

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนแอนไซโลสโตมาซีครีตโปรตีนชนิดที่ 2 ของ
พยาธิปากขอชนิดนี้เคเตอร์อเมริกันส์ในประเทศไทย

นายเจริญชัย อึ้งเจริญสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

SEQUENCE ANALYSIS OF THE *ANCYLOSTOMA* SECRETED PROTEIN-2
GENE OF *Necator americanus* IN THAILAND

Mr. Jaroenchai Ungcharoensuk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Parasitology

Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนแอนไซโลสโตมาซีครีต โปรตีนชนิดที่ 2 ของพยาธิปากขอชนิดนี้เคเตอร์ อเมริกันสีในประเทศไทย
โดย	นายเจริญชัย อึ้งเจริญสุข
สาขาวิชา	ปรสตีวิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิริวิบูลยชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงศักดิ์ ลิ้มปิติตติกุล)

เจริญชัย อึ้งเจริญสุข : การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนแอนไซโลสโตมาซีครีโตโปรตีนชนิดที่ 2 ของพยาธิปากขอชนิดนี้เคเตอร์อเมริกันในประเทศไทย. (SEQUENCE ANALYSIS OF THE ANCYLOSTOMA SECRETED PROTEIN-2 GENE OF *Necator americanus* IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพิทย, 101 หน้า.

ในปัจจุบันมีผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อและเป็นโรคพยาธิปากขอสูงถึง 600 ถึง 700 ล้านคนทั่วโลก สามารถคำนวณเป็นจำนวนปีที่สูญเสียไปอันเนื่องมาจากการตายก่อนวัยอันควรหรือจำนวนปีที่สูญเสียไปจากภาวะทุพพลภาพหรือเสื่อมสมรรถภาพ (DALY) ประมาณ 1.83 ล้าน DALY ต่อปี พยาธิปากขอชนิด *Necator americanus* มีอัตราสูงและการแพร่กระจายมากกว่าร้อยละ 85 ของการติดเชื้อพยาธิปากขอทั่วโลก โดยการสูญเสียเลือดในลำไส้จากการติดเชื้อพยาธิปากขอมาสู่การเกิดโรคโลหิตจางและภาวะทุพพลภาพโดยการโดยเฉพาะในเด็กซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการด้านสติปัญญา ยาฆ่าพยาธิปากขอเป็นวิธีที่ได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคพยาธิเป็นส่วนใหญ่อย่างไรก็ตามถึงแม้ยาฆ่าพยาธิจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดพยาธิแต่กลับพบการติดเชื้อพยาธิปากขอซ้ำในอัตราสูงหลังจากการรักษาภายในช่วงเวลาไม่กี่เดือน ด้วยสาเหตุนี้ทำให้มีการแสวงหามาตรการอื่นเพื่อป้องกันโรคพยาธิปากขอรวมทั้งการผลิตวัคซีน โปรตีน *Ancylostoma secreted protein-2* (ASP-2) ของเชื้อพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนสำหรับป้องกันโรคพยาธิปากขอ โดยมีข้อมูลยืนยันประสิทธิภาพของโปรตีน ASP-2 จากพยาธิปากขอซึ่งได้มีการศึกษาทดลองในสัตว์พบว่าสามารถลดจำนวนตัวอ่อนพยาธิปากขอที่เจริญเติบโตเป็นระยะตัวเต็มวัยได้ส่งผลให้จำนวนไข่ที่ปนออกมากับอุจจาระลดลงรวมทั้งลดการสูญเสียเลือดในลำไส้ โปรตีน ASP-2 จากพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 21.3 กิโลดาลตัน เรียกว่า *Na-ASP-2* จากการศึกษาพบว่ายีน *Na-ASP-2* มีกรดอะมิโนทั้งหมด 210 ตัวซึ่งอ้างมาจาก clone cDNA โดยความหลากหลายของยีน *Na-ASP-2* ในระดับนิวคลีโอไทด์ยังไม่มีการสำรวจจากประชากรพยาธิปากขอตามธรรมชาติมาก่อนซึ่งถ้าโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีนมี epitope ที่แตกต่างไปจากโปรตีนของพยาธิปากขอในประชากรที่ติดเชื้อโดยทั่วไป อาจทำให้วัคซีนมีประสิทธิภาพลดลงซึ่งเป็นอุปสรรคในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคพยาธิปากขอ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนชนิด *N. americanus* ทั้งหมด 32 ตัวอย่าง (ผู้ที่ติดเชื้อ 1 คนต่อตัวอ่อนพยาธิ 1 ตัว) จากผู้ป่วยที่มีเชื้อพยาธิปากขอจากจังหวัดตาก ราชบุรีและนครศรีธรรมราช แต่ละตัวอย่างได้มาจากการเพาะเลี้ยงให้เป็นระยะตัวอ่อนเพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอและทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *Na-ASP-2* ในแต่ละตัวอย่างโดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ใช้ Primers ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ในฐานข้อมูล GenBank Database ของยีน *Na-ASP-2* คือ accession number AY288089 จากการวิเคราะห์ผลทาง PCR พบว่าในแต่ละตัวอย่างมีขนาดประมาณ 2kb หรือ 2,000 bp ซึ่งมีขนาดยาวกว่า cDNA และในส่วนของยีนที่เพิ่มขึ้นมานั้นอาจเป็นส่วนของ intron โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ใน GenBank Database กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA และ genomic DNA จากที่ได้ทำการศึกษาพบว่ายีน *Na-ASP-2* ประกอบด้วย exon 8 ส่วน และ intron 7 ส่วน โดยในบริเวณระหว่างรอยต่อ exon และ intron ได้เป็นไปตาม GT/AG rule ซึ่งในส่วน intron พบได้ในยีนจำพวกเซลล์แบบยูคาริโอต และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* จำนวน 32 ตัวอย่าง พบความหลากหลายในส่วน intron 4 ส่วนจากทั้งหมด 7 ส่วน และในส่วน exon พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เพียง 3 ตำแหน่ง ซึ่งอยู่ใน 3 ส่วนจากทั้งหมด 8 ส่วน โดยมีเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด ส่วน 2 ตำแหน่งไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด ดังนั้นจะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* ที่ได้มาจากตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนของคนมีหลากหลายอยู่ในระดับต่ำ จากข้อมูลนี้จึงน่าจะเป็นข้อสนับสนุนในการนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานของการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคพยาธิปากขอต่อไปได้

ภาควิชา ปรสตีวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา ปรสตีวิทยาทางกรแพทย์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา 2554..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5274763030 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORDS : Hookworm / *Necator americanus* / Na-ASP-2 / Vaccine candidate

JAROENCHAI UNGCHAROENSUK : SEQUENCE ANALYSIS OF THE *ANCYLOSTOMA* SECRETED PROTEIN-2 GENE OF *Necator americanus* IN THAILAND. ADVISOR : PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D, Ph.D, CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. CHATURONG PUTAPORNTIP, Ph.D., 101 pp.

It has been estimated that 600 million to 700 million people are infected with hookworms, resulting in about 1.83 million disability adjusted life years (DALY). Although there are two major anthropophilic hookworm species, *Necator americanus* is the most prevalent and widely distributed accounting for more than 85% of total infections worldwide. Intestinal blood loss is the main pathological consequences caused by hookworm infections, leading to iron deficiency anemia and protein malnutrition. Importantly, chronic hookworm infections in children can impair neurological and cognitive functions, precluding educational achievement. Despite the availability of various strategies to control hookworms, such as administration of anthelmintic drugs and improved sanitation in endemic communities, development of vaccines against hookworms will substantially enhance other control measures. One of the attractive candidates for a hookworm vaccine is a protein expressed at the larval stage, designated *Ancylostoma* secreted protein-2 (ASP-2). Experimental studies in dogs and hamsters reveal that ASP-2-derived immunogens could induce specific antibodies that reduce adult worm burdens, fecal egg counts and host blood loss upon challenge infections with infective larvae. Furthermore, anti-ASP-2 antibodies could elicit inhibitory effects on larval migration through tissue. The ASP-2 homologue has been identified in *N. americanus* designated Na-ASP-2, a 21.3 kDa secreted protein. Previous studies have shown that Na-ASP-2 possesses 210 amino acids as inferred from the cDNA clone. However, the extent of antigenic polymorphism in Na-ASP-2 has not been explored among natural parasite isolates, an issue that could compromise vaccine efficacy if strain-specific immunity ensues. Herein, 32 stool samples containing hookworm ova from asymptomatic individuals living in Tak, Nakorn Srithammarat and Ratchaburi Provinces were recruited for analysis. Each stool sample was subject to polythelene tube culture to generate rhabditid larvae for subsequent DNA extraction. The Na-ASP-2 gene from each isolate was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers derived from the 5' and 3' ends of the Na-ASP-2 cDNA sequence available in the GenBank database (accession number AY288089). Results showed that the PCR amplified products of each isolate measure 2 kb that was 2000 bp longer than the cDNA sequence, indicating that the Na-ASP-2 gene possesses introns. Comparing with cDNA sequence in the Ganbank database and 1 newly determined cDNA sequences in this study, 7 introns and 8 exons were identified in the Na-ASP-2 locus. Sequence analysis has revealed a consensus GT and AG at the 5' and the 3' boundary of each intron akin to those found in other eukaryotic genes. Of 32 sequences analyzed, size variation was observed in 4 of 7 introns whereas 3 single nucleotide polymorphism occurred in 3 exons of the gene, 2 of which were synonymous substitutions and one was nonsynonymous substitutions. Therefore, sequence conservation in the Na-ASP-2 gene indicates the lack of antigenic polymorphism in this protein among natural human isolates and encourages vaccine incorporation.

Department : Parasitology..... Student's Signature

Field of Study : Medical Parasitology..... Advisor's Signature

Academic Year : 2011..... Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาประวัติศาสตร์วิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ข้อแนะนำในการแก้ปัญหาต่างๆ ในการศึกษาวิจัยและให้ความเมตตากรุณาต่อข้าพเจ้าเป็นอย่างดี ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้และเสนอแนะเทคนิคจนถึงสนับสนุนความคิดเห็นต่างๆ ในการศึกษาวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดียิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิทธีเจริญชัย ภาควิชาประวัติศาสตร์วิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกรียงศักดิ์ ลิ้มปิติพิบูล ภาควิชากุมารเวชศาสตร์เซตรัอน คณะเวชศาสตร์เซตรัอน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณอุรัสยา พัฒนวงศ์ คุณทวีศักดิ์ แซ่เตีย คุณธงชัย หงส์ศรีเมือง ภาควิชาประวัติศาสตร์วิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำและความช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาประวัติศาสตร์วิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือต่างๆ ตลอดจนความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัย สุดทำยนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา พี่น้อง และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ คำปรึกษาและให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
อนุกรมวิธานของพยาธิปากขอ	4
วงจรชีวิตของพยาธิปากขอ.....	5
สัณฐานวิทยาของพยาธิปากขอชนิด <i>N. americanus</i> และ <i>A. duodenale</i>	6
การกระจายทางภูมิศาสตร์และที่มาของการแพร่กระจายเชื้อพยาธิปากขอ.....	12
อาการทางคลินิก.....	14
พยาธิกำเนิดหรือกลไกทางชีวเคมีของพยาธิปากขอ.....	16
การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อพยาธิปากขอ.....	18
การวินิจฉัยโรคพยาธิปากขอ.....	19
การรักษาโรคพยาธิปากขอ.....	21
การป้องกัน.....	21
วัคซีนป้องกันโรคพยาธิปากขอ.....	22
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
รูปแบบการวิจัย.....	26
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	26
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	26
ขนาดของกลุ่มประชากร.....	26

บทที่	หน้า
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	27
การเก็บตัวอย่างอุจจาระ.....	31
การตรวจอุจจาระด้วยวิธี Simple smear และ Formalin-ether concentration technique	31
การเพาะเลี้ยงไขพยาธิ.....	32
การเตรียมตัวอย่างตัวพยาธิเพื่อสกัดดีเอ็นเอ.....	33
การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ.....	33
การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA (cDNA synthesis).....	35
การออกแบบ oligonucleotides สำหรับใช้เป็น PCR Primer.....	36
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	38
การตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี gel electrophoresis	38
การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ.....	39
4. ผลการทดลอง.....	41
ผลการตรวจหาเชื้อปรสิตในอุจจาระภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	41
ผลการเพาะเลี้ยงพยาธิปากขอระยะตัวอ่อน.....	43
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>Na-ASP-2</i> จาก genomic DNA โดยอาศัย ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	45
เปรียบเทียบยีน <i>Na-ASP-2</i> ที่ได้จาก genomic DNA กับ cDNA.....	48
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>Na-ASP-2</i> จากตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัว อ่อน.....	51
ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์พยาธิปากขอระยะตัว อ่อนชนิด <i>N. americanus</i> ที่เป็น genomic DNA.....	53
ผลการวิเคราะห์ลักษณะอัลลีลที่พบในยีน <i>Na-ASP-2</i>	62
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	68
รายการอ้างอิง.....	73
ภาคผนวก.....	77
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	101

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงผลของอุณหภูมิต่อไข่และตัวอ่อนพยาธิปากขอชนิด <i>N. americanus</i> และ <i>A. Duodenale</i>	9
2.	แสดงการแบ่งระดับความรุนแรงของโรคพยาธิปากขอจากตรวจอุจจาระ.....	19
3.	แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ได้ส่งอุจจาระและผลการตรวจปรสิต.....	42
4.	แสดงผลการเพาะเลี้ยงพยาธิปากขอ.....	44
5.	แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่มีผลทาง PCR.....	51
6.	แสดงตัวอย่างของยีน <i>Na-ASP-2</i> ในตำแหน่งที่เกิดการแทนที่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตัวอ่อนพยาธิ) บริเวณเฉพาะ exon เทียบกับฐานข้อมูล GenBank Database accession number AY288089.....	53
7.	แสดง Haplotypes of <i>Na-ASP-2</i> among field and published sequences.	63

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงวงจรชีวิตของเชื้อพยาธิปากขอ.....	5
2. แสดงลักษณะไข่พยาธิปากขอ.....	6
3. แสดงลักษณะช่องปาก (buccal cavity) ของตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่ 1...	7
4. แสดงลักษณะของตัวอ่อนระยะที่ 3 (filariform larva).....	8
5. แสดงลักษณะภายในของช่องปากพยาธิปากขอ	11
6. แสดงการกระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อพยาธิปากขอในคน.....	13
7. แสดงการใส่เข้าสู่ผิวหนังของตัวอ่อนพยาธิปากขอ.....	14
8. แสดงตำแหน่งของ primer ต่างๆ ของยีน <i>Na-ASP-2</i> ในรูปของ genomic DNA ที่ใช้ในทำ PCR และในขั้นตอนการหาลำดับเบส.....	36
9. แสดงลักษณะระยะตัวอ่อนพยาธิปากขอชนิด <i>A. duodenale</i> และ <i>N. americanus</i>	44
10. แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ของ genomic DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis.....	46
11. แสดงกระบวนการ transcription and translation ในยูคาริโอต.....	47
12. แสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างผลิตภัณฑ์ PCR ของ genomic DNA กับ cDNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis.....	48
13. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Na-ASP-2</i> ที่มาจาก genomic DNA.....	49
14. แสดงตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Na-ASP-2</i> ที่มาจาก genomic DNA.	49
15. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Na-ASP-2</i> บริเวณเฉพาะ exon เทียบกับฐานข้อมูล GenBank Database accession number AY288089.....	54
16. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intron 1.....	56
17. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intron 2.....	56
18. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intron 3.....	57
19. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intron 4.....	58
20. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intron 5.....	59
21. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intron 6.....	60

