

## บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย

### กิจกรรมที่ 1 การวางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้น

จัดหาและจัดเตรียมอุปกรณ์เครื่องแก้วและพลาสติก น้ำยา สารเคมี และวัสดุสิ้นเปลืองสำหรับห้องปฏิบัติการ รวมทั้งชุดอุปกรณ์ในการเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อใช้ในการสำรวจกลุ่มประชากร เป้า-หมาย และดำเนินการวิจัยในห้องปฏิบัติการตามแผนการดำเนินงานที่วางไว้

ผลการดำเนินการ : ได้แผนปฏิบัติการวิจัย และความพร้อมของห้องปฏิบัติการในการศึกษาวิจัยได้ผลการศึกษาและ samples ที่ จะใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป

### กิจกรรมที่ 2 การขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

จัดทำแบบเสนอโครงการวิจัยเพื่อขอรับการพิจารณาการรับรอง จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ก่อนที่จะดำเนินการวิจัย พร้อมทั้งจัดเตรียมเอกสารต่าง ๆ ดังนี้

- หนังสือประชาสัมพันธ์โครงการวิจัย ที่ระบุรายละเอียดเกี่ยวกับวัตถุประสงค์ การศึกษาวิจัย ขั้นตอนการดำเนินงานที่เกี่ยวข้องกับอาสาสมัคร และวิธีการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ รวมทั้งประโยชน์ที่อาสาสมัครจะได้ทราบถึงภาวะการติดเชื้อปรสิต เพื่อขอความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัยจากอาสาสมัคร หรือผู้ปกครองของอาสาสมัครให้ได้รับทราบก่อนการตัดสินใจสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย
- แบบสอบถามข้อมูลของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยเกี่ยวกับข้อมูลส่วนตัวและข้อมูลเกี่ยวกับอาการระบบทางเดินอาหาร
- เอกสารยินยอมเพื่อเข้าร่วมโครงการ (informed consent)
- แบบฟอร์มการส่งตรวจอุจจาระ
- คำแนะนำในการเก็บอุจจาระ
- แบบฟอร์มการรายงานผล

ผลการพิจารณา : ได้รับการอนุมัติรับรอง ซึ่งให้ทำการวิจัยในคนได้

### กิจกรรมที่ 3 การสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *Giardia intestinalis*

ในเบื้องต้นได้วางแผนการสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในประชากรไทย ด้วยการตรวจคัดกรองประชากรในกลุ่มต่างๆ เพื่อหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* จากนั้นดำเนินการคัดแยกตัวอย่างอุจจาระของอาสาสมัครและเก็บตัวอย่างเชื้อ *G. intestinalis* ระยะเวลา cyst ที่แยกได้จากแต่ละคน นำไปสกัดแยก DNA ของสายพันธุ์ต่างๆ ใช้ในการศึกษาลักษณะทางโครงสร้างยีนของเชื้อ *G. intestinalis* ต่อไป

*Giardia intestinalis* (Syn. *Giardia lamblia*) เป็นพยาธิโปรโตซัวในลำไส้ มีอัตราการติดเชื้อในเด็กสูงกว่าในผู้ใหญ่ และในแหล่งที่มีประชากรอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เช่น สถานรับเลี้ยงเด็ก สถานพักฟื้นผู้สูงอายุ เป็นต้น ก็เป็นกลุ่มที่มีโอกาสในการติดเชื้อสูงด้วยเช่นกัน *G. intestinalis* ติดต่อเข้าสู่คนโดยการกินชีสที่ปนออกมากับอุจจาระและเจริญเป็นระยะติดต่อกัน จึงจัดเป็นปรสิตในกลุ่ม fecal oral route transmission นอกจากนี้ยังสามารถแพร่กระจายปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่มจึงจัดเป็นทั้ง food borne protozoa และ water borne protozoa ด้วยลักษณะการติดต่อดังกล่าวมาแล้ว จึงพบว่ามีอัตราการติดเชื้อ *G. intestinalis* สูงในแหล่งที่มีระบบการสุขาภิบาลไม่ดี ดังนั้น การวางแผนสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* จึงกำหนดเกี่ยวกับ

- การคัดเลือกกลุ่มประชากรเป้าหมาย
- ท้องที่ที่ทำการสำรวจ /แหล่งที่เก็บ clinical sample เนื่องจากในแต่ละท้องที่อาจมีความแตกต่างกันในด้านระบบสุขาภิบาล และอนามัยส่วนบุคคล ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับอัตราการติดเชื้อพยาธิโปรโตซัวนี้ได้ จึงกำหนดการสำรวจกลุ่มประชากรเป้าหมายที่มีภูมิลำเนาทั้งในเขตกรุงเทพมหานคร และชุมชนในเขตชนบท

จากข้อกำหนดดังกล่าว ได้วางแผนที่จะเก็บตัวอย่างเชื้อ *G. intestinalis* จากการสำรวจกลุ่มประชากรเป้าหมายในแหล่งต่างๆ ดังนี้

#### ในเขตกรุงเทพมหานคร

- เด็กนักเรียนโรงเรียนในเขตกรุงเทพมหานครที่สนใจจะเข้าร่วมโครงการ รับอาสาสมัคร ทั้งชายและหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 3 ปี ขึ้นไปเพื่อคัดเลือกอาสาสมัครที่ประสงค์โครงการ โดยติดต่อประสานงานกับผู้อำนวยการ
- โรงเรียนราชานุกูล ดินแดง
- สถานรับเลี้ยงเด็ก ผู้อำนวยการมูลนิธิเด็ก
- โรงพยาบาลศิริราช (sporadic cases)
- ค่ายทหาร

## ในเขตต่างจังหวัด/ชนบท

- หมู่บ้านในเขตจังหวัดราชบุรี
- โรงเรียนประถมในเขตจังหวัดอุบลราชธานี

โดยมีวิธีการที่จะเข้าถึงประชากรที่จะเชิญชวนให้เข้าการวิจัย (recruitment process) ตามขั้นตอนดังนี้

- 1) ติดต่อโดยตรงกับผู้อำนวยการโรงเรียน / ผู้อำนวยการสถานรับเลี้ยงเด็ก / ผู้ดูแลชุมชน/ หมู่บ้าน ที่สนใจโครงการ เพื่อชี้แจงรายละเอียดของโครงการและขอความอนุญาติในการเข้าไปทำการศึกษาวิจัยในสถานที่นั้นๆ
- 2) เมื่อได้รับอนุญาตให้ดำเนินการได้ จึงส่งหนังสือประชาสัมพันธ์โครงการวิจัยเพื่อชี้แจงรายละเอียดวัตถุประสงค์การศึกษาวิจัย ขั้นตอนการดำเนินงานที่เกี่ยวข้องกับอาสาสมัครและวิธีการเก็บตัวอย่างอุจจาระ รวมทั้งประโยชน์ที่อาสาสมัครจะได้รับรวมถึงภาวะการติดเชื้อปรสิตเพื่อขอความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัยจากอาสาสมัครหรือผู้ปกครองของอาสาสมัคร (ในกรณีที่เป็นเด็ก หรือยังไม่บรรลุนิติภาวะ) ให้ได้รับทราบก่อนการตัดสินใจสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย
- 3) เมื่ออาสาสมัคร หรือผู้ปกครองของอาสาสมัคร ยินยอมเข้าร่วมโครงการ หรือยินยอม ให้อาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ โดยได้ตกลงยินยอมพร้อมลงลายมือชื่อในเอกสารยินยอมเพื่อเข้าร่วมโครงการ ผู้วิจัยจึงจะแจกซองพลาสติกสีน้ำตาลภายในมี แบบสอบถาม ภาชนะเก็บตัวอย่างอุจจาระพลาสติกใส หนึ่งยาง คำแนะนำการเก็บอุจจาระ และหนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยให้แก่อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการ
- 4) ผู้ที่ประสงค์จะสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัยเก็บตัวอย่างอุจจาระนำส่งในวันรุ่งขึ้น หรือวันถัดไป พร้อมส่งแบบสอบถามที่กรอกโดยผู้ปกครอง คณะผู้วิจัยจะเข้าไปรับนำกลับมายังห้องปฏิบัติการภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เพื่อดำเนินการตรวจวิเคราะห์หากการติดเชื้อทางปรสิตในอุจจาระของอาสาสมัคร คณะผู้วิจัยจะแจ้งผลการตรวจอุจจาระไปยังอาสาสมัคร หรือผู้ปกครองของอาสาสมัครให้ทราบในภายหลัง
- 5) จัดทีมในการออกสำรวจและเก็บตัวอย่างอุจจาระ เพื่อตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* จากประชากรในกลุ่มต่างๆ และเก็บตัวอย่างอุจจาระ เก็บตัวอย่างอุจจาระจากอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการจากแหล่งต่างๆ เพื่อนำไปตรวจหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* โดยการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Simple saline smear และ Formalin ethyl acetate technique คัดแยกอุจจาระที่ตรวจพบเชื้อ *G. intestinalis* เพื่อทำการคัดแยกระยะ cyst ของ *G.intestinalis* ต่อไป ผลการสำรวจสรุปได้ดังที่แสดงในตารางที่ 2

ผลการดำเนินการ : การสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *Giardia intestinalis* ในประชากรแหล่งต่างๆ ทำให้ทราบถึงสถานะการณ์ความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในปัจจุบัน ได้ผลการสำรวจสรุปดังที่แสดงในตารางที่ 2 จากผลการศึกษาพบว่า ในภาพรวมความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ลดลงอย่างมาก ยกเว้นในสถานเลี้ยงเด็กกำพร้าที่ยังมีความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในอัตราสูงไม่เปลี่ยนจากเดิมมากนัก และความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* มีความสัมพันธ์กับระบบสุขาภิบาลชุมชน

ตารางที่ 4 ผลการสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *Giardia intestinalis* ในประชากรแหล่งต่างๆ

แหล่งที่มาของ ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ	จำนวนตัวอย่าง ทั้งหมด ที่ส่งตรวจ	จำนวน ผู้ที่มีการติดเชื้อ <i>G. intestinalis</i>	อัตราชุกของ การติดเชื้อ <i>G. intestinalis</i>
<b>เขตต่างจังหวัด/ชนบท</b>			
• การสำรวจชุมชนหมู่บ้านในจังหวัดราชบุรี	949	39	4.11%
• การสำรวจในนักเรียนประถมต้นใน โรงเรียนประถมจังหวัดอุบลราชธานี	172	2	1.16%
<b>ในเขตกรุงเทพมหานคร</b>			
• นักเรียนประถมต้นในโรงเรียนประถม ในกรุงเทพมหานคร	99	3	3.03%
• โรงเรียนราชานุกูล ดินแดง	97	0	0%
• สถานรับเลี้ยงเด็ก มูลนิธิเด็ก	42	8	19.05%
• โรงพยาบาลศิริราช (Sporadic cases)	6,018	22	0.37%
• กรมพลาธิการทหารบก*	159	1**	0.63%
• สถานสงเคราะห์บ้านปากเกร็ด (เด็กชาย)*	80	14**	17.5%
<b>Total</b>	<b>7,616</b>	<b>89</b>	<b>1.17%</b>

\* การสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในสถานสงเคราะห์บ้านปากเกร็ด (เด็กชาย) และกรมพลาธิการทหารบก ได้ดำเนินการสำรวจเพิ่มเติมในปลายปีที่ 2 หลังจากผ่านการอนุมัติในรอบ 2 จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เพื่อเก็บข้อเท็จจริงและซีรัมเพื่อนำมาใช้ศึกษาโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* ด้วยวิธี Proteomics

\*\* ผู้ที่ติดเชื้อ *G. intestinalis* ซึ่งนำมาใช้ศึกษาโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* ด้วยวิธี Proteomics

#### กิจกรรมที่ 4 การคัดแยก *G. intestinalis* cyst (Isolation of *G. intestinalis*)

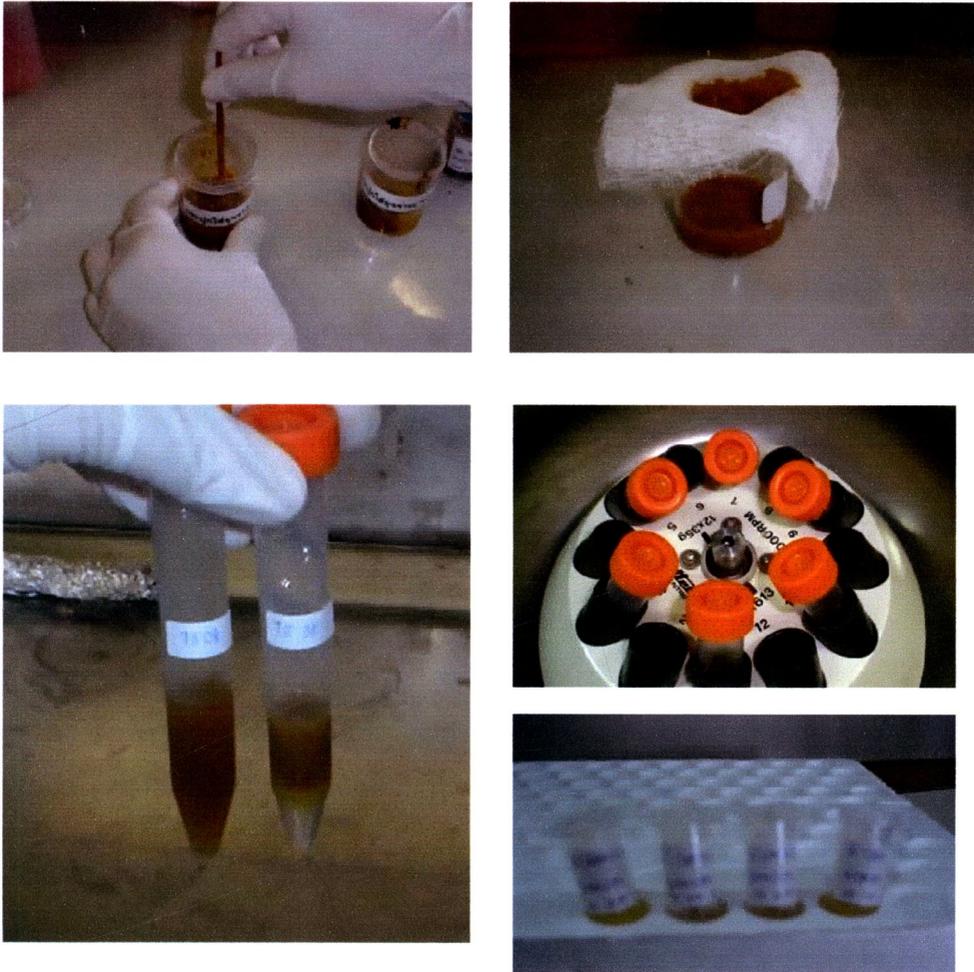
ทำการคัดแยกเฉพาะสิ่งส่งตรวจ (อุจจาระ) ที่ตรวจพบเชื้อ *G. intestinalis* และมีการบันทึกข้อมูลสนับสนุนตามเกณฑ์ที่กำหนดครบถ้วน ได้แก่ อายุ เพศ ลักษณะอาการทางคลินิกของอาสาสมัคร แหล่งที่อยู่อาศัยของอาสาสมัคร เป็นต้น และที่สำคัญต้องมีปริมาณที่หลีกเลี่ยงการตรวจคัดกรองเบื้องต้นในปริมาณที่มากพอที่จะทำการวิเคราะห์ต่อไป ในการศึกษานี้ได้อุจจาระที่จะศึกษาต่อไปทั้งหมด 61 ตัวอย่าง จึงนำอุจจาระที่ได้นั้นมาทำการคัดแยกระยะ cyst ของ *G.intestinalis* ออกจากอุจจาระของอาสาสมัครด้วยวิธี sucrose floatation

