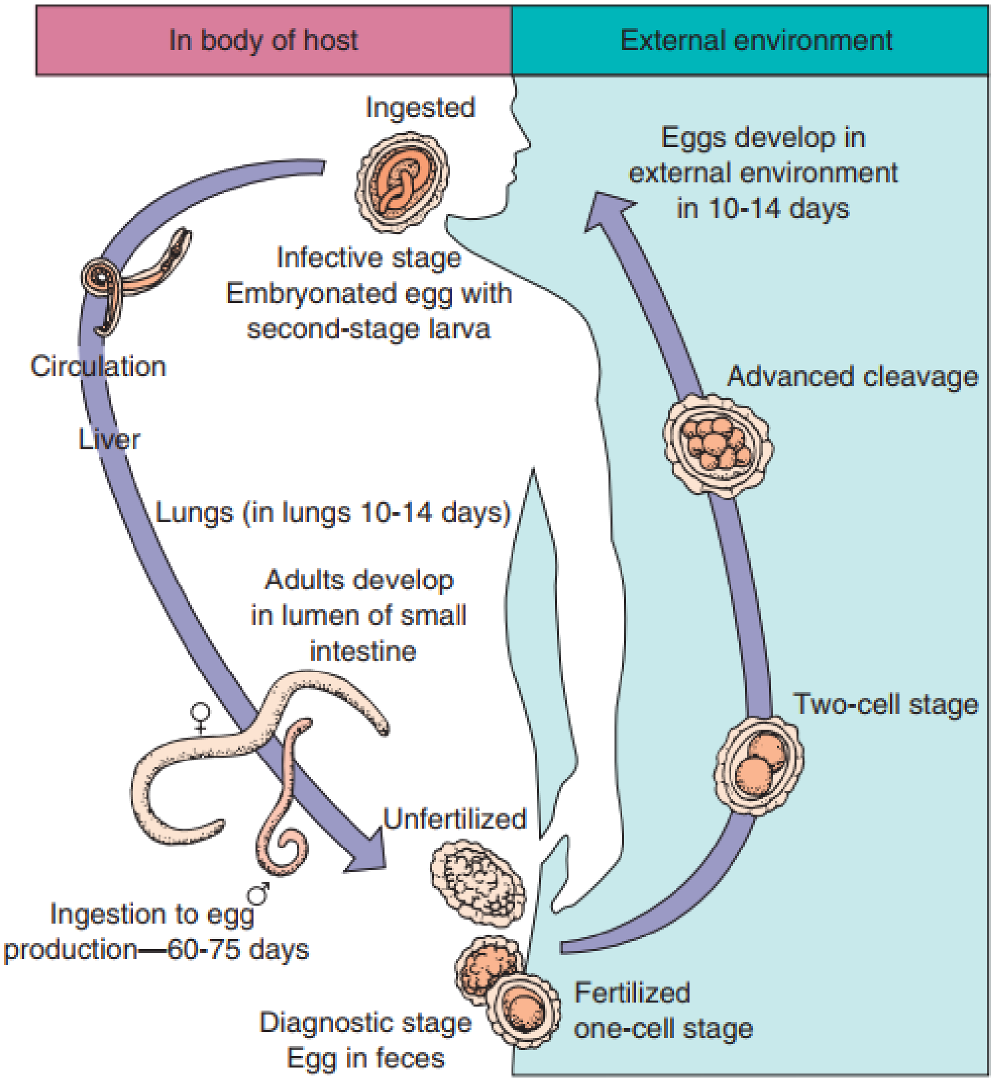
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 2 แสดงชนิดและลักษณะของไข่พยาธิผสมพันธุ์แล้ว (A) ไข่ที่เปลือกชั้นนอกหลุดออก (B) และไข่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ (C) (15)

วงจรชีวิตของพยาธิไส้เดือน

เมื่อพยาธิตัวเต็มวัยผสมพันธุ์กัน พยาธิไส้เดือนตัวเมียจะออกไข่ปะปนออกมากับอุจจาระของมนุษย์ เมื่อไข่ลงสู่พื้นดินที่มีความชื้นและอุณหภูมิเหมาะสม เซลล์ภายในจะเจริญเป็นตัวอ่อนอยู่ 10-21 วัน เมื่อมนุษย์ได้รับไข่ที่ผ่านการเจริญเป็นตัวอ่อนหรือไข่ระยะติดต่อ (Infective egg) เข้าสู่ร่างกายผ่านการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่ไม่ถูกสุขลักษณะจะถูกน้ำย่อยในกระเพราะอาหารและลำไส้เล็กย่อยเปลือกหุ้มทำให้ตัวอ่อนพยาธิฟักตัวบริเวณลำไส้เล็กตอนต้น ก่อนไชตัวผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าสู่ตับผ่านกระแสเลือด และเข้าไปเจริญอยู่ภายในปอดประมาณ 10-14 วัน ก่อนเคลื่อนตัวผ่านผนังถุงลมและทางเดินอาหารเพื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยภายในสำไส้เล็กส่วนกลางในที่สุด ระยะเวลาตั้งแต่มนุษย์ได้รับไข่พยาธิระยะติดต่อจนเจริญเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน โดยพยาธิโตเต็มวัยมีช่วงอายุโดยเฉลี่ย 1-2 ปี (ภาพที่ 3) (11, 16)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 3 แสดงวงจรชีวิตของพยาธิไส้เดือน (16)

พยาธิสภาพและอาการของโรคพยาธิไส้เดือน

โรคที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิไส้เดือนสามารถแบ่งลักษณะการติดเชื้อได้ 2 ลักษณะ (17) จากระยะการเจริญของพยาธิดังนี้

1. การติดเชื้อจากพยาธิระยะตัวอ่อน กล่าวคือขณะที่ตัวอ่อนไชตัวผ่านผนังลำไส้เล็กไปสู่ตับ หัวใจซีกขวา และเข้าไปเจริญอยู่ภายในปอด (18) ส่งผลให้อวัยวะดังกล่าวเกิดการอักเสบ และมีไข้เล็กน้อย ในกรณีที่พยาธิเจริญอยู่ภายในปอดมากจะส่งผลต่ออาการที่รุนแรงขึ้นทำให้ปอดอักเสบ มีไข้สูง หายใจหอบ ไปจนถึงภาวะไอเป็นเลือด

2. การติดเชื้อจากพยาธิระยะตัวเต็มวัย กล่าวคือกลไกการเกิดโรคในพยาธิระยะนี้จะส่งผลโดยตรงกับลำไส้เล็กทำให้ระบบทางเดินอาหาร และภาวะโภชนาการของมนุษย์ถูกรบกวนแบ่งออกได้ 3 ลักษณะดังนี้

2.1 ภาวะแย่งสารอาหาร (Robbing effect) โดยอาการของภาวะนี้จะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรคที่กำหนดได้จากจำนวนพยาธิในลำไส้ ส่งผลให้มีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน น้ำหนักลดเนื่องจากขาดสารอาหาร

2.2 ภาวะเสียหายโดยตรงต่ออวัยวะของมนุษย์ (Direct injurious effect) เกิดจากการที่พยาธิขดตัวเป็นก้อนอุดตันอยู่ภายในลำไส้เล็กทำให้เกิดไข้สูง ส่งผลให้พยาธิไชตัวทะลุผนังลำไส้เข้าสู่อวัยวะข้างเคียงก่อให้เกิดการภาวะเยื่อบุช่องท้อง และตับอักเสบ

2.3 ภาวะอาการแพ้จากสารพิษที่ผลิตมาจากตัวพยาธิ (Allergic effect) ในผู้ป่วยบางรายอาจเกิดอาการแพ้เนื่องจากร่างกายดูดซึมสารพิษเข้าสู่กระแสเลือด ส่งผลให้เกิดอาการผื่นแดงบริเวณผิวหนังหรืออวัยวะต่างๆ อาทิ ลำไส้เล็ก หลอดลม ปอด เป็นต้น

การวินิจฉัยโรคพยาธิไส้เดือน

ผู้ที่มีอาการเข้าข่ายติดเชื้อจากพยาธิไส้เดือนทางแพทย์จะวินิจฉัยโรคด้วย 2 วิธีดังนี้

1. การตรวจอุจจาระเพื่อหาไข่พยาธิ เป็นวิธีที่ได้ผลดีเนื่องจากพยาธิจะวางไข่จำนวนมากปะปนกับอุจจาระของผู้ป่วย จึงสะดวกต่อการนำตัวอย่างอุจจาระไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาชนิดและจำนวนไข่พยาธิ เพื่อช่วยประเมินความรุนแรงและติดตามผลการรักษาโรค อย่างไรก็ตามวิธีนี้อาจใช้ไม่ได้หากผู้ป่วยติดเชื้อจากพยาธิไส้เดือนเพศผู้เท่านั้น

2. การตรวจโดยการถ่ายภาพทางการแพทย์ เพื่อตรวจหาพยาธิในช่องท้อง ทรวงอก และตับด้วยเทคโนโลยีการถ่ายภาพเอกซเรย์ (X-ray) การทำอัลตราซาวด์ (Ultrasound) เป็นต้น (19) ที่ช่วยตรวจสอบระยะการเจริญของพยาธิทำให้แพทย์สามารถประเมินความเสี่ยงที่จะเกิดภาวะแทรกซ้อนและวางแผนการรักษาได้อย่างเหมาะสม

การรักษาโรคพยาธิไส้เดือน

ในผู้ป่วยบางรายที่มีการติดเชื้อรุนแรงและภาวะแทรกซ้อน อาทิ ลำไส้อุดตันหรือไส้ติ่งอักเสบอันเกิดจากพยาธิ แพทย์อาจเสนอวิธีรักษาเป็นการผ่าตัดเอาพยาธิออกจากร่างกายพร้อมทั้งรักษาบาดแผลบริเวณอวัยวะโดยรอบ (20) ในขณะที่ผู้ป่วยติดเชื้อไม่รุนแรงแพทย์นิยมใช้ยาต้านพยาธิในการขับพยาธิออกจากร่างกาย (2, 21) โดยกลุ่มยาดังกล่าวมีดังนี้

1. ยาอัลเบนดาโซล (Albendazole) ขนาดที่ใช้ 400 mg รับประทานครั้งเดียวสำหรับผู้ใหญ่และเด็กอายุ 2 ปีขึ้นไป ห้ามใช้ในหญิงตั้งครรภ์ โดยยาจะออกฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในลำไส้ของพยาธิ ส่งผลให้ไกลโคเจนที่สะสมไว้เพื่อใช้เป็นพลังงานขาดแคลนจนพยาธิตายในที่สุด

2. ยามีเบนดาโซล (Mebendazole) ขนาดที่ใช้ 100 mg รับประทานวันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 3 วัน ใช้ในผู้ใหญ่และเด็กอายุ 2 ปีขึ้นไป ห้ามใช้ในหญิงตั้งครรภ์ โดยยาจะออกฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในลำไส้ของพยาธิ และยับยั้งการใช้ฟอสฟอรัสในไมโทคอนเดรียของพยาธิ ส่งผลให้พยาธิตายเนื่องจากขาดแคลนพลังงาน และเกิดการบาดแผลบริเวณผิวหนัง ตามลำดับ

3. ยาไอเวอร์เมคติน (Ivermectin)) ขนาดที่ใช้ 150-200 μg/kg (น้ำหนักตัว) รับประทานครั้งเดียวในผู้ใหญ่และเด็กที่มีน้ำหนักมากกว่า 15 kg ห้ามใช้ในหญิงตั้งครรภ์ โดยยาออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งกระแสประสาทเนื่องจากการดูดซึมสารประกอบคลอไรด์ที่เยื่อหุ้มเซลล์มากจนผิดปกติ ทำให้พยาธิเคลื่อนไหวไม่ได้และตายในที่สุด

4. ยาไพแรนเทลพาโมเอต (Pyrantel pamoate) ขนาดที่ใช้ 10 mg/kg (น้ำหนักตัว) รับประทานครั้งเดียว ห้ามใช้ในหญิงตั้งครรภ์ โดยยาจะออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทและกล้ามเนื้อของพยาธิส่งผลให้พยาธิเป็นอัมพาตและตายในที่สุด

การศึกษาสังคมจุลชีพในปัจจุบัน

ร่างกายของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลชีพนับแสนล้านชนิดประกอบรวมกันเป็นสังคมจุลชีพ (Microbiome) ที่สามารถแยกย่อยได้อีกตามชนิดของจุลชีพ อาทิ สังคมแบคทีเรีย (Bacteriome) สังคมไวรัส (Virome) เป็นต้น ซึ่งกลุ่มของจุลชีพดังกล่าวมักพบในลำไส้ของมนุษย์ โดยมีมากกว่าจุลชีพทั้งหมดในร่างกายรวมกันถึง 10 เท่า (22) ทำให้บทบาทของสังคมจุลชีพในลำไส้สามารถอธิบายภาวะสุขภาพของมนุษย์ได้ (5) ตั้งแต่ การส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้ผ่านการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (23) รวมถึงการประยุกต์ใช้รักษาโรคอ้วนเรื้อรังในมนุษย์ในปัจจุบัน (6)

จากการศึกษาในสาธารณรัฐแคเมอรูนแสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของพยาธิสัมพันธ์กับสังคมแบคทีเรียในสำไส้มนุษย์ โดยพบว่าชนิดและสัดส่วนของแบคทีเรียสามารถใช้ทำนายภาวะติดเชื้อของกลุ่มพยาธิที่ติดต่อผ่านดินได้แม่นยำถึง 80% (24) และจากการศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียต่อพยาธิตัวกลมในกลุ่มฟิลาเรียอันเป็นสาเหตุของโรคเท้าช้างโดยมียุงลายเสือเป็นพาหะ พบว่าความสามารถในการเจริญพันธ์ของพยาธิดังกล่าวขึ้นอยู่กับการมีอยู่ของแบคทีเรียในสกุลวูลบัคเคีย (*Wolbachia*) จากความสัมพันธ์ระหว่างสังคมแบคทีเรียกับพยาธิตามที่กล่าวไปข้างต้น นำไปสู่กระแสในการศึกษาเพื่อค้นคว้าวิธีรักษาโรคเท้าช้างและโรคพยาธิแบบใหม่ (25)

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสต่อการศึกษาสังคมแบคทีเรีย

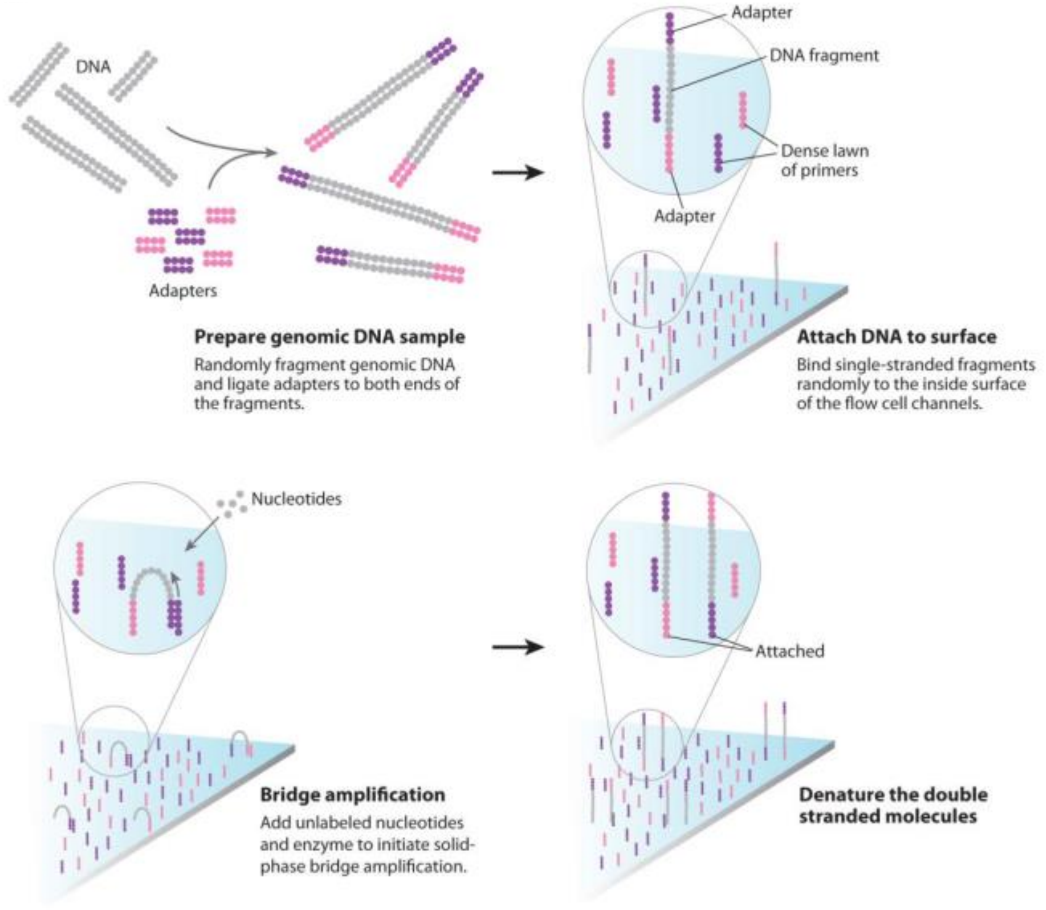
ปัจจุบันศาสตร์ที่ใช้ศึกษาสังคมจุลชีพเรียกว่า เมตาจีโนมิกส์ที่เป็นการศึกษาสารพันธุกรรมของจุลชีพทั้งหมดในสิ่งแวดล้อมอย่างจำเพาะ โดยไม่จำเป็นต้องใช้วิธีดั้งเดิมในการแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture dependent technique) ที่มีข้อจำกัดด้านสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง ทำให้สามารถหาความสัมพันธ์ของจุลชีพในระบบชีวภาพตามธรรมชาติได้มากยิ่งขึ้น โดยกระบวนการศึกษาดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลากหลายผ่านการวิเคราะห์ยีนที่จำเพาะต่อสิ่งมีชีวิต อาทิ การใช้เทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ หรือเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคที่สอง (SGSTs; Second generation sequencing technologies) ต่อยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งนี้เนื่องจากยีนนี้มีบริเวณอนุรักษ์สูง ความผันแปรทางวิวัฒนาการต่ำ และมีขนาดโมเลกุลที่เหมาะสมต่อการจำแนกแบคทีเรีย (ประมาณ 1,500 นิวคลีโอไทด์) (26) อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของเทคโนโลยีวิเคราะห์ดังกล่าวส่งผลกระทบต่อความแม่นยำในการจัดกลุ่มแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ (Species) ก่อให้เกิดการพัฒนาเทคโนโลยีจนสามารถสังเคราะห์สารพันธุกรรมสายยาวด้วยเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคที่สาม (TGSTs; Third generation sequencing technologies) เพื่อแก้ปัญหาความคลาดเคลื่อนจากการสังเคราะห์สารพันธุกรรมในหลอดทดลองและทำลายข้อจำกัดในการจำแนกกลุ่มแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับความแม่นยำในการถอดลำดับเบสที่ต่ำกว่าเทคโนโลยีวิเคราะห์ยุคที่สอง (27) ก่อให้เกิดข้อถกเถียงด้านประสิทธิภาพและการเลือกใช้เทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสในปัจจุบัน

หลักการและทฤษฎีของเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ด้วยเครื่องอิลลูมินา

เทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ด้วยเครื่องอิลลูมินา (Illumina) (28) ใช้หลักการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอเพื่อหาลำดับเบสร่วมกับการใช้นิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการดัดแปลงให้มีคุณสมบัติหยุดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอและสามารถคืนสภาพกลับเพื่อให้ต่อสายดีเอ็นเอได้ (Reversible terminator nucleotide)

การวิเคราะห์ลำดับเบสจะเริ่มจากเตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนแผ่นโฟลว์เซลล์ (Flow cell) ด้วยวิธีเพิ่มปริมาณแบบสะพานโค้งเชื่อมต่อ (Bridge amplification) สามารถทำได้โดยตัดดีเอ็นเอให้มีขนาดสั้น หรือการสังเคราะห์ยีนที่มีขนาดสั้น อาทิ บริเวณที่แปรผันสูง (HVR; Hypervariable regions) ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย จากนั้นนำดีเอ็นเอสายสั้นมาเชื่อมส่วนปลายด้วยอะแดปเตอร์ (Adaptors) ที่ปลายทั้งสองข้าง (29) โดยดีเอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 200 คู่เบสจะถูกนำมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR, Polymerase chain reaction) ก่อนนำดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรึงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่เคลือบด้วยอะแดปเตอร์ที่เป็นเบสคู่สมกับปลายของสายดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ (Primer)

ในการเพิ่มปริมาณแบบสะพานโค้งเชื่อมต่อจนได้สายคู่ดีเอ็นเอต้นแบบ และในช่วงท้ายจะทำการแยกสายดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวเพื่อใช้เป็นคลังดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป (ภาพที่ 4)

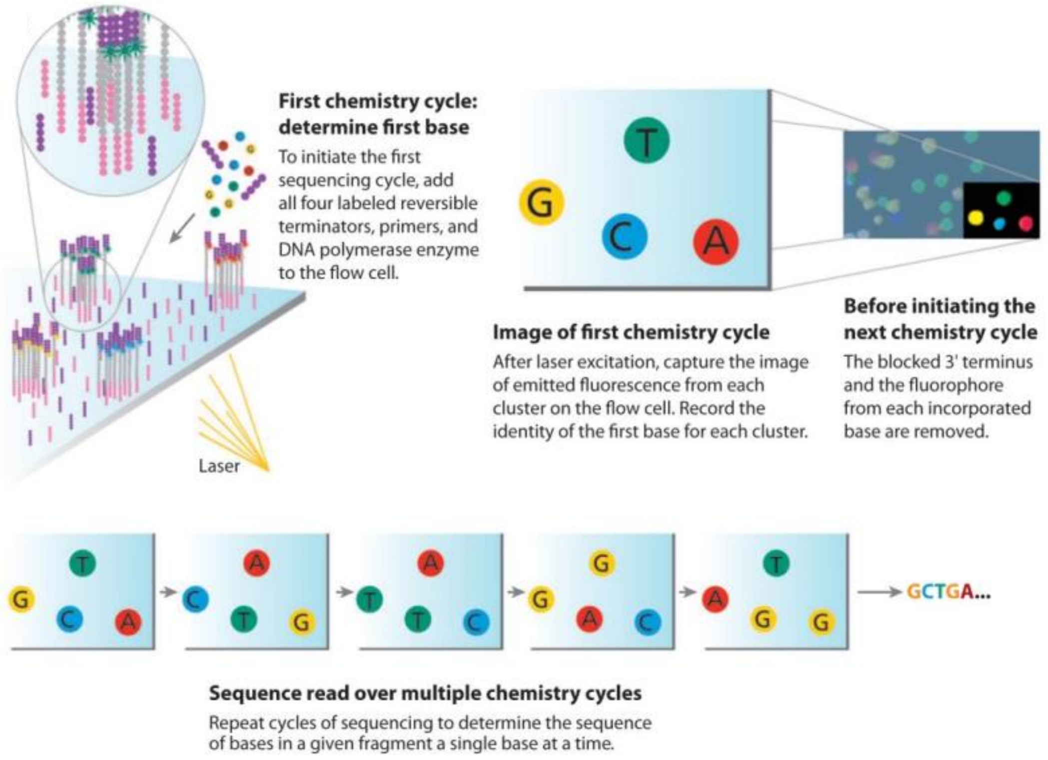


ภาพที่ 4 แสดงการเตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบด้วยวิธีสะพานโค้งเชื่อมต่อ (28)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

เมื่อได้คลังดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวแล้วการหาลำดับเบสของเครื่องอิลลูมินาจะใช้หลักการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (Sequencing by synthesis) โดยอาศัยไพรเมอร์ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอริเมอเรส (DNA polymerase) และนิวคลีโอไทด์ทั้งสี่ชนิดที่ผ่านการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงและดัดแปลงหมู่เคมีที่ป้องกันการต่อสายบริเวณ ปลาย 3’ OH ให้มีคุณสมบัติหยุดสังเคราะห์สายดีเอ็นเอและสามารถคืนสภาพเพื่อให้ต่อสายดีเอ็นเอ โดยนิวคลีโอไทด์ที่เหลือจากปฏิกิริยาสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจะถูกล้างออก แล้วทำการบันทึกภาพการปลดปล่อยสารเรืองแสงของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นจะเกิดกระบวนการตัดฉลากเรืองแสง และหมู่เคมีที่ป้องกันการต่อสายที่ปลาย 3’ OH ออกทำให้ปลายนิวคลีโอไทด์กลับมาปกติ หลังจากนั้นเติมนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการ

ดัดแปลงชุดใหม่ รวมถึงเอนไซม์ดีเอ็นเอพอริเมอเรสเพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอในรอบต่อไป โดยแต่ละรอบของการสังเคราะห์ (Cycle) จะเป็นตัวกำหนดลำดับเบสที่อ่านได้ในแต่ละครั้ง (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แสดงการหาลำดับเบสโดยอาศัยหลักการการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอร่วมกับคุณสมบัติการคืนสภาพกลับโดยการตัดหมู่เคมี (28)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ความยาวของสายดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องอิลลูมินาจะมีขนาดเท่ากันหมด โดยสามารถอ่านความยาวสายดีเอ็นเอได้ถึง 150 คู่เบส ด้วยความแม่นยำสูง (มากกว่าร้อยละ 99.5) โดยเครื่องอิลลูมินาเหมาะสำหรับงานที่ต้องการปริมาณสายดีเอ็นเอมากและขนาดสายดีเอ็นเอที่สั้น อาทิ การวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อค้นหาสนิป (SNPs; Single nucleotide polymorphisms) หรือการศึกษาสังคมจุลชีพ เป็นต้น

การศึกษาเมแทบอโลมในปัจจุบัน

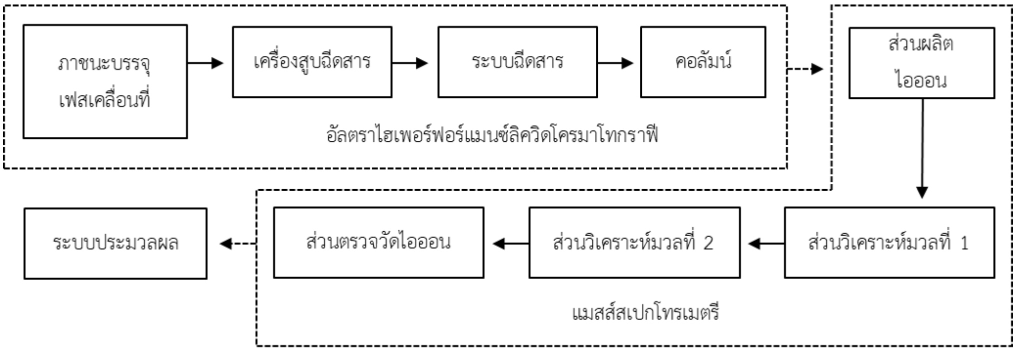
เมแทบอโลมเป็นศาสตร์ในการวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์หรือสารประกอบเคมีขนาดเล็กในสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่ง อาทิ กรดนิวคลีอิก กรดอะมิโน กรดไขมัน สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น โดยเทคโนโลยีเมแทบอโลมิกส์ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ เช่น การวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์

ระหว่างเมตาโบโลมกับลักษณะทางพยาธิวิทยาที่เกี่ยวข้องต่อการวินิจฉัยโรค เช่น ปัสสาวะ หรือ สารคัดหลั่งที่ได้จากผู้ป่วย (30)

ในปัจจุบันเทคโนโลยีเคมีวิเคราะห์สามารถจำแนกชนิด และตรวจหาปริมาณสารเมแทบอไลต์ได้แบบไม่จำเพาะเจาะจงที่ความละเอียดสูงจึงให้ข้อมูลครอบคลุมชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบจำนวนมากในรูปแบบเมแทบอโลม โดยนิยมใช้เทคนิคการแยกสารร่วมกับเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ อาทิ การใช้เทคโนโลยีแยกสารลิควิดโครมาโตกราฟฟี (LC; Liquid chromatography) ร่วมกับเทคโนโลยีเคมีวิเคราะห์แมสสเปกโทรเมตรี (MS; Mass spectrometry) (31) ซึ่งต้องอาศัยการประมวลผลด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์ (Computational) เพื่อวิเคราะห์หารูปแบบความสัมพันธ์ของข้อมูลเมตาโบโลมระหว่างกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (Multivariate statistical analysis) (32) อีกทั้งสามารถประยุกต์ใช้ข้อมูลดังกล่าวร่วมกับชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) เพื่อให้เข้าใจกระบวนการเมตาบอลิซึมภายใต้การเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมที่จะเกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตควบคู่ไปกับการทดลองในห้องปฏิบัติการได้

หลักการและทฤษฎีของเทคโนโลยีวิเคราะห์อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี

อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรีเป็นเทคนิคควบคู่กันระหว่างเทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีในการแยกสารเคมีตามคุณสมบัติ อาทิ ความมีขั้ว โดยอาศัยสมดุลระหว่างเฟสหยุดนิ่ง (Stationary phase) ในคอลัมน์ และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่เป็นตัวทำละลายในการพาสารเข้าและออกจากคอลัมน์ ร่วมกับเทคนิคแมสส์สเปกโทรเมตรีที่วิเคราะห์โครงสร้างเคมีโดยอาศัยหลักการแตกตัวเป็นไอเพื่อวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่จำเพาะต่อชนิดของสารเคมี ทำให้เทคนิคประยุกต์นี้สามารถวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แสดงระบบทำงานของเทคโนโลยีวิเคราะห์อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี

เทคนิคแยกสารอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

เทคนิคแยกสารอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (33) ใช้สำหรับแยกสารประกอบผสมโดยอาศัยสมดุลระหว่างตัวทำละลายที่ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการพาสารเข้าและออกจากคอลัมน์ ร่วมกับคอลัมน์ขนาดสั้นที่ทำหน้าที่เป็นเฟสหยุดนิ่ง ทำให้ความสามารถในการแยกออกจากกันได้ของสารประกอบผสมนั้นขึ้นอยู่กับความเข้ากันได้ดีของสารตัวอย่างกับเฟสเคลื่อนที่ หรือเฟสหยุดนิ่ง โดยสารที่เข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่จะถูกแยกออกมาก่อน และสารที่แยกออกมานี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณ แสดงผลในรูปแบบของกราฟโครมาโทแกรม (Chromatogram) ที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดถูกตรึงไว้กับเฟสคงที่ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของสารเคมี โดยมีรายละเอียดองค์ประกอบของเครื่องดังนี้

1. เครื่องสูบฉีดของเหลว (Pump) เป็นส่วนที่ควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ โดยสามารถแบ่งรูปแบบการประยุกต์ใช้ได้ 2 วิธี คือ การผ่านเฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติก (Isocratic pump) ซึ่งเป็นการใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราผสมคงที่ตลอดการทดลอง หรือการผ่านเฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ (Gradient pump) ที่สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ตลอดการทดลอง

2. ระบบฉีดของเหลว (Injection system) ทำหน้าที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์โดยไม่รบกวนการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้เครื่องฉีดสารอัตโนมัติโดยควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์

3. คอลัมน์ (Column) ในปัจจุบันมีให้เลือกใช้หลายประเภทขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเฟสเคลื่อนที่ โดยงานวิจัยนี้ใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดฝันกลับ (Reversed phase) ซึ่งเป็นที่นิยมสำหรับการแยกสารตามสภาพขั้ว โดยเป็นการใช้คอลัมน์เฟสหยุดนิ่งที่ไม่มีสภาพขั้ว กับสารละลายเฟสเคลื่อนที่สภาพขั้วสูง ทำให้สารเคมีตัวอย่างที่ถูกชะออกมาก่อนมีสภาพขั้วสูงเนื่องจากความสามารถในการละลายในเฟสเคลื่อนที่

เทคนิควิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคแมสส์สเปกโทรเมตรี

เป็นเทคนิควิเคราะห์โครงสร้างเคมีโดยการเปลี่ยนรูปโมเลกุลสารให้อยู่ในรูปไอออน (34) ก่อนทำการตรวจวัดค่ามวลต่อประจุและบันทึกข้อมูลในรูปของแมสสเปกตรัม ซึ่งเทคนิคดังกล่าวเป็นที่นิยมเนื่องจากความแม่นยำในการวิเคราะห์ที่สูง โดยมีรายละเอียดองค์ประกอบของเครื่องดังนี้ (ภาพที่ 7)

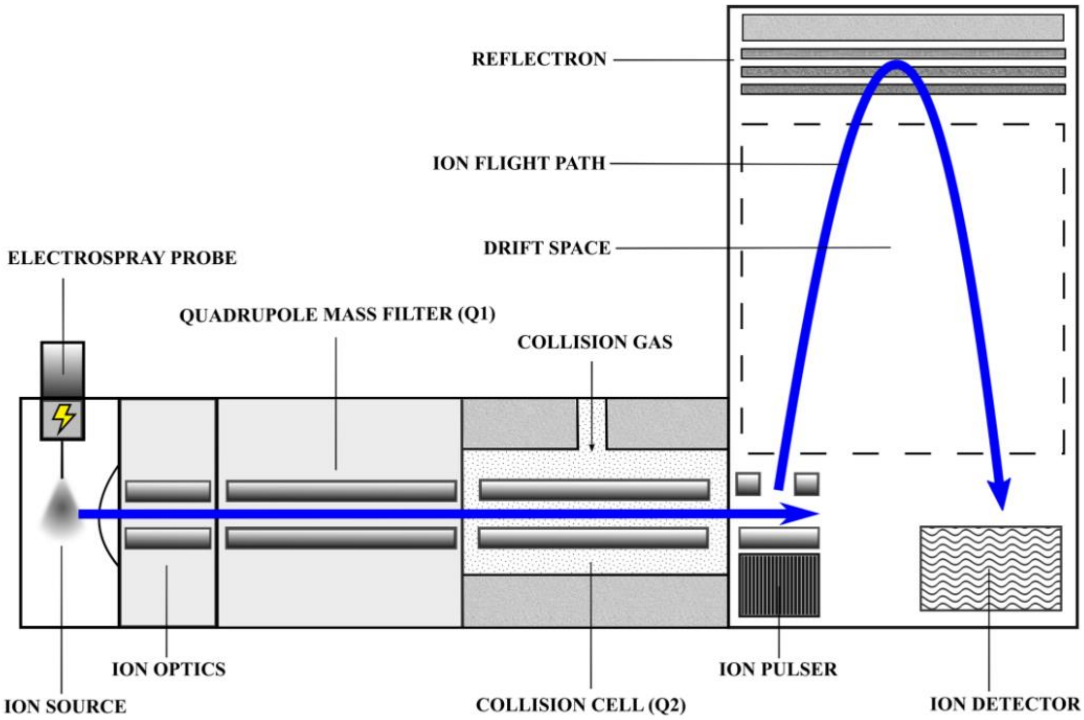
1. ส่วนผลิตไอออน (Ion source) เป็นส่วนที่ทำหน้าที่ผลิตไอออนภายใต้ภาวะความดันบรรยากาศสูง ส่วนผลิตไอออนที่นิยมใช้ในปัจจุบันมี 2 ประเภท ได้แก่ วิธีอิเล็กโทรสเปรย์ไอออไนเซ

ชัน (ESI; Electrospray ionization source) เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างในรูปไอออนในตัวทำละลาย โดยกระบวนการเริ่มจากการปั๊มสารละลายตัวอย่างผ่านหลอดแคปพิลลารีที่สนามไฟฟ้าแรงสูง ก่อนทำการระเหยเพื่อสร้างหยดประจุไอออน ซึ่งแตกต่างจากส่วนผลิตไอออนประเภทที่ 2 คือ ไอออไนเซชันด้วยเคมีความดันบรรยากาศ (APCI; Atmospheric pressure chemical ionization source) ที่อาศัยแรงขับของแก๊สไนโตรเจนหรือแก๊สเฉื่อยที่อุณหภูมิสูง โดยวิธีนี้เหมาะกับสารตัวอย่างที่ไม่ได้อยู่ในรูปไอออนในตัวทำละลาย หรือสารที่มีสภาพขั้วน้อย เช่น สารกลุ่มไขมัน และกลุ่มวิตามินที่ละลายในไขมัน เป็นต้น

2. ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass analyzer) ทำหน้าที่วิเคราะห์ค่ามวลต่อประจุ เพื่อทำการแยกไอออนของอนุภาคที่ส่งมาจากส่วนผลิตไอออนตามค่ามวลต่อประจุของไอออนนั้นๆ โดยงานวิจัยนี้ใช้ส่วนวิเคราะห์มวล 2 แบบ ได้แก่ ส่วนวิเคราะห์มวลแบบควอดดรูโพล (Quadrupole mass analyzer) (35) ที่ประกอบด้วยแท่งโลหะกลม 4 แท่งเชื่อมต่อกันด้วยแรงทางไฟฟ้า เพื่อนำพาประจุไอออนเคลื่อนที่ผ่านช่องวางระหว่างแท่งโลหะไปยังส่วนตรวจวัดได้อย่างจำเพาะตามค่าสนามไฟฟ้านั้นๆ เหมาะกับการวิเคราะห์ไอออนที่มีพลังงานต่ำ โดยมีข้อดีคือความเร็วต่อการวิเคราะห์สูงเนื่องจากสามารถตรวจจับไอออนได้แม่นยำและต่อเนื่องตลอดช่วงมวลที่ต้องการวิเคราะห์ ในปัจจุบันวิธีนี้สามารถประยุกต์ใช้ผ่านการนำส่วนวิเคราะห์มวล 3 ชุดมาต่อกันแบบอนุกรม เรียกว่า ทริปเปิลควอดดรูโพล (Triple quadrupole) ประกอบด้วย หน่วยวิเคราะห์มวลที่ 1 ซึ่งทำหน้าที่คัดเลือกไอออนตั้งต้น (Precursor ion) อย่างจำเพาะด้วยการปรับค่ามวลต่อประจุของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ก่อนส่งไปยังหน่วยวิเคราะห์มวลที่ 2 ที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนผ่านการชนของแก๊สเฉื่อยพลังงานสูง และคัดเลือกมวลที่จำเพาะอีกครั้งด้วยหน่วยวิเคราะห์มวลที่ 3 นอกจากการวิเคราะห์มวลด้วยสนามไฟฟ้าอย่างจำเพาะแล้ว ในงานวิจัยนี้ยังประยุกต์ใช้ส่วนวิเคราะห์มวลแบบไทม์ออฟไฟล์ท (Time-of-Flight (TOF) mass analyzer) เพื่อวิเคราะห์มวลผ่านการแยกไอออนโดยอาศัยความเร็วในการเคลื่อนที่ โดยไอออนที่มีมวลน้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็วและไปถึงส่วนตรวจวัดได้ก่อนไอออนที่มีมวลมาก ซึ่งทำให้การแยกไอออนด้วยวิธีนี้สามารถทำได้รวดเร็ว และมีความไว (Sensitivity) ค่อนข้างสูง เนื่องจากการไหลผ่านของไอออนไม่จำเป็นต้องผ่านช่องขนาดเล็ก รวมไปถึงการเบี่ยงเบนไอออนให้เข้าสู่ส่วนตรวจวัด ส่งผลให้ปริมาณไอออนสามารถเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวลได้มาก อย่างไรก็ตามวิธีแยกไอออนดังกล่าวมีข้อจำกัดด้านความละเอียด (Resolution) ที่ต่ำ เนื่องจากการกระจายของพลังงานจลน์ในแต่ละช่วงการปลดปล่อยไอออนส่งผลให้ไอออนที่มีมวลเท่ากันวิ่งเข้าสู่ส่วนตรวจวัดที่เวลาต่างกัน

3. ส่วนตรวจวัดไอออน (Detector) โมเลกุลไอออนที่ผ่านการแยกอย่างจำเพาะด้วยส่วนวิเคราะห์มวล จะถูกตรวจวัดและสรุปผลเป็นกราฟสเปกตรัมที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไอออนกับค่ามวลต่อประจุภายใต้สภาวะควบคุม โดยส่วนตรวจวัดที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ แชนแนล

อิเล็กตรอนมัลติพลายเออร์ (CEM; Channel electron multiplier) ซึ่งเป็นวิธีประยุกต์จากอิเล็กตรอนมัลติพลายเออร์ (Electron multiplier) ที่ประกอบด้วยหลอดโลหะผสมทองแดงขนาดเล็กหรือไดโอด (Dynode) ประมาณ 20 ชุด ซึ่งจะทำหน้าที่ขยายสัญญาณผ่านการกระทบของอิเล็กตรอนกับผนังไดโอด ส่งผลให้จำนวนอิเล็กตรอนสุดท้ายเพิ่มขึ้นกว่าเดิม 10^6 เท่า



ภาพที่ 7 แสดงส่วนประกอบของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์แบบควอดรูโพล-ไทม์ออฟไฟล์ท (35)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

- การวิจัยโดยการทดลอง (Experimental Research)

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

- 0.1 mL qPCR 8-strip with attached flat caps, clear (Kirgen, China)
- 0.2 mL microcentrifuge tube (Kirgen, China)
- 1.5 mL microcentrifuge Protein low-bind tube (Eppendorf, Germany)
- 96-well microtiter plate (Eppendorf, Germany)
- Balance (Precisa, UK)
- Biosafety cabinet class 2a (Esco, Singapore)
- C18 reversed-phase column (ACQUITY UPLC HSST3, 2.1 × 100 mm, 1.8 μM, Waters)
- Centrifuge (1.5mL) (Eppendorf, Germany)
- Dounce tissue grinder set, 1 mL (Merck, Germany)
- Electrophoresis chamber set (Major science, USA)
- Freezer -20˚C (Sanyo, Japan)
- Freezer -80˚C (Panasonic, Japan)
- Gel Doc 1000 (Vilber lourmat, Hong Kong)
- Heat block (Eppendorf, Germany)
- Illumina MiSeq platform (Illumina, USA)
- Incubator shaker (Biosan, Lattvia)
- Mastercycler® Thermocycler (Eppendorf, Germany)
- NanoPhotometer C40 (Implen, Germany)
- Quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF-MS) (SCIEX, USA)
- Refrigerator 4˚C (Panasonic, Japan)
- Single-channel microlitre pipette set (Eppendorf, Germany)
- Speed vacuum (Tomy Digital Biology, Japan)
- Stainless Steel Beads, 5 mm (Qiagen, Germany)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo fisher scientific, USA)
- TissueLyser LT (Qiagen, Germany)
- Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) (Agilent, USA)
- Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- Workstation Computer for Data Analysis

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากอุจจาระมนุษย์และชิ้นส่วนลำไส้ของพยาธิไส้เดือน
   - GenUP™ gDNA extraction kit (Biotechrabbit, Germany)

2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
   - 10X Reaction buffer (Biotechrabbit, Germany)
   - dNTPs 10 mM (Thermo Fisher Scientific, USA)
   - Dual-index (8x12) primers set (Illumina, USA)
   - Primer 16S 515F_sp1 และ 16S 806R_sp1 10 μM (Illumina, USA)
   - QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany)
   - *Taq* DNA polymerase 5 U/μL (Biotechrabbit, Germany)

3. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
   - 100 bp DNA ladder (GeneDirex, Taiwan)
   - Agarose (Invitrogen, USA)
   - Boric acid (Merck, Germany)
   - Redsafe™ nucleic acid staining solution (Boca Scientific, USA)
   - Tris-base (Amresco, USA)

4. สารเคมีที่ใช้ในการทำให้คลังดีเอ็นเอต้นแบบจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสบริสุทธิ์
   - QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany)

5. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมความเข้มข้นของคลังดีเอ็นเอต้นแบบ
   - DEPC-treated water (Thermo Fisher Scientific, USA)
   - KAPA Library Quantification Kit Illumina® Platforms (KAPA Biosystems, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

6. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ด้วยเครื่องอิลลูมินา
   - MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles) (Illumina, USA)
   - PhiX control (Illumina, USA)

7. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารเมแทบอไลต์จากชิ้นส่วนลำไส้ของพยาธิ
   - 100% methanol (Merck, Germany)
   - Deionized H_2O (Sigma-Aldrich, USA)

8. สารเคมีที่ใช้ในเทคโนโลยีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี
   - Mili-Q water (Sigma-Aldrich, USA)
   - Formic acid (Merck, Germany)
   - Acetonitrile solution (Merck, Germany)

แหล่งที่มาของตัวอย่างในงานวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยอุจจาระมนุษย์จำนวน 30 ชิ้น และชิ้นส่วนลำไส้พยาธิที่ถูกขับออกจากร่างกายผู้ป่วยจำนวน 19 ชิ้น โดยจะถูกแบ่งเป็นสองส่วนได้แก่ ลำไส้ส่วนต้น (Anterior gut) และส่วนปลาย (Posterior gut) เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมแต่ละบริเวณ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ดำเนินการเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครในหมู่บ้านแม่สลิดหลวง และหมู่บ้านเกร๊ะคี จังหวัดตาก จากนั้นดำเนินการตรวจวินิจฉัยไข่พยาธิจากอุจจาระของมนุษย์ด้วยวิธีโมดิฟายด์คาโต้แคท (Modified Kato Katz) พร้อมทั้งจัดระดับความรุนแรงหรือสถาะการติดเชื้อจากปริมาณไข่พยาธิในอุจจาระโดยแบ่งได้ 3 สถานะ ได้แก่ สถานะติดเชื้อรุนแรงมาก (มากกว่า 50,000 ฟองต่อกรัม) ปานกลาง (50,000-5,000 ฟองต่อกรัม) และน้อย (น้อยกว่า 5,000 ฟองต่อกรัม) ตามลำดับ ตลอดจนจำแนกชนิดของพยาธิด้วยการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล โดยแสดงรายละเอียดข้อมูลทางการแพทย์ตามตารางที่ 1

ทั้งนี้ทางภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อนได้ดำเนินการนำตัวอย่างอุจจาระมนุษย์และลำไส้ของพยาธิผสมกับสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ (Lysis buffer) ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อทำลายเชื้อจุลชีพ ก่อนดำเนินการส่งตัวอย่างให้แก่หน่วยปฏิบัติการวิจัยจุลชีววิทยาเชิงระบบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการศึกษาทางห้องปฏิบัติการต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดทางการแพทย์ของอาสาสมัครในจังหวัดตากที่มีการระบาดโรคพยาธิไส้เดือน

หมวดหมู่		หมู่บ้านที่ศึกษา	
		แม่สลิดหลวง	เกร๊ะคี
จำนวนอาสาสมัครทั้งหมด		18	12
เพศของอาสาสมัคร	ชาย	11	5
	หญิง	7	7
ช่วงวัยของอาสาสมัคร	วัยเด็กถึงวัยรุ่น (2-18 ปี)	13	6
	วัยหนุ่มสาว (19-24 ปี)	5	6
สถาะการติดเชื้อพยาธิไส้เดือน	รุนแรงมาก	2	1
	รุนแรงปานกลาง	7	2
	รุนแรงน้อย	ไม่พบ	1
	ไม่ติดเชื้อ	9	8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

การดำเนินการทดลองสามารถแบ่งออกได้ 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

1. การศึกษาสังคมแบคทีเรียด้วยวิธีเมตาจีโนมิกส์
2. การศึกษาเมแทบอโลมด้วยวิธีเมแทโบโลมิกส์
3. การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้ของหนอนพยาธิ

1. การศึกษาสังคมแบคทีเรียด้วยวิธีเมตาจีโนมิกส์

ประกอบด้วย 8 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นส่วนลำไส้ของพยาธิและอุจจาระของมนุษย์

1.2 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

1.3 การเตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรียบริเวณยีน 16S rRNA

1.4 การวิเคราะห์คุณภาพของคลังดีเอ็นดีเอ็นเอต้นแบบ

1.5 การทำให้คลังดีเอ็นเอต้นแบบบริสุทธิ์

1.6 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลังดีเอ็นเอต้นแบบ

1.7 การหาลำดับเบสด้วยเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่

1.8 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของแบคทีเรียด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นส่วนลำไส้ของพยาธิและอุจจาระของมนุษย์

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GenUP™ gDNA extraction kit ที่ขั้นตอนเริ่มต้นสกัดมีความแตกต่างแล้วแต่ชนิดของตัวอย่าง โดยตัวอย่างลำไส้ของหนอนพยาธิจะเริ่มจากการโฮโมจีไนซ์ (Homogenization) ด้วยเครื่อง TissueLyser LT ร่วมกับ Buffer LYSIS LG ปริมาตร 400 µL และ 5 mm Stainless Steel Beads ที่ความถี่ 50 Hz เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำสารละลายไปผสมกับ Proteinase K ปริมาตร 25 µL และ RNase A ปริมาตร 3 µL ในขณะที่ตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์สามารถนำไปผสมร่วมกับสาร Buffer LYSIS LG, Proteinase K และ RNase A ปริมาตร 400, 25 และ 3 µL ตามลำดับ ได้โดยไม่ต้องผ่านการโฮโมจีไนซ์ด้วยเครื่อง TissueLyser LT ดังที่กล่าวไปข้างต้น หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 60 นาที และเติม Buffer BINDING BD ปริมาตร 200 µL ถ่ายสารละลายทั้งหมดลงใน Mini Filter แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำ Mini Filter สวมกับ collection tube ใหม่ แล้วเติม Buffer WASH C ปริมาตร 700 µL แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำ Mini Filter สวมกับ collection tube ใหม่ โดยทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดสารละลายอื่นแล้วทำให้คอลัมน์แห้ง ก่อนนำ Mini Filter ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube แล้วเติม Buffer ELUTION ปริมาตร 50 µL โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที สารสกัดดีเอ็นเอที่ได้นำไปเก็บไว้ที่ -80°C จนกว่าจะนำออกมาใช้

1.2 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารสกัดดีเอ็นเอไปวัดความเข้มข้นผ่านความสามารถในการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NanoPhotometer C40 โดยใช้อัตราส่วนของความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 nm ในการประเมินความบริสุทธิ์ หากอัตราส่วนดังกล่าวมีค่าน้อยกว่า 1.8 หรือมากกว่า 2.0 จะบ่งชี้ถึงการความปนเปื้อนของโปรตีนและอาร์เอ็นเอสูงตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.3 การเตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรียบริเวณยีน 16S rRNA

การศึกษาในขั้นนี้เริ่มจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ V4 บนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ที่เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหลายเท่าตัวผ่านการจำลองสายดีเอ็นเอ (DNA replication) ในสภาวะเลียนแบบการสังเคราะห์ในสิ่งมีชีวิต โดยใช้สารเคมีและคู่ไพร์เมอร์ที่มีลำดับจำเพาะต่อบริเวณที่ 4 บนยีน 16S rRNA (ตารางที่ 2) ที่ความเข้มข้นและปริมาตรดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อผสมสารเคมีทั้งหมดลงในหลอด 0.2 mL microcentrifuge จะทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง Thermocycler ที่อุณหภูมิและจำนวนรอบอย่างจำเพาะดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4

ตารางที่ 2 แสดงลำดับไพร์เมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสบริเวณ V4 บนยีน 16S rRNA

ไพร์เมอร์	ทิศทาง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
16S V4_ F515_SP1	Forward	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC GCTCTTCCGATCTTCGCATA<u>GTGCCAGCMGCCGCGGTAA</u>
16S V4_ R806_SP1	Reverse	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT<u>GGACTACHVGG GTWTCTAAT</u>

*ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้แสดงส่วนที่จำเพาะกับบริเวณ V4 บนยีน 16S rRNA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 3 แสดงสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสบริเวณ V4 บนยีน 16S rRNA

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
10X Reaction buffer	1X	2.5
50 mM $MgCl_2$	1.5 mM	0.75
10 mM dNTPs	0.2 mM	0.5
10 µM Forward primer (16S 515F_sp1)	0.2 µM	0.5
10 µM Reverse primer (16S 806R_sp1)	0.2 µM	0.5
5 U/µl *Taq* DNA Polymerase	0.5 U	0.1
Distilled water	-	18.15
DNA template	-	2.0
รวม		25

ตารางที่ 4 แสดงสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสบริเวณ V4 บนยีน 16S rRNA

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	98	30 sec	1
Denaturation	98	10 sec	
Annealing	53	30 sec	25
Extension	72	45 sec	
Final extension	72	10 min	1

เมื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA อย่างจำเพาะในขั้นก่อน จึงนำสายดีเอ็นเอต้นแบบมาเชื่อมปลายด้วยคู่ไพร์เมอร์อะแดปเตอร์ (Dual-index (8x12) primers) ที่เปรียบเหมือนบาร์โค้ดแสดงความจำเพาะต่อชุดสายดีเอ็นเอนั้น ๆ กับลำดับอะแดปเตอร์ในเครื่องอิลลูมินา ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยความเข้มข้นของสารเคมีและสภาวะในการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยเครื่อง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Thermocycler แสดงรายละเอียดในตารางที่ 5 และตารางที่ 6 ตามลำดับ เมื่อดำเนินการเรียบร้อยแล้วจึงสามารถเก็บคลังดีเอ็นเอต้นแบบไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

ตารางที่ 5 แสดงสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสต่อการเชื่อมปลายด้วยอะแดปเตอร์

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
10X Reaction buffer	1X	7.5
50 mM $MgCl_2$	1.5 mM	2.25
10 mM dNTPs	0.2 mM	1.5
10 µM Forward primer index	0.2 µM	1.5
10 µM Reverse primer index	0.2 µM	1.5
5 U/µl *Taq* DNA Polymerase	0.5 U	0.3
Distilled water	-	54.45
DNA template	-	6
รวม		75

ตารางที่ 6 แสดงสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสต่อการเชื่อมปลายด้วยอะแดปเตอร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	98	30 sec	1
Denaturation	98	10 sec	
Annealing	55	30 sec	25
Extension	72	30 sec	
Final extension	72	10 min	1

CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.4 การวิเคราะห์คุณภาพของคลังดีเอ็นดีเอ็นเอต้นแบบ

เตรียม 2% agarose gel จากการผสมระหว่างผง agarose น้ำหนัก 2 กรัม กับสารละลาย 1X TBE buffer ปริมาตร 100 ml ลงในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติม Redsafe™ nucleic acid staining solution (Boca Scientific, USA) ปริมาตร 5 µl คนให้เข้ากันแล้วนำไปเข้าไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 130°C เป็นเวลา 2 นาที ก่อนเทลงในถาดพร้อมกับหวีเสียบเมื่อเจลแข็ง นำหวีเสียบออกและแช่เจลลงในแทงค์ (Electrophoresis chamber) ที่มี 1X TBE buffer คลุมผิวหน้าเจล จากนั้นนำดีเอ็นเอผสมกับ 6X loading dye ในอัตราส่วน 1:5 และทำการปิเปต 100 bp DNA ladder ลงในแต่ละหลุมเจลก่อนนำไปเปิดใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 volts เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลานำผลเจลไปส่องภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Doc 1000 เพื่อสังเกตแถบดีเอ็นเอที่คาดไว้

1.5 การทำให้คลังดีเอ็นเอต้นแบบบริสุทธิ์

ทำคลังดีเอ็นเอต้นแบบให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด QIAquick gel extraction kit โดยเริ่มจากนำชิ้นส่วนเจลบริเวณแถบที่คาดจากกระบวนการอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผสมกับ Buffer QG ปริมาตร 300 µl ที่อุณหภูมิ 50°C ด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ก่อนทำผสมด้วย Isopropanol ปริมาตร 100 µL จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดเติมลงใน QIAquick column เพื่อปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน collection tube ออก ทำการเติม Buffer QG ปริมาตร 500 µL พร้อมทั้งปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน collection tube ออก จากนั้นทำการเติม Buffer PE ปริมาตร 700 µL ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ก่อนเทสารละลายใน collection tube ออก และสุดท้ายทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อทำให้คอลัมน์แห้งรวมถึงกำจัดสารละลายที่ติดค้าง จากนั้นนำ QIAquick column ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube แล้วเติม Buffer EB ปริมาตร 30 µL ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารสกัดบริสุทธิ์ของคลังดีเอ็นเอต้นแบบไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้

1.6 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลังดีเอ็นเอต้นแบบ

ตรวจวัดปริมาณคลังดีเอ็นเอต้นแบบผ่านการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเออย่างจำเพาะตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคการตรวจวัดแบบเรียลไทม์พีซีอาร์ (real-time PCR; Real Time polymerase chain reaction) ในการทดลองนี้ใช้ชุดสำเร็จรูป KAPA Library Quantification Kit ที่ประกอบไปด้วยสารเคมีและคู่ไพร์เมอร์ที่มีลำดับจำเพาะ (ตารางที่ 7) ที่ความเข้มข้นและปริมาตรดัง