ภาพที่		หน้า
22.	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intron 7.....	60
23.	แสดงตำแหน่งของแต่ละอัลลีลตามลักษณะความแตกต่าง.....	66

บทที่ 1

บทนำ

พยาธิปากขอ (Hookworm) จัดเป็นหนอนพยาธิตัวกลมในลำไส้ (intestinal roundworm) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดการเจ็บป่วยกับประชากรโดยเฉพาะในเขตร้อนขึ้นทั่วโลก โดยก่อให้เกิดโรคโลหิตจางเนื่องจากขาดธาตุเหล็ก การสูญเสียเลือดเรื้อรังในลำไส้และเกิดภาวะทุพโภชนาการในผู้ที่ติดเชื้อ ส่งผลให้เกิดความเจ็บป่วยและการเสียชีวิตตามมา รวมถึงยังเป็นโรคที่ก่อให้เกิดผลกระทบทางตรงต่อสุขภาพของประชากรและทางอ้อมต่อประสิทธิภาพในการทำงาน ซึ่งมีผลต่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศ จากสาเหตุดังกล่าวโรคพยาธิปากขอจึงจัดว่าเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขและสุขภาพที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ต้องมีการแก้ไข ตามที่องค์การอนามัยโลกได้ให้ความสำคัญกับวิธีป้องกันแก้ไขปัญหาด้านสุขภาพของประชากรเพื่อที่จะสามารถนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งในการแก้ไขปัญหาความยากจนที่เกิดขึ้นกับประชากรทั่วโลกซึ่งเป็นผลมาจากความเจ็บป่วยและความตาย เป้าหมายที่นำมาแก้ไขที่สำคัญอย่างหนึ่งคือการป้องกันโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ โดยมุ่งเน้นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส HIV/AIDS มาลาเรีย และกลุ่มของโรคที่ถูกกละเลยที่พบในเขตร้อน (neglected tropical diseases) ซึ่งมีทั้งการติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิตหลายชนิด (สมชาย จงวุฒิวินัย และคณะ, 2554) โดยสามารถคำนวณเป็นจำนวนปีที่สูญเสียไปอันเนื่องมาจากการตายก่อนวัยอันควรหรือจำนวนปีที่สูญเสียไปจากภาวะทุพพลภาพหรือเสื่อมสมรรถภาพ (disability-adjusted life year หรือ DALY) พบว่าการติดเชื้อ HIV/AIDS ทำให้เกิดการสูญเสียประมาณ 84.5 ล้าน DALY ต่อปี ส่วนโรคมาลาเรียมีการสูญเสียประมาณ 46.5 ล้าน DALY ต่อปี ในขณะที่โรคติดเชื้อปรสิตรวมกันอย่างเดียวโดยไม่นับโรคมาลาเรียมีการสูญเสียประมาณ 43.5 ล้าน DALY ต่อปี (Hotez *et al.*, 2008)

กลุ่มของโรคที่ถูกกละเลยที่พบในเขตร้อน (neglected tropical diseases) มักเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อปรสิตจำพวกหนอนพยาธิจำนวน 7 โรค ได้แก่ โรคพยาธิไส้เดือน (ascariasis) โรคพยาธิเส้นด้าย (trichuriasis) โรคพยาธิปากขอ (hookworm disease/infection) โรคพยาธิเท้าช้างในระบบทางเดินน้ำเหลือง (lymphatic filariasis) โรคพยาธิเท้าช้างที่ทำให้ตาบอดได้ (onchocerciasis) โรคพยาธิกินนี (draculiasis) และโรคพยาธิใบไม้เลือด (schistosomiasis) (Bethony *et al.*, 2011) โดยโรคเหล่านี้มักไม่ทำให้ผู้ติดเชื้อถึงแก่ชีวิตแต่เป็นสาเหตุให้เกิดความเจ็บป่วยเรื้อรังซึ่งอาจส่งผลให้เกิดสภาวะความยากจนตามมาและยังพบว่ามีความเสี่ยงที่จะเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น เอเชีย แอฟริกา ทางแถบอเมริกากลางและอเมริกาใต้

ซึ่งความเรื้อรังของโรคที่เกิดขึ้นนั้นมีผลกระทบต่อสภาวะทางร่างกายและจิตใจ เช่น ในเด็กทำให้เกิดภาวะทุพโภชนาการซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการด้านสติปัญญาในการเรียนรู้ต่ำกว่าเด็กปกติทั่วไป นอกจากนี้การติดเชื้อพยาธิปากขอหรือพยาธิไส้เ็นในปริมาณมากส่งผลให้เกิดโรคโลหิตจางตามมาได้ และยังมีผลรุนแรงในสตรีมีครรภ์อาจเสี่ยงต่อการแท้งหรือความไม่สมบูรณ์ของทารกแรกเกิด โดยพบว่าการติดเชื้อพยาธิปากขอในสตรีมีครรภ์ทั่วโลกมีประมาณ 44 ล้านคน (Bundy et al., 1995) นอกจากนี้การติดเชื้อปรสิตยังมีผลต่อภาวะเศรษฐกิจของประเทศโดยเฉพาะในกลุ่มผู้ใช้แรงงานในส่วนของภาคอุตสาหกรรมส่งผลให้เกิดความเจ็บป่วยทางด้านร่างกายของผู้ใช้แรงงานอันเนื่องมาจากภาวะทุพโภชนาการและโลหิตจาง ผู้ป่วยเกิดสภาวะเจ็บป่วยเรื้อรังจนไม่สามารถทำงานได้หรือทำงานไม่ได้ตามเป้าหมายที่วางไว้ ด้วยสาเหตุนี้จึงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญอย่างยิ่งที่จะต้องมีการแก้ไขปัญหาสุขภาพที่เกิดขึ้นกับประชากรทั่วโลก

โรคพยาธิปากขอ (hookworm disease/infection) มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อพยาธิปากขอ (hookworm) ซึ่งจัดเป็นปรสิตจำพวกหนอนพยาธิตัวกลมในลำไส้จัดอยู่ใน phylum Nematoda, class Rhabditea, order Strongyloidea, family Ancylostomatidae, genus *Necator* และ *Ancylostoma* ทั้ง 2 genus สามารถพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด อาทิ *Necator americanus* (Stiles, 1902) และ *Ancylostoma duodenale* (Dubini, 1843) พบได้ในคน พยาธิปากขอก่อให้เกิดโรคกับคนเป็นจำนวนมากและกระจายอยู่ทั่วโลกในปัจจุบันมีผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อและเป็นโรคพยาธิปากขอสูงถึง 600 ล้านคนทั่วโลก (Bethony et al., 2006) โดยผู้ที่เป็โรคพยาธิปากขอมักเจ็บป่วยเรื้อรังมากกว่าเสียชีวิต ซึ่งโรคพยาธิปากขอเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคโลหิตจางเนื่องจากการเสียเลือดจนขาดธาตุเหล็ก หากมีอาการซีดมากๆเด็กอาจจะมีปัญหาที่ป ในผู้ใหญ่ถ้ามีอาการรุนแรงอาจทำให้เกิดอาการหัวใจวายได้ จากการสำรวจการระบาดของพยาธิปากขอพบการแพร่ระบาดอย่างมากในเด็กที่อาศัยอยู่ในประเทศเขตร้อน (Hotez et al., 2003) ผลของการเกิดโรคพยาธิปากขอในเด็กนอกจากจะทำให้ขาดธาตุเหล็กแล้วยังส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตช้า มีการพัฒนาการที่เชื่องช้าในด้านความรู้และความจำ (Lozoff et al., 1991; Harrison et al., 2001; Jones และ Cappello, 2004) รวมถึงทำให้เกิดโรคปัญญาอ่อนและการตายในเด็ก สำหรับประเทศไทยโรคพยาธิปากขอยังคงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญซึ่งได้มีการดำเนินงานควบคุมโรคพยาธิปากขอมาเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตามอัตราการติดเชื้อและความเจ็บป่วยจากโรคพยาธิปากขอยังคงมีแนวโน้มลดลงไปไม่มาก ในปัจจุบันโรคพยาธิปากขอจึงได้ถูกจัดอยู่ในงานควบคุมโรคหนอนพยาธิโดยเป็นงานหนึ่งของแผนงานป้องกันและควบคุมโรคติดต่อซึ่งอยู่ในแผนพัฒนาการสาธารณสุขแห่งชาติ ฉบับที่ 10 ของกรมควบคุมโรค กระทรวง

สาธารณสุขโดยมีเป้าหมายหาพื้นที่และกลุ่มที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ แก้ปัญหาการแพร่กระจายเชื้อ โรครวมถึงการให้ความรู้กับชุมชน (ฐิติมา วงศาโรจน์ และคณะ, 2552)

แม้ว่าการติดเชื้อพยาธิปากขอสามารถรักษาได้โดยการให้ยาฆ่าพยาธิ แต่หลังจากให้ยารักษา มักพบการติดเชื้อพยาธิปากขอซ้ำ (re-infection) ในอัตราสูงขณะที่อยู่ในช่วงติดตามการรักษาไม่กี่เดือน (Albonico et al., 1995) จากปัญหาดังกล่าวทำให้มีการแสวงหามาตรการอื่นเพื่อควบคุมโรคพยาธิปากขอรวมทั้งการพัฒนาวัคซีน จากการศึกษาในปัจจุบันพบโปรตีนที่สำคัญ 3 ชนิดที่เข้าเป็นองค์ประกอบของวัคซีนและพบว่ามีความสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของตัวอ่อนพยาธิไปยังอวัยวะต่างๆ ลดจำนวนไข่ที่ปนออกมากับอุจจาระรวมถึงลดการสูญเสียเลือด ได้แก่ Ac (*A. caninum*) -ASP-2, Na (*N. americanus*) -ASP-2, Na-GST-1 หลังจากทำการเลือกโปรตีน Na-ASP-2 เป็นองค์ประกอบของวัคซีนซึ่งคาดว่าจะสามารถนำไปใช้ควบคุมพยาธิปากขอในคนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่การระบาดของโรค จากการทดลองในหนูพบว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิด IgG หลังจากให้วัคซีน และสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของตัวอ่อนพยาธิปากขอไปที่ลำไส้ ซึ่งจากการตรวจพยาธิปากขอภายในลำไส้พบว่าพยาธิปากขอลดลง 30-46.2 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ต่อจากนั้นได้ทำการศึกษาในคนระยะ Phase 1 เพื่อประเมินประสิทธิภาพความปลอดภัยจากการทดลองในผู้ใหญ่จำนวน 36 คนที่ไม่ติดเชื้อพยาธิปากขอและอาศัยอยู่ในสหรัฐอเมริกา แบ่งกลุ่มให้ได้รับวัคซีนจริงและวัคซีนปลอมโดยใช้โปรตีน Na-ASP-2 เป็นองค์ประกอบของวัคซีน ร่วมกับ Alhydrogel ฉีดเข้ากล้ามเนื้อในวันที่ 1, 56 และ 112 ของการทดลองจากนั้นได้ทำการสังเกตจนครบ 6 เดือน พบว่าเกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิด IgG เพิ่มมากขึ้นต่อ Na-ASP-2 และมีการเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนปลอม แสดงว่าสามารถป้องกันความรุนแรงของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิปากขอและคาดว่าจะสามารถลดจำนวนพยาธิที่เข้าสู่ลำไส้และเจริญเป็นระยะตัวเต็มวัยได้ (Diemert et al., 2008)

แม้ว่า Na-ASP-2 มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันหรือลดความรุนแรงของโรคพยาธิปากขอ แต่ถ้าโปรตีนดังกล่าวมีความหลากหลายของ epitope แตกต่างกันในประชากรพยาธิปากขอ ดังนั้นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีนที่ได้มาจาก epitope ที่ต่างไปจากโปรตีนของพยาธิปากขอในประชากรที่ติดเชื้อ อาจส่งผลให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของคนต่อวัคซีนไม่มีผลในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิปากขอ ดังนั้นการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน Na-ASP-2 จากพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* ที่พบได้ในผู้ที่ติดเชื้อของประชากรทั่วไปจึงเป็นประโยชน์ในการเป็นข้อมูลพื้นฐานของการพัฒนาวัคซีนสำหรับการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อพยาธิปากขอต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

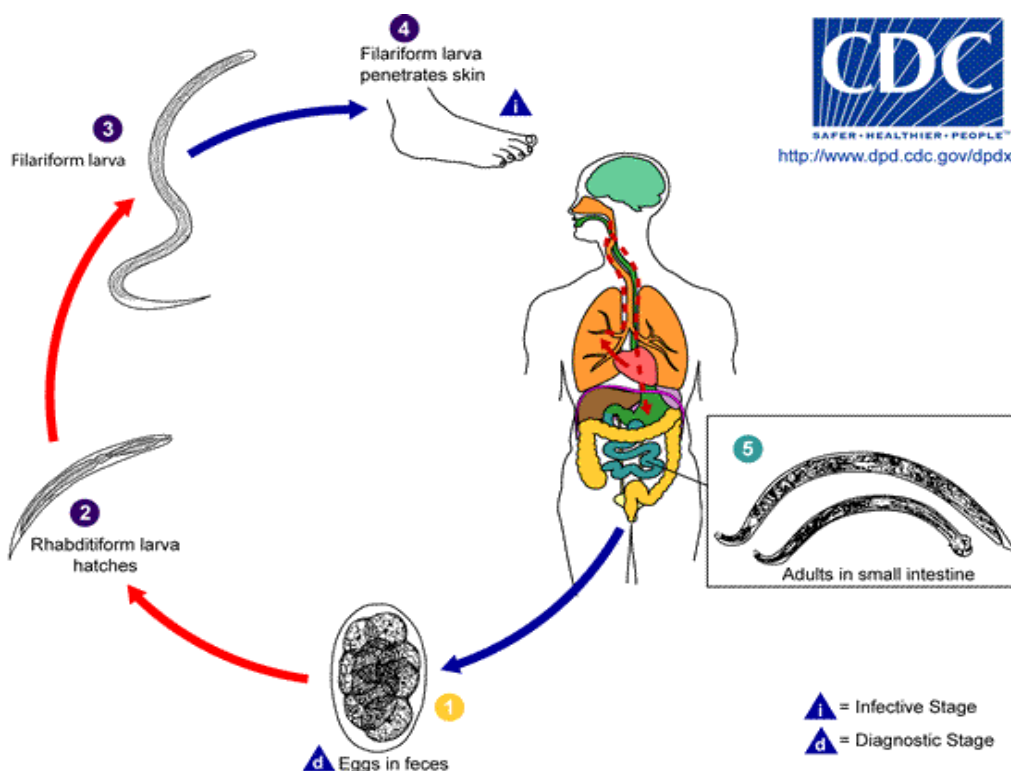
อนุกรมวิธานของพยาธิปากขอ

พยาธิปากขอ (hookworm) เป็นปรสิตจำพวกหนอนพยาธิตัวกลมในลำไส้จัดอยู่ใน
phylum Nematoda,
class Rhabditea,
order Strongyloidea,
family Ancylostomatidae,
genus *Necator* และ *Ancylostoma*