หมายเหตุ การคัดแยกระยะ cyst ของ *G.intestinalis* เพื่อวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *G. intestinalis* นั้นดำเนินการศึกษาวิจัยในช่วง 2 ปีแรก ส่วนการสำรวจการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในสถานสงเคราะห์บ้านปากเกร็ด (เด็กชาย) ได้ดำเนินในปลายปีที่ 2 หลังจากผ่านการอนุมัติในรอบ 2 จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ในการขอเก็บทั้งอุจจาระและซีรัมของผู้เข้าร่วมโครงการแต่ละราย เพื่อนำมาใช้ศึกษาโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* ด้วยวิธี Proteomics เนื่องจากเชื้อ *G. intestinalis* เป็น protozoa ที่มักพบในเด็กเล็กและมีความชุกของการติดเชื้อสูงในสถานสงเคราะห์ ซึ่งเด็กกลุ่มนี้จัดเป็น vulnerable group ดังนั้น ในการขอเจาะเลือดจึงต้องมีการพิจารณาใช้เท่าที่จำเป็นและเหมาะสม



การเตรียม saturated sucrose solution :

โดยชั่ง sacharose 200 g ใส่ในน้ำกลั่น 80 ml คนด้วย stirring rod เพื่อให้ sacharose ละลายหมดจนกระทั่งไม่สามารถละลายต่อไปได้อีก



รูปที่ 4 ภาพแสดงการตัดแยก *G.intestinalis* cyst ด้วยวิธี sucrose floatation

ขั้นตอนการทำ sucrose floatation

1. ใส่น้ำเกลือไปผสมกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (อุจจาระ) ประมาณอย่างน้อย 20 กรัม แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อตัดแยกกากอุจจาระขนาดใหญ่ออกก่อน นำ mixture นี้ไป centrifuge ที่ 2,000 rpm นาน 10 – 15 นาที
2. จากนั้นดูดตัวอย่างมาประมาณ 2 ml ใส่ใน centrifuge tubes แล้วเติม sucrose solution 2 ml ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 – 2 นาที
3. เติม sucrose solution 4 ml
4. ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 – 2 นาที

5. เติม sucrose solution 4 ml
6. ผสมให้เข้ากัน
7. centrifuge ที่ 2,000 rpm นาน 10 – 15 นาที
8. ดูดสารละลายส่วนบนของ tube 1 – 2 ml มาใส่ centrifuge tubes ใหม่
9. เติม normal saline solution 10 ml ผสมให้เข้ากัน
10. Centrifuge ที่ 2,000 rpm นาน 10 – 15 นาที
11. เทส่วนใสทิ้ง
12. เติม Normal saline solution 10 ml ผสมให้เข้ากัน
13. Centrifuge ที่ 2,000 rpm นาน 10 – 15 นาที
14. เทส่วนใสทิ้ง แล้วดูดตะกอนไปใส่ centrifuge tubes ใหม่
15. เติม sterile DW 10 ml ผสมให้เข้ากัน
16. Centrifuge ที่ 2,000 rpm นาน 10 – 15 นาที
17. เทส่วนใสทิ้ง
18. เติม sterile DW. 0.5 ml แล้วดูดตัวอย่างมาใส่ micro tube ปิดฝา micro tube ด้วยแผ่น Para film
19. เก็บรักษาที่ - 40 °C

**ผลการดำเนินการ :** ในช่วงปีที่ 2 ของการดำเนินการศึกษาวิจัย ผลการคัดแยกระยะ cyst ของ *G.intestinalis* ออกจากอุจจาระของด้วยวิธี sucrose floatation ได้ส่งส่งตรวจที่จะทำการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมต่อไปทั้งหมด 61 ตัวอย่าง

### **กิจกรรมที่ 5 Molecular analysis of *G.intestinalis* isolations**

นำ *G.intestinalis* ระยะ cyst ที่คัดแยกไว้มาสกัดแยก DNA โดยใช้ gel extraction kit (QIAEX; Qiagen) หลังจากนั้นเพิ่มจำนวน DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ polymerase (PCR) ตรวจสอบลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงในยีนของสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี DNA sequencing ตรวจสอบลำดับเบสเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างยีนของเชื้อ *G. intestinalis* ด้วยวิธี DNA sequencing และ restriction fragment length polymorphisms (RFLP) genotyping assays

#### **1. การสกัด genomic DNA ของ *Giardia* ด้วย Genomic DNA Extraction Kit**

**การจัดกลุ่มตัวอย่าง**

- ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ : *Giardia* ระยะ cyst ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระ
- Positive control : *Giardia* ระยะ trophozoite ที่มาจากการเพาะเลี้ยง
- Negative control : น้ำกลั่น

## ขั้นตอนการสกัด genomic DNA ของ *Giardia* โดยใช้ Genomic DNA Extraction Kit

1. นำ *Giardia* cyst ที่แยกได้จากวิธี sucrose floatation มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบ นาน 30 วินาที
2. ดูดส่วนใสทิ้ง



### รูปที่ 5 Genomic DNA Extraction Kit และ genomic DNA ของ *Giardia* ที่สกัดแล้ว

3. เติม sterile DW 20  $\mu$ l
4. เติม GN binding buffer 1 ml
5. ผสมให้เข้ากัน
6. เท solution ใน miniprep spin column
7. ปิดฝา ตั้งทิ้งไว้ 3 – 5 นาที
8. Centrifuge 13,000 รอบ นาน 30 วินาที
9. เทน้ำในส่วนบนของ tube ออกแล้วซัปปาก tube ให้แห้ง
10. เติม washing buffer 0.5 ml
11. Centrifuge 13,000 รอบ นาน 30 วินาที
12. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 9 – 11
13. เท washing buffer ส่วนล่างของ tube ออกแล้วซัปปาก tube ให้แห้ง
14. Centrifuge 13,000 รอบ นาน 1 นาที
15. ย้าย membrane tube มาวางใน microtubes ใหม่ขนาด 1.5 ml
16. เปิดฝาดังตั้งทิ้งไว้ 2 – 3 นาที
17. เติม sterile DW 25  $\mu$ l
18. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
19. Centrifuge 13,000 รอบ นาน 1 นาที
20. ทิ้งส่วนที่เป็น membrane tube เก็บ genomic DNA ที่  $-20^{\circ}\text{C}$



รูปที่ 6 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

## 2. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการสืบค้นข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางในการ design primers ที่ใช้ในการศึกษานี้ แล้วนำมาศึกษาทดลองจนได้ optimal condition สรุปได้ดังนี้

### 2.1 ขั้นตอนการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### A. PCR sample preparation

1. DDW (sterile)	36.6	μl
2. Buffer	5	μl
3. MgCl <sub>2</sub>	3	μl
4. Forward primer	1	μl
5. Reverse primer	1	μl
6. dNTP	1	μl
7. Taq DNA polymerase	0.4	μl
8. gDNA	2	μl
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>μl</b>

**\* การศึกษา 753 bp ของ  $\beta$  - *gairdin* gene**

- Forward primer ที่ใช้คือ F-G7 (5'- AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3')
- Reverse primer ที่ใช้คือ R-G759 (5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3')

**\* การศึกษา 384 bp ของ  $\beta$  - *gairdin* gene**

- Forward primer ที่ใช้คือ F-G376 (5'- CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3')
- Reverse primer ที่ใช้คือ R G759 (5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3')

**\* การศึกษา *ssrRNA* gene**

- Forward primer ที่ใช้คือ F-RH 11 (5'- CATCCGGTCGATCCTGCC-3')
- Reverse primer ที่ใช้คือ R-RH4 (5'-AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3')

**\* การศึกษา *gdh*- primary PCR**

- Forward primer ที่ใช้คือ F-*gdhe* (5'-TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT-3')
- Reverse primer ที่ใช้คือ R-*gdhi* (5'-GTTRTCCTTGACATCTCC-3')

**\* การศึกษา *gdh*- secondary PCR**

- Forward primer ที่ใช้คือ F-*gdhi* (5'-CAGTACAACCTCYGCTCTCGG-3')
- Reverse primer ที่ใช้คือ R-*gdhe* (5'-GTTRTCCTTGACATCTCC-3')

**\* การศึกษา *tpi-A* gene**

- Forward primer ที่ใช้คือ F-*tpiA* (5'-GGAGACCGACGAGCAAAGC-3')
- Reverse primer ที่ใช้คือ R-*tpiA* (5'-CTTGCCAAGCGCCTCAA-3')

**\* การศึกษา *tpi-B* gene**

- Forward primer ที่ใช้คือ F-*tpiB* (5'-AATAGCAGCACARAACGTGTATCTG-3')
- Reverse primer ที่ใช้คือ R-*tpiB* (5'-CCCATGTCCAGCAGCATCT-3')

**B. Condition of  $\beta$  - *gairdin* gene**

1. Initial Denature	94 °C	5 นาที
2. Denature	94 °C	30 วินาที
3. Annealing	65 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	1 นาที
5. Final extension	72 °C	7 นาที

**35 cycle**

### C. Condition of *ssrRNA* gene

1. Initial Denature	94 °C	5 นาที
2. Denature	94 °C	30 วินาที
3. Annealing	65 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	40 วินาที
5. Final extension	72 °C	7 นาที

**35 cycle**

### D. Condition of *gdh* gene

1. Initial Denature	94 °C	5 นาที
	56°C	1 นาที
	72 °C	2 นาที
2. Denature	94 °C	30 วินาที
3. Annealing	56 °C	20 วินาที
4. Extension	72 °C	45 วินาที
5. Final extension	72 °C	7 นาที

**55 cycle**

### E. Condition of *tpi* gene

1. Initial Denature	94 °C	5 นาที
2. Denature	94 °C	30 วินาที
3. Annealing	62 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	30 วินาที
5. Final extension	72 °C	7 นาที

**50 cycle**

## F. การวิเคราะห์ผลการทดลองของการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

### การเตรียมเจล

1. 1x TAE 25 ml
2. agarose gel 0.25 g
3. อุ่นให้ร้อน 1 นาที (จนสารละลายใส)
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
5. เติม Ethidium bromide 2.5  $\mu$ l
6. เทใส่แท่นพิมพ์ รอยเจลแข็ง
7. ดึงส่วน comb ออก

### Running buffer :

1x TAE 350 ml + Ethidium bromide 35  $\mu$ l

### การ run agarose gel electrophoresis

1. วางแผ่นเจลลงในเครื่อง run gel
2. เท running buffer ให้ท่วมแผ่นเจล
3. นำ PCR products 5  $\mu$ l มาผสมกับสี loading dye 1  $\mu$ l แล้วนำไปหยอดใส่หลุมเจล
4. เปิดเครื่อง run agarose gel electrophoresis (100 โวลต์) ประมาณ 30 นาที
5. นำเจลที่ run agarose gel electrophoresis แล้วไปดูภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation system และบันทึกไฟล์

## 2.2 การทำ Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

หลังจากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction แล้ว จากนั้น นำ  $\beta$ -*giardin* gene ขนาด 384 bp, 753 bp และ *gdh* gene ขนาด 432 bp ไปศึกษาต่อโดยใช้เทคนิค RFLP ซึ่ง  $\beta$ -*giardin* gene ขนาด 384 bp จะใช้เอนไซม์ *Hha*I เป็น specific restriction enzyme และ  $\beta$ -*giardin* gene ขนาด 753 bp จะใช้เอนไซม์ *Hae*III เป็น specific restriction enzyme และ *gdh* gene ขนาด 432 bp จะใช้เอนไซม์ *Rsa*I เป็น specific restriction enzyme โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ทำ concentration ของ PCR products
- ตัดด้วย specific restriction enzyme โดย Incubate RFLP sample ที่ 37°C เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง

### 2.2.1 ขั้นตอนการทำ concentration ด้วย PCR products / Agarose Gel

#### Purification Kit

1. เติม NE binding buffer 300  $\mu$ l ลงใน PCR products แล้วผสมให้เข้ากัน
2. ตูดสารมาใส่ใน miniprep spin column ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
3. Centrifuge 13,000 รอบ นาน 20 วินาที
4. เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง
5. เติม 80 % ethanol 500  $\mu$ l แล้วนำไป Centrifuge 13,000 รอบ นาน 30 วินาที
6. เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง
7. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5 – 6
8. Centrifuge 13,000 รอบ นาน 1 นาที เพื่อกำจัด 80 % ethanol ออก
9. นำ spin column มาใส่ใน microtube ใหม่ขนาด 1.5 ml ตั้งทิ้งไว้ 2 – 3 นาที
10. เติม DW (sterile) 25  $\mu$ l ตรงกลาง spin column ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไป Centrifuge 13,000 รอบ นาน 1 นาที
11. นำ spin column ออก แล้วเก็บส่วน DNA ที่  $-20^{\circ}\text{C}$

### 2.2.2 RFLP sample preparation

1. DW(sterile)	7	$\mu$ l
2. PCR product (concentration)	10	$\mu$ l
3. Buffer	2	$\mu$ l
4. Restriction enzyme	1	$\mu$ l
Total	20	$\mu$ l

#### \* RFLP 753 bp ของ $\beta$ - *gairdin* gene

- PCR product ที่ใช้คือ PCR product 753 bp ของ  $\beta$  - *gairdin* gene
- Restriction enzyme ที่ใช้คือ *HaeIII*
- Buffer ที่ใช้คือ buffer Tango

#### \* RFLP 384 bp ของ $\beta$ - *gairdin* gene

- PCR product ที่ใช้คือ PCR product 384 bp ของ  $\beta$  - *gairdin* gene
- Restriction enzyme ที่ใช้คือ *HhaI*
- Buffer ที่ใช้คือ buffer R

## 2.2.3 วิเคราะห์ผลการทดลองของการทำ RFLP ด้วย 3% agarose gel electrophoresis

### 2.2.3.1 การเตรียมเจล

1. 1x TAE 50 ml
2. agarose gel 1.5 g
3. Heat 1 นาที (จนสารละลายใส)
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
5. เติม Ethidium bromide 5  $\mu$ l
6. เทใส่แท่นพิมพ์ รอเจลแข็ง
7. ดึงส่วน comb ออก