แสดงในตารางที่ 8 เมื่อผสมสารเคมีทั้งหมดลงใน 0.1 mL qPCR 8-strip with attached flat caps จะทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง StepOnePlus™ Real-Time PCR ที่อุณหภูมิและจำนวนรอบดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 9 ซึ่งปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นตัวบ่งชี้ในเชิงปริมาณที่เพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอในแต่ละรอบปฏิกิริยา ปริมาณของดีเอ็นเอจะถูกคำนวณความเข้มข้นเทียบกับตัวอย่างดีเอ็นเอมาตราฐาน (DNA standard) จำนวน 6 ความเข้มข้นจากชุดสำเร็จรูปที่กล่าวไปข้างต้น เมื่อเครื่องดำเนินการเรียบร้อยแล้วนำสารคลังดีเอ็นเอต้นแบบไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้ รวมถึงนำผลความเข้มข้นที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อทำการปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมต่อการอ่านลำดับเบส (6 pM) ด้วยเครื่องอิลลูมินา

ตารางที่ 7 แสดงลำดับไพร์เมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลังดีเอ็นเอต้นแบบ

ไพร์เมอร์	ทิศทาง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
KAPA_F	Forward	AATGATACGGCGACCACCGA
KAPA_R	Reverse	CAAGCAGAAGACGGCATACGA

ตารางที่ 8 แสดงสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์

สารเคมี	ปริมาตร (µl)
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Universal	10
10 µM KAPA_F	0.4
10 µM KAPA_R	0.4
DEPC	5.2
10000X diluted DNA library	4
รวม	20

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 9 แสดงสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์

<table>
<tr><th>ขั้นตอน</th><th>อุณหภูมิ (°C)</th><th>เวลา</th><th>จำนวนรอบ</th></tr>
<tr><td>Initial denaturation</td><td>95</td><td>5 min</td><td>1</td></tr>
<tr><td>Denaturation</td><td>95</td><td>30 sec</td><td rowspan="2">35</td></tr>
<tr><td>Annealing</td><td>60</td><td>45 sec*</td></tr>
</table>

*มีการตรวจวัดการเรืองแสงที่ช่องสัญญาณ SYBR Green ทุกรอบของการเพิ่มจำนวน

1.7 การหาลำดับเบสด้วยเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่องอิลลูมินารุ่น MiSeq ที่อาศัยหลักการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอแบบสองทาง (Paired-end) จำนวน 250x2 รอบ โดยอาศัยชุดสำเร็จรูป MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอริเมอเรส และนิวคลีโอไทด์ทั้งสี่ชนิดที่ผ่านการดัดแปลงให้มีคุณสมบัติในการคืนสภาพในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอกลับไปมา และมีการติดฉลากสารเรืองแสงด้วยสีที่แตกต่างกันที่บริเวณเบส โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้ 20% PhiX spike-in control ในการควบคุมความผิดพลาดอันเกิดจากการตรวจวัดความยาวคลื่นแสงที่ได้จากการกระตุ้นด้วยเลเซอร์ ซึ่งลำดับเบสที่ได้จากการบันทึกค่าความยาวคลื่นจะถูกรวบรวมอยู่ในรูปข้อมูล FASTQ ที่บ่งบอกถึงลำดับและคุณภาพของสายดีเอ็นเอ

1.8 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของแบคทีเรียด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ

ข้อมูลสายลำดับเบสที่ได้จากเครื่องอิลลูมินารุ่น MiSeq จะอยู่ในรูปข้อมูล FASTQ ที่ผ่านการแยกเพื่อระบุตัวอย่างของคลังดีเอ็นเอต้นแบบที่ผสมรวมกัน (Demultiplexed) ด้วยโปรแกรม MiSeq reporter v2.6.2.3 โดยข้อมูล FASTQ ที่เก็บข้อมูลช่วงลำดับเบสสองทิศทาง (paired-end read) จะถูกนำมาวิเคราะห์ตามขั้นตอนผ่านโปรแกรม QIIME2 v2019.7 (36) โดยเริ่มจากการตัดชิ้นส่วนของอะแดปเตอร์ และกรองสายลำดับเบสคุณภาพต่ำออก (<Q30) จากนั้นนำสายลำดับเบสคุณภาพสูงไปจัดกลุ่มที่คล้ายคลึงกัน (มากกว่าร้อยละ 97) ให้อยู่ในหน่วยอนุกรมวิธานเชิงปฏิบัติการ (OTUs; Operational taxonomic units) เดียวกันด้วยอัลกอริทึม VSEARCH (37) พร้อมทั้งกำจัดสายลำดับเบสลูกผสม (Chimera read) ออกด้วยอัลกอริทึม UCHIME (38) จากนั้นนำสายลำดับเบสที่เป็นตัวแทนแต่ละ OTU ไปเทียบกับฐานข้อมูลของแบคทีเรีย Greengenes v13.5 (https://greengenes.secondgenome.com/) ด้วยอัลกอริทึม VSEARCH เพื่อระบุชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรีย รวมถึงคำนวณหาความหลากหลายทางชีวภาพภายในกลุ่มเดียวกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

(Alpha diversity) ด้วยดัชนี Chao1 และ Shannon เพื่อระบุความหลากชนิด (Richness) และความสม่ำเสมอ (Evenness) ของแบคทีเรีย รวมไปถึงการหาความหลากหลายทางชีวภาพระหว่างกลุ่ม (Beta diversity) ด้วยดัชนี Bray-Curtis dissimilarity ผ่านโปรแกรม QIIME2 ตลอดจนวิเคราะห์ผลกระทบในการจำแนกกลุ่มเชิงเส้น (LEfSe; Linear discriminant analysis effect size) (39) เพื่อจำแนกแบคทีเรียที่โดดเด่นระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาด้วยโปรแกรมที่ทำงานบนเว็บเบราว์เซอร์ Galaxy server (https://huttenhow er.sph.harvard.edu/galaxy/) สุดท้ายทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติของข้อมูลสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันด้วย Mann-Whitney U test และการทดสอบข้อมูลมากกว่าสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันด้วย Kruskal-Wallis test ผ่านโปรแกรม GraphPad Prism v8 (40)

2. การศึกษาเมแทบอโลมด้วยวิธีเมแทโบโลมิกส์

ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักได้แก่

2.1 การสกัดสารเมแทบอไลต์จากตัวอย่างชิ้นส่วนลำไส้พยาธิ

2.2 การระบุชนิดและปริมาณสารเมแทบอไลต์ด้วยเทคโนโลยีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลสารเมแทบอไลต์และแสดงวิถีเมแทบอลิซึมด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ

2.1 การสกัดสารเมแทบอไลต์จากชิ้นส่วนลำไส้พยาธิ

นำตัวอย่างชิ้นส่วนลำไส้พยาธิผสมกับ 100% methanol ปริมาตร 500 µL ลงใน Dounce tissue grinder 2 mL เพื่อบดสารให้เข้ากัน จากนั้นทำการแช่แข็งอย่างรวดเร็วด้วยไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen) ทิ้งไว้จนละลายก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายสกัดลงในหลอดใหม่ จากนั้นนำตะกอนที่เหลือไปทำการสกัดอีกรอบด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 250 µL แล้วทำการแช่แข็งอย่างรวดเร็วด้วยไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้จนละลายก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 17,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเก็บสารที่สกัดใหม่ลงในหลอดผสมสารละลายเดิม ในขั้นสุดท้ายนำสารละลายผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 17,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายลงหลอดใหม่เพื่อทำให้แห้งด้วยเครื่องปั่นสุญญากาศ (Speed vacuum) ก่อนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้

2.2 การระบุชนิดและปริมาณสารเมแทบอไลต์ด้วยเทคโนโลยีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี

ในขั้นศึกษาด้วยเครื่องอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี และแมสสเปกโทรมิเตอร์แบบควอดรูโพล-ไทม์ออฟไฟล์ท ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ดำเนินการตรวจวัดชนิดและปริมาณสารเมแทบอไลต์โดยมีรายละเอียดสภาวะที่ใช้ศึกษาดังแสดงในตารางที่ 10 และดำเนินการส่งข้อมูลให้แก่หน่วยปฏิบัติการวิจัยจุลชีววิทยาเชิงระบบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการศึกษาทางชีวสารสนเทศต่อไป

ตารางที่ 10 แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี

ปริมาตรสารที่ฉีด	5 µL
อัตราการไหล	0.3 mL/min
อุณหภูมิคอลัมน์	40°C
ชนิดของคอลัมน์	C18 reversed-phase column (2.1 × 100 mm, 1.8 µM)
ชนิดของเฟสเคลื่อนที่	เฟสเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 กรดฟอร์มิกในน้ำกลั่น 0.1% เฟสเคลื่อนที่ชนิดที่ 2 กรดฟอร์มิกในอะซีโตไนไตรล์ 0.1%
อุณหภูมิแก๊ส N_2	450°C
ส่วนผลิตไอออน	อิเล็กโทรสเปรย์ไอออไนเซชัน (ESI) ผลิตทั้งประจุบวกและลบ
ส่วนวิเคราะห์มวล	ชนิดควอดรูโพล-ไทม์ออฟไฟล์ท (Q-TOF)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ทำการผ่านเฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์เพื่อประสิทธิภาพในการแยกที่สมบูรณ์ โดยเมื่อทำการทดลองเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ ณ เวลาต่างๆ จนได้อัตราส่วนที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลา

เวลา (min)	กรดฟอร์มิกในน้ำกลั่น 0.1% (%v/v)	กรดฟอร์มิกในอะซีโตไนไตรล์ 0.1% (%v/v)
0.0	95	5
2.0	95	5
2.5	40	60
4.0	20	80
12.0	0	100
17.0	0	100
17.1	95	5
20.0	95	5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลสารเมแทบอไลต์และแสดงวิถีเมแทบอลิซึมด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ

ข้อมูลที่ได้จากเครื่องอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี และแมสสเปกโทรมิเตอร์แบบควอดรูโพล-ไทม์ออฟไฟล์ทจะอยู่ในรูปข้อมูลสกุล .wiff และ .wiff.scan ซึ่งจะถูกแปลงสกุลเป็น .mzML ด้วยโปรแกรม MSConvert (41) ก่อนทำการระบุชนิดของสารเมแทบอไลต์ผ่านการเทียบแนวพีค (Peak alignment) กับฐานข้อมูล METLIN (http://metlin.scripps.edu) ด้วยโปรแกรม XCMS v3.7.1 (42) โดยใช้อัลกอริทึม CentWave (43) เพื่อคัดกรองข้อมูลที่มีความผิดพลาด (Tolerance error) มากกว่า 15 ppm ออก จากนั้นทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารเมแทบอไลต์ที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างด้วยกราฟ Volcano และวิเคราะห์สหสัมพันธ์หลายตัวแปร (Multivariate analysis) ผ่านการจัดกลุ่มแบบกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (PLS-DA; Partial least squares-discriminant analysis) ผ่านโปรแกรม MetaboAnalyst v5.0

(44) ทำให้สามารถแสดงวิถีเมแทบอลิซึมผ่านอัลกอริทึม Mummichog (45) โดยเทียบกับข้อมูลวิถีเมแทบอลิซึมของหนอนตัวกลม (*Caenorhabditis elegans*) ในฐานข้อมูล KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) (www.genome.jp/kegg)

3. การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้ของหนอนพยาธิ

จากข้อมูลชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในระดับสกุล (Genus) และสารเมแทบอไลต์ที่มีความสำคัญต่อตัวแปรในการทดลอง (VIP; Variable importance in projection) จะถูกนำมาศึกษาปฏิสัมพันธ์ผ่านการสร้างเครือข่ายเชิงบูรณาการ (Integrative network) ด้วยโปรแกรมที่ทำงานบนเว็บเบราว์เซอร์ xMWAS v0.552 (https://kuppal.shinyapps.io/xmwas/) โดยอาศัยการจำแนกประเภทแบบกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (PLS-DA) ก่อนทำการศึกษาสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation) พร้อมทั้งวิเคราะห์ด้วยการแจกแจงทางสถิติแบบสติวเดนต์ที (Student's *t*-test) ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ความเป็นศูนย์กลางในเครือข่ายจะถูกนำมาพิจารณาความแตกต่างระหว่างกลุ่มตามอิทธิพลการเชื่อมโยงของจุดยอดแบบไอเกนเวกเตอร์ (Eigenvector centrality) เพื่อช่วยในการจัดกลุ่มตัวอย่างได้อย่างแม่นยำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4 ผลการศึกษา

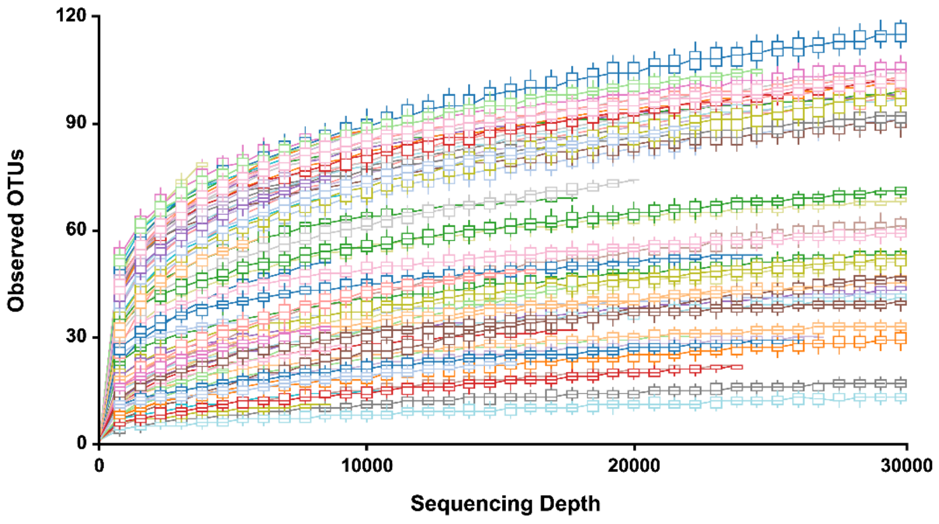
ข้อมูลจากการหาลำดับเบสด้วยเครื่องอิลลูมินา

หลังจากหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ด้วยเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ ชุดข้อมูลดิบของสายลำดับเบส (Raw read) ของตัวอย่างชิ้นส่วนลำไส้พยาธิและตัวอย่างอุจจาระมนุษย์มีทั้งหมด 2,343,769 สาย คิดเป็นค่าเฉลี่ยต่อตัวอย่างอยู่ที่ 34,467 สาย แสดงรายละเอียดในเชิงปริมาณของชุดข้อมูลลำดับเบสโดยสรุปในตารางที่ 12 โดยชุดข้อมูลดิบของสายลำดับเบสจะถูกตัดชิ้นส่วนของอะแดปเตอร์ และกรองสายลำดับเบสคุณภาพต่ำออก ก่อนนำไปเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียในระบบอนุกรมวิธาน ซึ่งจำนวนชุดสายข้อมูลดังกล่าวให้ข้อมูลที่เพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์ในระดับต่อไปดังแสดงในภาพที่ 8

ตารางที่ 12 แสดงรายละเอียดในเชิงปริมาณของข้อมูลสายลำดับเบส

ชนิดตัวอย่าง	จำนวน	จำนวนสายข้อมูลดิบของลำดับเบสต่อตัวอย่าง*	จำนวนสายข้อมูลลำดับเบสที่ผ่านการกรองต่อตัวอย่าง*	%ระบุชนิดแบคทีเรีย
ลำไส้พยาธิ	38	32,806 ± 21,490	32,746 ± 21,425	91.49
อุจจาระมนุษย์	30	36,571 ± 23,599	36,451 ± 23,525	93.85

*ข้อมูลในตารางแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD

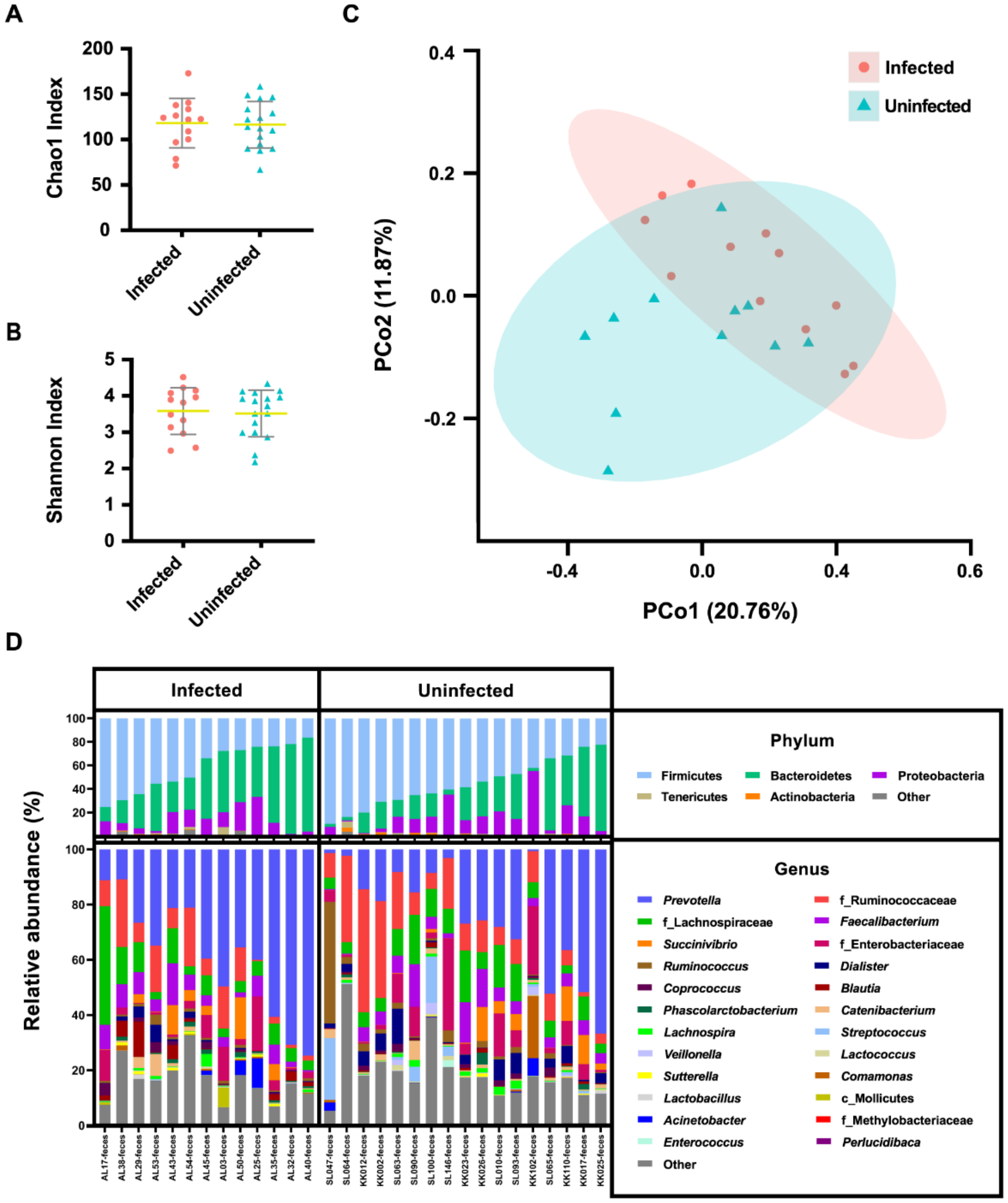


ภาพที่ 8 แสดงจำนวนชุดข้อมูลดิบของสายลำดับเบสในแต่ละตัวอย่างด้วยสีที่แตกต่างกัน โดยสายลำดับเบสดังกล่าวสามารถจัดกลุ่มเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียในระดับอนุกรมวิธาน

ชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์

จากวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียภายในกลุ่มเดียวกันด้วยดัชนี Chao1 และ Shannon สังคมแบคทีเรียในลำไส้ระหว่างผู้ป่วยโรคพยาธิไส้เดือนกับมนุษย์ที่ไม่ติดเชื้อ ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ (ภาพที่ 9A-B) อย่างไรก็ตามความหลากหลายของแบคทีเรียระหว่างกลุ่มที่วิเคราะห์จากองค์ประกอบหลักของข้อมูล (PCoA; Principal coordinate analysis) โดยอิงจากดัชนี Bray-Curtis dissimilarity พบความแตกต่างของสังคมแบคทีเรียในอุจจาระมนุษย์ระหว่างอาสาสมัครที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อพยาธิไส้เดือน (ภาพที่ 9C) เมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรียที่พบในอุจจาระมนุษย์ เผยให้เห็นถึงชนิดของแบคทีเรียที่โดดเด่นในระดับไฟลัมโดนเรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ Firmicutes, Bacteroidetes และ Proteobacteria ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในระดับสกุล พบแบคทีเรีย *Prevotella* โดดเด่นในผู้ป่วยโรคพยาธิไส้เดือนถึงร้อยละ 16.6% ซึ่งมากกว่าอาสาสมัครที่ไม่ติดเชื้อ (13.1%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann-Whitney U test, $P < 0.05$) นอกจากนี้การศึกษาแบคทีเรียในระดับวงศ์ (Family) พบการลดลงของแบคทีเรีย Ruminococcaceae และ Lachnospiraceae ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคพยาธิไส้เดือนดังแสดงในภาพที่ 9D

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 9 แสดงชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์ โดยการวิเคราะห์ความหลากหลายภายในกลุ่มเดียวกันเทียบกับอาสาสมัครที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อโรคพยาธิไส้เดือนด้วยดัชนี Chao1 (A) และ Shannon (B) แสดงผลเป็นกราฟการกระจายโดยมีแทบความคลาดเคลื่อนที่คำนวณจากค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน รวมไปถึงแสดงความแตกต่างทางสถิติด้วย Mann-Whitney U test ($P < 0.05$) และการวิเคราะห์ความหลากหลายระหว่างกลุ่มเทียบกับอาสาสมัครที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อโรคพยาธิไส้เดือนโดยอิงจากดัชนี Bray-Curtis dissimilarity ที่อธิบายช่วงความเชื่อมั่นสูงภายในรูปวงกลมสี (C) กราฟแท่งแสดงชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในระดับไฟลัมและสกุลที่โดดเด่นในลำไส้อาสาสมัครที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อโรคพยาธิ (D)

ชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียในพยาธิไส้เดือน

จากการศึกษาสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิไส้เดือนบริเวณส่วนต้น (Anterior gut) กับส่วนปลาย (Posterior gut) ด้วยเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบส จากการวิเคราะห์ความหลากหลายภายในกลุ่มเดียวกันด้วยดัชนี Chao1 และ Shannon ไม่พบความแตกต่างของแบคทีเรียในลำไส้พยาธิบริเวณส่วนต้นกับปลายอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 10A-B) อย่างไรก็ตามความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วยดัชนี Bray-Curtis dissimilarity เผยให้เห็นความใกล้ชิดกันของแบคทีเรียในลำไส้พยาธิทั้งสองส่วนที่บริเวณความเชื่อมั่นสูง (95%) (ภาพที่ 10E) และการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในลำไส้พยาธิไส้เดือนบริเวณส่วนต้นและปลายดังแสดงในภาพที่ 11 พบแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes (71.5%) และ Proteobacteria (23.5%) มากในลำไส้พยาธิ เมื่อพิจารณาในระดับสกุลพบแบคทีเรีย *Streptococcus* (27.9%) และ *Lactococcus* (26.4%) เจริญอยู่ภายในลำไส้พยาธิอย่างโดดเด่น

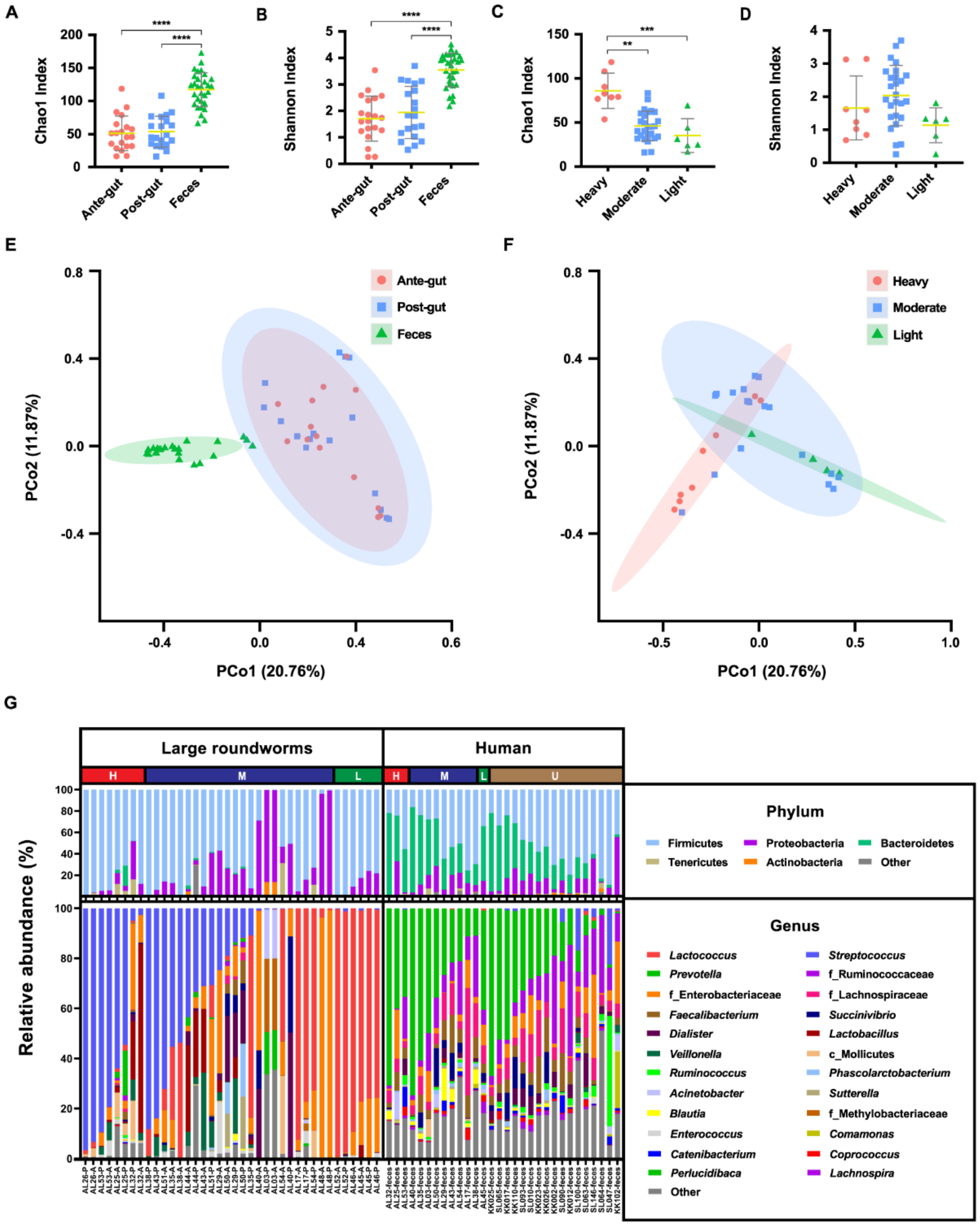
เปรียบเทียบชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียระหว่างมนุษย์กับพยาธิไส้เดือน

จากการศึกษาความหลากหลายภายในกลุ่มเดียวกันด้วยดัชนี Chao1 และ Shannon แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของแบคทีเรียในอุจจาระมนุษย์สูงกว่าในลำไส้พยาธิไส้เดือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 10A-B โดยผลจากการวิเคราะห์ความหลากชนิดของแบคทีเรียในลำไส้พยาธิด้วยดัชนี Chao1 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในพยาธิที่สถานะติดเชื้อรุนแรงมาก (Heavy infected) เมื่อเทียบกับสถานะอื่น ๆ (ภาพที่ 10C) ในขณะที่ดัชนี Shannon ไม่พบความแตกต่างระหว่างสถานะการติดเชื้อ (ภาพที่ 10D) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่างกลุ่มข้อมูลด้วยดัชนี Bray-Curtis dissimilarity แสดงให้เห็นถึงการความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียในอุจจาระมนุษย์กับลำไส้พยาธิไส้เดือนอย่างชัดเจน ในขณะที่สัดส่วนของแบคทีเรียในลำไส้พยาธิบริเวณส่วนต้นกับปลาย มีความคล้ายคลึงกัน (ภาพที่ 10E) นอกจากนี้ยังเผยให้เห็นถึงผลกระทบของสถานะการติดเชื้อส่งผลต่อแบคทีเรียในลำไส้พยาธิไส้เดือน โดยพยาธิที่ขับออกผู้ป่วยสถานะการติดเชื้อรุนแรงมากแสดงความแตกต่างทางความหลากหลายของแบคทีเรียมากกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อรุนแรงปานกลาง (Moderate infected) และน้อย (Light infected) ดังแสดงในภาพที่ 10F

ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์และพยาธิไส้เดือนที่โดดเด่นในสำไส้พยาธิและมนุษย์เทียบกับสถานะการติดเชื้อ (ภาพที่ 10G) พบแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes ในลำไส้มนุษย์และพยาธิโดดเด่นมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ถึงร้อยละ 62 อย่างไรก็ตามในลำไส้มนุษย์พบแบคทีเรีย Bacteroidetes (34.3%) โดดเด่นมาก ในขณะเดียวกันยังพบแบคทีเรีย Proteobacteria (23.5%) โดดเด่นในลำไส้ของพยาธิ เมื่อทำการเปรียบเทียบความสัมพัทธ์ของแบคทีเรียใน ลำไส้กับ

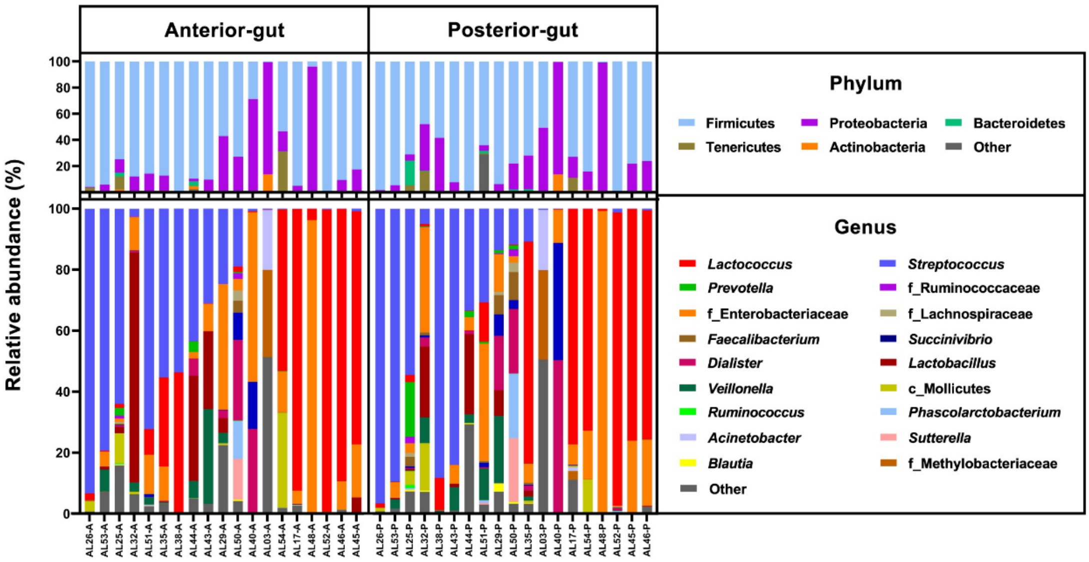
สถานะการติดเชื้อกลับไม่พบความแตกต่างของแบคทีเรียในระดับไฟลัม แต่เมื่อพิจารณาชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในระดับสกุลในลำไส้ของพยาธิเผยให้เห็นถึงผลกระทบจากสถานะการติดเชื้อพยาธิอย่างเห็นได้ชัด โดยสกุลของแบคทีเรียที่พบได้มากในสถานะการติดเชื้อรุนแรงมาก คือ *Streptococcus* (12.8%) ในขณะที่ผู้ป่วยสถานะการติดเชื้อรุนแรงน้อยจะถูกครอบงำด้วยแบคทีเรียสกุล *Lactococcus* (13.5%) นอกจากนี้แบคทีเรียในระดับสกุลดังกล่าวสามารถพบในผู้ป่วยสถานะการติดเชื้อรุนแรงปานกลางที่อัตราส่วนใกล้เคียงกัน (*Lactococcus* (12.7%) และ *Streptococcus* (15.1%)) ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าชนิดของแบคทีเรียที่โดดเด่นในลำไส้พยาธิจะมีโอกาสพบในลำไส้มนุษย์ได้น้อยอย่างมีนัยยสำคัญ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 10 แสดงชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิและมนุษย์ โดยการวิเคราะห์ความหลากหลายภายในกลุ่มเดียวกันเทียบกับชนิดของตัวอย่าง (A, B) และสถานะการติดเชื้อในมนุษย์ (C, D) ด้วยคำนวณจากดัชนี Chao1 และ Shannon แสดงผลเป็นกราฟการกระจายโดยมีแทบความคลาดเคลื่อนที่คำนวณจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน รวมไปถึงแสดงความแตกต่างทางสถิติด้วย Kruskal-Wallis test (***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001) และการวิเคราะห์ความหลากหลายระหว่างกลุ่มศึกษาเทียบกับชนิดของตัวอย่าง (E) และสถานะการติดเชื้อในมนุษย์ (F)

โดยอิงจากดัชนี Bray-Curtis dissimilarity ที่อธิบายช่วงความเชื่อมั่นสูงภายในรูปวงกลมสี (G) กราฟแท่งแสดงชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในระดับไฟลัมและสกุลที่โดดเด่นในสำไส้พยาธิและมนุษย์เทียบกับสถานะการติดเชื้อ

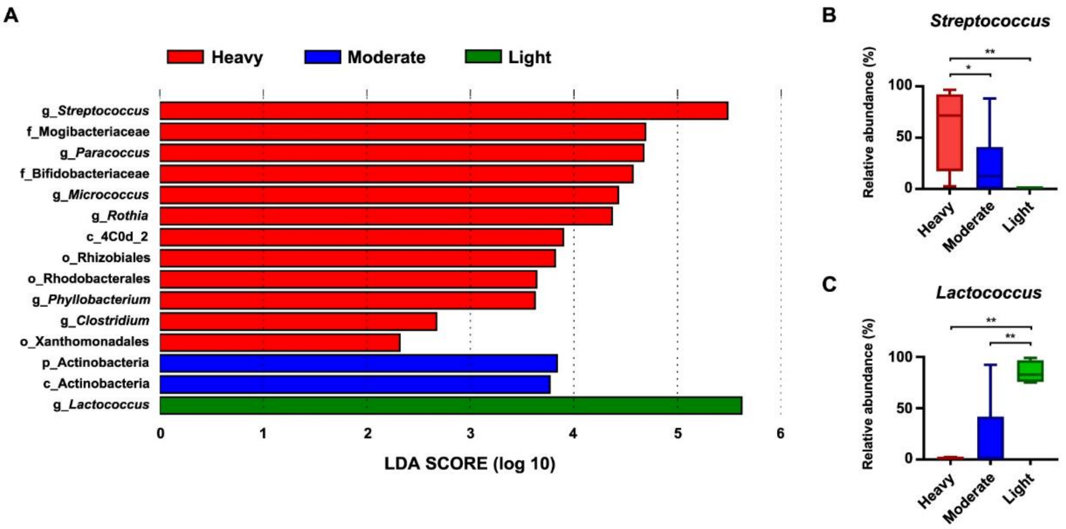


ภาพที่ 11 กราฟแท่งแสดงชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในระดับไฟลัมและสกุลที่โดดเด่นในลำไส้ของพยาธิไส้เดือนบริเวณส่วนต้นและส่วนปลาย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ความแตกต่างทางความชุกของสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิต่อสถานะการติดเชื้อ

เพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับความแตกต่างของสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิด้วยการวิเคราะห์ผลกระทบในการจำแนกกลุ่มเชิงเส้นของสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิระหว่างสถานะการติดเชื้อแสดงรายละเอียดในภาพที่ 12A โดยแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* (ภาพที่ 12B) และ *Lactococcus* (ภาพที่ 12C) พบมากอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยติดเชื้อรุนแรงมาก และน้อย ตามลำดับ อธิบายด้วยผลคะแนนในการจำแนกข้อมูลเชิงเส้น (LDA score > 5) อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยติดเชื้อรุนแรงมากสามารถพบแบคทีเรียระดับระดับสกุลอื่น ๆ ประกอบด้วย *Paracoccus*, *Micrococcus* และ *Rothia* โดดเด่น นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียไฟลัม Actinobacteria โดดเด่นในผู้ป่วยที่สถานะการติดเชื้อรุนแรงปานกลาง