พยาธิปากขอทั้ง 2 genus สามารถพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด อาทิ *Necator americanus* (Stiles, 1902) และ *Ancylostoma duodenale* (Dubini, 1843) พบได้ในคน, *Ancylostoma braziliense* (de Faria, 1910) และ *Ancylostoma ceylanicum* (Looss, 1911) พบในแมว แต่เคยมีรายงานพบ *A. ceylanicum* ในคนจากประเทศอินเดีย (Chowdhury และ Schad, 1972) และฟิลิปปินส์ (Velasquez and Cabrera, 1968) ส่วน *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1858; Hall, 1913) เป็นปรสิตที่พบในสุนัข พยาธิปากขอที่พบได้ในสุนัขและแมวเมื่อติดต่อกับคนอาจทำให้เกิดโรค cutaneous larva migrans หรือ creeping eruption ได้ (Beaver et al., 1984)

วงจรชีวิตของพยาธิปากขอ

พยาธิปากขอที่มีความสำคัญทางการแพทย์มี 2 ชนิด คือ *N. americanus* และ *A. duodenale* เป็นพยาธิที่มีวงจรชีวิตสมบูรณ์โดยไม่ต้องอาศัยโฮสต์ตัวกลาง (ดังแสดงในภาพที่ 1) ซึ่งมีช่วงหนึ่งในวงจรชีวิตที่เจริญบนพื้นดินจึงจัดเป็น soil-transmitted helminth ส่วนใหญ่มีการติดต่อสู่คนด้วยการไชเข้าสู่ผิวหนังโดยตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่สามเป็นระยะติดต่อ (infective 3rd stage larva) แล้วเจริญเติบโตเป็นระยะตัวเต็มวัยในลำไส้เล็กของคนหลังจากนั้นพยาธิปากขอจะใช้ฟัน (teeth) หรือแผ่นฟัน (cutting plate) เกาะติดกับผนังลำไส้เล็กและดูดเลือดเป็นอาหาร ตัวเมียจะออกไข่ปนมากับอุจจาระเมื่อไชตกลงสู่พื้นดินได้รับความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ตัวอ่อนจะออกจากไข่และเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่หนึ่ง (rhabditiform larva, L1) ต่อมาตัวอ่อนจะมีการลอกคราบอีก 2 ครั้ง เป็นตัวอ่อนระยะที่สอง (rhabditiform larva, L2) และตัวอ่อนระยะที่สามซึ่งเป็นระยะติดต่อ (filariform larva, L3) ตามลำดับ ตัวอ่อนระยะที่สามนี้จะอาศัยอยู่ตามพื้นดินเพื่อรอโอกาสเข้าสู่ร่างกายคนโดยการไชทะลุผิวหนังตรงบริเวณง่ามเท้าและง่ามมือ (Beaver et al., 1984)

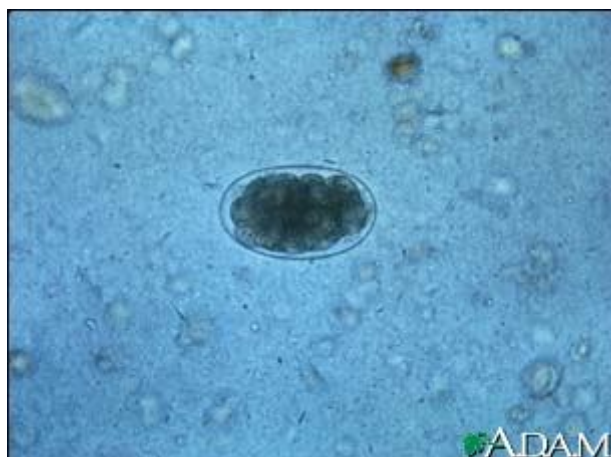


ภาพที่ 1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อพยาธิปากขอ (www.dpd.cdc.gov)

สัณฐานวิทยาของพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* และ *A. duodenale*

1. สัณฐานวิทยาของไข่พยาธิปากขอ (Hookworm egg)

ไข่ของพยาธิปากขอทั้ง 2 ชนิด คือ *N. americanus* และ *A. duodenale* ไม่มีลักษณะจำเพาะที่จะสามารถแยกออกจากกันได้ ไข่พยาธิมีขนาดเฉลี่ย 60 x 40 ไมครอน มีลักษณะรูปร่างกลมรี (oval) หัวมนท้ายมน เปลือกบางใสไม่มีสี ไม่มีเยื่อหุ้มชั้นนอก แต่มี true shell และ vitelline membrane หุ้มอยู่ (ดังแสดงในภาพที่ 2) ไข่ที่ออกมากับอุจจาระใหม่ๆ ภายในไข่จะยังไม่มีการพัฒนาเป็นตัวอ่อน หลังจากผ่านไป 2-3 ชั่วโมงภายในไข่จะมีการแบ่งเซลล์มากขึ้นและจะเจริญเป็นตัวอ่อน (Beaver et al., 1984; Gilman, 2000) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการฟักไข่พยาธิปากขอชนิด *A. duodenale* คือ 15-35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียสสำหรับ *N. americanus* (ดังแสดงในตารางที่ 1)

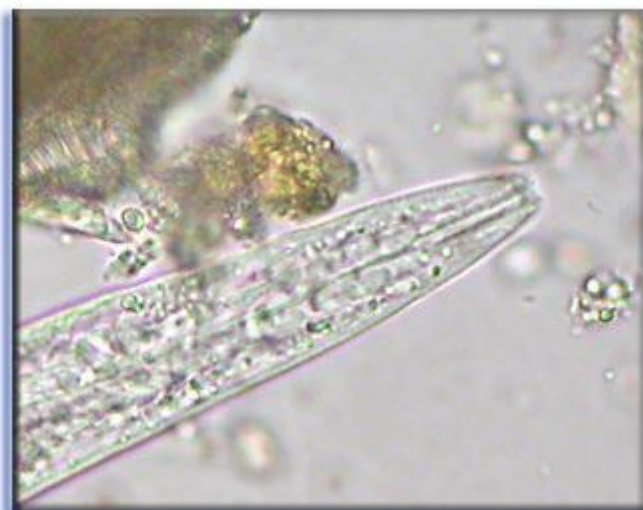


ภาพที่ 2 แสดงลักษณะไข่พยาธิปากขอ (<http://adam.about.net/encyclopedia/Hookworm-egg.htm>)

2. สันฐานวิทยาตัวอ่อนของพยาธิปากขอระยะแรบดิติออยด์และฟิลาริฟอร์ม (Rhabditiform larva และ Filariform larva)

ตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะ rhabditiform larva

ตัวอ่อนระยะ rhabditiform larva เป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 และ 2 ขณะที่ออกจากไข่ใหม่ๆจะมีขนาดยาวประมาณ 250 - 300 ไมโครเมตร กว้างประมาณ 17 ไมโครเมตร ช่องปาก (buccal cavity) ยาวและแคบ (ดังแสดงในภาพที่ 3) ส่วนหลอดอาหาร (esophagus) จะมีลักษณะเป็นแบบ rhabditiform type ส่วนปลายของ esophagus จะโป่งออกเป็น bulb และมีรอยคอดทำให้แยกออกจาก esophagus ส่วนหน้าได้ ต่อจาก esophagus เป็นลำไส้ จะไปเปิดออกที่ anus ซึ่งอยู่ทางด้าน ventral มักมองไม่เห็น genital primodium ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ อยู่บริเวณประมาณกึ่งกลางลำตัว ระหว่างลำไส้กับผิวของลำตัว ตัวอ่อนระยะที่ 1 จะหาอาหารกินอยู่ในดินประมาณ 1 - 2 วัน โดยกินพวกแบคทีเรียและ organic debris เป็นอาหารและเมื่ออุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (ดังแสดงในตารางที่ 1) พยาธิปากขอจะลอกคราบเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ซึ่งยังมีลักษณะต่างๆ เหมือนตัวอ่อนระยะที่ 1 โดยเฉพาะหลอดอาหาร ต่อจากนั้นอีกประมาณ 5 - 6 วัน จะเจริญเติบโตและลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ต่อไป (Beaver et al., 1984; Gilman, 2000)



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะช่องปาก (buccal cavity) ของตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่ 1 (rhabditiform larva) (www.tropicalmed.eu)

ตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะ filariform larva

ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิปากขอชนิด *A. duodenale* มีความยาวประมาณ 600-700 ไมครอน แต่ *N. americanus* มีความยาวประมาณ 500-600 ไมครอน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า ปลายหางมีลักษณะแหลม มีหลอดอาหาร (esophagus) เป็นแบบ filariform type คือมีลักษณะยาวเรียว ไม่มี bulb (ดังแสดงในภาพที่ 4) ตัวอ่อนระยะนี้จะหยุดกินอาหารเนื่องจากปากปิดและเป็นระยะติดต่อ (Infective third-stage) พบอยู่ตามพื้นดินรอโอกาสที่จะไชเข้าสู่ผิวหนังของคนต่อไป ซึ่งระยะนี้สามารถแบ่งแยกชนิดพยาธิปากขอทั้ง 2 ออกจากกันได้จากลักษณะความแตกต่างของ buccal spears รอยต่อระหว่างหลอดอาหารและลำไส้ ลักษณะความยาวช่องว่างระหว่างปลายหางและเยื่อหุ้มตัวรวมถึงรอยคลื่นของเยื่อหุ้มตัว (Beaver et al., 1984; Gilman, 2000)



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่ 3 (filariform larva)

(www.tropicalmed.eu)

ตารางที่ 1 แสดงผลของอุณหภูมิต่อไข่และตัวอ่อนของพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* และ *A. Duodenale*

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ผลต่อไข่และตัวอ่อนของพยาธิปากขอชนิด <i>N. americanus</i> และ <i>A. duodenale</i>
15	<i>N. americanus</i> ไม่มีไข่ฟักออกมาแต่ <i>A. duodenale</i> ส่วนมากจะฟักออกมาใน 5 วัน
20-27	เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน <i>A. duodenale</i>
28-32	เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน <i>N. americanus</i>
15-35	ไข่ของ <i>A. duodenale</i> ส่วนมากจะฟักออกมาใน 24 ชั่วโมง
20-35	ไข่ของ <i>N. americanus</i> ส่วนมากจะฟักออกมาใน 24 ชั่วโมง
40	ไข่ของ <i>N. americanus</i> ส่วนมากไม่สามารถฟักได้

ตารางนี้ดัดแปลงจากนิมิตร มรกต และ เกตุรัตน์ สุขวัจน์, 2546

3. สัณฐานวิทยาของพยาธิปากขอระยะตัวเต็มวัย (adult hookworm)

ระยะตัวเต็มวัยของพยาธิปากขอสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าโดยเฉลี่ยยาวประมาณ 1 เซนติเมตร กว้าง 0.5 มิลลิเมตร ตัวแก่มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายค่อนข้างอ้วนสั้น เมื่อพยาธิยังมีชีวิตอยู่จะมีสีครีมปนเทาหรือสีขาวนวลแกมชมพูที่บ (greenish-yellow or opaque) ตลอดลำตัวและมองไม่เห็นอวัยวะภายใน

ตัวเต็มวัย *N. americanus*

ส่วนหัวอโค้งไปด้านหลังโดยมีทิศตรงกันข้ามกับความโค้งของลำตัวทำให้มีรูปร่างลักษณะคล้ายตัวเอส (S-shape) ซึ่งจากลักษณะส่วนหัวนี้สามารถชี้แยกชนิดออกจากพยาธิปากขอชนิดอื่นๆ ได้ ถ้าส่องขยายดูที่ช่องปาก (buccal cavity) จะเห็นอวัยวะที่ใช้สำหรับเกาะติดกับผนังลำไส้ ซึ่งช่องปากของ *N. americanus* จะเห็นแผ่นฟัน cutting plate แตกต่างจากฟันของ *A. duodenale* ซึ่งเป็น teeth ในช่องปาก (ดังแสดงในภาพที่ 5) หลอดอาหารเป็นรูปทรงกระบอก (club-shaped) ยาวประมาณ 1/6 ของความยาวของลำตัวและลำไส้จะเป็นท่อตรงไปสุดที่ทวารหนักอยู่ทางปลายด้านหาง

พยาธิตัวผู้ มีขนาดลำตัวประมาณ 6-9 x 0.3 มิลลิเมตร มีอวัยวะเป็นท่อขดอยู่ส่วนกลาง ลำตัว มีท่อฉีดน้ำอสุจิ (ejaculatory duct) เปิดร่วมกันกับลำไส้ที่ cloaca บริเวณปลายสุดทางด้านหาง มี dorsal ray 1 อัน แยกออกเป็น 2 กิ่งตรงปลาย ปลายสุดของแต่ละกิ่งแตกเป็น 2 แฉกเล็กๆ (bipartite) มี spicules 2 อันยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ปลายของ spicule ทั้ง 2 อันรวมเข้าด้วยกัน

พยาธิตัวเมีย มีขนาดประมาณ 9-11 x 0.4 มิลลิเมตร ซึ่งใหญ่กว่าตัวผู้ vulva เปิดบริเวณเหนือจุดกึ่งกลางของลำตัวเล็กน้อย anus เปิดที่เกือบปลายหาง ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์อยู่บริเวณ 2/3 ของส่วนท้ายลำตัว ปลายหางเป็นรูปกรวย ตัวเมียจะวางไข่ได้ประมาณวันละ 6,000 - 20,000 ฟอง โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น จำนวนพยาธิที่อยู่ในร่างกายซึ่งถ้ามีพยาธิปากขออยู่ในร่างกายเป็นจำนวนมาก การออกไข่จะมีจำนวนลดลงเหลือประมาณวันละ 5000 ฟอง อายุของพยาธิและภูมิคุ้มกันโรคของผู้ที่ได้รับเชื้อก็มีผลต่อการออกไข่ของพยาธิ (ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุล และคณะ, 2549)

ตัวเต็มวัย *A. duodenale*

ส่วนหัวของพยาธิอยู่ในแนวเดียวกันกับทิศทางการโค้งงอของลำตัวทำให้มีลักษณะลำตัวโค้งงอคล้ายตัวอักษรซี (c-shape) มีช่องปากขนาดใหญ่ ภายในมีฟัน 2 คู่ (ventral teeth) ด้านนอกใหญ่กว่าด้านใน มีหลอดอาหารยาวประมาณ 1/6 ของลำตัว