### 2.2.3.2 การ run agarose gel electrophoresis

1. วางแผ่นเจลลงในเครื่อง run gel
2. เท Running buffer ให้ท่วมแผ่นเจล
3. นำ PCR products ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วมา 18  $\mu$ l มาผสมกับสี loading dye 2  $\mu$ l แล้วนำไปหยอดใส่หลุมเจล
4. เปิดเครื่อง run agarose gel electrophoresis (100 โวลต์) ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที
5. นำเจลที่ run agarose gel electrophoresis แล้วไปดูภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation system และบันทึกไฟล์

ตารางที่ 5 Oligonucleotide primers used in this study

Gene	Primer	Sequence	Amplicon size (bp)
<i>ssrRNA</i>	F-H11	5'-CATCCGGTTCGATCCTGCC-3'	292 bp
	R-RH4	5'-AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3'	
384 bp $\beta$ - <i>giardin</i>	F-376	5'-CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3'	384 bp
	R-G759	5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'	
753 bp $\beta$ - <i>giardin</i>	F-G7	5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3'	753 bp
	R-G759	5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'	
<i>gdh</i> - primary PCR	F-gdhe	5'-TCAACGTAAAYCGYGGYTTCCGT-3'	432 bp
	R-gdhi	5'-GTTRTCCTTGACACATCTCC-3'	
<i>gdh</i> - secondary PCR	F-gdhi	5'-CAGTACAACCTCYGCTCTCGG-3'	148 bp
	F-gdhe	5'-GTTRTCCTTGACACATCTCC-3'	
<i>tpi</i> -A	F- <i>tpi</i> A	5'-GGAGACCGACGAGCAAAGC-3'	81 bp
	R- <i>tpi</i> A	5'-CTTGCCAAGCGCCTCAA-3'	
<i>tpi</i> -B	F- <i>tpi</i> B	5'-AATAGCAGCACARAACGTGTATCTG-3'	81 bp
	R- <i>tpi</i> B	5'-CCCATGTCCAGCAGCATCT-3'	

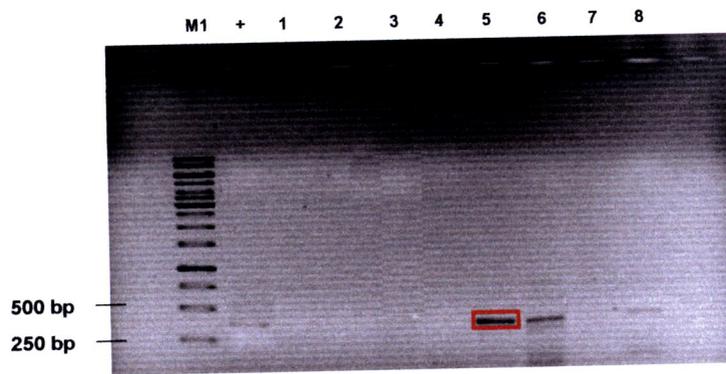
ผลการดำเนินการ : การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *G. intestinalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยคนไทย

จากการตรวจคัดกรองได้สิ่งส่งตรวจ (อุจจาระ) ที่มีการบันทึกข้อมูลสนับสนุนตามเกณฑ์ที่กำหนดครบถ้วนจำนวนทั้งหมด 61 ตัวอย่าง แล้วนำตัวอย่างทั้งหมดนี้ไปศึกษาต่อไปโดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาเพื่อหาโครงสร้างยีนของเชื้อ (genotyping) ในการศึกษาวิจัยนี้ ได้นำข้อมูลจากการสืบค้นมาทดลองศึกษา จนทำให้ทราบถึง วิธีการสกัด DNA, optimal condition ในแต่ละยีน และการทำ DNA sequencing ของเชื้อ *G. intestinalis* โดยสรุปดังในตารางที่ 5 และ 6

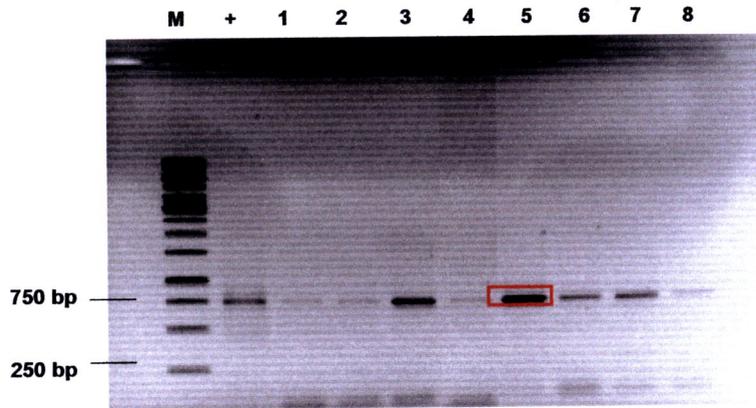
ตารางที่ 6 PCR conditions for amplifications of *ssrRNA*, *β-giardin*, *gdh* and *tpi* segments

Gene	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	No. of cycles
<i>ssrRNA</i>	94°C, 5 min	94°C, 30 s	50°C, 30 s	72°C, 40 s	72°C, 7 min	35
<i>β-giardin</i>	94°C, 5 min	94°C, 30 s	65°C, 30 s	72°C, 60 s	72°C, 7 min	35
<i>gdh</i>	94°C, 2 min and 56°C, 1 min and 72°C, 2 min	94°C, 30 s	56 °C, 20 s	72°C, 45 s	72°C, 7 min	55
<i>tpi</i>	94°C, 5 min	94°C, 30 s	62°C, 30 s	72°C, 30 s	72°C, 7 min	50

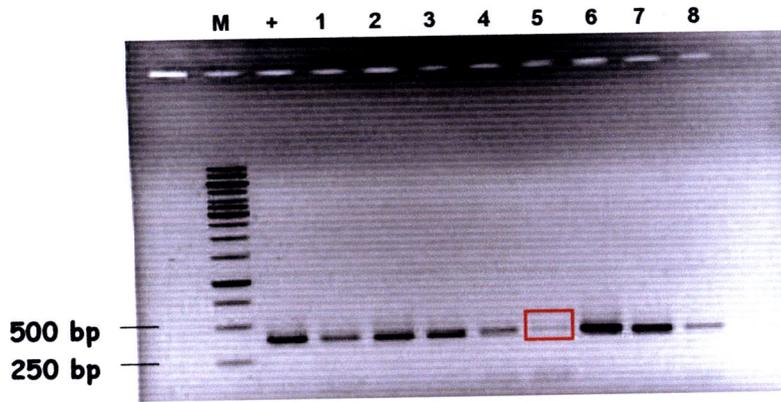




รูปที่ 7 PCR amplicons of *ssrRNA* gene (292 bp). Lanes M, 1 bp DNA ladders; Lane +, positive control; Lanes 1-8, selected specimens No.1-8, respectively.



รูปที่ 8 PCR amplicons of  $\beta$ - giardin gene segments (753 bp). Lane M, 1 bp DNA ladders; Lane +, positive control; Lanes 1-8, selected specimens No.1-8, respectively.



รูปที่ 9 PCR amplicons of  $\beta$ -giardin gene segments (384 bp). Lane M, 1 bp DNA ladders; Lane +, positive control; Lanes 1-8, selected specimens No.1-8, respectively.

ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *G. intestinalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยคนไทยได้ รวบรวมแสดงในตารางที่ 7 และตารางที่ 8

ตารางที่ 7 Background information of the subjects from whom *G. intestinalis* cysts were collected, the results of gene segment amplification, the assemblage classification of the cysts

Source	Group	No.	Age (yrs)	Sex	PCR amplicon				* Assemblage(s) based on PCR results of tpi gene segments
					<i>ssrRNA</i>	$\beta$ - <i>giardin</i> (384 bp)	$\beta$ - <i>giardin</i> (753 bp)	<i>gdh</i>	
Siriraj Hospital	1 (Healthy)	1	7	F	-	+	+	+	A + B
		2	14	M	+	+	+	-	A + B
		3	34	M	-	+	+	+	B
		4	57	M	+	+	+	+	B
		5	15	F	-	+	+	+	A + B
		6	2	M	-	+	+	-	B
		7	47	F	-	+	-	-	B
		8	33	F	-	-	-	-	B
		9	18	F	-	+	-	-	B
		10	37	M	-	+	+	-	A + B
		11	44	M	+	+	+	-	A + B
		12	32	F	-	-	-	-	B
		13	9	M	+	+	+	-	A + B
		14	55	M	-	+	-	-	B
		15	35	M	-	+	-	-	B
		16	58	F	-	-	-	-	B
		17	70	M	+	+	+	+	A + B
	2 (Symptomatic)	18	38	F	-	+	+	+	A + B
		19	50	M	-	+	+	+	A + B
		20	9	M	+	-	-	-	B
		21	54	M	+	+	-	-	B
		22	66	F	+	+	+	+	A + B
Ratchaburi province	3 (Healthy)	23	4	M	+	+	+	-	B
		24	7	F	-	+	+	-	A
		25	29	M	-	-	-	-	B
		26	2	F	-	+	+	-	B
		27	3	F	-	-	-	-	B
		28	4	F	-	-	-	-	B
		29	6	F	+	+	+	-	B
		30	9	M	-	+	-	+	A + B
		31	11	F	-	+	+	-	A + B
		32	3	M	-	-	-	+	B
		33	9	M	-	+	-	-	A
		34	12	M	-	+	+	-	B
		35	10	F	-	+	+	-	B
		36	31	M	-	+	+	+	B
		37	43	F	-	+	+	-	A + B
		38	42	M	-	-	-	+	B
		39	69	F	-	-	-	-	A + B
		40	6	F	-	+	-	-	B
		41	5	F	+	+	+	+	A + B
		42	13	M	-	-	-	+	A + B
		43	10	M	-	+	+	-	A
	44	4	F	-	+	-	-	A	
	45	7	M	-	+	+	-	A + B	
	46	13	F	+	+	-	-	B	
47	14	M	-	-	-	-	A + B		
4 (Symptomatic)	48	3	F	-	-	-	-	B	
	49	5	M	-	-	-	-	B	
	50	3	F	+	+	+	+	A + B	
	51	7	F	-	-	-	-	A + B	

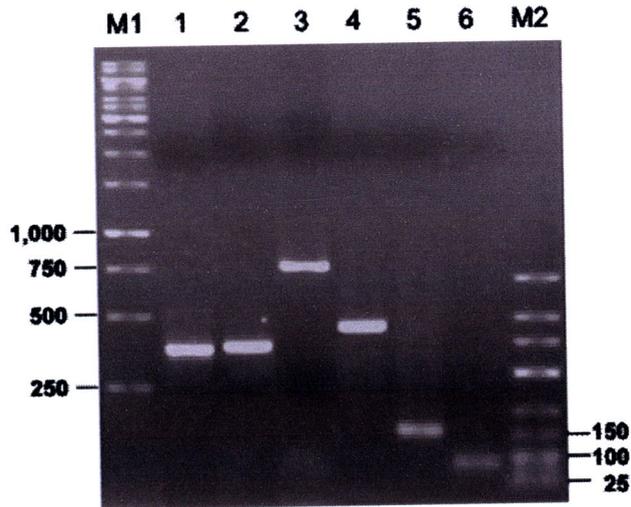
Source	Group	No.	Age (yrs)	Sex	PCR amplicon				* Assemblage(s) based on PCR results of <i>tpi</i> gene segments
					<i>ssrRNA</i>	<i>β-giardin</i> (384 bp)	<i>β-giardin</i> (753 bp)	<i>gdh</i>	
	4 (Symptomatic)	52	8	F	-	-	-	+	A + B
		53	2	F	-	-	-	+	B
		54	4	M	-	+	-	+	B
		55	7	M	-	+	+	+	A + B
		56	6	M	-	+	-	+	A + B
		57	6	M	+	+	-	-	B
		58	50	F	-	+	-	-	A
		59	4	F	-	+	-	+	A + B
		60	5	F	-	+	-	+	A + B
		61	5	F	-	+	+	-	B
<b>Total (%)</b>					<b>14/61</b> (22.95%)	<b>44/61</b> (72.13%)	<b>28/61</b> (45.90%)	<b>22/61</b> (36.07%)	<b>61/61</b> (100%)

\*Assemblage classification was based on the results of *tpi* amplification (assemblage A was positive for 148 bp *tpi* amplicon and assemblage B was positive for 81 bp *tpi* amplicon)

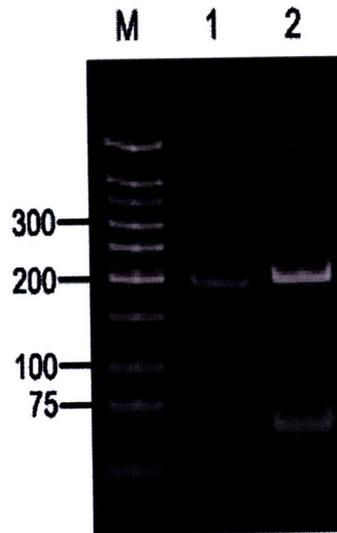
\*\* Sub-assemblages were based on the RFLP of the 384 *β-giardin* and *gdh* amplicons

ตารางที่ 8 Assemblages/sub-assemblages of the *G. intestinalis* cysts of patients with gastrointestinal disturbances whose stool samples contained *G. intestinalis* cysts only or with other potential pathogen(s) and the patients' age

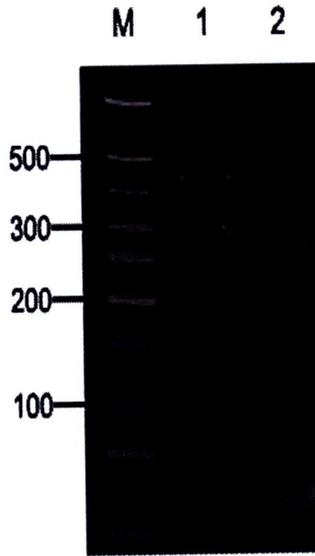
Group	No. of subject	Age (years)	Clinical diagnosis / (potential) pathogen found	Assemblage(s)/ Sub-assemblage(s)
2 (Siriraj Hospital, Bangkok)	18	38	Abdominal pain, diarrhea with soft stool / <i>G. intestinalis</i> ,	AII + BIII
	19	50	<i>B. hominis</i>	AII + BIV
	20	9	Abdominal pain with nausea, anemia / <i>G. intestinalis</i>	B
	21	54	Diarrhea, bronchitis / <i>G. intestinalis</i>	B
	22	66	Diarrhea, chronic urticaria / <i>G. intestinalis</i> Diarrhea with watery stool, hypertension, dyslipidemia / <i>G. intestinalis</i>	AI + BIV
4 (Community, Ratchaburi Province)	49	5	Diarrhea / <i>G. intestinalis</i> , <i>Entamoeba coli</i>	B
	50	3	Abdominal pain, diarrhea with soft stool / <i>G. intestinalis</i>	AII + BIII
	51	7	Diarrhea / <i>G. intestinalis</i>	A+B
	52	8	Abdominal pain, diarrhea / <i>G. intestinalis</i> , <i>Endolimax nana</i>	A+BIII
	53	2	Abdominal pain with nausea / <i>G. intestinalis</i>	BIV
	54	4	Abdominal pain, diarrhea / <i>G. intestinalis</i>	BIII
	55	7	Abdominal pain, diarrhea with soft stool / <i>G. intestinalis</i> , <i>Necator americana</i>	AII+BIII
	56	6	Watery diarrhea / <i>G. intestinalis</i>	AI+BIII
	57	6	Diarrhea / <i>G. intestinalis</i>	B
	58	50	Watery diarrhea / <i>G. intestinalis</i> , <i>B. hominis</i>	AII
	59	4	Abdominal pain, diarrhea with soft stool / <i>G. intestinalis</i>	AII+BIII
	60	5	Diarrhea with watery stool / <i>G. intestinalis</i>	AI+BIV
	61	5	Diarrhea / <i>G. intestinalis</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Entamoeba coli</i> , <i>E. nana</i>	B



**រូបភាព 10** PCR amplicons of *β-giardin*, *ssrRNA*, *gdh*, and *tpi* segments. Lanes M1 and M2, 1 kb and 100 bp DNA ladders, respectively; lane 1, 292 bp amplicon of *ssrRNA* segments; lanes 2 and 3, 384 and 753 bp amplicons of *β-giardin* segments, respectively; lane 4, 432 bp *gdh* gene segments; and lanes 5 and 6, 148 bp (assemblage A) and 81bp (assemblage B) amplicons of *tpi* segments, respectively.