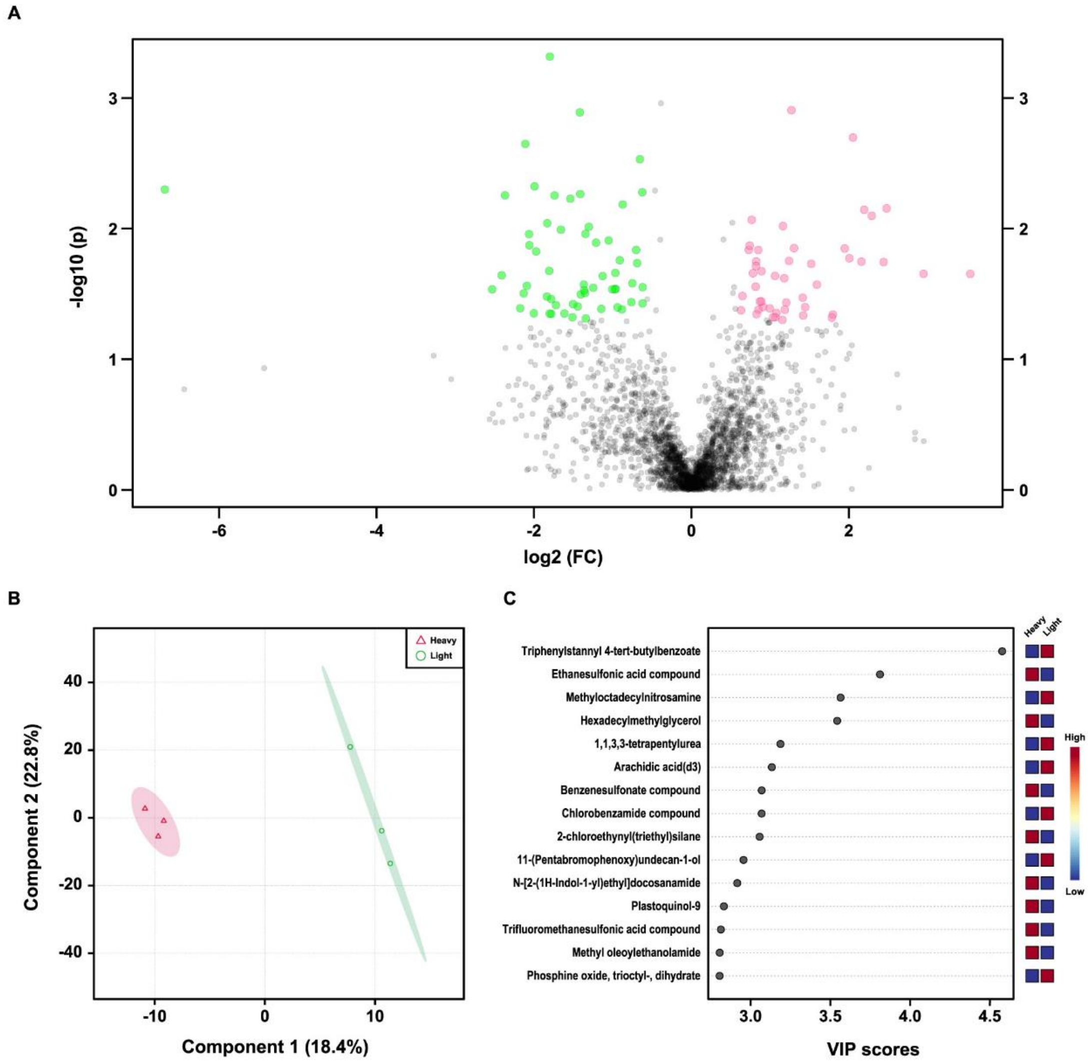


ภาพที่ 12 แสดงความแตกต่างทางความชุกของสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิเทียบกับสถานะการติดเชื้อโรคพยาธิไส้เดือนด้วยการวิเคราะห์ผลกระทบในการจำแนกกลุ่มเชิงเส้น (A) และจากผลคะแนนที่ใช้การจำแนกข้อมูลเชิงเส้น (LDA score > 5) แสดงปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในสกุล Streptococcus (B) และ Lactococcus (C) ระหว่างสถานะการติดเชื้อด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Kruskal-Wallis test (*P < 0.1, **P < 0.01)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

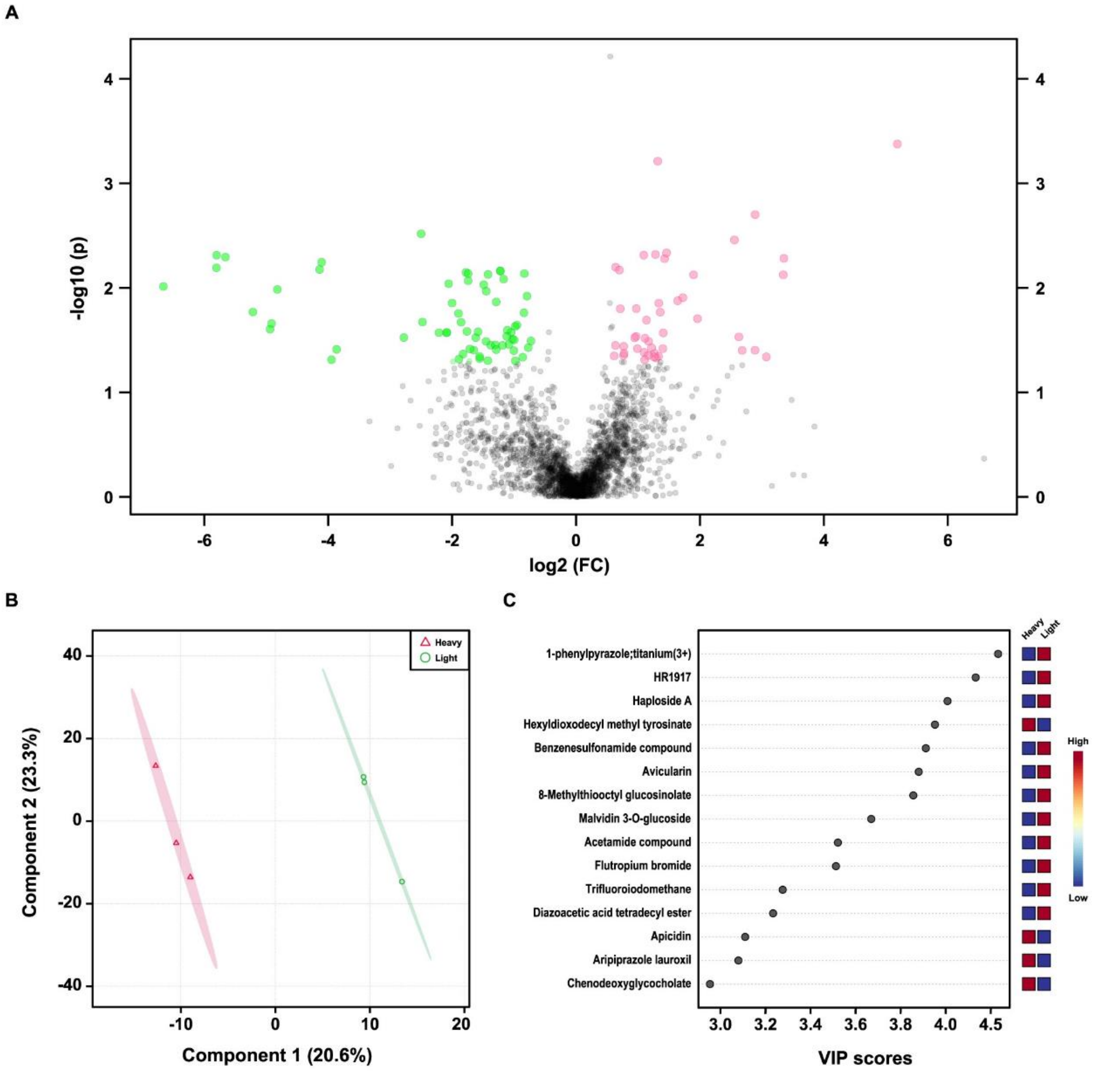
เมแทบอโลมในตัวอย่างลำไส้พยาธิที่ระดับสถานะการติดเชื้อรุนแรงมากและน้อย

จากข้อมูลทางความชุกของสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างสถานะการติดเชื้อรุนแรงมากและน้อย ก่อให้เกิดความสนใจในการวิเคราะห์ทางเมแทบอโลมเพื่อเปิดเผยความสัมพันธ์เชิงหน้าที่และผลกระทบของสารเมแทบอไลต์ในลำไส้พยาธิ จากผลวิเคราะห์คุณลักษณะของมวลต่อประจุ (m/z features) ในประจุบวกและลบ 4,988 จำนวน พบคุณลักษณะที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Fold changes > 1.5, $P < 0.05$) ของลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อรุนแรงมากและน้อย จำนวน 91 และ 121 ตามลำดับ (ภาพที่ 13A และ14A) เมื่อทำการจำแนกประเภทของตัวอย่างลำไส้ระหว่างสถานะการติดเชื้อด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน พบแนวโน้มที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างสถานะการติดเชื้อด้วยเมแทบอโลมประจุบวกและประจุลบ (ภาพที่ 13B และ14B) โดยปัจจัยทางคุณลักษณะของมวลต่อประจุจะถูกประเมินด้วยคะแนนความสำคัญต่อตัวแปรในการทดลอง (VIP score; Variable importance in projection score) ก่อนนำไประบุชนิดของสารเมแทบอไลต์ด้วยฐานข้อมูล Metlin โดยกลุ่มของสารเมแทบอไลต์ อาทิ Ethanesulfonic acid compound, Hexadecyl methyl glycerol, Benzenesulfonate compound, 2 -chloro-ethynyl(triethyl)silane, Hexyldioxodecyl methyl tyrosinate, Apicidin และ Aripiprazole lauroxil มีปริมาณสูงในตัวอย่างลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อรุนแรงมาก อย่างไรก็ตามกลับพบกลุ่มของสารเมแทบอไลต์ ได้แก่ Triphenylstannyl 4-tert-butylbenzoate, Methyloctadecylnitro-samine, 1 ,1 ,3 ,3 -tetrapentylurea, Arachidic acid(d3), Chlorobenzamide compound, 1 -phenylpyrazole;titanium(3 +), HR1 9 1 7 , Haploside a, Benzenesulfonamide compound, Avicularin, 8 -methylthiooctyl glucosinolate, Malvidin 3 -o-glucoside, Acetamide compound , Flutropium bromide, Trifluoroiodomethane และ Diazoacetic acid tetra-decyl ester มีปริมาณสูงในตัวอย่างลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อรุนแรงน้อยทั้งในเมแทบอโลมประจุบวกและประจุลบ ดังแสดงรายละเอียดในภาพที่ 13C และ 14C ตามลำดับ



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 13 แสดงผลวิเคราะห์เมแทบอโลมประจุบวกในตัวอย่างลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อโรครุนแรงมากและน้อย (A) การวิเคราะห์เชิงสถิติของคุณลักษณะมวลต่อประจุที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Fold changes > 1.5, $P < 0.05$) ระหว่างสถานะการติดเชื้อโรคพยาธิไส้เดือนหนักและเบาด้วยจุดวงกลมสีแดงและเขียวตามลำดับ (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างของกลุ่มตัวอย่างลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อหนักและเบาด้วยการจัดกลุ่มแบบกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (C) กราฟแสดงสารเมแทบอไลต์ในลำไส้พยาธิระหว่างสถานะการติดเชื้อรุนแรงมากและน้อย 15 ชนิดแรกที่มีคะแนนความสำคัญต่อตัวแปรในการทดลองสูงสุด



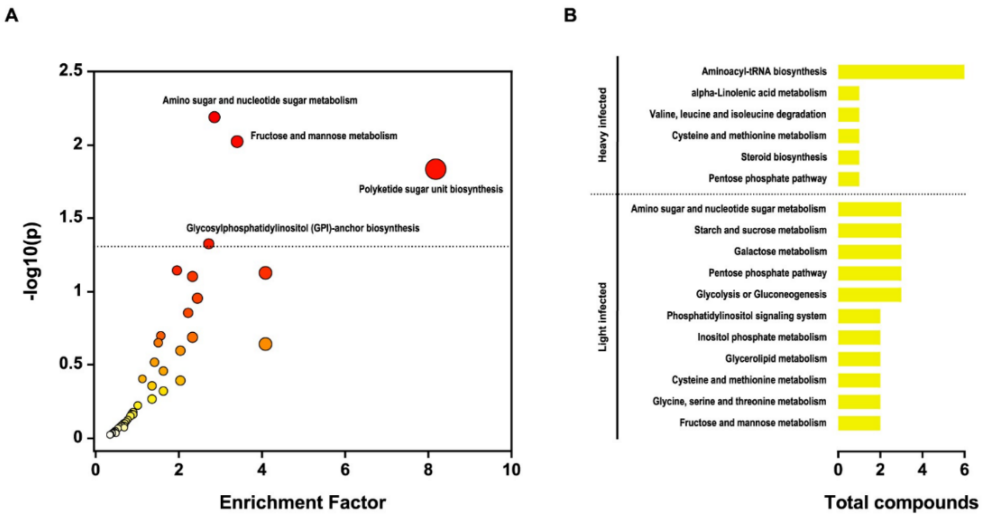
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 14 แสดงผลวิเคราะห์เมแทบอโลมประจุลบในตัวอย่างลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อโรครุนแรงมากและน้อย (A) การวิเคราะห์เชิงสถิติของคุณลักษณะมวลต่อประจุที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Fold changes > 1.5, *P* < 0.05) ระหว่างสถานะการติดเชื้อโรคพยาธิไส้เดือนหนักและเบาด้วยจุดวงกลมสีแดงและเขียวตามลำดับ (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างของกลุ่มตัวอย่างลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อหนักและเบาด้วยการจัดกลุ่มแบบกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (C) กราฟแสดงสารเมแทบอไลต์ในลำไส้พยาธิระหว่างสถานะการติดเชื้อรุนแรงมากและน้อย 15 ชนิดแรกที่มีคะแนนความสำคัญต่อตัวแปรในการทดลองสูงสุด

วิถีเมแทบอลิซึมในลำไส้ของพยาธิไส้เดือนที่สถานะการติดเชื้อรุนแรงมากและน้อย

จากการวิเคราะห์วิถีเมแทบอลิซึมที่พิจารณาจากชนิดและปริมาณของเมแทบอไลต์ในลำไส้พยาธิไส้เดือนในสถานะการติดเชื้อรุนแรงมากและน้อย พบวิถีเมแทบอลิซึมทั้งหมด 52 วิถี โดยมีเพียง 4 วิถีที่สามารถระบุหน้าที่ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Enrichment factor > 1 และ $P < 0.05$) ได้แก่ Amino sugar and nucleotide sugar metabolism, Fructose and mannose metabolism, Polyketide sugar unit biosynthesis และ glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis ซึ่งแสดงผลรายละเอียดในภาพที่ 15A

เมื่อทำการวิเคราะห์วิถีเมแทบอลิซึมในลำไส้พยาธิจากสารเมแทบอไลต์ที่พบมากในแต่ละระดับการติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fold changes > 1.5 และ $P < 0.05$) แสดงให้เห็นถึงอิทธิผลของสถานะการติดเชื้อต่อวิถีเมแทบอลิซึม โดยลำไส้พยาธิที่สถานะติดเชื้อรุนแรงมากพบวิถีเมแทบอลิซึม Aminoacyl-tRNA biosynthesis, Alpha-Linolenic acid metabolism, (Val, Leu and Ile) degradation, (Cys and Met) metabolism, Steroid biosynthesis และ Pentose phosphate pathway ซึ่งตรงข้ามกับวิถีเมแทบอลิซึมที่พบในลำไส้พยาธิที่สถานะติดเชื้อรุนแรงน้อยอันประกอบด้วย Amino sugar and nucleotide sugar metabolism, Starch and sucrose metabolism, Galactose metabolism, Pentose phosphate pathway, Glycolysis or gluconeogenesis, Phosphatidylinositol signaling system, Inositol phosphate metabolism, Glycerolipid metabolism, (Gly, Ser and Thr) metabolism และ (Fructose and mannose) metabolism ตามรายละเอียดที่แสดงในภาพที่ 15B

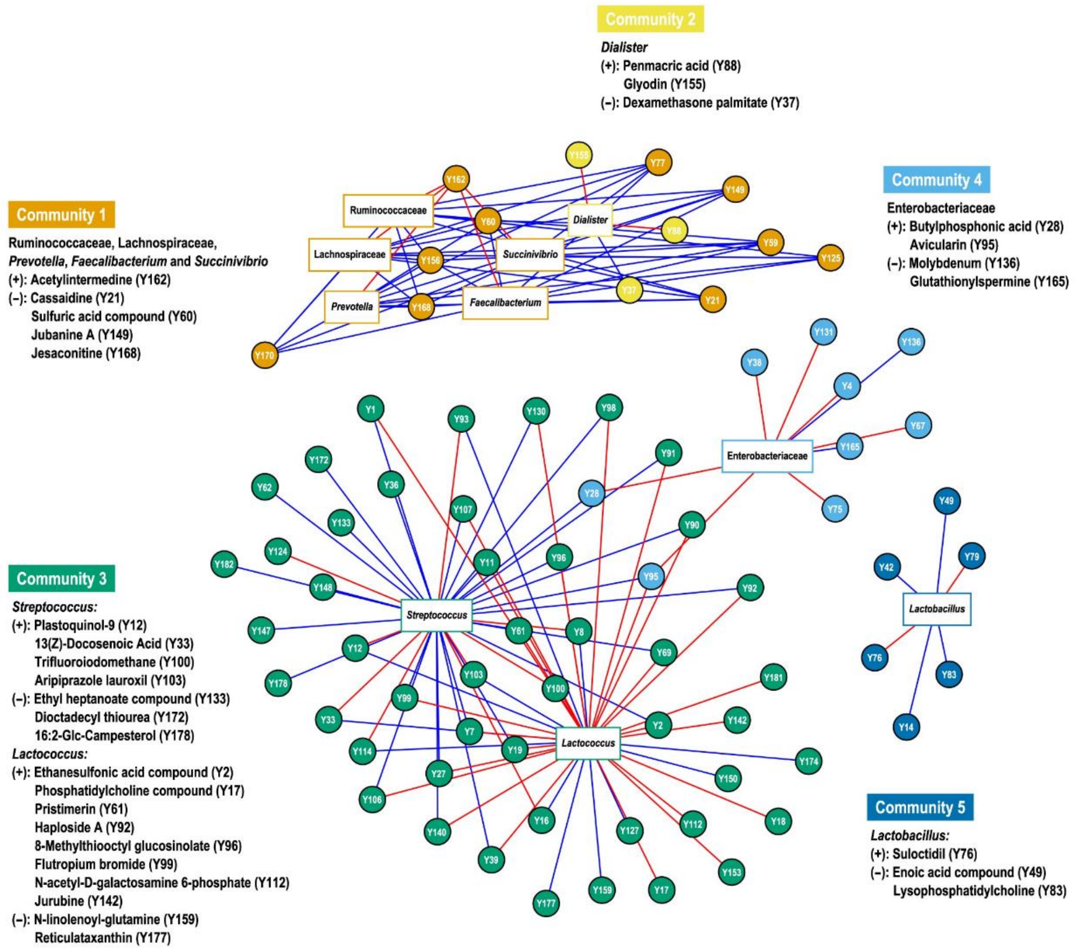


ภาพที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์วิถีเมแทบอลิซึมในลำไส้ของพยาธิไส้เดือน (A) กราฟแสดงวิถีเมแทบอลิซึมในลำไส้ของพยาธิที่ติดเชื้อรุนแรงมากและน้อย (B) กราฟแท่งแสดงวิถีเมแทบอลิซึมและจำนวนสารเมแทบอไลต์ที่พบมากระหว่างสถานะติดเชื้อรุนแรงมากและน้อย

ปฏิสัมพันธ์แบบเครือข่ายระหว่างสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้ของหนอนพยาธิ