พยาธิตัวผู้ มีขนาดประมาณ 8-11 x 0.45 มิลลิเมตร ปลายหางแผ่ออกเป็นแผ่น (bursa) มี dorsal ray 1 อัน แยกเป็นกิ่งสั้นๆ 2 กิ่งตรงโคน และปลายสุดของแต่ละกิ่งแตกเป็น 3 แฉกเล็กๆ (tripartite) มี spicules ขนาดเท่ากัน 2 อัน ยาว 1.4 – 2.9 มิลลิเมตร แต่ละปลายของ spicule ไม่รวมกันเหมือน spicule ของพยาธิ *N. americanus*

พยาธิตัวเมีย มีขนาดประมาณ 10-13 x 0.6 มิลลิเมตร ขนาดใหญ่กว่าตัวผู้เล็กน้อย ปลายหางแหลม มี vulva เปิดทางด้านท้อง (ventral) บริเวณกึ่งกลางลำตัวค่อนไปทางด้านท้าย ส่วนพยาธิ *A. duodenale* ตัวเมียออกไข่ได้ประมาณวันละ 25,000 - 30,000 ฟอง (Beaver et al., 1984; Gilman, 2000)

ภาพที่ 5 แสดงลักษณะภายในของช่องปากพยาธิปากขอ (www.parasiteinfo.com)



ลักษณะแผ่นฟันของ *A. duodenale*



ลักษณะแผ่นฟันของ *N. americanus*

อายุขัยเฉลี่ยของพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* พบว่าอยู่ในช่วงประมาณ 4-20 ปี ส่วน *A. duodenale* นั้นพบว่ามีอายุขัยน้อยกว่าคืออยู่ในช่วงประมาณ 5-7 ปี ซึ่งตรงกันข้ามกับปริมาณเลือดที่พยาธิปากขอดูดในแต่ละวันโดยพยาธิในกลุ่ม *Ancylostoma* spp. ดูดกินเลือดมากกว่าพยาธิชนิด *Necator* โดยพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* แต่ละตัวจะดูดกินเลือดต่อวันประมาณ 0.03 มิลลิลิตร ส่วนพยาธิในกลุ่ม *Ancylostoma* แต่ละตัวจะดูดเลือดต่อวันประมาณ 0.15-0.26 มิลลิลิตร (Beaver et al., 1984) ดังนั้นถึงแม้ว่ามีพยาธิปากขอชนิด *Ancylostoma* อยู่ในร่างกายเพียง 100 ตัว ก็สามารถทำให้เกิดอาการอย่างรุนแรงขึ้นได้ อย่างไรก็ตามอาการที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับภาวะทางโภชนาการของผู้ป่วยแต่ละคนและระบบภูมิคุ้มกันโรคของร่างกาย ในการต่อต้านการเจริญเติบโตของพยาธิในลำไส้รวมถึงปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย แต่กลับพบว่าการติดเชื้อพยาธิปากขอจะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อีกทั้งพยาธิปากขอยังมีวิธีการในการหลบหลีกต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจึงส่งผลทำให้พยาธิปากขอสามารถมีชีวิตในร่างกายได้

การกระจายทางภูมิศาสตร์และที่มาของการแพร่กระจายเชื้อพยาธิปากขอ

โรคพยาธิปากขอพบมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (ดังแสดงในภาพที่ 6) เพราะมีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนซึ่งในประเทศที่มีอากาศหนาวเย็นจะพบพยาธิปากขอได้น้อยกว่าบริเวณเขตร้อน พยาธิปากขอของคนทั้ง 2 ชนิด มักพบอยู่ปะปนกันแต่พบชนิด *N. americanus* มากกว่า *A. duodenale* ซึ่ง *N. americanus* พบเป็นจำนวนมากในประเทศที่อยู่แถบเขตร้อนส่วน *A. duodenale* พบได้น้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากไข่และระยะตัวอ่อนของพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* มีความทนทานต่ออุณหภูมิที่สูงได้ดีกว่า *A. duodenale* (Matsusaki., 1963) ประเทศไทยมีภูมิอากาศแบบร้อนชื้นซึ่งทำให้มีอัตราการความชุกของการติดเชื้อพยาธิปากขอสูงส่งผลให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขและสุขภาพของประชากรตามมา โดยเฉพาะในภาคใต้ของประเทศจะพบอัตราการติดเชื้อสูงกว่าภาคอื่นๆ จากการสำรวจโดยการตรวจอุจจาระตั้งแต่ปี พ.ศ.2494 จนถึงปัจจุบัน พบว่าพยาธิปากขอชุกชุมในทุกภาคส่วนภาคใต้ในบางพื้นที่ที่มีความชุกสูงสุดถึงร้อยละ 49.2 (Jongsuksantikul et al., 1992)

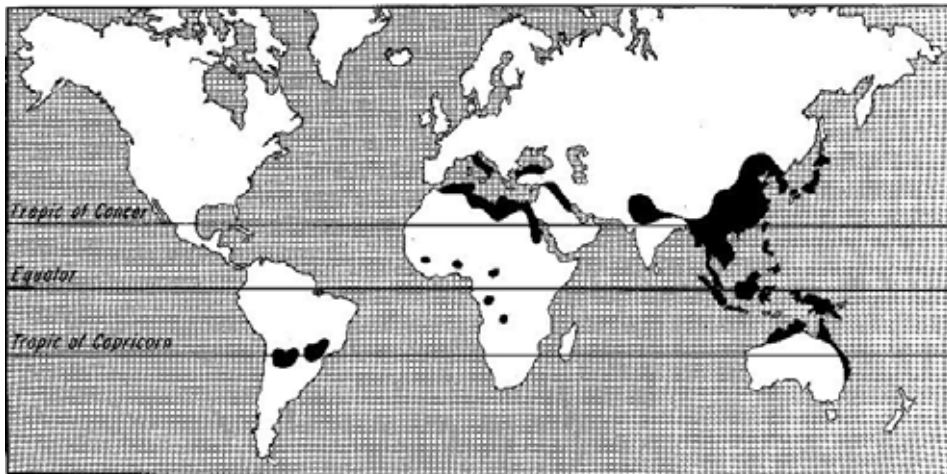
การที่มีการแพร่กระจายและติดเชื้อพยาธิปากขอเป็นจำนวนมากมีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากคนที่เป็นโรคพยาธิปากขอและเป็นแหล่งแพร่เชื้อได้ มีพฤติกรรมกรับถ่ายอุจจาระตามพื้นดินและการใช้ส้วมที่ไม่ถูกสุขลักษณะทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อเป็นวงกว้าง การเดินไม่สวมรองเท้าหรือมีอาชีพที่ต้องสัมผัสกับผิวดิน เช่น อาชีพเกษตรกร ทำนา ทำไร่ ทำสวนทำให้มีโอกาสเสี่ยงที่ตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะติดต่อจะไชเข้าสู่ผิวหนังตรงส่วนที่สัมผัสกับพื้นดินได้ง่าย รวมถึงการขาดความรู้เรื่องสุขศึกษาในเรื่องการป้องกันโรคติดเชื้อ นอกจากนี้สภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ลักษณะของดิน อุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนก็มีส่วนต่อการแพร่กระจายพยาธิปากขอ โดยดินที่มีลักษณะเป็นดินร่วนปนทรายจะมีผลให้ไข่ของพยาธิปากขอเจริญเป็นระยะตัวอ่อนได้ดี และหลังจากฝนตกจะทำให้พื้นดินมีความชื้นสูงซึ่งพบว่าตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะ *filariform larva* จะเคลื่อนที่ไปยังพื้นผิวดินหรือบนยอดหญ้าเพื่อรอโอกาสไชเข้าสู่ผิวหนัง แต่ตรงกันข้ามในฤดูแห้งแล้งตัวอ่อนจะหลบอยู่ใต้ดินเพื่อหาความชื้นและถ้ามีสภาพอากาศแห้งแล้งอุณหภูมิสูงขึ้นเป็นเวลานานหรือมีน้ำท่วมขังตัวอ่อนอาจตายได้ (Gilman, 2000)

จากข้อมูลดังกล่าวทำให้อัตราการแพร่กระจายพยาธิปากขอสามารถพบได้มากในภาคใต้ของประเทศไทย อันเนื่องมาจากมีลักษณะสิ่งแวดล้อมต่างๆเอื้ออำนวยและมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพยาธิปากขอระยะตัวอ่อน เช่น อุณหภูมิ ลักษณะของพื้นดิน และปริมาณฝนที่ตกลงมาเกือบตลอดปี ส่งผลให้ตัวอ่อนของพยาธิปากขอเจริญเติบโตได้ดีกว่าภาคอื่นๆ นอกจากนี้

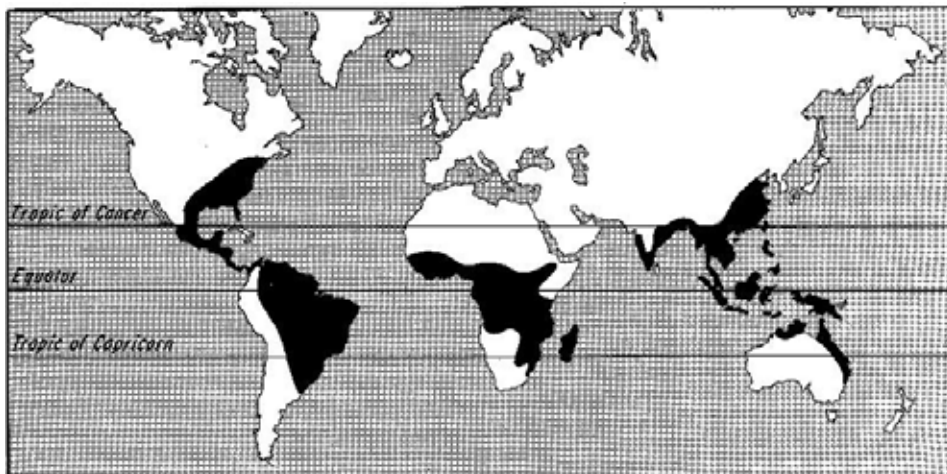
ประชาชนส่วนใหญ่มีอาชีพทำสวนและไม่นิยมสวมรองเท้าทำให้มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิปากขอได้ง่าย (Raknam et al., 2010)

ภาพที่ 6 แสดงการกระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อพยาธิปากขอในคน (<http://tmcr.usuhs.mil/>)

พยาธิปากขอชนิด *Ancylostoma duodenale*



พยาธิปากขอชนิด *Necator americanus*



อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิกประกอบด้วย 3 ระยะ คือ ระยะที่ทำให้เกิดโรคที่ผิวหนัง ระยะที่ทำให้เกิดโรคที่ปอดซึ่งเกิดจากพยาธิปากขอระยะตัวอ่อน และระยะที่พยาธิตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในลำไส้ ดังนี้

1. ระยะที่ตัวอ่อนไชทางผิวหนัง (cutaneous phase)

เมื่อตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่ 3 (filariform larva) ของคนไชเข้าสู่ผิวหนังมักไม่แสดงอาการ แต่ถ้าเป็นตัวอ่อนพยาธิปากขอของสัตว์เมื่อไชเข้าสู่ผิวหนังจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายซึ่งเรียกว่า Ground itch (ดังแสดงในภาพที่ 7) ทำให้ผู้ที่ติดเชื้อมีอาการคันบริเวณที่ตัวอ่อนพยาธิไชเข้าไป เกิดเป็นตุ่มนูนแดง (erythematous papular rash) หรืออาจเป็นตุ่มน้ำได้ อาการดังกล่าวจะอยู่ในช่วง 1-2 วันแรก หลังจากตัวอ่อนของพยาธิไชผ่านผิวหนังและหายไปเอง โดยความรุนแรงของอาการจะขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอ่อนพยาธิที่ไชเข้าไปในร่างกาย รวมถึงอาจเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียซ้ำซ้อนตามมาได้ นอกจากนี้จากการที่พยาธิไชไปตามผิวหนังชั้น Epithelial layer เป็นรอยแดงอักเสบและมีอาการคันตามทางเดินของพยาธิที่ไชผ่าน เรียกว่า creeping eruption หรือ Cutaneous larva migrans รอยแดงนั้นอาจยังคงปรากฏอยู่หลายวันซึ่งมักมีสาเหตุจากตัวอ่อนของพยาธิปากขอของสัตว์ เช่น สุนัขและแมวมากกว่าของคน (Gilman, 2000)



ภาพที่ 7 แสดงการไชเข้าสู่ผิวหนังของตัวอ่อนพยาธิปากขอ (<http://scienceblogs.com>)

2. ระยะที่ตัวอ่อนไขผ่านปอด (pulmonary phase)

หลังจากตัวอ่อนของพยาธิไซผ่านผิวหนังพยาธิจะเข้าไปยังระบบไหลเวียนโลหิตของร่างกาย จากนั้นจะไซทะลุหลอดเลือดฝอยเข้าสู่ถุงลมปอดต่อไปยังจนถึงลำคอ ผู้ป่วยในระยะนี้ส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการ แต่อาจพบการไอ หอบ เจ็บคอและหลอดลมอักเสบได้ อาการดังกล่าวมักหายได้เองภายใน 7 วัน แต่ถ้ามีการติดเชื้อที่รุนแรงผู้ป่วยจะมีอาการของภาวะปอดอักเสบและตรวจพบเม็ดเลือดขาว eosinophil ในเลือดสูง (Gilman, 2000)

3. ระยะที่ตัวเต็มวัยอาศัยในลำไส้ (intestinal phase)

พยาธิปากขอระยะนี้สามารถทำให้ก่อโรคได้รุนแรงมากโดยผู้ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการสูญเสียเลือดจากการที่พยาธิปากขอใช้ปากกัดเพื่อเกาะติดกับเยื่อเมือกในลำไส้และดูดเลือดมาเป็นอาหาร ซึ่งตรงตำแหน่งที่พยาธิปากขอเกาะจะทำให้เกิดเป็นแผลเนื่องมาจากการฉีกขาดรวมทั้งพยาธิปากขอจะมีการเปลี่ยนตำแหน่งที่เกาะอย่างต่อเนื่องทำให้ลำไส้เป็นแผลและมีเลือดไหลซึมออกมา โดยส่วนใหญ่พยาธิปากขอจะอาศัยบริเวณส่วนต้นของลำไส้เล็กแต่ถ้ามีการติดเชื้ออย่างรุนแรงอาจพบพยาธิได้ที่ลำไส้ใหญ่ ซึ่งผู้ที่ติดเชื้อมีพยาธิอยู่เป็นจำนวนมากการสูญเสียเลือดในแต่ละวันก็จะมากตามไปด้วย ในระยะแรกผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง จุกเสียดแน่นท้อง ท้องเสีย ถ่ายดำหรือเป็นมูกเลือด อ่อนเพลียและอาการเบื่ออาหารตามมารวมไปถึงการตรวจพบ eosinophilia และในระยะเรื้อรังเมื่อผู้ติดเชื้อมีการสูญเสียเลือดเป็นจำนวนมากจะเกิดภาวะโลหิตจางแบบขาดธาตุเหล็ก (Iron deficiency anemia) ทำให้มีอาการซีด เหนื่อยง่าย ใจสั่น หัวใจเต้นเร็ว อ่อนเพลีย เป็นลม อาจมีอาการกระสับกระส่าย ตรวจพบหัวใจโต ระดับฮีโมโกลบินในเลือดลดต่ำลงและยังตรวจพบเม็ดเลือดแดงมีลักษณะแบบ hypochromic microcytic anemia ซึ่งมีสีซีดลงและขนาดเล็กลง (Gilman, 2000)