รูปที่ 11 DNA banding patterns (RFLP) of the 384 bp *β-giardin* gene amplicons cut by the *HhaI* restriction endonuclease. Lane M, 100 bp DNA ladder; Lanes 1 and 2, DNA banding patterns of AI and AII sub-assemblages of *G. intestinalis*, respectively



รูปที่ 12 DNA banding patterns (RFLP) of the 432 bp-*gdh* amplicons cut by the *RsaI* restriction endonuclease. Lane M, 100 bp DNA ladder; Lanes 1 and 2, DNA banding patterns of BIII and BIV sub-assemblages of *G. intestinalis*, respectively.

## กิจกรรมที่ 6 การศึกษาโปรตีนของ *G. intestinalis* โดยวิธีทางโปรตีโอมิกส์และอิมมูโนมิกส์

การศึกษาโปรตีนโดยวิธีทางโปรตีโอมิกส์เริ่มทำในปีที่ 3 ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ระยะ trophozoite ของ *G. intestinalis* ซึ่งแยกได้จากสายพันธุ์ที่พบในคนและเพาะเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการแบบ axenic culture ใน TYI S-33 medium ตามวิธีของ Siriphan, 1995 หลังจากนั้นทำการสกัดแยกโปรตีนจากระยะ trophozoite นำโปรตีนที่สกัดได้มาทำการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ หรือ 2-D gel electrophoresis หลังจากการแยกโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* แล้วก็ทำการย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie brilliant blue หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบการแสดงผลของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม bioinformatics information ทำการ identify โปรตีนที่สนใจด้วย วิธี liquid chromatography / tandem mass spectrometer ขั้นตอนนี้ใช้เวลาประมาณ 1 ปี

### 6.1 การขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

สืบเนื่องจากการศึกษาโปรตีนของ *G. intestinalis* ที่มีความสัมพันธ์ในการก่อโรค โดยใช้ความรู้จากเทคนิคโปรตีโอมิกส์และอิมมูโนมิกส์ ต้องใช้ซีรัมของอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* แต่ละคน รวมทั้งอาสาสมัครที่ไม่มีติดเชื้อ *G. intestinalis* (เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม) มาทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่สกัดได้จาก *G. intestinalis* ระยะ trophozoite และระยะ cyst เพื่อหา specific band ที่มีความสัมพันธ์ในการก่อโรค จึงต้องจัดทำแบบเสนอโครงการวิจัย (รหัสโครงการ 390/2552(EC4) เพื่อขอรับการพิจารณาการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลรอบ 2 เนื่องจากเชื้อ *G. intestinalis* เป็น protozoa ที่มักพบในเด็กเล็ก และมีความชุกของการติดเชื้อสูงในสถานสงเคราะห์ ซึ่งเด็กกลุ่มนี้จัดเป็น vulnerable group ดังนั้นในการขอเจาะเลือดจึงต้องมีการพิจารณาให้เท่าที่จำเป็นและเหมาะสม ในการนี้ได้เก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (อุจจาระเพื่อทำการเพาะเลี้ยง *G. intestinalis* trophozoite) พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อคัดแยกซีรัมไว้ใช้การศึกษาต่อไป

ผลการพิจารณา : ได้รับการอนุมัติรับรองให้ทำการวิจัยในคนได้: หมายเลข SI 524/2009

### 6.2 การสำรวจหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *Giardia intestinalis*

เนื่องจากการคัดแยกตัวอย่างเชื้อ *G. intestinalis* และเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อคัดแยกซีรัมไว้ใช้การศึกษา โดยจำเป็นต้องใช้ fresh specimen ไม่สามารถใช้ preserved sample ได้จึงต้องวางแผนที่จะทำการตรวจหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* ใหม่ ในครั้งนี้สามารถติดต่อขอทำการสำรวจหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* จาก 2 แหล่ง ได้แก่

1. กรมพลานธิการทหารบก โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระจากผู้เข้าร่วมโครงการ เพื่อตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* ทั้งหมดจำนวน 159 ราย ตรวจพบผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* ระยะ cyst เพียงรายเดียว และมีการติดเชื้อโปรโตซัวชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Blastocystis*

*hominis* vacuolated form จำนวน 5 ราย, *Endolimax nana* ระยะ cyst จำนวน 2 ราย, *Entamoeba histolytica* ระยะ cyst จำนวน 1 ราย และผู้ที่มีการติดเชื้อ *Blastocystis hominis* ร่วมกับ *Endolimax nana* กับผู้ที่มีการติดเชื้อ *Blastocystis hominis* ร่วมกับ *Iodamoeba butschlii* เพียงอย่างละรายเดียว ซึ่งได้ขอเก็บตัวอย่างเลือดผู้ที่มีการติดเชื้อทุกรายเพื่อคัดแยกซีรัมไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป และให้การรักษาส่งผู้ที่มีการติดเชื้อโปรโตซัวทุกราย

2. สถานสงเคราะห์บ้านปากเกร็ด สังกัดกรมประชาสงเคราะห์ กระทรวงแรงงานและสวัสดิการสังคม โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระเพื่อตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* ทั้งหมดจำนวน 80 ราย มีผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* จำนวน 14 ราย เนื่องจากเป็นสถานสงเคราะห์เด็กและเพื่อเป็นการขอบคุณในความร่วมมือเป็นอย่างดี หลังจากการสำรวจได้นำทีมแพทย์และคณะผู้วิจัยได้เข้าไปบริการตรวจสุขภาพทั่วไป และให้การรักษาส่งผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* และการติดเชื้อปรสิตชนิดต่างๆ พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อคัดแยกซีรัมไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

**ตารางที่ 9** ผลการสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *Giardia intestinalis* ในประชากร

จากกรมพลานการทหารบก และสถานสงเคราะห์บ้านปากเกร็ด (เด็กชาย)

แหล่งที่มาของ ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ	จำนวน สิ่งส่งตรวจ ทั้งหมดที่ส่งตรวจ (ตัวอย่าง)	จำนวน ผู้ที่มีการติดเชื้อ <i>G. intestinalis</i> (ราย)	อัตราชุกของ การติดเชื้อ <i>G. intestinalis</i> (%)
กรมพลานการทหารบก	159	1	0.63
สถานสงเคราะห์บ้านปากเกร็ด (เด็กชาย)	80	14	17.5
<b>รวมทั้งหมด</b>	<b>239</b>	<b>15</b>	

**6.3 การคัดแยก *G. intestinalis* cyst (Isolation of *G. intestinalis*)**

ทำการคัดแยกเฉพาะสิ่งส่งตรวจ (อุจจาระ) ที่ตรวจพบเชื้อ *G. intestinalis* แล้วจึงนำอุจจาระที่ได้นั้นมาทำการคัดแยกระยะ cyst ของ *G. intestinalis* ออกจากอุจจาระของอาสาสมัครด้วยวิธี sucrose floatation ตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้วในการคัดแยกระยะ cyst ของ *G. intestinalis* ออกจากอุจจาระเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *G. intestinalis* แต่มีขั้นตอนแตกต่างกัน คือขั้นตอนสุดท้ายของวิธี sucrose floatation จะต้องนำ sediment ที่ได้มาล้างด้วย distilled water อย่างน้อย ครั้งเพื่อขจัดการปนเปื้อนโปรตีนในอุจจาระมากที่สุด นำ sediment ที่ได้ไปเก็บรักษาไว้ที่ -80 °C

#### 6.4 การคัดแยก *G. intestinalis* trophozoite

ทำการเพาะเลี้ยง *G. intestinalis* trophozoite ซึ่งแยกได้จากสายพันธุ์ที่พบในคนและเพาะเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการแบบ axenic culture ใน TYI S-33 medium (ตามวิธีของ Siriphan, 1995) ที่อุณหภูมิ 37°C ในภาวะไร้ออกซิเจน เมื่อเพาะเลี้ยงจนได้เชื้อในปริมาณ 4<sup>+</sup> ทำการคัดแยก *G. intestinalis* trophozoite ออกจากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยในการศึกษาวิจัยจะเลือกใช้เฉพาะ trophozoite ที่แข็งแรงซึ่งสามารถเกาะติดอยู่กับหลอดทดลอง (ส่วน trophozoite ที่ไม่แข็งแรง แก่ตัวเกินไป หรือใกล้ตายและตายแล้วจะไม่สามารถเกาะติดอยู่กับหลอดทดลองแต่จะลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ) เทส่วนที่เป็น suspension นี้ทิ้ง แล้วนำหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงนี้ไป incubate ในน้ำแข็ง (ice cold box) เพื่อให้ trophozoite หลุดจากการเกาะกับผิวของหลอดทดลองแล้วปั่นล้างด้วย PBS buffer pH 7.4 ที่ 300 g เป็นเวลา 5 นาที นำไปเก็บรักษาไว้ที่ -80 °C



รูปที่ 13 ภาพกิจกรรมในการประเมินภาวะทั่วไปและภาวะทางโภชนาการของเด็กที่สถาน  
สงเคราะห์บ้านปากเกร็ด สังกัดกรมประชาสงเคราะห์ กระทรวงแรงงานและสวัสดิการ  
สังคม จังหวัดนนทบุรี เมื่อวันที่ 15 กันยายน 2552 ซึ่งได้เข้าไปตรวจจู่จาะหาผู้ที่มีการ  
ติดเชื้อ *G. intestinalis* ที่จะนำมาใช้ในการศึกษาวิจัย





รูปที่ 14 ภาพกิจกรรมในการตรวจสอบสุขภาพที่สถานสงเคราะห์บ้านปากเกร็ด สังกัดกรมประชาสงเคราะห์ กระทรวงแรงงานและสวัสดิการสังคม จังหวัดนนทบุรี เมื่อวันที่ 15 กันยายน 2552 ซึ่งได้เข้าไปตรวจอุจจาระ เพื่อหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* ที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย

## 6.5 การเตรียม *G. intestinalis* trophozoite whole cell homogenates และการนำ homogenates ไปแยกด้วย SDS-PAGE และ two dimensional gel electrophoresis (2DE)

### 6.5.1 การเตรียม *G. intestinalis* trophozoite whole cell homogenates

การเตรียม *G. intestinalis* trophozoite whole cell homogenates สำหรับ proteomics และ immunomics มีโดยนำเชื้อ *G. intestinalis* trophozoite ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน TYI S-33 medium มาปั่นเป็น pellet ที่  $12,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที ปั่นล้าง pellet ด้วย cell wash buffer (10 mM Tris and 5 mM magnesium acetate, pH 8.0) 3 ครั้ง นำ cells ไป resuspend ใน lysis buffer [30 mM Tris, 2 M thiourea, 7 M urea, 4% CHAPS, 2% CA และ protease inhibitors (Roche Diagnostics GmGH, Mannheim, Germany), pH 8.0-9.0] แล้วเก็บไว้ที่ ice bath เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Model Labsonic® P, Sartorius, Germany) ที่ pulse-on/off: 2.0/2.0 sec โดยใช้ 25% amplitude เป็นเวลา 5 นาที ใน ice bath หลังจาก sonicated แล้วนำไปปั่นที่  $12,000 \times g$  ที่  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ใส่หลอดใหม่แล้วเก็บไว้ที่  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะใช้

### 6.5.2 SDS-PAGE and Immunoblotting of *Giardia intestinalis* trophozoite whole cell homogenates

นำ *G. intestinalis* trophozoite whole cell homogenates ที่เตรียมไว้ออกมา cleaned ด้วย 2D-Clean-up kit (Plus-one, GE Healthcare Biosciences, San Francisco, CA, USA) เพื่อกำจัด detergent, salts, lipids, phenolics และ nucleic acids หลังจาก cleaned แล้วนำไป ละลายใน rehydration buffer [2 M thiourea, 7 M urea, 4% CHAPS, 0.5% CA, 0.0002% Bromophenol blue จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ 2D-Quant kit (GE Healthcare Biosciences) ก่อนนำไปแยกโดย SDS-PAGE และ 2 dimensional gel electrophoresis ต่อไป

การแยกโปรตีนแอนติเจนด้วย SDS-PAGE นั้นทำใน mini PIII Vertical slab gel apparatus (BioRad) ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ stacking gel 4 % และ separating gel 11% และ 8% การ load โปรตีนแอนติเจน (whole cell homogenate ของเชื้อ *G. intestinalis*) ใช้โปรตีน 80  $\mu\text{g}$  สำหรับ Acrylamide gel ขนาด  $7.5 \times 8.3$  cm การทำ electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 10 mA/gel เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 20 mA/gel จนกระทั่ง Dye front เคลื่อนที่ถึงขอบล่างของ gel นำ gel ไป transblot ลงบน nitrocellulose membrane (NC) ขนาด  $7.5 \times 8.3$  cm ได้ใช้วิธีของ Towbin *et al.* (1979) หลังจาก electrotransblot โปรตีนแอนติเจนลงบน NC แล้ว block NC ด้วย blocking buffer (3% BSA ใน 0.2 M Tris-HCl-0.5% TWEEN20, pH 7.6) ที่อุณหภูมิห้อง ( $25^{\circ}\text{C}$ ) บน rocking platform เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง NC ด้วย washing buffer (0.02 M Tris-HCl-0.5% TWEEN20, pH 7.6) แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยากับ antibodies ที่ได้จากผู้ที่มีอาการติดเชื้อ *G. intestinalis* เปรียบเทียบกับผู้ที่มีอาการติดเชื้อโปรโตซัวชนิดต่างๆ (*Blastocystis hominis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba histolytica* และ *Iodamoeba butschlii*) และ ผู้ที่ติดเชื้อโรคหนองพยาธิอื่นๆ ที่พบได้บ่อยในคนไทย เช่น ในกลุ่มหนองพยาธิตัวกลม ได้แก่

