บทที่ 2 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Giardia intestinalis เป็นโปรโตซัวก่อโรคที่พบบ่อยที่สุด อาศัยอยู่ในลำไส้เล็ก พบในเด็กมากกว่าในผู้ใหญ่ แม้ว่าเชื้อจะไม่ไชเข้าผนังลำไส้แต่อาจจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพในลำไส้เล็ก ส่งผลให้เกิดภาวะทุพโภชนาการ ในระยะยาวยังมีผลสืบเนื่องต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเด็กทั้งทางร่างกายและสติปัญญา นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการเกิดอุจจาระร่วงในกลุ่มนักท่องเที่ยว สถิติจากองค์การอนามัยโลกพบว่ามีผู้ติดเชื้อ *G. intestinalis* ประมาณ 1,000 ล้านคน ในแต่ละปีมีการติดเชื้อที่เกิดอาการทางคลินิกถึง 280 ล้านคน และผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงถึงเสียชีวิตปีละ 2.5 ล้านคน[1-2] ในประเทศไทยพบความชุกของการติดเชื้อในแต่ละท้องที่แตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 5-20 สำหรับความชุกในเด็กประมาณร้อยละ 10-20[10-13]

โปรโตซัวใน genus *Giardia* มี 6 ชนิด (species) ได้แก่ *G. intestinalis* (syn. *G. duodenalis, G.lamblia), G. muris, G. microti, G. psicatti, G. ardeae* และ *G. agilis* เนื่องจากลักษณะโครงสร้าง (taxonomy) ของ *Giardia* ชนิดต่างๆทั้งระยะ trophozoite และระยะซีสต์แยกจากกันได้ยาก แม้จะศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน เดิมจึงใช้ชนิดของโฮสต์ในการวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อ[16-17] ต่อมาพบว่า *Giardia* บางชนิดพบได้ในโฮสต์หลายชนิด โดยเฉพาะ *G. intestinalis* เป็นชนิดที่พบได้ในคน ยังตรวจพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด จากลักษณะที่คล้ายคลึงกันนี้จึงทำให้เกิดการตั้งข้อสันนิษฐานว่าการติดเชื้อ *Giardia* ในคนอาจเป็นชนิดเดียวกับที่พบในสัตว์ หรือมีการติดต่อมาจากสัตว์ (zoonosis transmission)

การศึกษาด้วยวิธีทางวิทยาการระดับโมเลกุลพบว่าใน genus *Giardia* นี้ประกอบไปด้วย 8 assemblage genotypes ความแตกต่างในแต่ละ assemblages นี้มีสัมพันธ์กับความจำเพาะต่อชนิดของโฮสต์ การก่อโรคและอาการทางคลินิกด้วย assemblages A และ B genotype เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากคน assemblages C จะพบในสุนัข และ assemblages C-G genotype พบแต่ในสัตว์ เช่น สุนัข แมว และม้า เป็นต้น การศึกษาโดยโดยใช้ cyst จากคนและสุนัขในชุมชนเดียวกันพบว่า สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนคือ assemblage A หรือ B เท่านั้น ในสุนัขก็พบเฉพาะ assemblage C หรือ D ซึ่งเป็น dog-specific assemblage แต่มีเพียงสุนัขตัวเดียวที่พบ assemblage B และ C ซึ่งน่าจะเป็นการที่สุนัขได้รับการติดเชื้อจากคนไป การศึกษาในลิงกอริลาในอุกันดาพบว่าเชื้อ *Giardia* เป็นชนิด assemblage A ซึ่งอาจเป็นการติดเชื้อจากคนก็ได้ ในอินเดียพบว่าการติดต่อผ่านจากสัตว์สู่คนเพราะพบ *G. intestinalis* genotype เดียวกันทั้งในคนและสุนัขที่อยู่ในบ้านเดียวกัน[19]

การแยก major assemblage ใช้ single-stranded ribosomal RNA gene, elongation factor 1α-gene markers ส่วน triose phosphate isomerase gene, β-giardin gene และ glutamate dehydrogenase gene ใช้ในการแยกกลุ่มย่อย (sub-genotype) ของแต่ละ assemblage การศึกษาด้วย restriction fragement length polymorphism assay (RFLP) สำหรับ β-giardin gene สามารถแยก 3 sub-genotype ใน assemblage A และ 4 sub-genotype ใน assemblage B พบว่า *Giardia* ที่ก่อโรคในคนมักอยู่ในกลุ่ม assemblage A genotype A II ซึ่งพบการติดเชื้อในคนเท่านั้นทำให้ทราบถึงต้นกำเนิดของการติดเชื้อ[20-21] จากการศึกษายังพบว่าลักษณะของ phenotype นี้ยังสัมพันธ์โดยตรงกับอาการแสดง โดยพบว่า assemblage A จะทำให้เกิด intermittent diarrhea ขณะที่ assemblage B จะทำให้เกิด persistent diarrhea การศึกษาในเด็กชาวออสเตรเลียที่มีอายุน้อยกว่า 5 ขวบ จำนวน 353 ราย พบว่าเด็กที่ติดเชื้อสายพันธุ์ที่เป็น assemblage A genotype จะเกิดอาการท้องเสียได้มากกว่าเด็กที่ติดเชื้อ assemblage B ถึง 26 เท่า ($p < 0.0005$) การศึกษาในประเทศอังกฤษ โดยใช้ specimen จากผู้ป่วยพบว่าเป็น *Giardia* assem-blage B ถึงร้อยละ 64 และ assemblage A genetic group II ร้อยละ 27 ส่วนที่เหลือเป็นชนิดที่เป็น mixture ของ assemblage B และ assemblage A genetic group II[22] การติดเชื้อ *Giardia* พบอัตราทุกสูงสุดในช่วงเด็กเล็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ขวบ เช่น เดียวกับในสัตว์จะพบในช่วงอายุน้อยกว่า 1 เดือนมากที่สุด[23] ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างของ genotype ในแต่ละช่วงอายุของโฮสต์