ภาวะโลหิตจางของผู้ที่ป่วยเป็นโรคพยาธิปากขอพบว่ามีปัจจัยหลายสาเหตุ เช่น จำนวนและชนิดของพยาธิปากขอที่อยู่ในร่างกาย ระยะเวลาของการติดเชื้อ อายุและเพศของผู้ที่เป็นโรคพยาธิปากขอ ปริมาณธาตุเหล็กที่สะสมไว้ในร่างกาย ความต้องการของร่างกายในการใช้ธาตุเหล็กและปริมาณธาตุเหล็กในอาหารที่ได้รับในแต่ละวัน ปริมาณธาตุเหล็กที่สูญเสียจากร่างกายซึ่งเกิดขึ้นจากการที่เลือดออกในตำแหน่งที่พยาธิปากขอเกาะอยู่บนลำไส้และปริมาณธาตุเหล็กที่จะเข้าไปทดแทนการสูญเสียเลือดที่เกิดขึ้นให้กับร่างกายในแต่ละวัน รวมถึงการติดเชื้อซ้ำแล้วซ้ำอีก ภายหลังการรักษาของผู้ที่ป่วยเป็นโรคพยาธิปากขอ นอกจากจะพบการสูญเสียเลือดแล้วยังพบว่ามีการสูญเสียโปรตีนทำให้ปริมาณอัลบูมินในกระแสเลือดต่ำ (hypoalbuminemia) รวมไปถึงทำให้การดูดซึมของลำไส้เกิดความผิดปกติส่งผลให้เกิดภาวะทุพโภชนาการขึ้นได้ทำให้มีอาการหน้าบวม

รวบรวม จากการศึกษาของ ธาณี รักนามและคณะได้ทำการศึกษาภาวะโภชนาการของเด็กนักเรียนชั้นประถมศึกษาอายุ 7-11 ปี จำนวน 214 คน ในอำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช จากที่เคยตรวจพบเชื้อหนอนพยาธิปากขอระดับรุนแรงปานกลางและรุนแรงมากในปี 2548 พบว่า เด็กนักเรียนจำนวน 122 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 57 มีการติดเชื้อหนอนพยาธิปากขอระดับรุนแรงปานกลาง โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนไข่พยาธิที่ตรวจพบต่ออุจจาระ 1 กรัม เท่ากับ 3,878 ฟอง และเด็กนักเรียน 92 คน อยู่ในระดับรุนแรงมาก จำนวนไข่พยาธิต่ออุจจาระ 1 กรัม เท่ากับ 14,347 ฟอง ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มเป็นเพศชายมากกว่าเพศหญิงและส่วนมากมีอายุ 11 ปี ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าเด็กนักเรียนที่ติดเชื้อพยาธิปากขอระดับรุนแรงปานกลางและรุนแรงมากมีน้ำหนักตามอายุต่ำกว่าเกณฑ์ร้อยละ 22.1 และ 29.3 มีส่วนสูงต่ำกว่าเกณฑ์อายุ ร้อยละ 30.3 และ 39.1 จากข้อมูลดังกล่าวได้แสดงถึงการขาดสารอาหารอาจเนื่องมาจากการติดเชื้อพยาธิปากขอแล้วไม่มีการป้องกันรักษาอย่างถูกวิธีรวมถึงการขาดความรู้ในเรื่องพยาธิปากขอ ดังนั้นจึงควรมีการให้ความรู้ทางด้านสุขศึกษาและดูแลด้านการโภชนาการ จะเห็นได้ว่าโรคพยาธิปากขอยังคงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยจึงควรได้รับการแก้ไขปัญหา (Raknam et al., 2010)

พยาธิกำเนิดหรือกลไกทางชีวเคมีของพยาธิปากขอ

1. การไชผ่านผิวหนัง (skin penetration) ของพยาธิปากขอระยะตัวอ่อน

โดยปกติผิวหนังของร่างกายจะมีการป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมและเชื้อโรคไม่ให้เข้าสู่ร่างกายได้เมื่อตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่ 3 (filariform larva) ไช้เข้าสู่ผิวหนังและพยายามเคลื่อนที่ไปตามผิวหนังของร่างกายจะพบกับ hyaluronic acid ซึ่งเป็นสารประกอบของผิวหนังชั้น dermis ตัวอ่อนของพยาธิระยะนี้มีการกระตุ้นระบบเมตาโบลิซึมในตัวและมีการสร้างเอ็นไซม์ hyaluronidase เพื่อย่อย hyaluronic acid ในระหว่างที่เคลื่อนตัวผ่าน keratinocyte ในชั้นผิวหนัง ส่งผลให้ตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 3 สามารถที่จะเคลื่อนที่ผ่านระหว่าง epidermal keratinocyte และ ground substance ของชั้น dermis ได้ง่าย ซึ่งเอ็นไซม์ hyaluronidase จะปล่อยออกมารวมกับ protease โดยพบว่าในระหว่างการไชผ่านผิวหนังตัวอ่อนพยาธิปากขอจะปล่อยสารจำพวก secreted protein ต่างๆ เพื่อช่วยให้ตัวอ่อนพยาธิปากขอสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายและสามารถหลีกเลี่ยงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทำให้ไม่สามารถกำจัดพยาธิได้ซึ่งสารที่พบมากที่สุดคือ metalloprotease (MTP-1) และ *Ancylostoma*-secreted proteins (ASPs) ประกอบด้วย ASP-1 และ ASP-2 (Hotez et al., 2003)

2.พยาธิระยะตัวเต็มวัยในลำไส้

เมื่อตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่ 3 เจริญเป็นระยะตัวเต็มวัยในลำไส้เล็กจะมีการยึดเกาะกับเยื่อผนังลำไส้โดยใช้ฟันหรือแผ่นฟันและดูดเลือดมาเป็นอาหาร พยาธิปากขอจะมีการสร้างสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดขึ้นมาหลายชนิด เช่น การสร้าง anticoagulant peptide (ACAP-1) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งปัจจัยที่มีส่วนช่วยทำให้เลือดเกิดการแข็งตัว (coagulation factor Xa) ทำให้พยาธิปากขอระยะตัวเต็มวัยสามารถดูดเลือดผ่านผนังลำไส้ได้ง่ายขึ้น (Cappello *et al.*, 1996 และ Harrison *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าพยาธิปากขอระยะตัวเต็มวัยจะสร้างสารยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดที่ เรียกว่า hookworm platelet inhibitor (HPI) โดยมีหน้าที่ยับยั้งการจับกลุ่มและรวมกลุ่มกันของเกล็ดเลือด รวมถึงมีการลดลงของ platelet dense granule ส่งผลทำให้เกิดเลือดไม่สามารถทำหน้าที่ต่อไปได้ (Del Valle *et al.*, 2003; Jones and Cappello, 2004) ดังนั้นเมื่อสารทั้ง 2 ชนิด (สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดกับสารยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด) ทำงานร่วมกันจะทำให้พยาธิปากขอสามารถดูดเลือดจากเยื่อผนังลำไส้ได้ง่าย (Jones and Cappello, 2004) จากการศึกษาพบว่าในระยะตัวเต็มวัยพยาธิปากขอจะปล่อย protease ออกมาเพื่อช่วยในการย่อยสลายฮีโมโกลบินโดยเอนไซม์ hemoglobinases หลายชนิด ซึ่งได้แก่ aspartic protease (APR1) ประกอบด้วย APR-1 และ APR-2, cysteine protease (CP3) และ metalloprotease (MEP1) (Williamson *et al.*, 2004; Jones and Cappello, 2004) โดยเอนไซม์ aspartic protease จะเป็นเอนไซม์ลำดับแรกที่ใช้ในการย่อยสลายและยังพบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสูง ส่วนเอนไซม์ (CP3) สามารถพบได้ในบริเวณทางเดินอาหารของพยาธิปากขอ (Williamson *et al.*, 2004) และ metalloprotease สามารถสังเคราะห์ได้จากในลำไส้ ซึ่งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับกลไกในการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ แต่อย่างไรก็ตามพยาธิปากขอจะใช้เอนไซม์ในกลุ่มนี้เพื่อย่อยสลายโปรตีนที่ได้จากผู้ที่ถูกดูดเพื่อมาเป็นอาหาร (Jones and Cappello, 2004)

การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อพยาธิปากขอ

โดยทั่วไปพบว่า การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อพยาธิปากขอจะตอบสนองแบบ cellular response เป็นการตอบสนองของ cytokines ที่อาศัย T helper type 2 (Th2) เป็นหลัก ร่างกายจะต่อต้านและกำจัดพยาธิจากการทำงานของ Th2 lymphocyte โดยการหลั่ง IL-4, IL-5, IL-13 และ IgE และมีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อซ้ำ รวมถึงระดับของ IFN- γ จะสูงเพิ่มมากขึ้นซึ่งมีความสามารถในการลดความหนาแน่นของการติดเชื้อพยาธิปากขอได้ แต่ไม่มีผลในการยับยั้งการติดเชื้อพยาธิซ้ำที่จะเกิดขึ้น และการตอบสนองของแอนติบอดีภายหลังการติดเชื้อพยาธิปากขอจะพบว่า มีแอนติบอดีชนิด IgM ในสัปดาห์ที่ 6 และในสัปดาห์ที่ 8 จะพบแอนติบอดีชนิด IgG ซึ่งแอนติบอดีชนิด IgE จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ (Hotez et al., 2004; Jongwutiwes et al., 1999; Ogilvie et al., 1978; Maxwell et al., 1987) ผู้ที่ติดเชื้อพยาธิปากขอชนิด *N.americanus* จะมีระดับของ IgE และ IgG ที่ตอบสนองจำเพาะต่อพยาธิสูงขึ้นซึ่งแอนติบอดีชนิด IgG4 สามารถแสดงถึงการติดเชื้อพยาธิปากขอในร่างกายได้ เมื่อมีการตอบสนองแอนติบอดีรวมกับการกระตุ้นของ IL-5 จึงนำไปสู่การเกิดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด eosinophilia เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นเฉพาะที่หรือทั่วร่างกาย (Loukas et al., 2005; Bethony et al., 2005) จากการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองแบบ cellular response และการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) จากเด็กในกลุ่มที่ได้รับยารักษาโรคหลังจากการติดเชื้อพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* เปรียบเทียบกับเด็กในกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อพยาธิปากขอ พบว่าร่างกายของเด็กในกลุ่มที่ผ่านการรักษาการโรคพยาธิปากขอมีความสามารถของระบบภูมิคุ้มกันที่มาต่อต้านแอนติเจนจากพยาธิปากขอได้ลดลง รวมถึงการผลิตไซโตไคน์จาก Th1 (IL-12 และ IFN- γ) และ Th2 (IL-5 และ IL-13) มีระดับลดลงแต่พบว่าร่างกายจะผลิต IL-10 เพิ่มมากขึ้น สันนิษฐานว่าร่างกายของผู้ที่ติดเชื้อพยาธิปากขอชนิด *N.americanus* ต้องใช้ IL-10 ในการตอบสนองต่อการอักเสบและจากการศึกษาพบว่าระดับของ IL-10 จะสูงขึ้นในช่วงการติดเชื้อพยาธิปากขอแบบเรื้อรัง นอกจากนี้ยังพบว่าคนที่ได้รับการตรวจพบไข่พยาธิปากขอในอุจจาระจากพื้นที่ที่มีการระบาดของพยาธิปากขอมีระดับของ TNF- α สูงขึ้น (Geiger et al., 2004; Loukas et al., 2005)

พยาธิปากขอปล่อยสารที่สามารถไปควบคุมและเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ เรียกสารชนิดนี้ว่า excretory-secretory (ES) product ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการทำลายพยาธิไม่สามารถกำจัดพยาธิได้ทำให้พยาธิมีชีวิตรอดอยู่ในร่างกายได้เป็นเวลานานหลายปี และจากการศึกษาพบว่าพยาธิปากขอสามารถเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันโดยอาจไปเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocytes ชนิด Th2 และ IL-4 แล้ว

ส่งผลทำให้เป็นปัญหาสำหรับผู้ป่วยเป็นโรคพยาธิปากขอและรักษาจนหายพบว่าส่วนใหญ่ระบบภูมิคุ้มกันมีประสิทธิภาพน้อยลงในการที่จะช่วยป้องกันการติดเชื้อพยาธิปากขอที่อาจจะเกิดขึ้นซ้ำได้ (Hotez et al., 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าพยาธิมีการเจริญเติบโตในช่วงวงจรชีวิตได้หลายระยะซึ่งในแต่ละระยะจะมี antigen ที่อยู่บนผิวของพยาธิแตกต่างกันออกไปส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ที่ติดเชื้อซึ่งถูกกระตุ้นสร้างขึ้นมาจากระยะก่อนไม่สามารถกำจัดพยาธิที่เจริญไปยังระยะอื่นได้

การวินิจฉัยโรคพยาธิปากขอ

การวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิปากขอต้องอาศัยประวัติผู้ป่วยว่าได้สัมผัสกับดินบริเวณที่สงสัยว่ามีตัวอ่อนของพยาธิปากขอและอาการ การตรวจพบทางคลินิก ทั้งนี้การส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่

1. ตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระสด ถ้าตรวจอุจจาระโดยวิธีธรรมดา (direct smear) แล้วไม่พบไข่พยาธิจึงส่งตรวจอุจจาระด้วยวิธี concentration เช่น formalin-ether concentration หรือ ethyl-acetate sedimentation ซึ่งจะให้ความไวในการตรวจมากกว่า และถ้าต้องการทราบความรุนแรงของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อสามารถทำได้โดยการตรวจหาจำนวนไข่พยาธิต่ออุจจาระ 1 กรัม ด้วยวิธี Stoll dilution egg count และ Kato thick smear ทำได้โดยการเก็บอุจจาระของผู้ป่วยมาชั่งน้ำหนักอุจจาระแล้วนับจำนวนไข่ในอุจจาระจากนั้นคำนวณหาจำนวนตัวพยาธิที่อยู่ในร่างกายผู้ป่วยซึ่งวิธีนี้ควรทำภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากเก็บอุจจาระมาจากผู้ป่วย จากการตรวจด้วยวิธีนี้จะทำให้ทราบปริมาณความหนาแน่นของการติดเชื้อซึ่งมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อพยาธิปากขอ (ดังแสดงในตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังทำให้ทราบสาเหตุว่าโรคหรืออาการที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยมาจากการติดเชื้อพยาธิหรือไม่ (Gilman, 2000)

ตารางที่ 2 แสดงการแบ่งระดับความรุนแรงของโรคพยาธิปากขอจากตรวจอุจจาระด้วยวิธี Stoll dilution egg count และ Kato thick smear ตามการแบ่งขององค์การอนามัยโลก (WHO, 1978)

