บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง

Giardia intestinalis เป็นโปรโตซัวก่อโรคที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็ก เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันและเรื้อรัง ลักษณะทางคลินิกหลากหลายตั้งแต่ไม่มีอาการแสดงจนกระทั่งรุนแรงถึงเสียชีวิตได้ การติดเชื้อ *Giardia* ในคนส่วนใหญ่เกิดจากการกินซีสต์ระยะติดต่อที่ปนเปื้อนมากับอาหารและน้ำดื่ม หรือการปนเปื้อนในแหล่งน้ำกินน้ำใช้[2, 33] Infectious dose ของโปรโตซัวนี้ค่อนข้างต่ำแม้ได้รับเพียง 10 cyst ก็สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในคน ดังนั้น ระบบสุขาภิบาลที่ดีของแหล่งน้ำและสุขอนามัยส่วนบุคคลจึงเป็นตัวบ่งชี้อัตราชุกของโรค giardiasis ในชุมชนนั้นๆ[34] ผู้วิจัยได้ดำเนินการสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในประชากรไทยด้วยการตรวจคัดกรองประชากรในกลุ่มต่างๆ เพื่อหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* การสำรวจนี้ทำให้ทราบถึงสถานะการณ์ความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในปัจจุบัน จากผลการศึกษาพบว่าในภาพรวมความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ลดลงอย่างมาก ยกเว้นในสถานเลี้ยงเด็กกำพร้าที่ยังมีความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในอัตราสูงไม่เปลี่ยนจากเดิมมากนัก เมื่อเทียบกับการศึกษาในปี 2546 ที่จังหวัดปทุมธานีซึ่งเป็นจังหวัดในเขตปริมณฑลของกรุงเทพมีอัตราชุกของเชื้อ *G. intestinalis* สูงถึงร้อยละ 37.7[14] ประชากรที่จังหวัดปทุมธานีนี้มีวิถีชีวิต สิ่งแวดล้อม ความเป็นอยู่คล้ายคลึงกับประชากรเขตชนบทของจังหวัดราชบุรี ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการสำรวจชุมชนมีอาสาสมัครเข้าร่วมทั้งเด็ก ผู้ใหญ่ และผู้สูงอายุ พบว่ามีอัตราชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* เพียง 4.1 % สะท้อนให้เห็นว่าระบบสุขาภิบาล การดูแลสุขอนามัย และการให้ความรู้ทางด้านสุขศึกษาในประเทศมีการพัฒนาดีขึ้น สำหรับอัตราชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในประชากรที่อาศัยอยู่ในเขตกรุงเทพมหานครพบเพียงร้อยละ 0.36 ซึ่งต่ำกว่าอัตราชุกในเขตชนบทดังกล่าวของจังหวัดราชบุรีถึงเกือบ 10 เท่า โดยวิถีชีวิตของคนเมืองโดยเฉพาะประชาชนที่อาศัยอยู่ในกรุงเทพจะมีระบบประปาที่ถูกสุขลักษณะ มีน้ำสะอาดใช้ในการบริโภคอุปโภค มีการบำบัดน้ำเสีย และกำจัดขยะที่มีประสิทธิภาพกว่าในเขตชนบท ขณะที่ประชาชนในชนบทส่วนใหญ่ยังอาบน้ำ ล้างถ้วยชาม และซักผ้าโดยใช้แหล่งน้ำธรรมชาติได้แก่ หนองน้ำ ลำคลอง และแม่น้ำเป็นต้น ซึ่งมักมีการปนเปื้อนของโปรโตซัวนี้ได้ง่าย ไม่ว่าจะมาจากคน สัตว์เลี้ยง และสัตว์ในธรรมชาติต่างๆ ที่ใช้แหล่งน้ำร่วมกันจึงน่าจะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในชนบทสูงกว่าเขตเมือง[2]

การศึกษาลักษณะทางโครงสร้างยีนของเชื้อ *Giardia* นอกจากเพื่อใช้วิเคราะห์สายพันธุ์แล้วยังมีประโยชน์ในการเข้าใจชีววิทยาของพยาธิโปรโตซัวนี้ รวมถึงชนิดของโฮสต์จำเพาะ ระบาดวิทยา กลไกการก่อโรค[2] แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันข้อมูลในประเทศไทยเกี่ยวกับการแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Giardia* ที่พบในคนและสัตว์ต่างๆ จากลักษณะทางโครงสร้างยีนยังมีน้อยมาก ในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาหาความหลากหลายทางโครงสร้างของยีนของ *Giardia* โดยนำตัวอย่างเชื้อ *G. intestinalis* ระยะ cyst ที่แยกได้จากผู้ที่มีการติดเชื้อแต่ละคนมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *G. intestinalis* ซึ่ง gene ที่ใช้ศึกษานี้คือ *ssrRNA* , *β - giardin*, *gdh* , และ *tpi* gene ใช้ *tpi*

gene แบบ one step PCR ในการแยก assemblages ของเชื้อ *G. intestinalis* โดย148 bp-*tpi* gene มีความจำเพาะต่อ assemblages A ในขณะที่ 81 bp-*tpi* มีความจำเพาะต่อ assemblages B[35] พบว่าวิธีนี้สามารถใช้แยก assemblage A และ B ได้ดี เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นวิธีที่มีความไวสูงมาก (sensitivity 100%) เมื่อเทียบกับ 2 step PCR ซึ่งใช้วิเคราะห์สารสกัด DNA จากตัวอย่างอุจจาระโดยตรง ในวิธีนี้แม้ว่าจะสะดวกกว่าที่ไม่ต้องแยกซีสต์จากตัวอย่างอุจจาระก่อนการตรวจวิเคราะห์แต่ต้องใช้ primer หลายชุด ขั้นตอนยุ่งยากกว่าและที่สำคัญมีความไวน้อยกว่า มีการรายงานว่าในการตรวจวิเคราะห์ sporadic cases มีความไวเพียงร้อยละ 94 สำหรับและสำหรับตัวอย่างที่พบในเนอสเซอรีมีความไวมีความไวเพียงร้อยละ 88[36] ผลการวิเคราะห์หา assemblage จากตัวอย่างต่างๆ ในการศึกษานี้พบว่าร้อยละ 8 (5 จาก 61) เป็น assemblage A และร้อยละ 51 (31 จาก 61) เป็น assemblage B และที่เหลือร้อยละ 41 (25 จาก 61) พบทั้ง assemblage A และ B เป็นที่ทราบกันดีว่า การติดเชื้อ *Giardia* นี้เป็นลักษณะ heterogenous คือ อาจพบการติดเชื้อ *Giardia* assemblages A-G genotype ได้ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับความเป็นจริงนี้เพราะพบว่าในบ้านเรามีการติดเชื้อ *Giardia* ทั้ง assemblage A และ assemblage B แต่พบแต่เฉพาะ 2 assemblage นี้เท่านั้น ไม่พบ assemblage อื่นๆ (assemblages C-G genotype) แต่มีการศึกษาในอินเดียที่รายงานว่าพบ *G. intestinalis* genotype เดียวกันทั้งในคนและสุนัขที่อยู่ในบ้านเดียวกัน แสดงว่ามีการติดต่อผ่านจากสัตว์สู่คน[19] เมื่อพิจารณาถึงผู้ที่มีการติดเชื้อแต่ assemblage A หรือ assemblage A+B ซึ่งมีทั้งหมด 30 คน เปรียบเทียบกับผู้ที่มีการติดเชื้อ *Giardia* assemblage B เพียงอย่างเดียวและติดเชื้อ *Giardia* assemblage B+A ที่มีจำนวนทั้งหมด 56 คน อัตราชุกของติดเชื้อ *Giardia* assemblage B จะเป็น 2 เท่าของติดเชื้อ *Giardia* assemblage A ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้ก็มีผลสอดคล้องเช่นเดียวกับอัตราชุกของติดเชื้อ *Giardia* ที่พบในบังคลาเทศ[37] ฟิลิปปินส์[38] อินเดีย[39] อังกฤษ[40] เนเธอร์แลนด์[41] และบราซิล[42] แต่แตกต่างจากข้อมูลที่รายงานมาจากประเทศเกาหลี[43] เม็กซิโก[44] ซึ่งพบ assemblage A มากกว่า assemblage B

การศึกษาวิเคราะห์ต่อถึงระดับชนิดของ sub-assemblages ใช้เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดย restriction enzyme โดยใช้ 384 bp-*β-giardin* และ432 bp-*gdh* segments เมื่อพิจารณาในระดับชนิดของ sub-assemblages ในกลุ่ม sub-assemblage A พบว่ามีเพียง 3 ราย (ร้อยละ 12) ที่เป็น sub-assemblage AI แต่ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 88) เป็น sub-assemblage AII ขณะที่ในกลุ่ม assemblage B มี 10 ราย (ร้อยละ 45.5) เป็น sub-assemblage BIII และ 12 ราย(ร้อยละ 54.5) เป็น sub-assemblage BIV มีรายงานก่อนหน้านี้ระบุว่า assemblage AI และ assemblage B (ไม่ระบุ sub-assemblage B) พบได้ในคนและโฮสต์หลากหลายชนิด ได้แก่ สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า แต่ขณะที่ sub-assemblage AII มักจะพบแต่ในคนเท่านั้น ดังนั้น ข้อมูลนี้บ่งชี้ได้ว่า assemblage AI และ assemblage B ในการศึกษานี้อาจจะเกิดจากการติดเชื้อผ่านสัตว์ได้เนื่องจาก sub-assemblage AII เป็นการติดเชื้อในคนเท่านั้น

แม้ว่ายังไม่มีหลักฐานชัดเจนถึงความสัมพันธ์ของ assemblage และ sub-assemblage กับอาการทางคลินิกของโรค giardiasis แต่ในการศึกษานี้ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 8) พบว่าผู้ที่มีการติดเชื้อ sub-assemblage AI ไม่ว่าจะเป็น sub-assemblage AI + sub-assemblage BIII หรือ sub-assemblage AI + sub-assemblage BIV ก็มีอาการในระบบทางเดินอาหาร ส่วนในผู้ป่วยรายที่ 18 แม้มีอาการในระบบทางเดินอาหารนั้นพบว่ามีการติดเชื้อ *Giardia* sub-assemblage AII + BIII ไม่ใช่ sub-assemblage AI การตรวจอุจจาระพบการติดเชื้อทั้ง *G. intestinalis* และ *Blastocystis hominis* แม้ว่า *B. hominis* จัดเป็นเพียง potential pathogen ก็อาจจะเป็นสาเหตุของอาการแสดง เช่น ปวดท้อง คลื่นไส้อาเจียนและท้องเสียได้ เพราะผู้ที่มีการติดเชื้อ *Giardia* sub-assemblage AI อีก 2 รายที่เหลือมีอาการแสดงในระบบทางเดินอาหารมีการติดเชื้อเฉพาะ *G. intestinalis* ไม่มีการติดเชื้อร่วมของจุลชีพอื่น

ในงานวิจัยนี้พบว่าผู้ที่มีการติดเชื้อ *Giardia* ที่มี sub-assemblage BIII (ทั้งหมด 7 ราย) ไม่ว่าจะเป็น sub-assemblage BIII เพียงอย่างเดียว หรือ sub-assemblage AI+BIII หรือ assemblage AII+BIII มีอาการแสดงทางระบบทางเดินอาหารได้ ในจำนวน 7 รายนี้ 4 รายมีการติดเชื้อเฉพาะ *G. intestinalis* ไม่มีการติดเชื้อร่วมของจุลชีพอื่น แต่ 3 รายที่เหลือ มีการติดเชื้อ *Giardia* ร่วมกับการติดเชื้อ *B. hominis* (ผู้ป่วยรายที่ 18) *Endolimax nana* (ผู้ป่วยรายที่ 52) และพยาธิปากขอ (ผู้ป่วยรายที่ 55) ไม่เป็นที่สงสัยว่า *B. hominis* และพยาธิปากขอ อาจเป็นสาเหตุของอาการแสดงการในผู้ป่วยเหล่านี้ได้ ส่วน *E.nana* จัดเป็น non pathogenic protozoa ที่คงไม่ใช่สาเหตุของอาการแสดงดังกล่าว ดังนั้น จากผู้ป่วย 5 ในจำนวน 7 รายที่ตรวจพบ sub-assemblage BIII อาจสรุปได้ว่า sub-assemblage BIII น่าจะเป็นสาเหตุของอาการแสดงในผู้ป่วยเหล่านี้ได้ แต่อย่างไรก็ดี ลักษณะอาการทางคลินิกที่ก่อให้เกิดความรุนแรงนั้นเป็นความสัมพันธ์ของ host และ อาจเป็นปัจจัยจากโฮสต์หรือปัจจัยจากปรสิตก็ได้ รวมถึง susceptibility ของโฮสต์ด้วย ดังนั้นการศึกษาหารายละเอียดของ antigen จากปรสิตจะเป็นตัวบ่งชี้สำคัญถึงโอกาสในการติดเชื้อ การศึกษาถึงระดับ molecule ของเชื้อจะช่วยให้ข้อมูลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

เมื่อพิจารณารายละเอียดของผู้ที่มีอาการทางคลินิกที่อาศัยอยู่ในกรุงเทพ (จำนวน 5 ราย) พบว่า มีผู้ป่วยรายเดียว (ร้อยละ 20) เป็นเด็กซึ่งมีอายุเพียง 9 ขวบ แต่ผู้ป่วยอีกที่ 4 รายจะมีอายุ 38, 50, 54 และ 66 ปี ในทางตรงกันข้ามอาการทางคลินิกที่พบในอาสาสมัครจากเขตชนบทในจังหวัดราชบุรีมักเป็นเด็ก อายุ ระหว่าง 2- 7ปี (ร้อยละ 92, 12 ในจำนวน 13 ราย) มีผู้สูงอายุเพียงรายเดียวอายุ 50 ปี การศึกษานี้พบว่าข้อมูลนี้คล้ายคลึงกับที่มีรายงานพบในประเทศอื่นๆ ที่อาการแสดงทางคลินิกของผู้ติดเชื้อ *Giardia* มักจะพบในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยและสูงอายุ[34,35] สามารถอธิบายได้ว่าโอกาสในการติดเชื้อโปรโตซัวนี้มีความ สัมพันธ์กับอายุและภาวะการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่พัฒนาเต็มที่ ในขณะที่ในวัยเด็กภาวะการตอบสนองของภูมิคุ้มกันยังพัฒนาไม่เต็มที่ แต่

ในผู้สูงอายุภูมิคุ้มกันกลับเริ่มลดลงตามวัยที่มากขึ้น ในระหว่างการติดเชื้อ *Giardia* นี้อาจจะมีการผลิต antigen ที่ซับซ้อนหลายชนิด มีผลไปกระตุ้นการตอบสนองในลักษณะต่างๆ ของโฮสต์ได้แก่ secretory IgA หรือ non immunological factor[45] เช่น protease เป็นต้น เมื่อระยะ trophozoite ของ *Giardia* สามารถต้านทานกับภูมิคุ้มกันได้ ร่วมกับการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมในลำไส้ของโฮสต์ได้ *Giardia* อาจผลิต *Giardia* lectin[46] สารที่ส่งเสริมให้เกิดการเกาะของพยาธิกับผนังลำไส้ดี *Giardia* ก็จะสามารถเจริญเติบโต มีการเพิ่มจำนวนและก่อโรคได้ จากข้อมูลและความสัมพันธ์ที่กล่าวมานี้เห็นได้ชัดว่ายังมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมในรายละเอียดระดับโมเลกุลเกี่ยวกับการติดเชื้อปรสิตนี้ ผลการศึกษาเกี่ยวกับ genotype ที่แยกได้จากเชื้อ *Giardia* ที่พบในคนไทยนี้ยังช่วยให้ข้อมูลที่สามารถแสดงให้เห็นความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิก ในอายุต่างๆกันด้วย

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะของเชื้อไกอาร์เดีย ซึ่งจับกับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยโดยใช้เทคนิคโปรติโอมิกส์และอิมมูโนมิกส์ ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry เพื่อวิเคราะห์หาชนิดโปรตีนซึ่งสัมพันธ์กับการตอบสนองของโฮสต์ในระหว่างการติดเชื้อนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้โปรตีนที่เป็น specific antigen ที่สามารถใช้เป็นต้นแบบของ vaccine หรือการพัฒนายาที่ใช้ในการรักษา เพราะ antibody ที่ร่างกายสร้างขึ้นมาต้องมีความจำเพาะต่อโปรตีนนั้นๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการติดเชื้อ แม้ว่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อโปรตีนดังกล่าวมานาน แต่มีความชัดเจนและก้าวหน้าน้อย ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ขึ้นมาก มีรายงานว่า specific antigen ที่สำคัญมีอยู่ระหว่าง 155-170 kDa, 30-34 kDa และอาจจะเล็กถึง 8 kDa ที่เกาะอยู่กับ fatty acid[47] ในการศึกษานี้โปรตีนที่สนใจได้คัดเลือกมา 3 จุด จากการวิเคราะห์ได้โปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้คือ Carbamate kinase (*Giardia intestinalis* ATCC 50581); Beta tubulin (*Giardia intestinalis* ATCC 50803) และ Fructose-bisphosphate aldolase (*Giardia intestinalis* ATCC 50581) ซึ่งโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 30-50 kDa (ดังแสดงในตารางที่ 15) ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา[32,45,46] จึงน่าจะเป็นโปรตีนสำคัญที่สามารถจะทำการศึกษาต่อเนื่องต่อไป

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบระหว่างแผนงานวิจัยที่เสนอไว้ในโครงการกับงานวิจัยที่ดำเนินการแล้ว

กิจกรรม/ขั้นตอนดำเนินงาน	ปีที่ 1		ปีที่ 2		ปีที่ 3	
	1-6	7-12	1-6	7-12	1-6	7-12
1. วางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้น ในการเก็บข้อมูลและการ ติดต่อ อาสาสมัคร	←→					
2. คัดแยก *G.intestinalis* cyst จากอาสาสมัคร จากตรวจ วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้นและเก็บไว้ที่ -40^0 C เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการต่อไป	←→	←→				
3. คัดแยก *G.intestinalis* สายพันธุ์ที่ก่อให้โรคในคนไทย		←→	←→			
4. สกัด DNA และทำ DNA Sequencing ตรวจหาโครงสร้างยีนของเชื้อและภาวะ polymorphisms ของแต่ละสายพันธุ์			←→	←→		
5. ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจาก *G.intestinalis* trophozoite ที่พบในคน ด้วยเทคนิคทาง proteomics					←→	←→
6. รวบรวมข้อมูลทั้งหมด ตรวจสอบความถูกต้องเพื่อวิเคราะห์ และเขียนรายงาน						←→

หมายเหตุ ←→ **แผนงานวิจัยที่เสนอไว้ในโครงการ**

←→ **แผนกับงานวิจัยที่ดำเนินการแล้ว**

ผู้วิจัยสามารถดำเนินการวิจัยได้ดังแผนที่กำหนดไว้ คิดเป็นร้อยละ 100 ของแผนงานทั้งหมด

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงอัญชลี ตั้งตรงจิตร

หัวหน้าโครงการวิจัย