ผลวิเคราะห์เครือข่ายเชิงบูรณาการที่แสดงความสัมพันธ์ของจุดยอดตามอิทธิพลการเชื่อมโยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($|r| > 0.4$ และ $P < 0.05$) ระหว่างแบคทีเรียที่มีชนิดและปริมาณสัมพัทธ์สูงสุด 10 ชนิด และสารเมแทบอไลต์ 200 อันดับแรกที่มีความสำคัญต่อการทดลองสูงสุด พบกลุ่มของเครือข่ายดังกล่าว 5 กลุ่ม (ภาพที่ 16) ประกอบด้วย กลุ่มเครือข่ายที่ 1 พบกลุ่มของแบคทีเรีย *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Succinivibrio*, Ruminococcaceae และ Lachnospiraceae แสดงความสัมพันธ์เชิงลบกับกลุ่มของสารเมแทบอไลต์ Cassaidine, Jubanine a, Jesaconitine และ Sulfuric acid compound ขณะที่กลุ่มเครือข่ายที่ 2 พบสารเมแทบอไลต์ Glyodin และ Penmacric acid แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกกับแบคทีเรียสกุล *Dialister* แต่กลับแสดงความสัมพันธ์เชิงลบกับสารเมแทบอไลต์ Dexamethasone palmitate อย่างไรก็ตามกลุ่มเครือข่ายที่ 3 พบแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* แสดงความสัมพันธ์เชิงลบกับกลุ่มของสารเมแทบอไลต์ Ethyl heptanoate compound, Dioctadecyl thiourea และ 16:2-Glc-campesterol ในขณะที่แบคทีเรียสกุล *Lactococcus* แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกกับกลุ่มของสารเมแทบอไลต์ N-acetyl-D-galactosamine 6-phosphate, Jurubine และ Phosphatidylcholine compound นอกจากนี้ยังพบกลุ่มของสารเมแทบอไลต์บางชนิด อาทิ Trifluoroiodomethane, Aripiprazole lauroxil, Plastoquinol-9 และ 13(Z)-Docosenoic acid มีความสัมพันธ์เชิงลบกับแบคทีเรียสกุล *Lactococcus* แต่กลับพบความสัมพันธ์เชิงบวกกับแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* ในทำนองเดียวกันสารเมแทบอไลต์ในกลุ่ม Haploside a, Pristimerin, Ethanesulfonic acid compound, 8-methylthiooctyl glucosinolate และ Flutropium bromide มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับแบคทีเรียสกุล *Lactococcus* แต่กลับพบความสัมพันธ์เชิงลบกับแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* เมื่อมองส่วนคาบเกี่ยวระหว่างกลุ่มเครือข่ายที่ 3 และ 4 พบสารเมแทบอไลต์ Avicularin และ butylphosphonic acid compounds มีความสัมพันธ์เชิงลบกับแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* ซึ่งตรงข้ามกับแบคทีเรีย *Lactococcus* และ Enterobacteriaceae ที่แสดงความสัมพันธ์เชิงบวก นอกจากนี้สารเมแทบอไลต์ของ Molybdenum และ Glutathionylspermine มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ Enterobacteriaceae สุดท้ายแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* แสดงความสัมพันธ์เชิงลบกับสารเมแทบอไลต์ Enoic acid compound และ Lysophosphatidylcholine ในทางตรงข้ามพบความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารเมแทบอไลต์ Suloctidil ที่แสดงในกลุ่มเครือข่ายที่ 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 16 แสดงปฏิสัมพันธ์แบบเครือข่ายระหว่างสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้ของพยาธิที่อธิบายด้วยสีของเส้นเชื่อมและรูปทรงทางเรขาคณิต (สีแดงแทนความสัมพันธ์ในเชิงบวก, สีน้ำเงินแทนความสัมพันธ์ในเชิงลบ, สี่เหลี่ยมแทนแบคทีเรีย และวงกลมแทนเมแทบอไลต์)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง

โรคพยาธิไส้เดือน คือภาวะที่ร่างกายติดเชื้อพยาธิไส้เดือนในลำไส้ส่งผลต่อกลไกการตอบสนองพื้นฐาน หรือระบบภูมิคุ้มกันในมนุษย์ (46) อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับผลกระทบของสังคมแบคทีเรียในลำไส้ของมนุษย์ต่อการติดเชื้อพยาธิยังมีข้อจำกัดทางความรู้ รวมไปถึงการศึกษาสังคมแบคทีเรียในลำไส้ของพยาธิไส้เดือนในปัจจุบันที่ยังไม่พบรายงาน ส่งผลให้งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์และพยาธิไส้เดือน รวมไปถึงการศึกษาทางเมตาโบโลมของลำไส้พยาธิเพื่อเปิดเผยความสัมพันธ์เชิงหน้าที่ระหว่างมนุษย์และพยาธิไส้เดือนในแต่ละระดับการติดเชื้อ

การศึกษาชนิดและความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์และพยาธิไส้เดือน

จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสังคมแบคทีเรียแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างมนุษย์และพยาธิไส้เดือนอย่างชัดเจน รวมไปถึงผลกระทบจากสถานะการติดเชื้อที่ส่งผลในลำไส้พยาธิ โดยการวิเคราะห์เพื่ออธิบายความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มข้อมูลด้วยดัชนี Bray-Curtis dissimilarity เผยให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียในอุจจาระมนุษย์ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อโรคพยาธิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในพยาธิไส้เดือนในสุกร (*Ascaris suum*) ที่อธิบายถึงผลกระทบจากการติดเชื้อส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสังคมแบคทีเรียและวิถีเมแทบอลิซึมในสุกร (47)

ผลวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสังคมแบคทีเรียในลำไส้พบแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes มีความโดดเด่นมากที่สุดทั้งในมนุษย์และพยาธิไส้เดือน นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียไฟลัม Bacteroidetes และ Proteobacteria โดดเด่นในลำไส้มนุษย์และพยาธิตามลำดับ โดยอัตราส่วนของแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes และ Bacteroidetes ในลำไส้มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพมนุษย์ ซึ่งปัจจุบันสามารถประยุกต์ใช้เพื่ออธิบายภาวะผิดปกติของร่างกายอันเกิดจากการขาดสมดุลของแบคทีเรีย (Dysbiosis) ได้เป็นอย่างดี (48) โดยการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria ยังสัมพันธ์กับการลดลงของแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes ในมนุษย์ ที่ภาวะดังกล่าวจะกระตุ้นให้เกิดความผิดปกติต่อลำไส้และระบบเผาผลาญ (49) ซึ่งจากรายงานในปัจจุบันพบแบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria ในโฮสต์ที่ติดเชื้อพยาธิแส้ม้า (*Trichuris muris*) (50) โดยการพบแบคทีเรียดังกล่าวมากอาจส่งผลให้แบคทีเรียชนิดนี้เป็นตัวแปรหนึ่งที่รบกวนการทำงานของลำไส้มนุษย์ รวมไปถึงความสามารถในการเจริญทั้งในภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) ที่อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่พบแบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria มากในลำไส้ของพยาธิไส้เดือนเนื่องจากการปรับสภาพแวดล้อมให้อำนวยต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Obligate anaerobe) เมื่อพิจารณาผลของชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสังคมแบคทีเรียในระดับสกุลพบ *Prevotella* โดดเด่นใน

ลำไส้ผู้ป่วยโรคพยาธิไส้เดือน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาผลกระทบของสังคมแบคทีเรียต่อโรคจากกลุ่มพยาธิที่ติดต่อผ่านดินในหมู่บ้านไลบีเรียและประเทศอินโดนีเซีย (51) เป็นที่ทราบกันดีว่าแบคทีเรียสกุล *Prevotella* มีบทบาทสำคัญต่อการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ซึ่งการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อจากพยาธิใบไม้ในลำไส้ (*Schistosoma haematobium*) (52) ผลลัพธ์ทั้งหมดตามที่กล่าวไปข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยในปัจจุบันที่ศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อพยาธิต่อสังคมแบคทีเรียในลำไส้ในมนุษย์ (53-55) อย่างไรก็ตามผลความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ระหว่างส่วนต้นและส่วนปลายของพยาธิไส้เดือนกลับไม่พบความแตกต่าง ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงสภาพแวดล้อมของพยาธิไส้เดือนมีความคล้ายคลึงกันตลอดช่วงของลำไส้ และจากการศึกษาเชิงเปรียบเทียบของสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิไส้เดือนต่อสถานะการติดเชื้อ พบแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* โดดเด่นในลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อรุนแรงมาก ในขณะที่แบคทีเรียสกุล *Lactococcus* เจริญได้มากที่สถานะการติดเชื้อรุนแรงน้อย โดยแบคทีเรียทั้งสองเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักน้ำตาลให้เกิดกรดแลคติก และมีบทบาทสำคัญต่อการส่งเสริมภาวะสุขภาพดีในมนุษย์ (56) รวมไปถึงแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* สามารถลดภาวะอักเสบของเนื้อเยื่อในลำไส้มนุษย์อย่างมีนัยสำคัญ (57) ซึ่งอาจบ่งชี้ว่าสถานะการติดเชื้ออาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิไส้เดือน

การศึกษาชนิดและวิถีเมแทบอลิซึมของเมแทบอโลมในลำไส้พยาธิไส้เดือน

จากการวิเคราะห์เมแทบอโลมแบบไม่จำเพาะเพื่อทำความเข้าใจเชิงผลกระทบและหน้าที่ของแบคทีเรียต่อพยาธิไส้เดือนในลำไส้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ พบจำนวนคุณลักษณะมวลต่อประจุที่มีนัยสำคัญทางสถิติทั้งหมด 91 และ 121 ในลำไส้ที่มีสถานะการติดเชื้อรุนแรงมากและน้อยตามลำดับ เมื่อนำผลคุณลักษณะดังกล่าวไประบุชนิดของสารเมแทบอไลต์และวิถีเมแทบอลิซึมเพื่อเปิดเผยกลไกการทำงาน พบวิถี Aminoacyl-tRNA biosynthesis, Alpha-Linolenic acid metabolism, (Val, Leu and Ile) degradation, (Cys and Met) metabolism, Steroid biosynthesis และ Pentose phosphate pathway โดดเด่นในลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อหนัก โดย Aminoacyl-tRNA synthetases (ARSs) มีบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีนบนไรโบโซมด้วย tRNA ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต และพัฒนาการของเซลล์ภูมิคุ้มกัน (58, 59) ในขณะที่วิถี Pentose phosphate pathway สร้าง NADPH และน้ำตาลเพนโทสซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ (60) จึงอาจบงชี้ได้ว่าวิถีเมแทบอลิซึมดังกล่าวที่พบในลำไส้พยาธิไส้เดือนที่สถานะการติดเชื้อรุนแรงมากจะสนับสนุนกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน, สารตั้งต้นของนิวคลีโอไทด์, กรดไขมัน และสารชีวโมเลกุลที่จำเป็น ก่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไข่พยาธิที่เป็นสาเหตุของโรคพยาธิไส้เดือน อย่างไรก็ตามเมแทบอโลมของลำไส้พยาธิที่สถานะการติดเชื้อรุนแรงน้อยพบวิถีเมแทบอลิซึม

เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตอันประกอบด้วย Amino sugar and nucleotide sugar metabolism, Starch and sucrose metabolism, Galactose metabolism glycolysis or gluconeogenesis, Phosphatidylinositol signaling system, Inositol phosphate metabolism และ Fructose and mannose metabolism โดยวิถีเมแทบอลิซึมดังกล่าวอาจส่งผลต่อการสังเคราะห์พลังงานมากกว่าการผลิตไข่ของพยาธิไส้เดือน

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้ของพยาธิ

จากการวิเคราะห์เครือข่ายเชิงบูรณาในลำไส้ของพยาธิไส้เดือนเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย 10 ชนิดที่มีความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์สูงสุด และสารเมแทบอไลต์ 200 ชนิดแรกที่มีความสำคัญต่อการทดลองสูงสุด พบความสัมพันธ์ที่น่าสนใจในกลุ่มเครือข่ายที่ 3 โดยแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารเมแทบอไลต์ Trifluoroiodomethane, aripiprazole lauroxil, Plastoquinol-9 และ 13(Z)-Docosenoic acid โดยงานวิจัยในปัจจุบันยังขาดข้อมูลสนับสนุนเกี่ยวกับสารเมแทบอไลต์ในพยาธิไส้เดือน อย่างไรก็ตามเราอาจอนุมานหน้าที่ของสารดังกล่าวจากหน้าที่พื้นฐาน อาทิ Plastoquinone ที่ทำหน้าสำคัญในระบบขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (61) หรือสาร 13(Z)-Docosenoic acid ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันโอเลอิก (62) และสารสื่อประสาทที่อยู่ในรูปกรดไขมันโดโคซีโนอิก (63)

สำหรับแบคทีเรียสกุล *Lactococcus* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารเมแทบอไลต์ N-acetyl-D-galactosamine 6-phosphate, Jurubine, Phosphatidylcholine compound, Haploside a, Pristimerin, Ethanesulfonic acid compound, 8-methylthiooctyl glucosinolate และ Flutropium bromide ซึ่งกลุ่มสารเมแทบอไลต์ที่พบส่วนใหญ่ยังไม่พบรายงานในลำไส้ของพยาธิ อย่างไรก็ตามสารเมแทบอไลต์ Jurubine เป็นสารอัลคาลอยด์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (64) และสามารถพบได้ในไส้เดือนฝอยรากปม (Root-knot nematode) (65) นอกจากนี้ยังพบว่าสาร Pristimerin ที่มีบทบาทสำคัญในเชิงเภสัชวิทยาตั้งแต่การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระไปจนถึงยับยั้งการอักเสบ (66) ด้วยเหตุนี้เองสาร Jurubine และ Pristimerin อาจส่งผลต่อการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบในลำไส้ของพยาธิไส้เดือน

ข้อเสนอแนะ

ด้วยข้อจำกัดทางการแพทย์ที่จำเป็นต่อการศึกษาได้แก่ ประวัติการบริโภคอาหารและยาปฏิชีวนะ รวมไปถึงประวัติการติดเชื้อโรคชนิดต่าง ๆ อาจทำให้การวินิจฉัยผลการทดลองคลาดเคลื่อน อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้สร้างสมมติฐานใหม่ประกอบกับข้อมูลเชิงลึกเพื่อพัฒนาความเข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างสังคมแบคทีเรียและเมแทบอโลมในลำไส้มนุษย์และพยาธิไส้เดือน ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาใดที่แสดงผลกระทบของการติดเชื้อโรคพยาธิไส้เดือนต่อสังคมแบคทีเรียในลำไส้พยาธิ และแม้ว่าการศึกษานี้จะพบความสัมพันธ์ระหว่างสารเมแทบอไลต์กับชนิดของแบคทีเรียในลำไส้พยาธิไส้เดือน แต่ความสัมพันธ์ดังกล่าวไม่สามารถทำนายได้อย่างถูกต้องแม่นยำเนื่องจากข้อจำกัดของการศึกษาเมแทบอโลมแบบไม่จำเพาะ อย่างไรก็ตามการค้นพบเหล่านี้ได้ให้ข้อมูลและสมมติฐานที่เป็นประโยชน์ โดยตัวผู้วิจัยมีความคาดหวังให้มีการศึกษาเมแทบอโลมแบบจำเพาะร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ เพื่อพิสูจน์กลไกในเชิงลึกเพื่อนำมาประยุกต์ใช้รักษาโรคอันเกิดจากพยาธิในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

ตารางแสดงรายละเอียดของสารสารเมแทบอไลต์ที่ผ่านการระบุชนิดของประจุบวกและลบ 30 ตัวแรกที่มีคะแนนความสำคัญต่อตัวแปรในการทดลองสูงสุดด้วยฐานข้อมูล Metlin

ชื่อสารเมแทบอไลต์	ค่า VIP	ประจุ	เลขมวล/ประจุ
Triphenylstannyl 4-tert-butylbenzoate	4.577	[M+H]+	528.1111
1-phenylpyrazole;titanium(3+)	4.2326	[M+Cl]-	477.1307
HR1917	4.1329	[M-H]-	569.1345
Haploside A	4.0079	[M-H]-	536.1166
Hexyldioxodecyl methyl tyrosinate	3.9524	[M-H]-	447.2985
N-[3-(2-amino-4-chloro-6-phenylpyrimidin-5-yl)propyl]-4-methyl-N-phenylbenzenesulfonamide	3.9118	[M+Cl]-	492.1387
Avicularin	3.8803	[M+Cl]-	434.0849
8-Methylthiooctyl glucosinolate	3.856	[M+Cl]-	477.1161
Ethanesulfonic acid, 2-(cyclohexyl(1-oxohexadecyl)amino)-, sodium salt	3.8112	[M+H]+	439.2732
Malvidin 3-O-glucoside	3.6695	[M+Cl]-	492.1268
Methyloctadecylnitrosamine	3.5638	[M+H]+	312.3141
Hexadecylmethylglycerol	3.5425	[M+H]+	330.3134
N-(4-chlorophenyl)-2-[[5-[(2,6-dimethylphenoxy)methyl]-4-(4-methylphenyl)-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]acetamide	3.5213	[M+Cl]-	492.1387

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Flutropium bromide	3.5127	[M+Cl]-	477.1315
Trifluoroiodomethane	3.2763	[M-H]-	195.8997
Diazoacetic acid tetradecyl ester	3.2334	[M-H]-	282.2307
1,1,3,3-tetrapentylurea	3.1872	[M+H]+	340.3454
Arachidic acid(d3)	3.1332	[M+Na]+	315.3217
Apicidin	3.1094	[M+Cl]-	623.3683
Aripiprazole lauroxil	3.0796	[M-H]-	659.3257
Benzenesulfonate;tetrakis-decylazanium	3.0694	[M+Na]+	735.6563
N-Methyl-N-octadecyl-3-nitro-4-chlorobenzamide	3.0689	[M+H]+	467.3040459
2-chloroethynyl(triethyl)silane	3.0562	[M+H]+	174.0632
11-(Pentabromophenoxy)undecan-1-ol	2.9555	[M+Na]+	653.7615
Chenodeoxyglycocholate	2.9534	[M-H]-	449.3141
N-[2-(1H-Indol-1-yl)ethyl]docosanamide	2.9159	[M+H]+	482.4124
Plastoquinol-9	2.8322	[M+Na]+	750.6315
Trifluoromethanesulfonic acid 2,3-bis(octadecyloxy)propyl ester	2.8132	[M+H]+	728.56
Methyl oleoylethanolamide	2.8061	[M+H]+	339.3137
Phosphine oxide, trioctyl-, dihydrate	2.8055	[M+Na]+	422.3889

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางแสดงรายละเอียดวิถีเมแทบอลิซึมในลำไส้ของพยาธิไส้เดือนติดเชื้อหนักและเบาโดยเรียงความสำคัญจากจำนวนสารประกอบที่พบในวิถี

ชื่อวิถีเมแทบอลิซึม	จำนวนสารแทบอไลต์	ค่า *P*	ค่า Enrichment factor
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	20	0.006516	2.863688
Fructose and mannose metabolism	12	0.009559	3.409013
Polyketide sugar unit biosynthesis	2	0.014748	8.181967
Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis	12	0.047509	2.727211
Glycosaminoglycan degradation	25	0.07222	1.963608
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin	4	0.075003	4.0909
Lysine degradation	14	0.079413	2.337678
Pentose and glucuronate interconversions	10	0.11171	2.45459
Galactose metabolism	11	0.14052	2.231479
Steroid biosynthesis	26	0.20134	1.573416
Arachidonic acid metabolism	26	0.20134	1.573416
Starch and sucrose metabolism	7	0.2062	2.33765
Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate	7	0.2062	2.33765
Pentose phosphate pathway	27	0.22463	1.515152