ระดับความรุนแรง	จำนวนไข่พยาธิที่ตรวจพบต่ออุจจาระ 1 กรัม	จำนวนตัวพยาธิที่อยู่ในร่างกาย
ต่ำ	น้อยกว่า 2,000 ฟอง	50 หรือน้อยกว่า
ปานกลาง	2,000-7,000 ฟอง	51-200
สูง	มากกว่า 7,000 ฟอง	มากกว่า 200

2. ในกรณีที่เกิดอุจจาระไว้หลายวันหรือมากกว่า 24 ชั่วโมง ตัวอ่อนของพยาธิปากขอจะฟักออกจากไข่จึงต้องตรวจหาระยะตัวอ่อนในอุจจาระและต้องแยกออกจากระยะตัวอ่อนของพยาธิเส้นด้าย (*Strongyloides stercoralis*) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันโดยตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะนี้จะมี genital primordium ขนาดเล็กกว่าแต่ buccal cavity มีขนาดยาวกว่า (Beaver et al., 1984)

3. วิธีการเพาะเลี้ยงไข่ให้เจริญเป็นระยะตัวอ่อน เช่น Harada-Mori's culture method / filter paper culture และ charcoal culture วิธีนี้คือการเพาะเชื้อบนกระดาษกรองซึ่งกระดาษกรองที่ใช้เปรียบเหมือนดินที่มีลักษณะขึ้นเพื่อให้ไข่พยาธิสามารถเจริญเติบโตการเพาะเชื้อ วิธีนี้ทำให้สามารถแยกชนิดตัวอ่อนว่าเป็นชนิด *Necator* หรือชนิด *Ancylostoma* โดยดูจากลักษณะของตัวอ่อนในระยะ filariform larva พยาธิทั้งสองชนิดนี้จะแตกต่างกันที่ความยาวลำตัว ลักษณะรูปร่างของหลอดอาหารและปลายหาง และลายของปลอกหุ้มตัว (Beaver et al., 1984)

4. วิธีการตรวจหาตัวอ่อนของพยาธิปากขอซึ่งมีประสิทธิภาพและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ agar place culture method วิธีนี้ทำได้โดยการนำอุจจาระสดปริมาณ 1-2 กรัมมาวางไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน สามารถตรวจหาพยาธิโดยการดูจากลักษณะทางเดินบนวุ้นซึ่งพยาธิปากขอและพยาธิเส้นด้ายจะมีทางเดินที่แตกต่างกันและวิธีการนี้มีประสิทธิภาพในการตรวจหาพยาธิดีกว่าวิธี filter paper culture (Jongwutiwes et al., 1999)

5. การตรวจโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา เช่น การตรวจโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) วิธีนี้สามารถนำมาใช้แยกชนิดของพยาธิปากขอระหว่าง *N. americanus* และ *A. duodenale* ได้ด้วยซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำและละเอียดสูงกว่าวิธีอื่นๆแต่ยังไม่นิยมนำมาใช้ในทางปฏิบัติเนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง

การรักษาโรคพยาธิปากขอ

การรักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อพยาธิปากขอ ได้แก่ การรักษาตามอาการและการให้ยากำจัดพยาธิ (Gilman, 2000)

1. **การรักษาตามอาการ** เช่น ในผู้ป่วยที่มีอาการอ่อนเพลียอาจจำเป็นต้องบำรุงร่างกายให้ผู้ป่วยแข็งแรงดีขึ้นเสียก่อนจึงจะให้ยาถ่ายพยาธิ โดยการให้อาหารที่มีโปรตีนสูงและให้วิตามินที่มีธาตุเหล็ก นอกจากนี้ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการชืดมาก ๆ อาจจำเป็นต้องมีการให้เลือด

2. **การรักษาโดยการให้ยาถ่ายพยาธิ** ได้แก่

Albendazole เป็นยาในกลุ่ม benzimidazole ที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อพยาธิปากขอ โดยให้ขนาด 200 มก. ทานครั้งเดียวให้ได้ในผู้ที่อายุตั้งแต่ 2 ปีขึ้นไป

Mebendazole (Fugacar) เนื่องจากยามีประสิทธิภาพในการรักษาไม่ดีเท่าการให้ยา

Albendazole และมีรายงานว่ามีการดื้อยาของ *N. americanus* ในแถบอัฟริกา โดยยา 1 เม็ดมี 100 มิลลิกรัม ทานยา 1 เม็ด วันละ 2 ครั้ง นาน 3 วัน และในเด็กอายุ 3 ปีขึ้นไป ให้ทานยาขนาดเท่ากับขนาดยาในผู้ใหญ่ แต่ยังไม่แนะนำให้ใช้ในหญิงตั้งครรภ์

Pyrantel pamoate (combantrin) สามารถกำจัดพยาธิปากขอชนิด *A. duodenale* ได้ดีกว่า *N. americanus* โดยยา 1 เม็ดมี 125 มิลลิกรัม ให้ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทานยาเพียงครั้งเดียว

การป้องกัน

การป้องกันการแพร่กระจายของพยาธิโดยการรักษาความสะอาดส่วนบุคคลเป็นสิ่งสำคัญที่สุดซึ่งทำได้ดังนี้

- หลีกเลี่ยงการเดินเท้าเปล่าบริเวณพื้นดินที่คาดว่ามีความชื้นหรือมีตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิปากขออยู่
- การจัดการเกี่ยวกับสุขาภิบาล โดยการสร้างและส่งเสริมการใช้ส้วมที่ถูกสุขลักษณะ และไม่ควรรนำอุจจาระไปรดผัก
- ให้ยาถ่ายพยาธิแก่ผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่าเป็นโรคพยาธิปากขอ หรือถ้าสำรวจพบว่าบริเวณใดที่มีผู้ป่วยเป็นจำนวนมากอาจพิจารณา ให้การรักษาแบบหมู่ (Mass Treatment) คือ การให้ทุกคนในท้องถิ่นนั้นรับประทานยาถ่ายพยาธิ
- ให้ความรู้และสุขศึกษาแก่ผู้ป่วย นักเรียน และผู้นำชุมชนตามพื้นที่ต่างๆ เพื่อให้ทราบและเข้าใจถึงวงจรชีวิตของพยาธิปากขอ วิธีการติดต่อ วิธีการป้องกันโรครวมถึงวิธีการรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสม

วัคซีนป้องกันโรคพยาธิปากขอ

ปัญหาที่เกิดขึ้นหลังจากให้ยารักษาผู้ติดเชื้อพยาธิปากขอโดยใช้ยาเพียงอย่างเดียวนั้นอาจไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากพบการติดเชื้อซ้ำในอัตราสูงในช่วงไม่กี่เดือนหลังจากให้การรักษา จากปัญหาดังกล่าวจึงมีการพัฒนาผลิตวัคซีนโดยมีเป้าหมายที่จะทำให้ตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะติดต่อลดน้อยลง การเริ่มต้นผลิตวัคซีน (Human Hookworm Vaccine Initiative, HHVI) ของสถาบัน Sabin Vaccine ได้ทำการเริ่มต้นผลิตวัคซีนต่อต้านพยาธิปากขอโดยมีจุดประสงค์เพื่อลดความรุนแรงของการติดเชื้อพยาธิ (Hotez et al., 2003) แอนติเจนที่ปล่อยออกมาจากตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่สามในช่วงที่บุกรุกเข้าไปในร่างกายของโฮสต์ คือ cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคและจัดอยู่ใน pathogenesis-related protein (PRP) superfamily ทั้งนี้โปรตีนในกลุ่ม PRP superfamily มีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาผลิตเป็นวัคซีน (Henriksen et al., 2001)

การศึกษาครั้งแรกของการผลิตวัคซีนเริ่มทดลองโดยการเลี้ยงตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่สามชนิด *Ancylostoma caninum* ซึ่งเป็นระยะติดต่อ โดยจำลองสภาวะแวดล้อมให้คล้ายกับการบุกรุกเข้าไปในเนื้อเยื่อของโฮสต์ พยาธิจะเจริญเป็นระยะที่พัฒนามากขึ้นคือมีการกินอาหาร หลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยเซรั่มของสุนัขที่ถูกกรองอย่างละเอียดและ S-methylated glutathione พบว่าโปรตีนส่วนมากที่พยาธิปากขอปล่อยออกมา (excretory/secretory products) หลังจากการได้รับการกระตุ้นดังกล่าวพบโปรตีนที่สำคัญ 3 ชนิด คือ metalloprotease และโปรตีน 2 ชนิดซึ่งเป็นโปรตีนที่จัดอยู่ใน pathogenesis-related protein (PRP) superfamily เรียกว่า *Ancylostoma*-secreted protein (ASPs) เป็นโปรตีนใน subfamily ของ PRP superfamily ประกอบด้วย ASP-1 และ ASP-2 โดยไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจนแต่พบว่า ASP มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพยาธิปากขอขณะเข้าไปอาศัยอยู่ในร่างกายของโฮสต์โดยอาจทำหน้าที่เกี่ยวกับการปรับสภาวะของตัวอ่อนจากการเจริญในธรรมชาติเข้าสู่สภาวะการเจริญแบบปรสิตรในร่างกาย (Hotez et al., 2003) โปรตีนทั้งสามชนิดที่ปล่อยออกมาสามารถนำมาผลิต recombinant protein ได้หลายชนิด เช่น โปรตีน 2 ตัวคือ Ac-SAA-1 และ Ac-16 พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำมาเป็นองค์ประกอบของการผลิตเป็นวัคซีน จากการทดลองในสุนัขได้ใช้โปรตีน Ac-16 เป็นองค์ประกอบของวัคซีนพบว่าไซพยาธิที่ปนออกมากับอุจจาระมีจำนวนลดลงและช่วยลดการสูญเสียเลือด (Diemert et al., 2008)

จากความสำเร็จในระยะแรกของการผลิตวัคซีนจากการนำสารคัดหลั่งที่ปล่อยออกมาจากตัวอ่อนพยาธิปากขอ *A. caninum* ระยะที่สามมาผลิตวัคซีนและนำไปทดลองในสัตว์พบว่า

สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่สามได้ ต่อมาจึงมีเป้าหมายที่จะผลิตวัคซีนมาใช้กับคนโดยได้ทำศึกษากับพยาธิปากขอของคนชนิด *N. americanus* เนื่องจากพบการระบาดของผู้ติดเชื้อพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* ในคนมากกว่าพยาธิปากขอชนิดอื่นๆ (Diemert et al., 2008) โดยโปรตีนที่ปล่อยออกมาจากตัวอ่อนพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* ระยะที่สาม (Na-ASP-2) ขณะเข้าไปในโฮสต์ได้ถูกนำมาวิเคราะห์และทำให้เป็นวัคซีนเพื่อนำมาใช้กับประชากรที่ติดเชื้อซึ่งทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโรคสำหรับป้องกันและควบคุมการติดเชื้อพยาธิปากขอในคนและนำไปใช้ทดลองทาง clinical trials (Bethony et al., 2008) จากการศึกษาพบโปรตีนชนิดหนึ่ง ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 21.3 กิโลดาลตัน เรียกว่า *Necator americanus Ancylostoma secreted protein-2 (Na-ASP-2)* เป็นสารที่ตัวอ่อนพยาธิปากขอ *N. americanus* ระยะที่สามปล่อยออกมาหลังจากเข้าไปในร่างกายของโฮสต์มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันการติดเชื้อพยาธิปากขอ เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านการติดเชื้อพยาธิปากขอได้ (Goud et al., 2005) ซึ่งมีข้อมูลยืนยันประสิทธิภาพของโปรตีน ASP-2 จากการศึกษาทดลองในสัตว์พบว่าสุนัขที่ได้รับวัคซีนที่มีองค์ประกอบของ Ac-ASP-2 ที่ปล่อยออกมาจากตัวอ่อนพยาธิปากขอ *A. caninum* ระยะที่สามสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันได้ นอกจากนี้เมื่อนำ recombinant protein ASP-2 ของ *A. caninum* หรือ *A. ceylanicum* นำมาใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีนในสุนัขและหนู hamsters ตามลำดับพบว่ามี การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิด IgG จำเพาะต่อแอนติเจนและสามารถทำลายตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่สามที่ยังมีชีวิตอยู่ได้เป็นจำนวนมากทำให้สามารถลดจำนวนพยาธิปากขอที่เจริญเติบโตเป็นระยะตัวเต็มวัย ดังนั้นจึงทำให้จำนวนไข่ที่ปนออกมากับอุจจาระจึงลดลงรวมทั้งลดการสูญเสียเลือดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการศึกษาในประชากรของประเทศบราซิลและจีนซึ่งมีการระบาดของ การติดเชื้อพยาธิปากขอจำนวนมากพบว่ามี การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ ASP-2 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงของการติดเชื้อพยาธิปากขอ (Diemert et al., 2008) ดังนั้นจากผลการทดลองที่ทำการศึกษาดังกล่าวนำไปสู่การผลิตวัคซีนเพื่อมาใช้กับคนจากโปรตีน Na-ASP-2 ของตัวอ่อนพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* ระยะที่สาม และมีการนำโปรตีนดังกล่าวมาเป็นองค์ประกอบสำหรับผลิตเป็นวัคซีนซึ่งได้รับการพัฒนาเพื่อนำมาใช้กับประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่การระบาดของโรคพยาธิปากขอ รวมถึงเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของคน โดยนำไปทำการทดสอบวัคซีนในสัตว์ทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน

จึงมีการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน Na-ASP-2 ประกอบด้วยด้าน N-terminal loop และด้าน cysteine-rich C terminus ซึ่งมีโครงสร้างแบบ 3 ชั้นในลักษณะของ $\alpha\beta\alpha$ sandwich

ประกอบด้วยแผ่น β sheet แบบขนานทิศตรงข้ามกันอยู่ตรงกลางระหว่างเกลียว α ทั้งสองที่มีทิศเดียวกัน ซึ่งลักษณะโครงสร้างนี้มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ CC-chemokines โดย Na-ASP-2 ในฐานข้อมูล GenBank Database คือ accession number AY288089 (Asojo et al., 2005) พบว่ามีเพียง 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์เท่านั้น ดังนั้นปัจจุบันจึงไม่ทราบว่าโปรตีนดังกล่าวมีความหลากหลายในลำดับกรดอะมิโนหรือไม่

โดยมีการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของยีน *Ay* (*A. ceylanicum*)-ASP-2 ที่ได้จากการโคลนยีนและเปรียบเทียบกับโปรตีน ASP-2 ของตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่สามที่อยู่ในสปีชีส์อื่น พบว่า *Ay*-ASP-2 มีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนร้อยละ 83 เมื่อเปรียบเทียบกับ *Ac*-ASP-2 และ *Ad*-ASP-2 และร้อยละ 61 เมื่อเปรียบเทียบกับ *Na*-ASP-2 (Goud et al., 2004) สำหรับการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของยีน *Na*-ASP-2 เปรียบเทียบกับโมเลกุล ASP-2 ของพยาธิปากขอในจิ้งนัส *Ancylostoma* ชนิดต่างๆ พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันประมาณร้อยละ 58-65 (Goud et al., 2005)

จากการทดลองในหนูพบว่าโปรตีน *Na*-ASP-2 ที่ตัวอ่อนพยาธิปากขอ *N.americanus* ระยะที่สามปล่อยออกมาสามารถผลิตเป็นโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) ในยีสต์ *Pichia pastoris* ได้ จากการทดสอบทางระบบภูมิคุ้มกันในหนู hamster (*Mesocricetus auratus*) โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่ม หนูในกลุ่มที่ 1 ได้รับการฉีด *rNa*-ASP-2 ปริมาณ 25 ug ร่วมกับ Adjuvant ชนิด ASO3 ซึ่งมี monophosphoryl lipid A และ oil (squalene)-in-water emulsion เป็นองค์ประกอบ กลุ่มที่ 2 ได้รับการฉีด *rNa*-ASP-2 ปริมาณ 25 ug ร่วมกับ Adjuvant ชนิด Alhydrogel และกลุ่มที่ 3 ได้รับการฉีด *rNa*-ASP-2 ปริมาณ 50 ug ร่วมกับ Alhydrogel โดยฉีดเข้าไปที่ใต้ผิวหนังในวันที่ 1 และฉีดเพิ่มขึ้น 2 เท่าในวันที่ 14 และวันที่ 28 โดยเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้ฉีด Adjuvant เข้าไปเพียงอย่างเดียว หลังจากฉีดวัคซีนเข็มสุดท้าย 1 สัปดาห์ หนูในแต่ละกลุ่มได้รับการฉีดตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่สามเข้าไปภายใต้ผิวหนังบริเวณกลางท้องในปริมาณเท่ากันทุกตัว และใน 25-28 วันหลังจากนั้นทำการตรวจหาพยาธิปากขอระยะตัวเต็มวัยในลำไส้พบว่าหนูในกลุ่ม 1 และ 3 ที่ได้รับวัคซีนมีจำนวนพยาธิปากขอน้อยกว่ากลุ่มควบคุมร้อยละ 39.7 และ 30.0 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มที่ได้รับ Adjuvant เพียงอย่างเดียว แต่หนูในกลุ่มที่ 2 มีจำนวนพยาธิปากขอน้อยกว่ากลุ่มควบคุมร้อยละ 46.2 ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงว่าวัคซีน recombinant *Na*-ASP-2 สามารถยับยั้งหรือทำลายตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิปากขอได้ (Xiao et al., 2007; Goud et al., 2005; Fujiwara., 2005)

หลังจากนั้นได้มีการศึกษาวัคซีน recombinant *Na*-ASP-2 ในคนระยะ Phase 1 เพื่อศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ *Na*-ASP-2 ร่วมกับ Alhydrogel ในผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพร่างกายสมบูรณ์และไม่ติดเชื้อพยาธิปากขอในสหรัฐอเมริกาจำนวน 36 คน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดย 9 คนในแต่ละกลุ่มได้รับวัคซีนจริงและส่วนอีก 3 คนในแต่ละกลุ่มได้รับวัคซีนปลอมซึ่งเป็นตัวควบคุม การทดลองเป็นแบบ double-blind ซึ่งอาสาสมัครและผู้ให้วัคซีนไม่ทราบว่าวัคซีนที่ได้รับของจริงหรือปลอม จากการวิจัยนี้ได้ใช้ โปรตีน *Na*-ASP-2 เป็นส่วนประกอบของวัคซีนและแบ่งความเข้มข้นของ *Na*-ASP-2 เป็น 3 ขนาดแตกต่างกัน (10, 50, และ 100 ug) ร่วมกับ Alhydrogel ปริมาณ 1.5 mg ฉีดเข้าไปภายใต้กล้ามเนื้อในวันที่ 1, 56 และ 112 ของการทดลอง จากนั้นทำการเก็บข้อมูลจนครบ 6 เดือนหลังจากฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย พบว่าระบบภูมิคุ้มกัน IgG เพิ่มขึ้นต่อ *Na*-ASP-2 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนปลอมจากการตรวจด้วยวิธี ELISA และเพิ่มมากขึ้นสูงสุดหลังจากฉีดวัคซีนเข็มที่ 3 ไป 2 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังตรวจพบ IgG subclasses ชนิด IgG1 และ IgG4 ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนจริงซึ่งตรวจไม่พบในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนปลอมและตรวจไม่พบ IgM และ IgA หลังจากนั้นยังคงตรวจพบ IgG ต่อ *Na*-ASP-2 ในวันที่ 336 หลังจากได้รับวัคซีน (Diemert et al., 2008; Bethony et al., 2008)

จากการศึกษาดังกล่าวได้แสดงว่ายีน *Na*-ASP-2 มีศักยภาพในการนำไปเป็นองค์ประกอบของวัคซีนควบคุมการติดเชื้อพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* ในคน อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของ *Na*-ASP-2 จากประชากรพยาธิปากขอในธรรมชาติ ซึ่งถ้าโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีนมี epitopes ที่ต่างไปจากโปรตีนของพยาธิปากขอในประชากรที่ติดเชื้อโดยทั่วไป ซึ่งอาจส่งผลให้วัคซีนมีประสิทธิภาพลดลงหรือใช้ไม่ได้ผล ดังนั้นจึงต้องมีการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Na*-ASP-2 ของพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* ที่พบในประชากรที่ติดเชื้อพยาธิปากขอจริงในธรรมชาติ ซึ่งข้อมูลที่ได้นอกจากจะสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของการผลิตวัคซีนสำหรับใช้ป้องกันผู้ติดเชื้อพยาธิปากขอแล้ว การทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Na*-ASP-2 ยังมีประโยชน์ในด้านการศึกษาพันธุกรรมประชากรและวิวัฒนาการของพยาธิปากขออีกด้วย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (research design)

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive study)

วัตถุประสงค์ (objectives)

เพื่อศึกษาและสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Na-ASP-2* ของพยาธิปากขอชนิด *Necator americanus* ที่พบในประเทศไทย

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือพยาธิปากขอที่พบในอุจจาระผู้ที่ติดเชื้อจากแหล่งชุมชนในภาคตะวันตกและภาคใต้ของประเทศไทย

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอนไซม์จำเพาะเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ขนาดของตัวอย่าง (Sample size)

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Na-ASP-2* ของพยาธิปากขอชนิด *Necator americanus* ที่พบในประเทศไทยเป็นครั้งแรก ดังนั้นคาดว่าจะใช้ตัวอย่างพยาธิจากตัวอย่างอุจจาระผู้ที่ติดเชื้อไม่ต่ำกว่า 30 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 ตัวซึ่งเป็นจำนวนที่ยอมรับในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิและเวลาได้

(high speed refrigerated microcentrifuge, Tomy)

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) OLYMPUS รุ่น BX51

เครื่องปั่นความเร็วสูงขนาดเล็ก

เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียดอ่านค่าได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Bosh)

ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Hitachi)

ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Puffer Hubbard)

ตู้เย็น -40 องศาเซลเซียส (Haier)

ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส (Forma Scientific)

ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติ (automatic adjustable micropipette) ขนาด 10, 100 และ

1,000 ไมโครลิตร

เครื่อง laminar flow

กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิและเวลา

อัตโนมัติ (PCR cycle, Automatic thermal cycler, Takara)

เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอโดยกระแสไฟฟ้า (Mupid-II)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Cyberscan 500)

เครื่องอ่านผลแถบดีเอ็นเอจากเจล (Bio Rad)

ตู้ปลอดเชื้อ (Nunre)

ตู้เลี้ยงเชื้อพร้อมเครื่องเขย่า (Taitec)

ตู้อบสำหรับเพาะเชื้อ (P-Selecta)

ตู้อบแห้ง (Memmert)

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง (Hirayama)

หน้ากากกันแสงอุลตราไวโอเล็ต

แหล่งกำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต

เครื่องยิงกระแสไฟฟ้า (*E.coli* pulser)

นาฬิกาจับเวลา

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Memmert)
 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Bio Rad)
 เครื่องไมโครเวฟ
 เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
 เครื่อง incubate
 Hematocytometer
 Vortex mixer (Scientific Industries)

วัสดุอุปกรณ์

เพลทเลี้ยงเชื้อ
 กระจกสำหรับเก็บอุจจาระ
 ไม้จิ้มฟัน
 ไม้สำหรับตักอุจจาระ
 กระดาษ filter paper สำหรับเลี้ยงพยาธิ
 กระจกสไลด์ ขนาด 2.5 x 75 เซนติเมตร
 กระจกปิดสไลด์ (cover slip)
 กระบอกตวง ขนาด 10, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร
 หลอดทดลองสำหรับปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge tube) ขนาด 0.1, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
 หลอดหยดสาร (dropper)
 กล้องโพรบใส่น้ำแข็ง
 กระดาษติดฉลาก
 กล่องพลาสติก
 ขวดสำหรับใส่สารเคมี
 ถุงมือยาง (Latex gloves)
 ถุงพลาสติก
 ที่วางหลอดทดลอง สำหรับหลอดขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
 แท่งแก้วสำหรับคนสาร
 ปีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100, 200, 500, 1000 มิลลิลิตร
 พาราฟิล์ม (Parafilm)
 กระดาษขึงสาร

ข้อต้นตักสาร

ผ้าก๊อช

สำลี

หนังยาง

สารเคมี

1. สารเคมีทั่วไป

absolute ethanol (Merck)

agarose, low gelling temperature (CAMBREX)

agarose (1 st BASE)

boric acid (Sigma)

cleaning solution (ICN Biomedicals)

disodium ethylenediamine tetracetic acid (EDTA, Promega)

double distilled water

ethidium bromide (Bio Rad)

glycerol

TE Buffer (Promega)

Tris Base (Promega)

LB (Merck)

2. สารเคมีที่เป็น Reagent Kit

QIAGEN Stool Extraction Kit

QIAGEN DNA Purification Kit

QIAGEN DNA Plasmid Mini Kit

QIAGEN Gel Extraction Kit

Cloning Kit (Promega)

PCR reagent Kit

ABI3100 Prism Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

3. เอนไซม์

proteinase K

Ex *Taq* polymerase

r*Taq* polymerase

T4 DNA ligase

4. Oligonucleotides

NMASP2F0 : 5'-GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCAC-3'

NMASP2F1 : 5'-GTCTTCTATCACATGTTTGG-3'

NMASP2F2 : 5'-ATGTTTGGTTCTTCTCTCGATTG-3'

NMASP2F3 : 5'-GCCAAGGATGGAGCTGGTGGA-3'

NMASP2F4 : 5'-AACCAAAGGAAAGGATTGG-3'

NMASP2R0 : 5'-GCTGGCATCATGTTTATTTGAATATTAAG -3'

NMASP2R1 : 5'-TTAAAGCAACTACAGATCACTAC-3'

NMASP2R2 : 5'-CCTATTCTAACGTTTGCTTTAGTCGT-3'

NMASP2R3 : 5'- CAACCTGAAGATTTTCGAATAAA-3'

NMASP2R4 : 5'-GCTTGCAAATTATTAAGTTAGAC -3'

5. ดีเอ็นเอมาตรฐาน

λ *Hind* III marker

100 bp DNA Ladder

1. การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

การศึกษาคั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างอุจจาระนักเรียนจากโรงเรียนไม้กะพงและโรงเรียนบ้านปรอผาใต้ อำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก และโรงเรียนสินแร่สยาม อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี รวมถึงเก็บอุจจาระจากชุมชน อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยไม่มีข้อจำกัดเรื่องเพศและอายุ

ขั้นตอนการเก็บอุจจาระนักเรียนเริ่มจากเก็บอุจจาระสดลงในกระปุกสำหรับเก็บอุจจาระ โดยแยกใส่กระปุกละตัวอย่าง พร้อมทั้งบันทึกประวัติ ซึ่งประกอบด้วย ชื่อ-สกุล เพศ อายุ และชั้นเรียน จากนั้นแบ่งอุจจาระสดส่วนหนึ่งจากกระปุกตัวอย่างอุจจาระผสมกับ 10% formaldehyde ด้วยอัตราส่วนประมาณ 1:1 โดยปริมาตรแล้วคนให้เข้ากันเพื่อรักษาสภาพของเชื้อปรสิตในอุจจาระ นำอุจจาระที่ผสมเข้ากันดีแล้วใส่อีกกระปุกหนึ่งเขียนสัญลักษณ์ให้ตรงกับชื่อตัวอย่างปิดฝาให้แน่นสนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยอุจจาระส่วนนี้จะใช้สำหรับวิธีการตรวจหาเชื้อปรสิต ขึ้นต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบ่งอุจจาระอีกส่วนหนึ่งเก็บใส่หลอด tube ขนาด 1.5 มิลลิตร โดยคงสภาพอุจจาระสดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาระหว่างนำกลับห้องปฏิบัติการเมื่อถึงห้องปฏิบัติการแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในกระบวนการทางอณูชีววิทยา ส่วนอุจจาระที่เหลืออยู่ปิดฝาให้แน่นสนิทโดยเก็บไว้สำหรับนำมาเพาะเลี้ยงให้เป็นพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนในกรณีที่เกิดการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้ผลบวก ซึ่งกระปุกเก็บตัวอย่างอุจจาระที่รับมานั้นได้ทำการปิดฝากระปุกให้แน่นสนิท ไม่ปล่อยวางทิ้งไว้กลางแดดเป็นเวลานาน และนำมาเพาะเลี้ยงหลังจากตรวจพบไข่พยาธิปากขอในทันที

2. การตรวจอุจจาระด้วยวิธี Simple smear และ Formalin-ether concentration technique

2.1 วิธี Simple smear

- 2.1.1 หยดน้ำกลั่น 1 หยด ตรงกลางแผ่นสไลด์ที่สะอาด
- 2.1.2 ใช้ไม้เขี่ยเนื้ออุจจาระโดยเฉพาะตรงที่มีลักษณะเป็นมูกเลือดให้ได้เนื้ออุจจาระประมาณ 1-2 มิลลิกรัมหรือขนาดเท่าหัวไม้ขีดไฟ
- 2.1.3 นำอุจจาระที่เขี่ยติดไม้ขึ้นมาผสมกับน้ำกลั่นที่หยดไว้บนแผ่นสไลด์ จนอุจจาระละลายในน้ำกลั่นสม่ำเสมอ แล้วจึงปิดด้วย coverslip โดยไม่ให้มีฟองอากาศ
- 2.1.4 นำแผ่นสไลด์ไปตรวจหาไข่พยาธิปากขอด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.2 วิธี Formalin-ether concentration technique

2.2.1 ผสมอุจจาระใน 10% formalin ให้ทั่วแล้วกรองผ่านผ้าก๊อชสองชั้นซึ่งเปียกน้ำ ลงในหลอดแก้วสำหรับปั่นความจุ 15 มิลลิลิตร ให้ได้ส่วนผสมของอุจจาระกับ 10% formalin ประมาณ 10 มิลลิลิตร

2.2.2 เติม diethyl ether ลงไป 3 มิลลิลิตร อุดปากหลอดด้วยจุกให้แน่นแล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 1-2 นาที