*Angiostrongylus cantonensis*, *Capillaria philippinensis*, Hookworms, *Gnathostoma spinigerum*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichinella spiralis*, ในกลุ่มพยาธิตัวติดได้แก่ *Taenia* spp. และในกลุ่มพยาธิใบไม้ได้แก่ *Opisthorchis viverrini* รวมทั้งคนปกติที่ไม่มีการติดเชื้อปรสิตใดๆ ที่เป็นคนไทย (ภูมิลำเนาในกรุงเทพฯ) และชาวอเมริกันซึ่งไม่ได้อาศัยอยู่ในแหล่งที่การระบาดของโรคติดเชื้อทางปรสิต (non-endemic area) โดยใช้ซีรัมที่ความเข้มข้น 1:200 ใน diluent (1% BSA ใน 0.02 M Tris-HCl-0.5% TWEEN20, pH 7.6) บน rocking platform เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) และ 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างด้วย washing buffer อีกครั้งหนึ่งแล้วให้ NC ทำปฏิกิริยากับ rabbit anti-human IgG alkaline phosphatase conjugate (Southern) 1:2,000 ใน diluent บน rocking platform เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) ล้าง NC ด้วย washing buffer และครั้งสุดท้ายด้วย 0.15 M Tris-HCl- pH 9.6 แล้วเติม BCIP/NBT phosphatase substrate solution (KPL, USA) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำ de-ionized แล้ววางบนกระดาษกรองปล่อย NC ให้แห้งแล้วอ่านผล

**ผลการดำเนินการ:** การศึกษาโปรตีนของ *G. intestinalis* โดยวิธีโปรตีนโอมิกส์และอิมมูโนโอมิกส์

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการแสดงออกของโปรตีนของในเชื้อ *G. intestinalis* สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กับการก่อโรคในคนไทย เพื่อใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยและการรักษาต่อไป ในเบื้องต้นจึงเลือกใช้โปรตีนจากระยะ trophozoite เนื่องจากเป็นระยะก่อโรค โดยระยะนี้จะใช้ sucking disc เกาะกับผนังลำไส้ด้วยแรงดูด (adhesive tension) โดยไม่ได้มีการบุกรุกเนื้อเยื่อของผนังลำไส้เล็ก และระยะ trophozoite นี้ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจนได้เป็น axenic culture ทำให้ปราศจากการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และ fecal material อื่นๆ เมื่อนำไปทำการสกัดแยกโปรตีน จึงได้โปรตีนที่มาจากตัวเชื้อ *G. intestinalis* ที่มีความบริสุทธิ์สูงมาก แต่การคัดแยกระยะ cyst ที่ได้จากตัวอย่างอุจจาระนั้นแม้จะผ่านขบวนการของ sucrose floatation ซึ่งสามารถคัดแยก cyst ออกจาก fecal material ได้อย่างมากแล้ว แต่ยังคงมีการปนเปื้อนของโปรตีนจากอุจจาระในรูปแบบต่างๆ สูงมาก ผู้วิจัยได้เพิ่มขั้นตอนของการปั่นล้างและตกตะกอนอีก 5 ขั้นตอนพบว่ายังมีการปนเปื้อนสูงอยู่มาก ได้ทดลองใส่ antibiotic ตามขั้นตอนการ excystation เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอุจจาระแต่ก็พบว่ายังมีการปนเปื้อนสูงอยู่ ด้วยเหตุผลดังกล่าวมาแล้วผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะทำการศึกษาโปรตีนที่สกัดได้จากระยะ trophozoite เท่านั้น

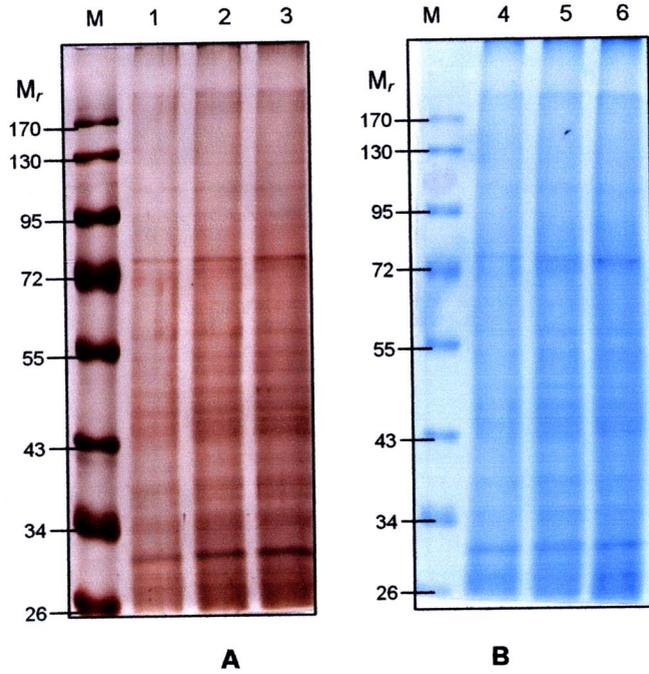
การศึกษาโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* โดยวิธีโปรตีนโอมิกส์และอิมมูโนโอมิกส์นั้น เริ่มต้นจากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม (optimal condition) ที่จะใช้ในการศึกษานี้ โดยทำใน 1DE (SDS PAGE) ก่อนด้วยการ vary condition ของความเข้มข้นของโปรตีนจากเชื้อ *G. intestinalis* ที่ 0.1 µg, 0.25 µg, 0.5 µg ย้อมด้วย silver stain และความเข้มข้นของโปรตีนที่ 2.5 µg, 5.0 µg, 7.5 µg ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue และ percent ของ Acrylamide gel ที่ 8% และ 11% แล้วจึงทำ immunoblotting ก่อนที่จะไปดำเนินการวิเคราะห์ด้วย 2 dimensional gel electrophoresis ต่อไป

การย้อมด้วยสี silver stain จะมีความไวมากกว่าการย้อมด้วย Coomassie brilliant blue ตั้งแต่ 10–100 เท่า ดังนั้น จึงใช้โปรตีนในปริมาณน้อยกว่ามาก ความเข้มข้นของโปรตีนจากเชื้อ *G. intestinalis* ที่ใช้จึงเป็น 0.1 µg, 0.25 µg, 0.5 µg ขณะที่การย้อมด้วย Coomassie brilliant blue จึงต้องใช้โปรตีนในปริมาณสูงกว่าเป็น 10 เท่า (2.5 µg, 5.0 µg, 7.5 µg) ดังในรูปที่ 15 และ 16 นอกจากนี้สี silver stain ยังสามารถย้อมติดสีของโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตได้ด้วย การย้อมด้วยสี silver stain ในเบื้องต้นเป็นการย้อมเพื่อดูความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่สกัดได้ ผลการศึกษาจากรูปที่ 15 และ 16 จะพบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ run SDS PAGE ภาวะที่เหมาะสมในการศึกษานี้ที่เลือกใช้คือ 11% acrylamide gel และความเข้มข้นของสารสกัดโปรตีนที่ 7.5 µg

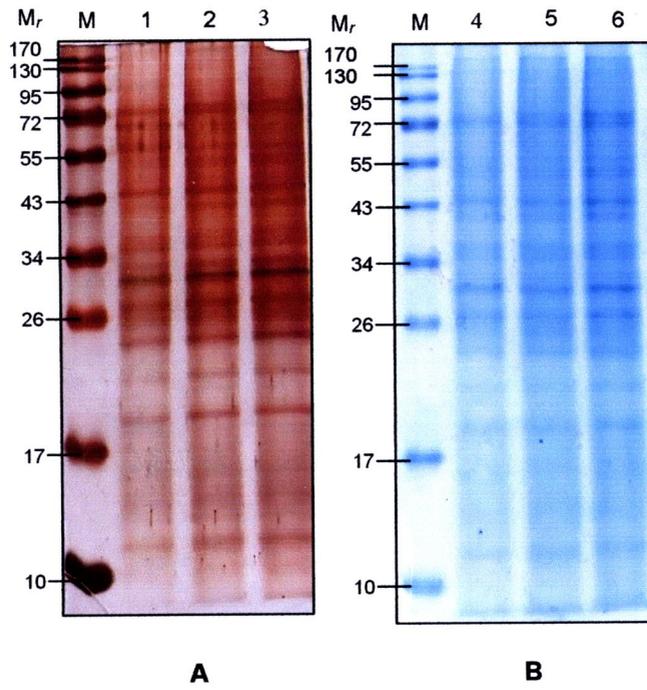
ผลการศึกษาหา specific antigen ของผู้ป่วยคนไทยที่มีความจำเพาะต่อโปรโตซัว *Giardia* ที่มีความสัมพันธ์กับการก่อโรคจากเชื้อ *G. intestinalis* โดยการนำสารสกัดโปรตีนจากเชื้อ *G. intestinalis* ทำปฏิกิริยากับ antibody ในซีรัมของผู้ที่มีการติดเชื้อ *Giardia* คนไทยเปรียบเทียบกับคนไทยที่มีการติดเชื้อโปรโตซัวหนอนพยาธิอื่นๆ และ normal control ได้ผล immunoblot pattern ดังแสดงในรูปที่ 17, 18 และ 19 พบว่ามีความหลากหลายของ specific antigenic component มาก ผลการศึกษาจากรูปที่ 17 พบว่าโปรตีนจาก crude extract ของเชื้อ *G. intestinalis* ระยะ trophozoite ที่เป็น antigenic component ซึ่งทำปฏิกิริยากับ antibodies ในซีรัมของผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* ทุกสายเป็น band ชัดเจนจะเป็นช่วง 24 kDa โดยมีความชัดเจนของปฏิกิริยา (grading reaction) ที่เกิดแตกต่างกันไปในผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* แต่ละราย และพบ antigenic component นี้ในผู้ที่มีการติดเชื้อโปรโตซัวชนิดอื่นๆ ด้วยเช่นกัน โดยมีในลักษณะที่ชัดเจนใกล้เคียงกัน แต่สำหรับผู้ที่ไม่มีเชื้อปรสิต (normal host) จะพบความชัดเจนของปฏิกิริยา (grading reaction) ของ antigenic component ที่ 24 kDa นี้เป็น band บางๆไม่ชัดเจน ดังนั้น antigenic component นี้ จึงไม่เป็น specific band สำหรับเชื้อ *G. intestinalis* ที่ควรศึกษาต่อ แต่พบว่าในผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* รายที่ 1 จะมี specific band ที่น่าสนใจที่  $M_r$  17.2 kDa และ 22.2 kDa เพราะมีความชัดเจน +4 (รูปที่ 17 และตารางที่ 8, 10) ในผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* รายที่ 3 และ 4 จะทำการศึกษา antigenic component ที่มี  $M_r$  14.6 และ 15 ตามลำดับ แต่ในผู้ที่ติดเชื้อ *G. intestinalis* รายที่ 8 และ 9 จะคัดเลือก specific band ที่  $M_r$  20.6 และ 16 kDa ตามลำดับ ในรูปที่ 18 และ 19 เป็น immunoblot pattern ที่มาจาก SDS PAGE ที่ลด % ของ separating gel เป็น 8% ทำให้สามารถแยก antigenic band ในช่วง 24 kDa ถึง 170 kDa ได้ชัดเจนขึ้น ผลจากรูปที่ 18 และตารางที่ 9,10 และได้คัดเลือก specific band ที่มี  $M_r$  102 kDa ซึ่งเป็น band ที่พบได้ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* ทุกสาย และที่  $M_r$  57 kDa สำหรับผู้ติดเชื้อ *G. intestinalis* รายที่ 3 และ 4 ที่จะดำเนินการศึกษาต่อ

### 6.5.3 การแยกโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* แบบ 2 มิติ (Isolation of protein from *G. intestinalis* trophozoite with 2 dimensional gel electrophoresis)

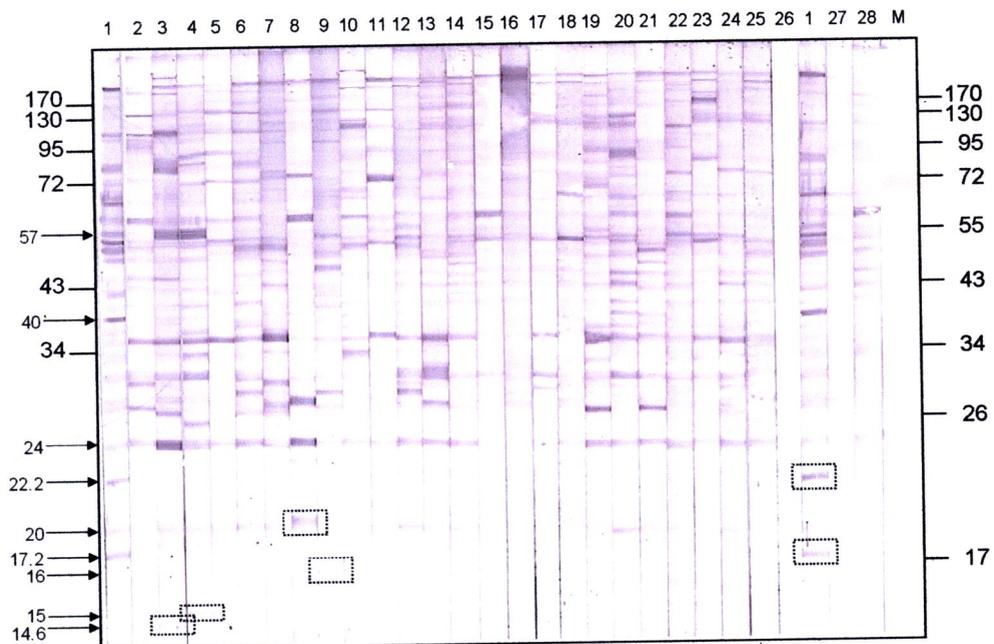
เริ่มจากสกัดแยกโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* แล้วทำการแยกโปรตีนโดยใช้เทคนิค 2-D gel electrophoresis หลังจากนั้นนำ gel ไป transblot ลงบน nitrocellulose membrane (NC) ขนาด  $7.5 \times 8.3$  cm โดยวิธีของ Towbin *et al.* (1979) แล้วทำการเปรียบเทียบโปรตีนที่แสดงออกต่างกัน เพื่อหา specific antigen ของผู้ป่วยคนไทยที่มีความจำเพาะต่อโปรโตซัว *Giardia* โดยการนำ nitrocellulose membrane ที่มีสารสกัดโปรตีนจากเชื้อ *G. intestinalis* มาทำปฏิกิริยากับ antibody ใน pooled serum ของผู้ที่มีการติดเชื้อ *Giardia* คนไทย เปรียบเทียบกับ 2-DE-immunoblotting ของ normal control (รูปที่ 22 และ 23) เพื่อคัดเลือก protein spot ที่สนใจ และเพื่อเป็นการ validate data ว่า protein spot ที่คัดเลือกนั้นเป็น specific antigen ที่พบได้ common จึงต้องทำ 2-DE-immunoblotting ให้ทำปฏิกิริยากับ antibody ใน serum ของผู้ที่มีการติดเชื้อ *Giardia* คนไทยแต่ละราย (ดังแสดงในรูปที่ 20 และ 21) การคัดแยกได้โปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* ที่น่าสนใจ 3 จุด ดังแสดงในรูปที่ 22 และ 23



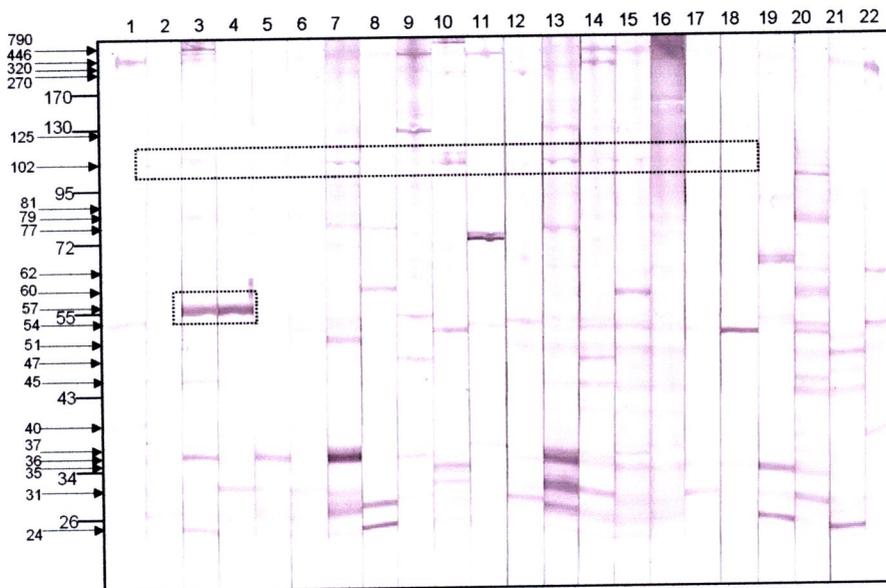
**รูปที่ 15** SDS-PAGE analysis of various concentration of freshly prepared crude extract of *Giardia intestinalis* trophozoite stained with silver stain (A) and Coomassie brilliant blue (B) from 8% separating gel. Lane M: molecular weight markers, Lanes 1-6 : crude extract of *Giardia intestinalis* trophozoite in the concentration of 0.1  $\mu\text{g}$ , 0.25  $\mu\text{g}$ , 0.5  $\mu\text{g}$ ; 2.5  $\mu\text{g}$ ; 5.0  $\mu\text{g}$ ; 7.5  $\mu\text{g}$ , respectively.



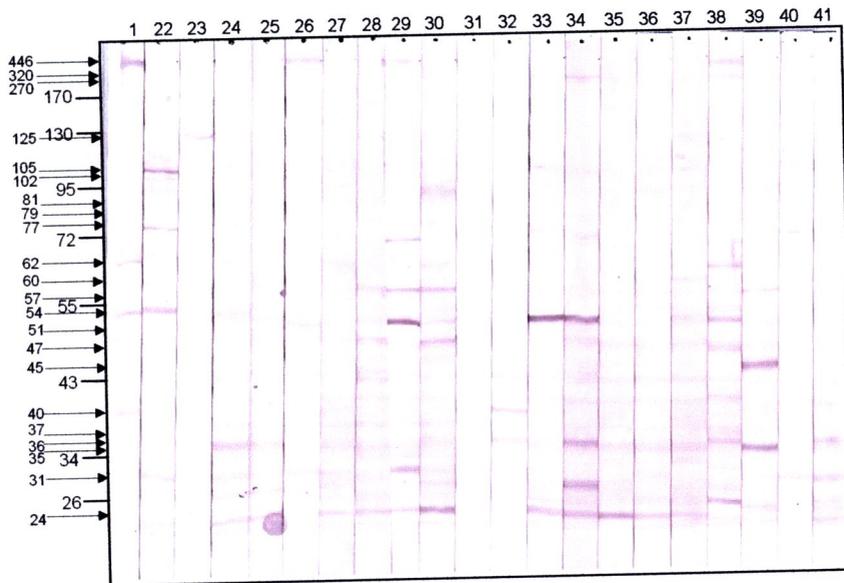
**រូបភាព 16** SDS-PAGE analysis of various concentration of freshly prepared crude extract of *Giardia intestinalis* trophozoite stained with silver stain (A) and Coomassie brilliant blue (B) from 11% separating gel. Lane M: molecular weight markers, Lanes 1-6 : crude extract of *Giardia intestinalis* trophozoite in the concentration of 0.1  $\mu\text{g}$ , 0.25  $\mu\text{g}$ , 0.5  $\mu\text{g}$ ; 2.5  $\mu\text{g}$ ; 5.0  $\mu\text{g}$ ; 7.5  $\mu\text{g}$ , respectively.



**រូបភាព 17** Immunoblot patterns of *G. intestinalis* antigen from 11% separating gel showing reactive antigenic component with antibodies of protozoan infection host comparing to that of normal host. Lanes 1-15: *G. intestinalis* infections; Lane 16: *G. intestinalis* and *S. stercoralis* infections; Lanes 17-20: *B. hominis* infections; Lane 21: *B. hominis* and *Iodamoeba butschlii* infection; Lanes 22-24: *Endolimax nana* infections; Lane 25: *E. nana* and *B. hominis* infections; Lane 26: *Entamoeba histolytica* infection; Lane M: molecular weight markers and the number at left and right are  $Mr \times 10^{-3}$ . The selected bands as marked will be focused for further study by proteomic technique.



**រូបភាព 18** Immunoblot patterns of *G. intestinalis* antigen from 8% separating gel showing reactive antigenic components with antibodies of protozoan infection hosts including *G. intestinalis* infections. The number of molecular weight markers is on the left are  $Mr \times 10^{-3}$ ; Lanes 1-15: *G. intestinalis* infection; Lane 16: *G. intestinalis* and *S. stercoralis* infections; Lanes 17-20: *B. hominis* infections; Lane 21: *B. hominis* and *I. butschlii* infection; Lane 22: *E. nana* infections. The selected bands as marked will be focused for further study by proteomic technique.



**រូបភាព 19** Immunoblot patterns of *G. intestinalis* antigen from 8% separating gel showing reactive antigenic components with antibodies of parasitic infection hosts and normal hosts. The number of molecular weight markers is on the left are  $Mr \times 10^{-3}$ ; Lane 1: *G. intestinalis* infection; Lanes 22-24: *E. nana* infections; Lane 25: *E. nana* and *B. hominis* infection; Lane 26: *Entamoeba histolytica* infection; Lanes 27-28: normal hosts; Lanes 29-30: *S. stercoralis* infections; Lanes 31-32: *Taenia* spp. infections; Lanes 33-34: *Gnathostoma spinigerum* infections; Lane 35: *Trichinella spiralis* infection; Lanes 36-37: *Angiostrongylus cantonensis* infection; Lanes 38: *Opisthorchis viverrini* infection; Lane 39: hookworms infection; Lane 40: *Ascaris lumbricoides* infection; Lane 41: *Capillaria philippinensis* infection.

ตารางที่ 10 รายละเอียดและจำนวนตัวอย่างซีรัมที่ใช้ในงานวิจัย

	Protozoan Infections	จำนวนตัวอย่างซีรัม
No. 1 - 15	<i>Giardia intestinalis</i>	15
No. 16	<i>G. intestinalis</i> + <i>Strongyloides stercoralis</i>	1
No 17 -20	<i>Blastocystis homonis</i>	4
No. 21	<i>B. homonis</i> + <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
No. 22 - 24	<i>Endolimax nana</i>	3
No. 25	<i>E. nana</i> + <i>B. homonis</i>	1
No. 26	<i>Entamoeba histolytica</i>	1
	<b>Normal host</b>	
No. 27	Normal Healthy Thai	1
No. 28	Normal Healthy American	1
	<b>Helminthic Infections</b>	
No. 29 – 30	<i>Strongyloides stercoralis</i>	2
No. 31 - 32	<i>Taenia</i> spp.	2
No. 33 – 34	<i>Gnathostoma spinigerum</i>	2
No. 35	<i>Trichinella spiralis</i> [TS52]	1
No. 36 - 37	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	2
No. 38	<i>Opisthorchis viverrini</i>	1
No. 39	Hookworms	1
No. 40	<i>Ascaris lumbricoides</i>	1
No. 41	<i>Capillaria philippinensis</i>	1

**Protozoan Infections**

Gi; *G. intestinalis*, GiSs; *G. intestinalis* + *Strongyloides stercoralis*, Bh; *Blastocystis hominis*, BhIb; *B. hominis* + *Iodamoeba butschlii*, En; *Endolimax nana*, EnBh; *E. nana* + *B. hominis*, Eh; *Entamoeba histolytica*

**Normal hosts**

NormT; Normal Healthy Thai, NormA; Normal Healthy American

**Helminthic Infections**

Ss; *S. stercoralis*, Tn; *Taenia* spp., Gs; *Gnathostoma spinigerum*, Ts; *Trichinella spiralis*, Ac; *Angiostrongylus cantonensis*, Ov; *Opisthorchis viverrini*, Hw; Hookworms, Al; *Ascaris lumbricoides*, Cp; *Capillaria philippinensis*

ตารางที่ 11 Serum samples of patients with parasitic infections and normal Thai and normal American which contained antibodies reactive to antigenic components of *Giardia intestinalis* trophozoite antigens

Antigenic component	Serum samples which gave reaction												
	Mr	Gi1	Gi2	Gi3	Gi4	Gi5	Gi6	Gi7	Gi8	Gi9	Gi10	Gi11	Gi12
1	790	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
2	446	++++	-	++	-	+	+	-	++	++++	-	++++	+
3	320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	270	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	-	++
5	135	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	++	-
6	125	-	-	-	-	+	-	-	-	++++	-	-	-
7	110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
8	105	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	102	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+++	-	+
10	94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	88	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
12	81	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	79	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	77	+	-	+	-	+	+	+	+++	-	-	-	-
15	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
16	71	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++++	-
17	69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	67	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
19	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
20	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	62	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	60	-	-	-	-	+	-	-	+++	-	-	-	-
23	57	-	-	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
24	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	55	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
26	54	++++	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+++
27	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
28	51	+	-	-	-	-	+	+	-	-	++++	-	+

Mr, Relative molecular mass, Gi; *G. intestinalis*, GiSs; *G. intestinalis* + *Strongyloides stercoralis*, Bh; *Blastocystis hominis*, Bhlb; *Blastocystis hominis* + *Iodamoeba butschlii*, En; *Endolimax nana*, EnBh; *E. nana* + *B. hominis*, En; *Entamoeba histolytica*  
 NomT; Normal Healthy Thai, NormA; Normal Healthy American

ตารางที่ 11 Serum samples of patients with parasitic infections and normal Thai and normal American which contained antibodies reactive to antigenic components of *Giardia intestinalis* trophozoite antigens (continued)

Antigenic component Mr	Serum sample which gave reaction															
	Gi1	Gi2	Gi3	Gi4	Gi5	Gi6	Gi7	Gi8	Gi9	Gi10	Gi11	Gi12				
29	++	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+++				
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
31	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-				
32	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	++				
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-				
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-				
35	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-				
37	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-				
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
39	-	-	+++	+	++	+	+++	-	++	-	-	+++				
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-				
41	-	-	+	+++	+	+	-	+	+	+++	++	++				
42	-	-	-	-	+	+	-	+++	++	-	-	+++				
43	-	-	-	-	+	+	-	+++	++	-	++	+				
44	-	-	+++	-	+	-	-	+++	-	-	-	-				
45	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-				
46	-	-	++++	-	-	+++	+++	-	-	+	-	-				
47	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++				
48	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-				
49	++++	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+				
50	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-				
51	++++	++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	+	++++				
52	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
53	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	-				
54	-	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-				
55	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

Mr, Relative molecular mass, Gi; *G. intestinalis*, GiS; *G. intestinalis* + *Strongyloides stercoralis*, Bh; *Blastocystis hominis* + *Iodamoeba butschlii*, En; *Endolimax nana*, EnBh; *E. nana* + *B. hominis*, Eh; *Entamoeba histolytica*  
 NormT; Normal Healthy Thai, NormA; Normal Healthy American



ตารางที่ 11 Serum samples of patients with parasitic infections and normal Thai and normal American which contained antibodies reactive to antigenic components of *Giardia intestinalis* trophozoite antigens (continued)

Antigenic component	Serum sample which gave reaction															
	Mr	Gi13	Gi14	Gi15	GiSs16	Bh17	Bh18	Bh19	Bh20	Bh1b21	En22	En23	En24			
1	790	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
2	446	+	++++	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-			
3	320	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+			
4	270	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-			
5	135	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	125	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-			
7	110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
8	105	-	-	-	+++	+	-	-	-	-	++++	-	-			
9	102	++	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-			
10	94	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-			
11	88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
12	81	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-			
13	79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
14	77	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	++++	-	+			
15	72	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
16	71	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-			
17	69	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-			
18	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
19	65	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++	-	-			
20	63	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-			
21	62	+	-	-	-	-	+	-	++	-	-	-	-			
22	60	-	-	++++	-	+	-	-	+++	-	-	-	-			
23	57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
24	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
25	55	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++++	+	+			
26	54	+	+	-	-	-	-	+	+++	-	-	-	-			
27	52	+	+	++	++	++	++++	-	+++	-	-	-	-			

Mr, Relative molecular mass, Gi; *G. intestinalis*, GiSs; *G. intestinalis* + *Strongyloides stercoralis*, Bh; *Blastocystis hominis*, Bh1b; *Blastocystis hominis* + *Iodamoeba butschlii*, En; *Endolimax nana*, EnBh; *E. nana* + *B. hominis*, Eh; *Entamoeba histolytica*  
 NomT; Normal Healthy Thai, NomA; Normal Healthy American

ตารางที่ 11 Serum samples of patients with parasitic infections and normal Thai and normal American which contained antibodies reactive to antigenic components of *Giardia intestinalis* trophozoite antigens (continued)

Antigenic component	Serum sample which gave reaction													
	Mr	Gi13	Gi14	Gi15	GiSs16	Bh17	Bh18	Bh19	Bh20	Bh1b21	En22	En23	En24	
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
29	+	+	+	++	++	-	-	-	+	++	-	+	+	
30	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
31	-	-	+++	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	
32	++	++	++	+++	++	-	-	-	++	++	-	-	+	
33	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
34	+	+	+	++	++	-	-	-	+	+	-	-	+	
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
36	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
37	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
38	+++	-	-	+++	++	-	-	-	+	+	-	-	-	
39	++++	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	-	-	++	+++	++	+	++	++++	++	++	-	+	+	
41	++++	++++	++++	+	+	+	+	++++	++++	+	+	+	+	
42	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	
43	++++	++++	++	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
44	++	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
46	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	++++	-	-	-	
47	++++	++++	++++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+	+	+	
48	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
51	++	++	++++	+	++	+	+	+++	++++	+++	-	-	-	
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Mr, Relative molecular mass, Gi; *G. intestinalis*, GiSs; *G. intestinalis* + *Strongyloides stercoralis*, Bh; *Blastocystis hominis*, Bh1b; *Blastocystis hominis* + *Iodamoeba butschlii*, En; *Endolimax nana*, EnBh; *E. nana* + *B. hominis*, Eh; *Entamoeba histolytica*  
 NomT; Normal Healthy Thai, NomA; Normal Healthy American

ตารางที่ 11 Serum samples of patients with parasitic infections and normal Thai and normal American which contained antibodies reactive to antigenic components of *Giardia intestinalis* trophozoite antigens (continued)

	Antigenic component		Serum sample which gave reaction			
	Mr	Enlb25	Eh26	NomT27	NomA28	
1	790	-	-	-	-	-
2	446	-	-	++	-	-
3	320	+	++	-	-	-
4	270	-	-	-	-	-
5	135	-	-	-	-	-
6	125	-	-	-	-	-
7	110	-	-	-	-	-
8	105	-	-	-	-	-
9	102	-	-	-	-	-
10	94	-	-	-	-	-
11	88	-	-	-	-	-
12	81	-	-	-	-	-
13	79	-	-	-	-	-
14	77	-	-	-	-	-
15	72	-	-	-	-	-
16	71	-	-	-	-	-
17	69	-	-	-	-	-
18	67	-	-	-	-	-
19	65	-	-	-	+	-
20	63	-	-	-	-	-
21	62	-	-	-	+++	-
22	60	-	-	-	+	-
23	57	-	-	-	-	-
24	56	-	-	-	-	+
25	55	-	-	-	-	-
26	54	-	-	-	-	-
27	52	-	-	-	+++	-
28	51	+	+	-	-	-
	29	50	+	+	+	+
	30	48	-	-	+	-
	31	47	-	-	-	-
	32	45	-	-	+	+
	33	42	+	+	-	+
	34	41	-	-	+	+
	35	40	-	-	+	-
	36	39	-	-	+	-
	37	38	-	-	-	-
	38	37	-	-	+	+
	39	36	-	-	-	-
	40	35	+	+	+	+
	41	31	+	+	+	-
	42	29	-	-	-	-
	43	28	+	+	-	-
	44	26	-	-	-	-
	45	25.5	-	-	-	-
	46	25	-	-	-	-
	47	24	+++	+	+	+
	48	23.2	-	-	-	-
	49	22.2	-	-	-	-
	50	20.6	+	+	-	-
	51	20	-	-	-	-
	52	17.2	-	-	-	-
	53	16	-	-	-	-
	54	15	-	-	-	-
	55	14.6	-	-	-	-

Mr, Relative molecular mass, Gi; *G. intestinalis*, GiSs; *G. intestinalis* + *Strongyloides stercoralis*, Bh; *Blastocystis hominis* + *Iodamoeba butschlii*, En; *Endolimax nana*, EnBh; *E. nana* + *B. hominis*, Eh; *Entamoeba histolytica*  
 NomT; Normal Healthy Thai, NomA; Normal Healthy American

ตารางที่ 12 Serum samples of patients with helminthic infections which contained antibodies reactive to antigenic components of *Giardia intestinalis* trophozoite antigens

Antigenic component	Serum samples which gave reaction															
	Mr	Ss(10)	Ss(11)	Tn1(12)	Tn2(13)	Gs(14)	Gs(15)	Ts(16)	Ac(17)	Ac(18)	Ov(19)	Hw(20)	Al(21)	Cp(22)		
1	320	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		
2	270	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-		
3	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
4	110	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
5	105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	97	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7	81	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
8	79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9	72	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
10	69	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		
11	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
12	65	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		
13	61	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		
14	60	++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	-		
15	57	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-		
16	54	++++	+	-	+	++++	++++	+	+	+	+++	+	-	-		
17	51	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-		
18	50	-	+++	-	+	-	+	+	+	+	++	+	+	+		
19	45	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-		
20	43	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	-	-	+		

Mr, Relative molecular mass, Ss; *Strongyloides stercoralis*, Tn; *Taenia* spp, Gs; *Gnathostoma spinigerum*, Ts; *Trichinella spiralis*, Ac; *Angiostrongylus cantonensis*, Ov; *Opisthorchis viverrini*, Hw; Hookworm, Al; *Ascaris lumbricoides*, Cp; *Capillaria philippinensis*

ตารางที่ 12 Serum samples of patients with helminthic infections which contained antibodies reactive to antigenic components of *Giardia intestinalis* trophozoite antigens (continued)

Antigenic component	Serum sample which gave reaction													
	Mr	Ss(10)	Ss(11)	Tn1(12)	Tn2(13)	Gs(14)	Gs(15)	Ts(16)	Ac(17)	Ac(18)	Ov(19)	Hw(20)	Al(21)	Cp(22)
21	41	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
22	40	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	37	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
24	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
25	35	-	-	-	++	-	+++	+	++	+	-	++++	++++	+
26	31	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
27	30	++	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	29	-	+	+	-	-	++++	-	-	-	-	-	++	+
29	28	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
30	27	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	++	-	-
31	24	++	++++	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	-

Mr, Relative molecular mass, Ss; *Strongyloides stercoralis*, Tn; *Taenia* spp, Gs; *Gnathostoma spinigerum*, Ts; *Trichinella spiralis*, Ac; *Angiostrongylus cantonensis*, Ov; *Opisthorchis viverrini*, Hw; Hookworm, Al; *Ascaris lumbricoides*, Cp; *Capillaria philippinensis*

ตารางที่ 13 Frequency (%) of grading reactions of individual antigenic component to antibodies of patients infected with *G. intestinalis* alone and *G. intestinalis* and *S. stercoralis* (Gi+Ss).

Antigenic component	Mr	Number(s) of serum sample which gave reaction to antigenic component									
		<i>G. intestinalis</i> alone				%	Total	<i>Gi+Ss</i>		%	Total
		(+4)	(+3)	(+2)	(+1)		(n/15)	(1)		(n/16)	
1	790	0	2	0	0	13.3	(2/15)	0	12.5	(2/16)	
2	446	4	0	2	5	73.3	(11/15)	0	68.8	(11/16)	
3	320	1	0	0	0	6.7	(1/15)	0	6.3	(1/16)	
4	270	0	1	1	2	26.7	(4/15)	0	25.0	(4/16)	
5	135	0	0	2	1	20.0	(3/15)	0	18.8	(3/16)	
6	125	1	1	0	0	13.3	(2/15)	0	12.5	(2/16)	
7	110	0	1	0	0	6.7	(1/15)	0	6.3	(1/16)	
8	105	0	0	0	1	6.7	(1/15)	1(+3)	12.5	(1/16)	
9	102	0	1	1	6	53.3	(8/15)	1(+1)	56.3	(9/16)	
10	94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	88	0	0	0	2	13.3	(2/15)	0	12.5	(2/16)	
12	81	0	0	0	1	6.7	(1/15)	0	6.3	(1/16)	
13	79	0	0	0	1	6.7	(1/15)	0	6.3	(1/16)	
14	77	0	1	0	5	40.0	(6/15)	0	25.0	(4/16)	
15	72	0	2	0	0	13.3	(2/15)	0	25.0	(4/16)	
16	71	1	0	0	1	13.3	(2/15)	0	12.5	(2/16)	
17	69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18	67	0	0	0	1	6.7	(1/15)	0	6.3	(1/16)	
19	65	0	0	0	1	6.7	(1/15)	0	6.3	(1/16)	
20	63	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	
21	62	0	1	0	1	13.3	(2/15)	0	12.5	(2/16)	
22	61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	60	1	1	0	1	20.0	(3/15)	0	18.8	(3/16)	
24	57	2	0	0	0	13.3	(2/15)	0	12.5	(2/16)	
25	55	0	1	0	0	6.7	(1/15)	0	6.3	(1/16)	
26	54	1	1	0	4	40.0	(6/15)	0	37.5	(6/16)	
27	52	0	1	2	1	26.7	(4/15)	1(+2)	31.3	(5/16)	
28	51	1	0	0	4	33.3	(5/15)	0	31.3	(5/16)	
29	50	0	1	2	5	60.0	(6/15)	1(+2)	43.8	(7/16)	
30	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
31	47	0	2	0	0	13.3	(2/15)	0	12.5	(2/16)	
32	45	0	1	3	5	60.0	(9/15)	1(+2)	62.5	(10/16)	
33	42	0	0	1	2	20.0	(4/15)	0	25.0	(4/16)	
34	41	0	0	1	2	20.0	(4/15)	1(+2)	31.3	(5/16)	
35	40	0	1	1	0	13.3	(2/15)	0	12.5	(2/16)	

(+4) : band ขนาดใหญ่ เข้มและชัดเจน

(+3) : band ขนาดกลาง และเข้ม

(+2) : band ขนาดเล็ก และเข้ม

(+1) : band ขนาดเล็ก และไม่เข้ม

ตารางที่ 13 Frequency (%) of grading reactions of individual antigenic component to antibodies of patients infected with *G. intestinalis* alone and *G. intestinalis* and *S.stercoralis* (Gi+Ss). (continued)

	Antigenic component	Number(s) of serum sample which gave reaction to antigenic component							
		<i>G. intestinalis</i> alone				%	Total	<i>Gi+Ss</i>	
		(+4)	(+3)	(+2)	(+1)			(1)	%
Mr						(n/15)	(1)	(n/16)	
36	39	0	0	0	0	0	0	0	0
37	38	0	1	1	0	13.3	(2/15)	0	12.5 (2/16)
38	37	0	2	0	2	26.7	(4/15)	1(+2)	31.3 (5/16)
39	36	2	2	3	3	66.7	(10/15)	0	62.5 (10/16)
40	35	1	1	1	0	20.0	(3/15)	1(+2)	25.0 (4/16)
41	31	1	3	2	6	80.0	(12/15)	1(+1)	81.3 (13/16)
42	29	2	0	1	3	40.0	(6/15)	1(+1)	43.8 (7/16)
43	28	1	0	1	3	33.3	(4/15)	1(+1)	31.3 (5/16)
44	26	1	1	3	3	53.3	(8/15)	1(+1)	56.3 (9/16)
45	25.5	0	1	0	0	6.7	(1/15)	0	6.3 (1/16)
46	25	1	2	0	1	26.7	(4/15)	0	25.0 (4/16)
47	24	14	0	1	0	100.0	(15/15)	1(+3)	100.0 (16/16)
48	23.2	0	0	1	1	13.3	(2/15)	0	12.5 (2/16)
49	22.2	1	0	0	7	53.3	(8/15)	0	50.0 (8/16)
50	20.6	1	0	0	0	6.7	(1/15)	0	6.3 (1/16)
51	20	9	2	2	2	100.0	(15/15)	1(4)	100.0 (16/16)
52	17.2	1	0	0	0	6.7	(1/15)	0	6.3 (1/16)
53	16	1	0	0	0	6.7	(1/15)	0	6.3 (1/16)
54	15	1	0	0	0	6.7	(1/15)	0	6.3 (1/16)
55	14.6	1	0	0	0	6.7	(1/15)	0	6.3 (1/16)

(+4) : band ขนาดใหญ่ เข้มและชัดเจน

(+3) : band ขนาดกลาง และเข้ม

(+2) : band ขนาดเล็ก และเข้ม

(+1) : band ขนาดเล็ก และไม่เข้ม

ตารางที่ 14 Frequency (%) of grading reactions of individual antigenic component to antibodies of patients infected with other parasitic infections and normal host

Antigenic component	Serum samples of patients with other parasitic infections excluding <i>G. intestinalis</i> infections (number of sample)													
	Bh (4)	Bh+Ib (1)	En (3)	En+Bh (1)	Eh (1)	Nom (2)	Ss (2)	Tn (2)	Gs (2)	Ac (2)	Ov (1)	HW (1)	AI (1)	Cp (1)
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	4 (+1)	1 (+1)	0	0	0	1 (+2)	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	3 (+1)	1 (+1)	1 (+2)	0	1 (+1)	0	0	0	1 (+1)	0	0	0
4	3 (+1)	0	0	0	0	0	1 (+1)	0	2 (+1)	0	1 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	1 (+3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	1 (+1)	0	0	0	0	0	1 (+1)	0	0	0	0	0
8	1 (+1)	0	1 (+4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	2 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1 (+2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1 (+4)	0	1 (+4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (+2)	0	0	0	0	0
16	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1 (+1)	0	0	0	0	0	1 (+2)	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (+)	0	0	0
19	2 (+1)	0	0	0	0	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1 (+1)	0	1 (+2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	1 (+1,+2)	0	0	0	0	1 (+3)	0	0	0	0	0	0	0	0
22	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (+1)	0	0	0	0
23	1 (+3)	0	0	0	0	2 (+1)	2 (+2)	0	0	2 (+1)	1 (+1)	1 (+2)	1 (+2)	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (+1)	1 (+1)	0	0	0
25	1 (+1)	0	1 (+4)	0	0	1 (+1)	1 (+1,+4)	0	0	0	0	0	0	0
26	2 (+1,+3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	3 (+1,+3,+4)	0	0	0	0	1 (+3)	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	1 (+1)	0	1 (+1)	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bh; *Blastocystis hominis*, BhIb; *B. butschlii*, En; *E. nana*, EnBh; *E. nana* + *B. hominis*, Eh; *Entamoeba histolytica*, Nom; Normal Healthy Thai and American, Ss; *S. stercoralis*, Tn; *Taenia* spp., Gn; *G. spingerum*, Ts; *T. spiralis*, Ac; *A. cantonensis*, Ov; *O. viverrini*, Hw; hook worm, Ai; *A. lumbricoides*, Cp; *C. philippinensis*.  
 (+4) : band ขนาดใหญ่ เข้มและชัดเจนน, (+3) : band ขนาดกลาง และเข้ม, (+2) : band ขนาดเล็ก และเข้ม, (+1) : band ขนาดเล็ก และไม่เข้ม

ตารางที่ 14 Frequency (%) of grading reactions of individual antigenic component to antibodies of patients infected with other parasitic infections and normal host

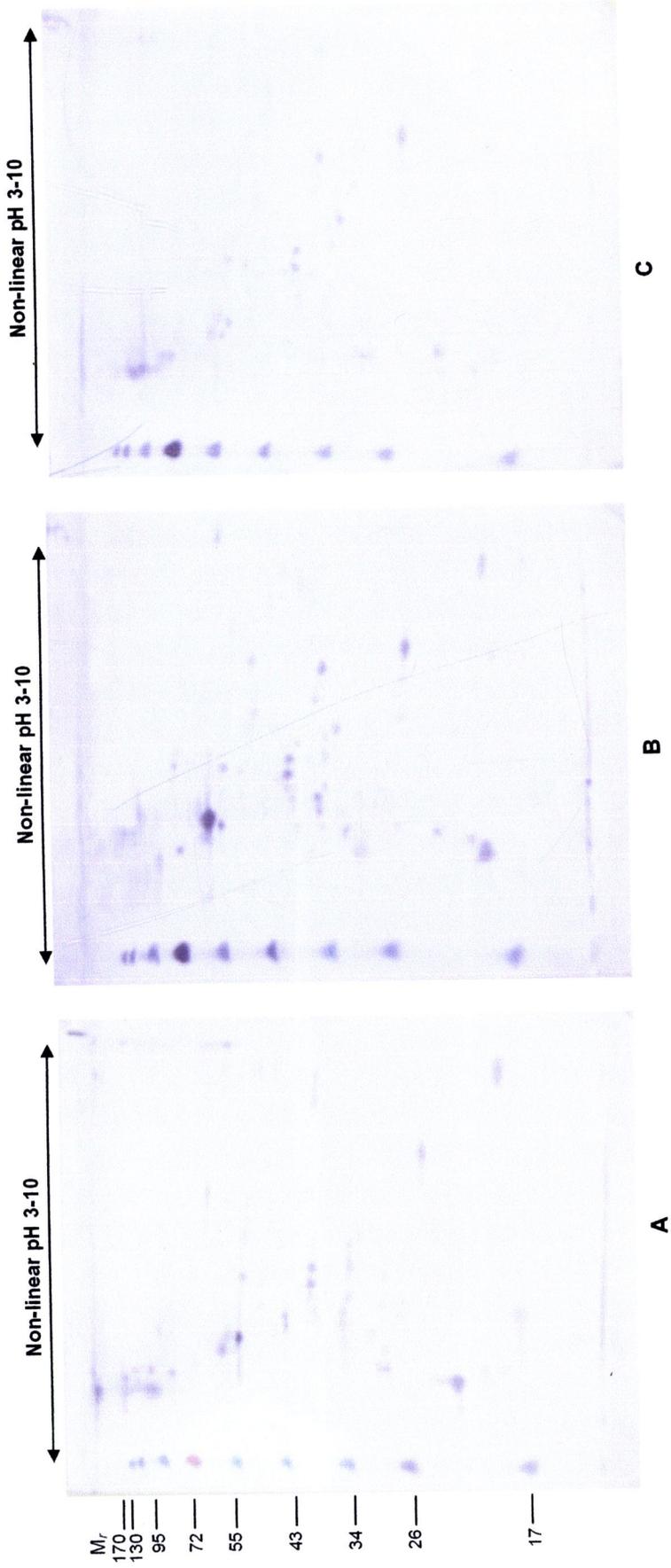
Antigenic component	Serum samples of patients with helminthic infections (number of sample)														
	Mr	Bh	Bh+Ib	En	En+Bh	Eh	Nom	Ss	Tn	Gs	Ac	Ov	Hw	Al	Cp
	(4)	(1)	(3)	(1)	(1)	(1)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(1)	(1)	(1)	(1)
29	1 (+1)	1 (+2)	2 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	2 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0
30	2 (+1)	0	0	0	0	0	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0
31	1 (+2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	1 (+2)	1 (+2)	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	1 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0
34	1 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	0	0	0	2 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0
36	1 (+1)	1 (+1)	0	0	0	0	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	1 (+1)	1 (+1)	0	0	0	0	2 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	4 (+1,+2,+4)	1 (+2)	1 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	0	2 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0
41	4 (+1,+2,+4)	1 (+1)	3 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0
42	1 (+1)	0	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	1 (+1)	0	0	0	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	1 (+4)	1 (+4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	3 (+4)	1 (+4)	3 (+1)	1 (+3)	1 (+3)	1 (+1)	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0
48	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	1 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	3 (+1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	4 (+1,+4)	1 (+3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bh; *Blastocystis hominis*, BhIb; *B. hominis* + *I. butschlii*, En; *E. nana*, EnBh; *E. nana* + *B. hominis*, Eh; *Entamoeba histolytica*, Nom; Normal Healthy Thai and American, Ss; *S. stercoralis*, Tn; *Taenia* spp., Gn; *G. spingerum*, Ts; *T. spiralis*, Ac; *A. cantonensis*, Ov; *O. viverrini*, Hw; hook worm, Al; *A. lumbricoideis*, Cp; *C. philippinensis*.

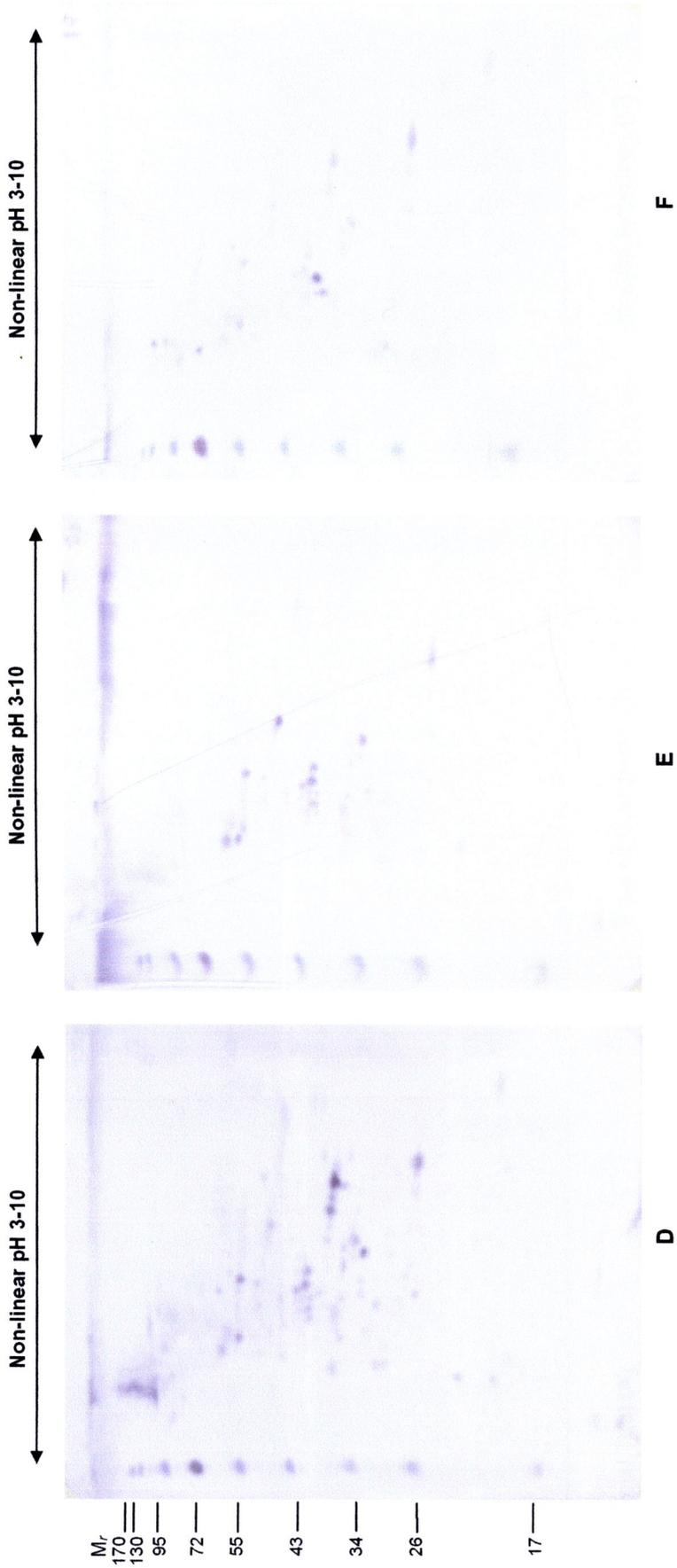
(+4) : band ขนาดใหญ่ เข้มและชัดเจนน, (+3) : band ขนาดกลาง และเข้ม, (+2) : band ขนาดเล็ก และเข้ม, (+1) : band ขนาดเล็ก และไม่เข้ม

## กิจกรรมที่ 7 การวิเคราะห์ชนิดโปรตีนของ *G. intestinalis* ที่คัดแยกได้

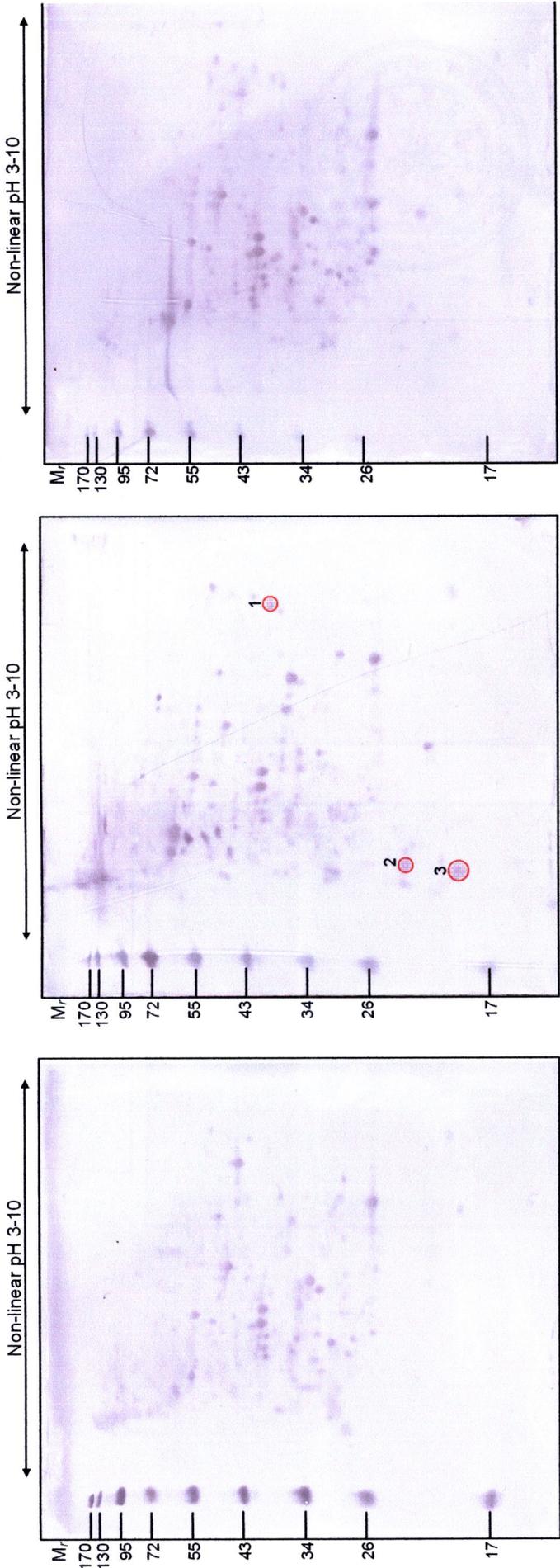
หลังจากการคัดแยกโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* แล้วทำการ identify โปรตีนที่สนใจจะดำเนินการ โดยใช้โปรแกรม bioinformatics information identify โปรตีน ด้วยวิธี liquid chromatography และ tandem mass spectrometer ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 15 โปรตีน 3 จุด ดังกล่าวคือ Carbamate kinase (*Giardia intestinalis* ATCC 50581); Beta tubulin (*Giardia intestinalis* ATCC 50803) และ Fructose-bisphosphate aldolase (*Giardia intestinalis* ATCC 50581)



รูปที่ 20 2-DE-immunoblotting of *G. intestinalis* protein lysate probed with individual serum of giardiasis patients (A, B, C)



รูปที่ 21 2-DE-immunoblotting of *G.intestinalis* protein lysate probed with individual serum of giardiasis patients (D, E, F)



**Normal Thai (A)**

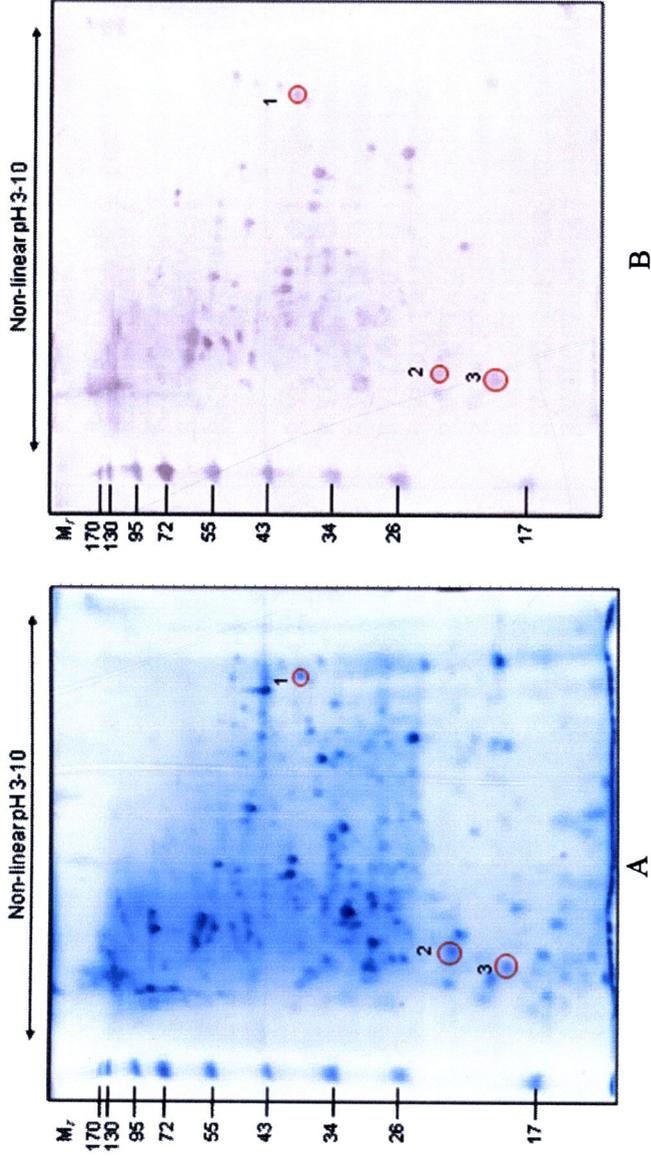
**Pooled Giardiasis (B)**

**Normal American (C)**

รูปที่ 22 2-DE-immunoblotting of *G. intestinalis* protein lysate probed with pooled serum of giardiasis patients (B) and probed with sera of normal Thai (A) and normal American (C) hosts

11% CBB stained gel

Pooled Giardia



รูปที่ 23 A: 2DE *G.intestinalis* protein homogenate, separated by IEF in a 7 cm long IPG strip containing narrow range pH gradient 3-10 NL followed by SDS-PAGE in a vertical 11% gel, stained with Coomassie Brilliant blue dye (CBB); B: 2-DE-immunoblotting of *G. intestinalis* protein lysate probed with pooled serum of giardiasis patients. Red circles indicate the representative protein spots corresponded to the proteins in gel plugs in the CBB stained gel which will be characterized by LC/MS-MS