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	2	0.22936	4.090983
Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series	2	0.22936	4.090983
Glycerolipid metabolism	8	0.25413	2.04545
Porphyrin and chlorophyll metabolism	23	0.30521	1.422931
Phosphatidylinositol signaling system	10	0.34995	1.636393
Purine metabolism	65	0.3959	1.132873
Phosphonate and phosphinate metabolism	4	0.40657	2.04545
Glycolysis or Gluconeogenesis	12	0.44149	1.363605
Inositol phosphate metabolism	12	0.44149	1.363605
alpha-Linolenic acid metabolism	5	0.4794	1.636367
Sulfur metabolism	5	0.4794	1.636367
Ascorbate and aldarate metabolism	6	0.54339	1.363643
Caffeine metabolism	6	0.54339	1.363643
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	6	0.54339	1.363643
Drug metabolism - cytochrome P450	16	0.60103	1.022704
Terpenoid backbone biosynthesis	18	0.66716	0.9090909
Arginine and proline metabolism	28	0.68646	0.8766291
Phenylalanine metabolism	9	0.69227	0.9090909

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Sphingolipid metabolism	29	0.71013	0.8464056
N-Glycan biosynthesis	21	0.74966	0.7792107
Glycerophospholipid metabolism	22	0.77302	0.7437986
Mannose type O-glycan biosynthesis	12	0.79297	0.6818027
Drug metabolism - other enzymes	23	0.79448	0.7114653
One carbon pool by folate	13	0.81867	0.6293662
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	35	0.82447	0.7012951
Folate biosynthesis	25	0.83216	0.6545359
Fatty acid degradation	14	0.84121	0.5844194
Nicotinate and nicotinamide metabolism	14	0.84121	0.5844194
Pyrimidine metabolism	47	0.85032	0.6963303
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	15	0.86097	0.5454645
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	17	0.89349	0.4812783
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	18	0.9068	0.4545455
Retinol metabolism	19	0.91847	0.4306261
Cysteine and methionine metabolism	33	0.92845	0.4958719
Tryptophan metabolism	20	0.92869	0.4090983
Pantothenate and CoA biosynthesis	22	0.94548	0.3718993
Glycine, serine and threonine metabolism	23	0.95235	0.3557326

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางแสดงรายละเอียดกลุ่มเครือข่ายระหว่างชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแบคทีเรียสูงสุด 10 ชนิดและสารเมแทบอไลต์ที่สำคัญต่อการหาปฏิสัมพันธ์ในลำไส้ของหนอนพยาธิ

ลำดับกลุ่มเครือข่าย	ชื่อแบคทีเรีย	รหัสแทนสารเมแทบอไลต์	ชื่อเมแทบอไลต์
1	*Prevotella* *Faecalibacterium* *Succinivibrio* Ruminococcaceae Lachnospiraceae	Y125	2-Octylundecane-1,11-diol
		Y149	Jubanine A
		Y156	Diethyl (2R,3R)-2-bromo-3-fluorobutanedioate
		Y162	Acetylintermedine
		Y168	Jesaconitine
		Y170	(4R)-4-Benzyl-3-{(2R,3S,4R,5S,6S)-3-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-2,4,6-trimethyl-5-[(triethylsilyl)oxy]deca-7,9-dienoyl}-1,3-oxazolidin-2-one
		Y21	Cassaidine
		Y59	Pro Glu Arg Val Lys
		Y60	Sulfuric acid, monooctadecyl ester, compd. with 2-(diethylamino)ethanol (1:1)
		Y77	5-{[3-(Octadecyloxy)propyl]carbamoyl}benzene-1,2,3-triyl triacetate
2	Enterobacteriaceae	Y131	2-hexyldodecanoic acid
		Y136	Molybdenum, compd. with nickel (1:8)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

		Y165	Glutathionylspermine
		Y28	Butylphosphonic acid diphenyl ester
		Y38	(+/-)N-(1-methyl-2-hydroxy-2-phenyl-ethyl) arachidonyl amine
		Y4	Hexadecylmethylglycerol
		Y67	3,6-Di(ethanesulfonyl)pyridazine
		Y75	N-Methyl-N,N-dioctyloctan-1-aminium trifluoroacetate
		Y95	avicularin
3	*Streptococcus Lactococcus*	Y133	Ethyl 7-(2,4,5-trichlorophenoxy) heptanoate
		Y147	Thiobenzoic acid S-hexyl ester
		Y148	Leu Leu Val Val Tyr
		Y172	Dioctadecyl thiourea
		Y178	16:2-Glc-Campesterol
		Y182	LPA(0:0/16:0)
		Y36	L-Phenylalanylglycyl-L-leucyl-L-alanyl-L-lysyl-L-leucine
		Y62	Gln Ile Gln Val
		Y124	Arg Val Ile Trp Gly
		Y127	PE(16:0/24:0)
		Y150	6,7-Dihydro-8-phenyl-9-(4-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-5-H-benzocycloheptene
		Y159	N-linolenoyl-glutamine

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

		Y174	Selenophene-2-carbonyl azide
		Y177	Reticulataxanthinz
		Y112	N-Acetyl-D-galactosamine 6-phosphate
		Y142	Jurubine
		Y153	Urea, N-(2,6-bis(1-methylethyl) phenyl)-N'-((1-(1,3-dimethyl-1H-indol-2-yl)cyclopentyl)methyl)-
		Y17	PC(20:3(8Z,11Z,14Z)/16:1(9Z))
		Y18	Propanoic acid, 3-mercapto-, octadecyl ester
		Y181	2,3,4,5-Tetraiodo-6-[(naphthalen-1-yl)carbamoyl]benzoic acid
		Y100	Trifluoroiodomethane
		Y103	Aripiprazole lauroxil
		Y114	Arg Arg Arg His
		Y12	Plastoquinol-9
		Y16	2-Phenyl-4-tetradecyl-1,3,2-dioxaborolane
		Y33	13(Z)-Docosenoic Acid
		Y8	N-Methyl-N-octadecyl-3-nitro-4-chlorobenzamide
		Y93	Hexyldioxodecyl methyl tyrosinate
		Y90	1-phenylpyrazole;titanium(3+)
		Y91	4',4''-Di-2-imidazolin-2-yl-2-nitroterephthalanilide dihydrochloride

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

		Y92	Haploside A
		Y7	Benzenesulfonate; tetrakis-decylazanium
		Y69	3-[3,4-Bis(decyloxy)phenyl]-2-(ethoxymethyl)prop-2-enenitrile
		Y61	Pristimerin
		Y39	Azelaic acid, potassium salt
		Y27	(3beta)-3-{[(2Z)-3-(4-Hydroxy phenyl)prop-2-enoyl]oxy}urs-12-en-28-oic acid
		Y2	Ethanesulfonic acid, 2-(cyclohexyl(1-oxohexadecyl)amino)-, sodium salt
		Y19	Lupeol acetate
		Y140	2,4-Bis(4-methylpiperazin-1-yl)-3H-1,5-benzodiazepine
		Y130	3-(4-Methylpyridin-1-ium-1-yl) cholest-5-ene 4-methyl benzene-1-sulfonate
		Y11	N-[2-(1H-Indol-1-yl)ethyl] docosanamide
		Y107	Idarubicin hydrochloride
		Y106	Malvidin 3-O-glucoside
		Y1	Triphenylstannyl 4-tert-butylbenzoate
		Y96	8-Methylthiooctyl glucosinolate
		Y98	N-(4-chlorophenyl)-2-[[5-[(2,6-dimethylphenoxy)methyl]-4-(4-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

			methylphenyl)-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]acetamide
		Y99	Flutropium bromide
4	*Dialister*	Y155	Glyodin
		Y37	Dexamethasone palmitate
		Y88	Penmacric acid
5	*Lactobacillus*	Y14	(4e)-4-(hexadecylimino) pentanoic acid
		Y42	Trp Leu Arg Arg
		Y49	3-Oxooctadec-4-enoic acid
		Y76	Suloctidil
		Y79	Asp Arg Arg Arg
		Y83	Lysophosphatidylcholine (22:2)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Organization WH. Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites: World Health Organization; 2019.
2. Bharti B, Bharti S, Khurana S. Worm infestation: Diagnosis, treatment and prevention. The Indian Journal of Pediatrics. 2018;85:1017-24.
3. Krücken J, Fraundorfer K, Mugisha JC, Ramünke S, Sifft KC, Geus D, et al. Reduced efficacy of albendazole against Ascaris lumbricoides in Rwandan schoolchildren. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2017;7:262-71.
4. Levecke B, Easton AV, Cools P, Albonico M, Ame S, Gilleard JS, et al. The optimal timing of post-treatment sampling for the assessment of anthelminthic drug efficacy against Ascaris infections in humans. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2018;8:67-9.
5. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. Current opinion in gastroenterology. 2015;31:69.
6. Choi BS-Y, Daoust L, Pilon G, Marette A, Tremblay A. Potential therapeutic applications of the gut microbiome in obesity: from brain function to body detoxification. International Journal of Obesity. 2020;44:1818-31.
7. Chen MX, Wang S-Y, Kuo C-H, Tsai I-L. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. Journal of the Formosan Medical Association. 2019;118:S10-S22.
8. Tang Z-Z, Chen G, Hong Q, Huang S, Smith HM, Shah RD, et al. Multi-omic analysis of the microbiome and metabolome in healthy subjects reveals microbiome-dependent relationships between diet and metabolites. Frontiers in Genetics. 2019;10:454.
9. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. Microbial ecology in health and disease. 2015;26:26191.
10. Koh JH, Kim W-U. Dysregulation of gut microbiota and chronic inflammatory disease: from epithelial defense to host immunity. Experimental & Molecular Medicine. 2017;49:e337-e.
11. Roberts LS, Janovy Jr J. Gerald D. Schmidt e Larry S. Roberts' foundations of

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

parasitology. Gerald D Schmidt e Larry S Roberts' foundations of parasitology. 2000;18:670-xviii.

12. Jiraamonninit C, Wongkamchai S, Santabutr W, Loymek S, Monkong N, Nochot H, et al. The prevalence of intestinal parasitic infections among schoolchildren with annual anthelminthic treatment in Narathiwat province, Thailand. Age. 2006;11:12.
13. Waikagul J, Krudsood S, Radomyos P, Radomyos B, Chalemrut K, Jonsuksuntigul P, et al. A cross-sectional study of intestinal parasitic infections among schoolchildren in Nan Province, Northern Thailand. Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 2002;33:218-23.
14. Lőw P, Molnár K, Kriska G. Atlas of animal anatomy and histology: Springer; 2016.
15. Zeibig E. Clinical parasitology: A practical approach: Elsevier Health Sciences; 2014.
16. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology E-book: Elsevier Health Sciences; 2020.
17. Martel AJ. Tropical and geographical medicine. JAMA. 1991;266:1704-5.
18. Read A, Sharping A. The evolution of tissue migration by parasitic nematode larvae. Parasitology. 1995;111:359-71.
19. Price J, Leung J. Ultrasound diagnosis of Ascaris lumbricoides in the pancreatic duct: the “four-lines” sign. The British Journal of Radiology. 1988;61:411-3.
20. Hesse AA, Nouri A, Hassan HS, Hashish AA, editors. Parasitic infestations requiring surgical interventions. Seminars in pediatric surgery; 2012: Elsevier.
21. Katzung BG, Trevor AJ. Basic & clinical pharmacology. 2012.
22. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. Physiological reviews. 2010.
23. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. Cell research. 2020;30:492-506.
24. Rubel MA, Abbas A, Taylor LJ, Connell A, Tanes C, Bittinger K, et al. Lifestyle and the presence of helminths is associated with gut microbiome composition in Cameroonians. Genome biology. 2020;21:1-32.
25. Slatko BE, Taylor MJ, Foster JM. The Wolbachia endosymbiont as an anti-filarial nematode target. Symbiosis. 2010;51:55-65.
26. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the

Chulalongkorn University

diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. Journal of clinical microbiology. 2007;45:2761-4.

27. Mestan KK, Ilkhanoff L, Mouli S, Lin S. Genomic sequencing in clinical trials. Journal of Translational Medicine. 2011;9:1-10.
28. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2008;9:387-402.
29. Son MS, Taylor RK. Preparing DNA Libraries for Multiplexed Paired‐End Deep Sequencing for Illumina GA Sequencers: Emerging Technologies. Current protocols in microbiology. 2011;20:1E. 4.1-E. 4.13.
30. Nicholson JK, Lindon JC. Metabonomics. Nature. 2008;455:1054-6.
31. Castro-Puyana M, Herrero M. Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2013;52:74-87.
32. Ren S, Hinzman AA, Kang EL, Szczesniak RD, Lu LJ. Computational and statistical analysis of metabolomics data. Metabolomics. 2015;11:1492-513.
33. Horváth C. High-performance liquid chromatography: advances and perspectives. 2013.
34. Dass C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry: John Wiley & Sons; 2007.
35. Allen DR, McWhinney BC. Quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a paradigm shift in toxicology screening applications. The Clinical Biochemist Reviews. 2019;40:135.
36. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature biotechnology. 2019;37:852-7.
37. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ. 2016;4:e2584.
38. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics. 2011;27:2194-200.
39. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome biology. 2011;121-18.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

40. Swift ML. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing. Journal of chemical information and computer sciences. 1997;37:411-2.
41. Adusumilli R, Mallick P. Data conversion with ProteoWizard msConvert. Proteomics: Springer; 2017:339-68.
42. Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G. XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. Analytical chemistry. 2012;84:5035-9.
43. Tautenhahn R, Böttcher C, Neumann S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. BMC bioinformatics. 2008;9:1-16.
44. Pang Z, Chong J, Zhou G, de Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. Nucleic acids research. 2021;49:W388-W96.
45. Li S, Park Y, Duraisingham S, Strobel FH, Khan N, Soltow QA, et al. Predicting network activity from high throughput metabolomics. PLoS computational biology. 2013;9:e1003123.
46. McSorley HJ, Maizels RM. Helminth infections and host immune regulation. Clinical microbiology reviews. 2012;25:585-608.
47. Wang Y, Liu F, Urban Jr JF, Paerewijck O, Geldhof P, Li RW. Ascaris suum infection was associated with a worm-independent reduction in microbial diversity and altered metabolic potential in the porcine gut microbiome. International journal for parasitology. 2019;49:247-56.
48. Vaiserman A, Romanenko M, Piven L, Moseiko V, Lushchak O, Kryzhanovska N, et al. Differences in the gut Firmicutes to Bacteroidetes ratio across age groups in healthy Ukrainian population. BMC microbiology. 2020;20:1-8.
49. Shin N-R, Whon TW, Bae J-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends in biotechnology. 2015;33:496-503.
50. White EC, Houlden A, Bancroft AJ, Hayes KS, Goldrick M, Grencis RK, et al. Manipulation of host and parasite microbiotas: Survival strategies during chronic nematode infection. Science advances. 2018;4:eaap7399.
51. Rosa BA, Supali T, Gankpala L, Djuardi Y, Sartono E, Zhou Y, et al. Differential human gut microbiome assemblages during soil-transmitted helminth infections in Indonesia and Liberia. Microbiome. 2018;6:1-19.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

52. Kay GL, Millard A, Sergeant MJ, Midzi N, Gwisai R, Mduluza T, et al. Differences in the faecal microbiome in Schistosoma haematobium infected children vs. uninfected children. PLoS neglected tropical diseases. 2015;9:e0003861.
53. Jenkins TP, Rathnayaka Y, Perera PK, Peachey LE, Nolan MJ, Krause L, et al. Infections by human gastrointestinal helminths are associated with changes in faecal microbiota diversity and composition. PLoS One. 2017;12:e0184719.
54. Giacomin P, Zakrzewski M, Jenkins TP, Su X, Al-Hallaf R, Croese J, et al. Changes in duodenal tissue-associated microbiota following hookworm infection and consecutive gluten challenges in humans with coeliac disease. Scientific reports. 2016;6:1-10.
55. Cooper P, Walker AW, Reyes J, Chico M, Salter SJ, Vaca M, et al. Patent human infections with the whipworm, Trichuris trichiura, are not associated with alterations in the faecal microbiota. PloS one. 2013;8:e76573.
56. Perdigon G, Maldonado Galdeano C, Valdez J, Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. European journal of clinical nutrition. 2002;56:S21-S6.
57. Vitetta L, Llewellyn H, Oldfield D. Gut dysbiosis and the intestinal microbiome: Streptococcus thermophilus a key probiotic for reducing uremia. Microorganisms. 2019;7:228.
58. Kim S, You S, Hwang D. Aminoacyl-tRNA synthetases and tumorigenesis: more than housekeeping. Nature Reviews Cancer. 2011;11:708-18.
59. Park SG, Schimmel P, Kim S. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105:11043-9.
60. Alfarouk KO, Ahmed S, Elliott RL, Benoit A, Alqahtani SS, Ibrahim ME, et al. The pentose phosphate pathway dynamics in cancer and its dependency on intracellular pH. Metabolites. 2020;10:285.
61. Van Eerden FJ, Melo MN, Frederix PW, Periole X, Marrink SJ. Exchange pathways of plastoquinone and plastoquinol in the photosystem II complex. Nature communications. 2017;8:1-8.
62. Hulan H, Kramer J, Mahadevan S, Sauer F, Corner A. Relationship between erucic acid and myocardial changes in male rats. Lipids. 1976;11:9-15.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

63. Cravatt BF, Prospero-Garcia O, Siuzdak G, Gilula NB, Henriksen SJ, Boger DL, et al. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. Science. 1995;268:1506-9.
64. Innih SO, Agu KC, Eze GI. Immunomodulatory and hepatoprotective properties of Solanum torvum (Turkey berry). Sahel Medical Journal. 2018;21:13.
65. García-Gaytán V, Sánchez-Rodríguez E, Ordaz-Ortiz JJ, Montero-Vargas JM, Alonso-Pérez O, Rojas-Abarca L, et al. Novel determination on root-knot nematodes; microspace, mineral profile and transduction of metabolic signals in tomato. bioRxiv. 2019:851832.
66. Jeller AH, Silva DHS, Lião LM, da Silva Bolzani V, Furlan M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from Cheiloclinium cognatum. Phytochemistry. 2004;65:1977-82.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ปวิช กลมเกลียว
วัน เดือน ปี เกิด	23 มกราคม 2539
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)
ที่อยู่ปัจจุบัน	เลขที่ 197 ซอยนราธิวาสราชนครินทร์ 6 แขวงยานนาวา เขตสาทร กรุงเทพมหานคร 10120
ผลงานตีพิมพ์	นำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบตีพิมพ์ในวารสารทางการแพทย์ PLOS Neglected Tropical Diseases เรื่อง "Gut Bacteriome and metabolome of Ascaris lumbricoides in patients"

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY