ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245544

RSA5080006 รศ.พญ.อัญชลี ตั้งตรงจิตร

**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

**โครงการ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของเชื้อ *Giardia intestinalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาและโปรติโอมิกส์**

**(The study of genetic diversities of *Giardia intestinalis* isolated from human clinical specimens using molecular and proteomics approaches)**

**(สัญญาเลขที่ RSA 5080006)**

**โดย**

**รศ. พญ. อัญชลี ตั้งตรงจิตร และคณะ**

**ภาควิชาปรสิตวิทยา**

**คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล**

b00250799

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

# โครงการ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของเชื้อ *Giardia intestinalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาและโปรติโอมิกส์

**(The study of genetic diversities of *Giardia intestinalis* isolated from human clinical specimens using molecular and proteomics approaches)**

โดย

**รศ. พญ. อัญชลี ตั้งตรงจิตร และคณะ**

**ภาควิชาปรสิตวิทยา**

**คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล**

**มีนาคม พ.ศ. 2554**

**(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)**

สัญญาเลขที่ RSA 5080006

# รายงานฉบับสมบูรณ์

---

โครงการ : การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของเชื้อ *Giardia intestinalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาและโปรติโอมิกส์ **(The study of genetic diversities of *Giardia intestinalis* isolated from human clinical specimens using molecular and proteomics approaches)**


| คณะผู้วิจัย | สังกัด |
|---|---|
| รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง อัญชลี ตั้งตรงจิตร | ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล |
| อาจารย์ ดร. นิทัศน์ สุขรุ่ง | สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล |
| รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงดาราวรรณ วนะชิวนาวิน | ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล |
| นายพันธ์พบ เลิศลายต่วน | ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล |



สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากผู้เกี่ยวข้องหลายฝ่าย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.วันเพ็ญ ชัยคำภา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ได้ให้ความคำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคต่างๆ ทางห้องปฏิบัติการ และการดำเนินการวิจัย ดร.ยุวพร สากลวารี คุณสุกัญญา กวางษี ผู้ช่วยวิจัยในโครงการ และคุณสมชาย ภู่ด้วง ภาควิชาโภชนศาสตร์เขตร้อนและวิทยาศาสตร์อาหาร คณะเวชศาสตร์เขตร้อนที่ออกเก็บตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ได้ให้ความร่วมมือช่วยเหลือเป็นอย่างดีจนงานวิจัยนี้สำเร็จได้สมความมุ่งหมาย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมืออย่างดีในการให้ข้อมูล ส่งตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ และการให้ตัวอย่างเลือด

ขอขอบคุณคณะกรรมการพิจารณาเกี่ยวกับการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ส่งเสริมให้คณะผู้วิจัยได้มีโอกาสทำการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณ ศ.ดร.รังสรรค์ ตั้งตรงจิตร และรศ.เบญจลักษณ์ ผลรัตน์ ภาควิชาโภชนศาสตร์เขตร้อนและวิทยาศาสตร์อาหาร คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ที่ได้ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์และแปลผลทางสถิติ คุณมนสิชา สุขชม เจ้าหน้าที่การเงินประจำโครงการ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ได้ให้ความร่วมมือช่วยเหลือเป็นอย่างดีจนงานวิจัยนี้สำเร็จได้

งานวิจัยเรื่องนี้ไม่อาจสำเร็จได้ ถ้าขาดการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ตลอดจนบุคลากรจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ประสานงาน ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำเป็นอย่างดีตลอดการดำเนินงาน คณะผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

# สารบัญเรื่อง


| | | หน้า |
|---|---|---|
| **กิตติกรรมประกาศ** | | iii |
| **สารบัญเรื่อง** | | iv |
| **สารบัญตาราง** | | vi |
| **สารบัญรูป** | | viii |
| **บทคัดย่อ** | | xi |
| **Abstract** | | xiii |
| **บทที่ 1** | **บทนำ** | 1 |
| **บทที่ 2** | **รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย** | |
| | ความสำคัญและที่มาของปัญหา | 5 |
| | วัตถุประสงค์ของโครงการ | 7 |
| | ขอบเขตการวิจัย | 8 |
| **บทที่ 3** | **วิธีดำเนินการวิจัย** | |
| | ระเบียบวิธีวิจัย | 9 |
| | แผนการดำเนินงานการวิจัย | 11 |
| **บทที่ 4** | **รายละเอียดของการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย** | |
| | กิจกรรมที่ 1 การวางแผนปฏิบัติงานวิจัยเบื้องต้น | 14 |
| | กิจกรรมที่ 2 การขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน | 14 |
| | กิจกรรมที่ 3 การสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *Giardia intestinalis* | 15 |

# สารบัญเรื่อง (ต่อ)


| | | หน้า |
|---|---|---|
| | กิจกรรมที่ 4 การคัดแยก *G. intestinalis* cyst | 19 |
| | กิจกรรมที่ 5 Molecular analysis of *G.intestinalis* isolations | 21 |
| | กิจกรรมที่ 6 การศึกษาโปรตีนของ *G. intestinalis* โดยวิธีทางโปรติโอมิกส์และอิมมูโนมิกส์ | 40 |
| | กิจกรรมที่ 7 การวิเคราะห์ชนิดโปรตีนของ *G. intestinalis* ที่คัดแยกได้ | 66 |
| **บทที่ 5** | **อภิปรายผลการทดลอง** | 72 |
| **บทที่ 6** | **เอกสารอ้างอิง** | 77 |
| **บทที่ 7** | **Output จากโครงการวิจัย** | 81 |
| | ภาคผนวก : Publication | 83 |

# สารบัญตาราง


| | | หน้า |
|---|---|---|
| ตารางที่ 1 | Recognized species and hosts of *Giardia* species | 2 |
| ตารางที่ 2 | แผนภูมิแสดงขั้นตอนและระยะเวลาในการทำการวิจัย | 12 |
| ตารางที่ 3 | ผลงานความก้าวหน้าของการวิจัยที่ดำเนินการแล้ว | 13 |
| ตารางที่ 4 | ผลการสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *Giardia intestinalis* ในประชากรแหล่งต่างๆ | 18 |
| ตารางที่ 5 | Oligonucleotide primers used in this study | 29 |
| ตารางที่ 6 | PCR conditions for amplifications of *ssrRNA*, *β-giardin, gdh* and *tpi* segments | 30 |
| 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 | 34 |
| ตารางที่ 8 | Assemblages/sub-assemblages of the *G. intestinalis* cysts of patients with gastro-intestinal disturbances whose stool samples contained *G. intestinalis* cysts only or with other potential pathogen(s) and the patients'age | 36 |
| ตารางที่ 9 | ผลการสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *Giardia intestinalis* ในประชากรจากกรมพลาธิการทหารบก และสถานสงเคราะห์บ้านปากเกร็ด (เด็กชาย) | 41 |
| ตารางที่ 10 | รายละเอียดและจำนวนตัวอย่างซีรัมที่ใช้ในงานวิจัย | 54 |
| 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 | 55 |
| ตารางที่ 12 | Serum samples of patients with helminthic infections which contained antibodies reactive to antigenic components of *Giardia intestinalis* trophozoite antigens | 60 |

# สารบัญตาราง (ต่อ)


| | | หน้า |
|---|---|---|
| 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). | 62 |
| ตารางที่ 14 | Frequency (%) of grading reactions of individual antigenic component to antibodies of patients infected with other parasitic infections and normal hosts | 64 |
| ตารางที่ 15 | The selected protein spots [as marked with red circles in Fig 23] characterized by LC/MS-MS | 71 |
| ตารางที่ 16 | การเปรียบเทียบระหว่างแผนงานวิจัยที่เสนอไว้ในโครงการกับงานวิจัยที่ดำเนินการแล้ว | 76 |

# สารบัญรูป


| | | หน้า |
|---|---|---|
| รูปที่ 1 | Light and transmission electron microscope of *Giardia intestinalis in situ* | 2 |
| รูปที่ 2 | Life cycle of *Giardia intestinalis* | 3 |
| รูปที่ 3 | กรอบแนวความคิดของการศึกษาวิจัย | |
| รูปที่ 4 | ภาพแสดงการคัดแยก *G.intestinalis cyst* ด้วยวิธี sucrose floatation | 20 |
| รูปที่ 5 | Genomic DNA Extraction Kit และ genomic DNA ของ *Giardia* ที่สกัดแล้ว | 22 |
| รูปที่ 6 | การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction | 23 |
| รูปที่ 7 | PCR amplicons of ssrRNA gene (292 bp). | 31 |
| รูปที่ 8 | PCR amplicons of ß- giardin gene segments (753 bp). | 32 |
| รูปที่ 9 | PCR amplicons of ß-giardin gene segments (384 bp). | 33 |
| รูปที่ 10 | PCR amplicons of ß-giardin, ssrRNA, gdh, and tpi gene segments. | 37 |
| รูปที่ 11 | DNA banding patterns (RFLP) of the 384 bp *β-giardin* gene amplicons cut by the *Hha*I restriction endonuclease. | 38 |
| รูปที่ 12 | DNA banding patterns (RFLP) of the 432 bp-*gdh* amplicons cut by the *Rsa*I restriction endonuclease. | 39 |
| รูปที่ 13 | ภาพกิจกรรมในการประเมินภาวะทั่วไปและภาวะทางโภชนาการของเด็กที่สถานสงเคราะห์บ้านปากเกร็ด สังกัดกรมประชาสงเคราะห์ กระทรวงแรงงานและสวัสดิการสังคม จังหวัดนนทบุรี เมื่อวันที่ 15 กันยายน 2552 ซึ่งได้เข้าไปตรวจอุจจาระหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* ที่จะนำมาใช้ในการศึกษาวิจัย | 43 |

# สารบัญรูป (ต่อ)


| | | หน้า |
|---|---|---|
| รูปที่ 14 | ภาพกิจกรรมในการตรวจสุขภาพที่สถานสงเคราะห์บ้านปากเกร็ด สังกัดกรมประชาสงเคราะห์ กระทรวงแรงงานและสวัสดิการสังคม จังหวัดนนทบุรี เมื่อวันที่ 15 กันยายน 2552 ซึ่งได้เข้าไปตรวจอุจจาระเพื่อหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* ที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย | 44 |
| 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. | 49 |
| รูปที่ 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 | 50 |
| รูปที่ 17 | Immunoblot patterns of *G. intestinalis* antigen from 11% separating gel showing reactive antigenic component with antibodies of protozoan infection hosts comparing to that of normal host | 51 |
| รูปที่ 18 | Immunoblot patterns of *G. intestinalis* antigen from 8% separating gel showing reactive antigenic components with antibodies of parasitic infection hosts. | 52 |
| รูปที่ 19 | Immunoblot patterns of *G. intestinalis* antigen from 8% separating gel showing reactive antigenic components with antibodies of parasitic infection hosts and normal hosts. | 53 |
| รูปที่ 20 | 2-DE-immunoblotting of *G. intestinalis* protein lysate probed with individual serum of giardiasis patients (A, B, C) | 67 |
| รูปที่ 21 | 2-DE-immunoblotting of *G. intestinalis* protein lysate probed with individual serum of giardiasis patients (D, E, F) | 68 |

# สารบัญรูป (ต่อ)


หน้า

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 69

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 70

# บทคัดย่อ

**รหัสโครงการ :** สัญญาเลขที่ RSA 5080006

**ชื่อโครงการ :** การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของเชื้อ *Giardia intestinalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาและโปรติโอมิกส์

**ชื่อนักวิจัย :** รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงอัญชลี ตั้งตรงจิตรและคณะ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

**E-mail Address :** siatc@mahidol.ac.th

**ระยะเวลาโครงการ :** กรกฎาคม 2550 - มีนาคม 2554

245544

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหา (1)ความชุกและ (2) ความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของการติดเชื้อไกอาร์เดียที่พบในประชากรไทย และ (3) โปรตีนที่จำเพาะของเชื้อไกอาร์เดียสายพันธุ์ที่แยกได้จากในคนไทย ผลการสำรวจความชุกของการติดเชื้อไกอาร์เดียในประชากรไทยกลุ่มต่างๆ เช่น เด็กที่มีความบกพร่องทางสมอง เด็กในสถานเลี้ยงเด็กกำพร้า เจ้าหน้าที่ทหาร ผู้ป่วยในโรงพยาบาล เด็กและประชากรที่มีภูมิลำเนาต่างจังหวัด เป็นต้น พบว่ามีอัตราชุกของการติดเชื้อไกอาร์เดียร้อยละ 0.37-19.05 อัตราการติดเชื้อไกอาร์เดียสูงที่สุดยังคงพบในสถานเลี้ยงเด็กกำพร้า

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไกอาร์เดียวิเคราะห์จากระยะซีสต์ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่ตรวจพบการติดเชื้อไกอาร์เดียจากจำนวนอาสาสมัคร 7,536 รายที่เข้าร่วมโครงการนี้วิจัย จากอาสาสมัคร 6,018 รายเป็นผู้ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลศิริราชระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2549- กรกฎาคม พ.ศ. 2550 พบผู้ที่มีการติดเชื้อไกอาร์เดียเพียง 22 ราย (0.36%) ในการสำรวจชุมชนเขตชนบทของจังหวัดราชบุรีในเดือนกันยายน พ.ศ. 2550 พบการติดเชื้อไกอาร์เดีย 39 ราย (4.1%) จากประชากร 949 ราย การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไกอาร์เดีย (assemblage genotype) ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนทีพีไอ (tpi) ที่ขนาด 148-bp และ 81-bp พบว่าร้อยละ 8 เป็นแอสเซ็มเบลจเอ (assemblage A) ร้อยละ 41 เป็นแอสเซ็มเบลจเอและบี (assemblage A & B) และร้อยละ 51 เป็นแอสเซ็มเบลจบี (assemblage B) จากนั้นทำการศึกษาต่อด้วยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP) การใช้อาร์เอฟแอลพีของยีน $\beta$-giardin ขนาด 384 bp พบว่าร้อยละ 12 ของแอสเซ็มเบลจเอเป็น แอสเซ็มเบลจเอ 1 (AI) และร้อยละ 88 ของแอสเซ็มเบลจเอเป็นแอสเซ็มเบลจเอ 2 (AII) ส่วนการใช้อาร์เอฟแอลพีของยีนจีดีเอช (gdh gene) ขนาด 432 bp พบว่า

245544

ร้อยละ 45.5 ของแอสเซ็มเบลจบี (B) เป็น แอสเซ็มเบลจเอบี 3 (BIII) และร้อยละ 54.5 ของแอสเซ็มเบลจบีเป็น แอสเซ็มเบลจบี 4 (BIV)

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะของเชื้อไกอาร์เดียซึ่งจับกับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยโดยใช้เทคนิคโปรติโอมิกส์และอิมมูโนมิกส์ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปคโตรเมตรี (mass spectrometry) พบโปรตีน 3 ชนิดคือ Carbamate kinase (*Giardia intestinalis* ATCC 50581); Beta tubulin (*Giardia intestinalis* ATCC 50803) และ Fructose-bisphosphate aldolase (*Giardia intestinalis* ATCC 50581)

ผลการศึกษานี้พบว่าความชุกของการติดเชื้อไกอาร์เดียในประเทศไทยลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ สะท้อนให้เห็นว่าระบบสุขาภิบาล การดูแลรักษาสุขอนามัย การให้ความรู้ทางสุขภาพในปัจจุบันมีการพัฒนาดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มจำนวนยีนโดยใช้ยีนทีพีไอที่ขนาด 148-bp และ 81-bp มีความไวสูงกว่าที่มีเคยรายงานมาแล้วเพราะสามารถวิเคราะห์ได้ทุกตัวอย่างของสิ่งส่งตรวจ โปรตีนที่ตรวจพบนี้เป็นแอนติเจนจำเพาะของเชื้อไกอาร์เดีย ซึ่งน่าจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นวัคซีนใช้ในการรักษาและวิธีการตรวจวินิจฉัยทางวิทยาภูมิคุ้มกันต่อไป

**คำหลัก :** *Giardia intestinalis,* genotyping, PCR, ssrDNA, $\beta$-giardin, glutamate dehydrogenase (gdh), triose phosphate isomerase (tpi), proteomics, 2D-PAGE

# Abstract

**Project Code :** RSA 5080006

**Project Title :** The study of genetic diversities of *Giardia intestinalis* isolated from human clinical specimens using molecular and proteomics approaches

**Investigators :** Associate Professor Dr. Anchalee Tungtrongchitr *et.al*
Department of Parasitology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital,
Mahidol University

**E-mail Address :** siatc@mahidol.ac.th

**Project Period :** July 2007 – March 2011

245544

This study was undertaken to determine (1) the infection rates of Giardiasis (2) their genetic diversities among Thai population and (3) the specific protein of *G. intestinalis* isolated from Thai patients. Our result showed that the prevalence of giardial infections among various groups *i.e.* mental handicapped children, orphanages, army staffs, hospital patients and the people living in rural communities ranged from 0.37 to 19.05%. The highest *G. intestinalis* infection rate (19.05%) was found in the orphanage inhabitants.

Genetic diversities were verified from the cyst isolated from positive samples. A total of 7,536 subjects were included. Among 6,018 Bangkok inhabitants who visited Siriraj Hospital during December 2006 to July 2007, only 22 subjects (0.36%) were microscopically positive for *Giardia* cysts. Out of 949 subjects from the community survey in Ratchaburi province conducted in September 2007, 39 subjects (4.1%) were infected with *G. intestinalis*. Cyst assemblage determination by PCR of the 148- and 81-bp tpi gene segments were 8 % assemblage A, 41 % assemblages A and B, and 51 % assemblage B. RFLP of 384 bp $\beta$-giardin gene segments revealed that 12 % and 88 % of the assemblage A cysts were AI and AII, respectively. RFLP based on the 432 gdh gene segments showed the assemblage B cysts to be 45.5 % BIII and 54.5 % BIV.

To characterize the specific antigens, the proteins of *G. intestinalis* trophozoite binding to antibodies in the patients' serum had been investigated using 2D-PAGE Western

245544

blots. Three discovered protein spots which were further identified by mass spectrometry were Carbamate kinase (*Giardia intestinalis* ATCC 50581); Beta tubulin (*Giardia intestinalis* ATCC 50803) and Fructose-bisphosphate aldolase (*Giardia intestinalis* ATCC 50581).

Our result reveals that the prevalence of giardiasis in Thailand is much lower than previously reported which reflects improved sanitary conditions, health care, and health education during recent years. In addition, the sensitivity of tpi gene amplification is slightly higher than those previously reported and assemblages of all the samples could be identified based on the 148- and 81-bp gene segments. Those identified proteins were specific antigens of *G. intestinalis* might be utilized not only for vaccine candidates but also targets of immunodiagnosis.

**Keywords :** *Giardia intestinalis,* genotyping, PCR, ssrDNA, $\beta$-giardin, glutamate dehydrogenase (gdh), triose phosphate isomerase (tpi), proteomics, 2D-PAGE