การศึกษาหาอัตราชุกที่รายงานจากทั่วโลกจะเป็นการตรวจหาระยะ cyst หรือ ระยะ trophozoite ในอุจจาระว่ามีหรือไม่มีการติดเชื้อ ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้แต่สรุปว่าน่าจะเป็น *G. intestinalis* ซึ่งเป็นชนิดที่พบในคน โดยไม่สามารถบอกถึง assemblage ได้[7,19] ในปัจจุบันการศึกษาอัตราชุกโดยใช้ลักษณะโครงสร้างทางยีนน้อยยังมีรายงานจากทั่วโลกน้อยกว่าการศึกษานี้ในเชื้อ *Cryptosporidium* เช่นเดียวกันที่การศึกษา วิจัยเกี่ยวกับเชื้อ *G. intestinalis* ในประเทศไทยที่ผ่านมามักจะมุ่งเน้นในแง่อัตราความชุกของการติดเชื้อ การรักษา ประสิทธิภาพของยาชนิดต่างๆ ยังไม่มีการศึกษาทางด้าน phylogeny และ genotyping ของ *Giardia* ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่จะต้องศึกษาถึงลักษณะ assemblage genotype ของ *Giardia* ที่พบในบ้านเรา ซึ่งสามารถทำให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติม ที่จะสัมพันธ์กับกลไกการก่อโรค ลักษณะทางคลินิก การติดต่อจากสัตว์สู่คน และความเข้าใจทางด้านระบาดวิทยาที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมป้องกันและการรักษาโรคได้ด้วย

การศึกษายีน (genetic study) นำไปสู่การศึกษาการแสดงออกและหน้าที่ของโปรตีน ในต่างประเทศมีการศึกษา variable surface protein ของเชื้อ *G. intestinalis* พบว่า 57 kDa antigen [24], tubulin (55 kDa) [25], 49 kDa glycosylphosphatidylinositol-anchoredpropein[26] และโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30-34 kDa[27-30] และ 8 kDa fatty acid binding protein[31] เป็น common immunodominant protein ที่น่าจะสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยได้ แต่โปรตีนเหล่านี้ก็ยังต้องการการศึกษาคุณสมบัติเพิ่มเติมก่อนนำมาใช้ประโยชน์ ในปี ค.ศ. 2003 Palm และคณะได้

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจากเชื้อ *G.intestinalis* โดยทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วย acute giardiasis และใช้เทคนิค 2-Dimensional Western blots พบว่ามี 16 protein spots หลังจากนั้นทำการศึกษาต่อโดยใช้เทคนิค mass spectrometry พบว่าเป็นกลุ่มโปรตีนดังนี้คือ Variable surface proteins, β-giardins, arginine deiminase, ornithine carbamoyl transferase และ fructose-1,6-biphosphate aldolase[32]

ดังนั้นการศึกษาจนทราบถึงโปรตีนที่มีความสัมพันธ์ในการก่อโรคจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพราะการทราบถึงโปรตีนที่สำคัญนี้จะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย การรักษา และการออกแบบวิธีป้องกันต่อไป ขณะนี้มีการศึกษาทางด้าน phylogeny ของเชื้อ *G. intestinalis* จากผู้ป่วยคนไทย (local wild type strain) น้อยมาก จึงมีความสำคัญที่ควรศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของเชื้อ *G. intestinalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเพื่อหา assemblage genotypes ของสายพันธุ์ที่พบในคนไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่พบทั่วโลก ทั้งจากคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ผลการศึกษานี้ยังเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นข้อมูลเชิงระบาดวิทยา ที่จะเป็นแนวทางในการอธิบายกลไกการก่อโรค ลักษณะทางคลินิก การติดต่อจากสัตว์สู่คน ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมป้องกันโรค การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย การรักษาและการออกแบบวัคซีน (vaccine design) ในลำดับต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของเชื้อ *Giardia intestinalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเพื่อเป็นข้อมูลเชิงระบาดวิทยา และข้อมูลในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย และการรักษา

วัตถุประสงค์รอง

1. เพื่อศึกษาความแตกต่างทางโครงสร้างยีนของเชื้อ *G. intestinalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยคนไทยแต่ละคน
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางคลินิก *G. intestinalis* ที่มีโครงสร้างยีนต่างกัน
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นแอนติเจนจำเพาะของเชื้อ *G. intestinalis* สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไทย

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นเพื่อศึกษาลักษณะทางโครงสร้างยีนของเชื้อ *G. intestinalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทางโครงสร้างของยีนที่แยกได้จากผู้ป่วยแต่ละคน แล้วจึงดำเนินการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของโครงสร้างยีนของ *G. intestinalis* กับการก่อโรคและลักษณะอาการทางคลินิก โดยจะทำการศึกษาเฉพาะสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในคนไทย และศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันในเชื้อ *G. intestinalis* สายพันธุ์ที่มีก่อโรคในคนไทย เพื่อใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยและการรักษาต่อไป