2.2.3 นำหลอดแก้วใส่ในเครื่องปั่น แล้วปั่นโดยใช้ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.2.4 นำหลอดแก้วที่ปั่นออกจากเครื่องปั่น ใช้ไม้เล็กๆ เขี่ยกากอุจจาระที่ติดอยู่ชั้นบน จากนั้นรินส่วนสารละลายส่วนบนทิ้งซ้ำๆ

2.2.5 ใช้ capillary pipette ดูดผสมส่วนของตะกอนที่เหลือในก้นหลอดแก้วให้เข้ากัน จากนั้นดูดตะกอนนี้ไปตรวจหาไข่พยาธิปากขอด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้วิธี Simple smear ข้อ 2.1

3. การเพาะเลี้ยงพยาธิ

3.1 นำไข่พยาธิปากขอที่ได้จากอุจจาระผู้ป่วยมาเพาะเลี้ยงให้เป็นระยะตัวอ่อน ด้วยวิธี Polyethylene tube culture โดยการนำอุจจาระที่ positive มาป้ายทาที่กระดาษกรอง

3.2 ใส่น้ำกลั่นในถุง polyethylene ปริมาณ 1 ใน 4 ของถุงแล้วใส่กระดาษกรองที่ป้ายอุจจาระ ลงในถุง polyethylene ให้อยู่เหนือน้ำกลั่นขึ้นมาเล็กน้อยโดยไม่ให้อุจจาระที่ป้ายโดนน้ำกลั่น

3.3 นำถุง polyethylene ที่ใส่กระดาษกรองมาแขวนไว้ที่ stand ไม้รูปตัวทีที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ประมาณ 4-7 วัน

3.4 ตรวจสอบการเจริญเติบโตของพยาธิด้วยกล้อง inverted microscope และทำการแยกตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่สามชนิด *Necator americanus* ออกจาก *Ancylostoma duodenale* โดยใช้รูปร่างทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิปากขอซึ่ง *N. americanus* มีขนาดสั้นและอ้วนกว่าเล็กน้อย มี mouth spear และ sheath ที่หุ้มรอบตัวมีลักษณะเป็นรอยย่นขีดขวาง (transverse striation) เห็นชัดกว่า

3.5 นำตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนที่ได้ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัวต่อผู้ที่ติดเชื้อ 1 คน จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PBS (PH 7.4) 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดดีเอ็นเอ

4. การเตรียมตัวอย่างตัวพยาธิเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

- 4.1 นำหลอดที่ใส่ตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนจากผู้ติดเชื้อ 1 คนต่อตัวอ่อน 1 ตัวมาปั่นล้างด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 4.2 ดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือในหลอดประมาณ 80 ไมโครลิตร
- 4.3 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ PBS 500 ไมโครลิตร
- 4.4 ทำการปั่นล้างตัวพยาธิด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 4.5 ทำซ้ำข้อ 4.2-4.4 จำนวน 2 ครั้ง เพื่อทำการปั่นล้างพยาธิ
- 4.6 ดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือในหลอดประมาณ 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Lysis Solution TLS 5 ไมโครลิตร จากชุดสกัดดีเอ็นเอ
- 4.7 ทำการบดตัวพยาธิให้แตกโดยใช้แท่งพลาสติกสำหรับบด
- 4.8 ดูดเก็บตัวพยาธิที่บดจนแตกแล้วไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดดีเอ็นเอ

5. การสกัดดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอ

5.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

- 5.1.1 ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอของ Analytik Jena โดยนำตัวอย่างที่เก็บไว้มาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PBS 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Lysis Solution TLS 250 ไมโครลิตร และเติม proteinase K 25 ไมโครลิตร สำหรับย่อยโปรตีนจากเนื้อเยื่อพยาธิ
- 5.1.2 ทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 5 วินาที แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 5.1.3 เติม Binding Solution TBS 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า vortex เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
- 5.1.4 ดูดส่วนใสใสในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอทานอล (70%) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 5.1.5 นำ Spin Filter ใส่บน Receiver Tube และดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงใน Spin Filter แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำ Spin Filter ถ่ายใส่ Receiver tube หลอดใหม่

5.1.6 เติม Washing Solution HS ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเปลี่ยน Receiver tube หลอดใหม่

5.1.7 เติม Washing Solution MS 700 ไมโครลิตร แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ Spin Filter ถ่ายใส่ Receiver tube หลอดใหม่ นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที

5.1.8 นำ spin Filter ใส่ใน Elution tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer ปริมาณ 30 ไมโครลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำการชะล้างดีเอ็นเอออกจาก spin Filter

5.1.9 นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดดีเอ็นเอที่สกัดได้ใส่ไว้ใน microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction) สำหรับทำ reverse transcription

5.2.1 นำตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนชนิด *N. americanus* 1 ตัวต่อผู้ที่ติดเชื้อ 1 คน ใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี RNA Later 100 ไมโครลิตรและใช้แท่งพลาสติกบดพยาธิให้ละเอียด หลังจากนั้นทำการสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัดของ QIAGEN จากการนำมาเติมบัฟเฟอร์ RLT 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20-40 วินาที

5.2.2 นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

5.2.3 เติม ethanol 70 % 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

5.2.4 ดูดสารละลายที่ได้ใส่ใน RNeasy spin column ที่มี collection tube นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำ RNeasy spin column ถ่ายใส่ collection tube หลอดใหม่

5.2.5 ทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ RW1 700 ไมโครลิตร และนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที นำ RNeasy spin column ถ่ายใส่ collection tube หลอดใหม่

5.2.6 ทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ RPR 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที

5.2.7 เติมบัฟเฟอร์ RPR 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

5.2.8 นำ RNeasy spin column ถ่ายใส่ collection tube หลอดใหม่และนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที

5.2.9 นำ RNeasy spin column มาใส่ไว้ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วเติม RNase-free water 30 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

5.2.10 คัดสารละลาย mRNA ที่สกัดได้ใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วนำไปใช้เป็น template สำหรับทำ reverse transcription ต่อไปหรือไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

6. การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA (cDNA synthesis)

ทำการสังเคราะห์ mRNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ชุด TaKaRa cDNA Synthesis kit โดยเตรียมองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาเพื่อสังเคราะห์ cDNA โดยกำหนดปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร ในหลอด microtube ซึ่งประกอบด้วย

6.1 Oligo dT-Adaptor primer ความเข้มข้น 2.5 pmol ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร

6.2 dNTP Mixture ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

6.3 10X RT buffer ความเข้มข้น 20 pmol ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

6.4 MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมล ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

6.5 AMV Reverse Transcriptase XL ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร

6.6 RNase Inhibitor ความเข้มข้น 40 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร

6.7 Template RNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

6.8 RNase free dH₂O ปริมาตร 2.75 ไมโครลิตร

ผสม mixture ในหลอด microtube ให้เข้ากันแล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิ 30, 42, 99 และ 5 องศาเซลเซียสและบ่มในแต่ละอุณหภูมิเป็นเวลา 10, 30, 5, 5 นาที ตามลำดับเมื่อครบเวลานำมาแช่บนน้ำแข็งทันที

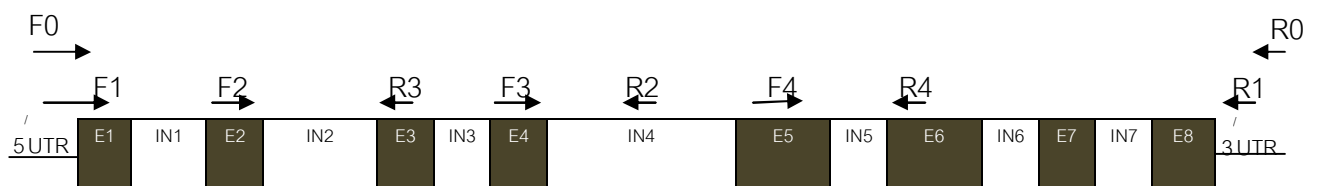
7. การออกแบบ oligonucleotides สำหรับใช้เป็น PCR Primer

นำข้อมูลดีเอ็นเอของยีน *Na-ASP-2* ที่ได้มาจาก GenBank Database accesses number AY 288089 เพื่อเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์คำนวณจากสูตรอุณหภูมิหลอมตัว (Melting temperature, T_m) ของ primer

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

โดยคำนึงถึงข้อกำหนดดังต่อไปนี้

1. ความยาวของ primer มีความยาวประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ และมีองค์ประกอบเบสชนิด guanine และ cytosine ประมาณร้อยละ 50-60
2. หลีกเลี่ยงการใช้ primer ที่มีลักษณะการเรียงตัวของเบสซ้ำๆ กัน
3. ในส่วนบริเวณปลาย 3' ของ primer ไม่มีลำดับเบสที่เป็น complementary กัน เพื่อป้องกันการจัดคู่กันเองของ primer (primer-dimer)
4. การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer แต่ละส่วนไม่มีลำดับเบสที่เหมือนกันเมื่ออ่านจากทิศทาง 5' ไปทาง 3' และ 3' ไปทาง 5' เพื่อป้องกันปลาย 3' งอมาจับกับ primer สายเดียวกันเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure)
5. ค่า T_m ของ Forward primer และ Reverse primer ใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วง 50-80 องศาเซลเซียส



E คือ exon และ IN คือ intron

ภาพที่ 8 แสดงตำแหน่งของ primer ต่างๆ ของยีน *Na-ASP-2* ในรูปของ genomic DNA ที่ใช้ในการทำ PCR และในขั้นตอนการหาลำดับเบส

NMASP2F0 : 5'-GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCAC-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสในช่วงเริ่มต้น(5'UTR) ถึงตำแหน่งที่ 17 ของยีน *Na-ASP-2*)

NMASP2F1 : 5'-GTCTTCTATCACATGTTTGG-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 6-25 ของยีน *Na-ASP-2*)

NMASP2F2 : 5'-ATGTTTGGTTCTTCTCTCGATTG-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 96-120 ของยีน *Na-ASP-2*)

NMASP2F3 : 5'-GCCAAGGATGGAGCTGGTGGA-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 606-626 ของยีน *Na-ASP-2*)

NMASP2F4 : 5'-AACCAAAGGAAAGGATTGG-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1321-1339 ของยีน *Na-ASP-2*)

NMASP2R0 : 5'-GCTGGCATCATGTTTATTTGAATATTAAAG -3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1969 ถึงตำแหน่งที่ 1995 ซึ่งอยู่หลัง stop codon (3'UTR) ของยีน *Na-ASP-2*)

NMASP2R1 : 5'-TTAAAGCAACTACAGATCACTAC-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1949 ถึงตำแหน่งที่ 1971 ซึ่งอยู่หลัง stop codon (3'UTR) ของยีน *Na-ASP-2*)

NMASP2R2 : 5'-CCTATTCTAACGTTTGCTTTAGTCGT-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 773-798 ของยีน *Na-ASP-2*)

NMASP2R3 : 5'- CAACCTGAAGATTTTCGAATTA-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 426-449 ของยีน *Na-ASP-2*)

NMASP2R4 : 5'-GCTTGCAAAATTATTAAGTTAGAC -3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1399-1422 ของยีน *Na-ASP-2*)

โดยในขั้นตอนการทำ PCR จะใช้ NMASP2F0 และ NMASP2R0 ส่วนในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) จะใช้ primer ทั้ง 8 แบบ ดังแสดงในรูปที่ 8

8. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

8.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับทำพีซีอาร์ โดยมีองค์ประกอบในการดำเนินปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอที่สกัดไว้ 2 ไมโครลิตร ,forward และ reverse primer ความเข้มข้น 30 พิโคโมล primer ละ 0.13 ไมโครลิตร, 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1.6 ไมโครลิตร , Ex Taq DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยา และน้ำกลั่น 14.04 ไมโครลิตร

8.2 นำหลอดที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสายนก่อนปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที และเริ่มปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 0.30 นาที การจับของ primer กับดีเอ็นเอต้นแบบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 0.30 นาที และการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ที่อุณหภูมิ 74 องศาเซลเซียส 2 นาที โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 38 รอบ และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ในรอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

9. การตรวจผลิตผลพีซีอาร์โดยวิธี gel electrophoresis

9.1 เตรียมอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ใน 1X TBE ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ภายหลังจากการหลอมเจลด้วยความร้อนแล้วปล่อยให้แข็งตัวในภาชนะเตรียมเจล แล้วจึงนำเจลมาใส่ใน electrophoresis chamber

9.2 นำผลิตผลพีซีอาร์ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมของ 1% อะกาโรสเจล ซึ่งใช้ λ Hind III เป็นดีเอ็นเอสำหรับบอกขนาด (DNA marker) เพื่อให้เปรียบเทียบกับขนาดของผลิตผลพีซีอาร์

9.3 เดินกระแสไฟฟ้าภายใต้กระแสขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำอะกาโรสเจลไปย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที

9.4 นำไปดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต และถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอผลิตผล โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอบอกขนาด

10. sequence analysis

นำผลิตภัณฑ์ซีอาร์ทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAamp PCR purification kit มีวิธีดังนี้

10.1 ใส่ 5 เท่าของ PB buffer ต่อปริมาตร 1 เท่า PCR product และทำให้เข้ากัน ดูดทั้งหมดใส่ใน QIAquick spin column ปั่น 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 1 นาที ทิ้ง ส่วนใสที่อยู่ในหลอดข้างล่าง column ไป และใส่กลับที่เดิม

10.2 เติม PE buffer ปริมาตร 750 ใน column และปั่น 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ในหลอดข้างล่าง column และใส่หลอดกลับที่เดิม

10.3 ปั่นให้ column แห่งที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งหลอดที่อยู่ด้านล่าง column ไป นำหลอด 1.5 มิลลิลิตรมาใส่แทน

10.4 เติม EB buffer 30 ไมโครลิตร ตรงกลาง membrane ของ column ตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 5 นาที และนำไปปั่น 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

จากนั้นนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่อง automated ABI Prism 310 โดยใช้ชุด ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของดีเอ็นเอในปัจจุบันจะนิยมใช้เครื่องหาลำดับดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ (Automated sequencer) ซึ่งสามารถทำได้ในเวลาอันรวดเร็วจากการค้นพบของ Sanger et al. (1997) เรียกว่าวิธี Sanger Method มีหลักการคล้ายกับการทำ PCR (polymerase chain reaction) โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลอง แต่มีการยับยั้งการสังเคราะห์สาย DNA ที่ตำแหน่งของ base (A, C, G หรือ T) ต่างๆอย่างจำเพาะเจาะจง ในปฏิกิริยาจะเตรียมคล้ายกับ PCR ตามปกติ จะแยกทำทั้งหมด 4 หลอดโดยมีการเติมสารเคมี primer, DNA polymerase และ ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) ทั้ง 4 ชนิด แยกใส่ลงไปในแต่ละหลอด เพื่อให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่จากการใช้ดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นต้นแบบ และมีการถูก labelled ด้วยสาร fluorescent เพื่อให้เกิดความสะดวกต่อการอ่านผลด้วยเครื่อง automated DNA sequencer ผลลัพธ์ที่ได้คือ ชิ้นส่วนสาย DNA ที่มีขนาดสั้นยาวแตกต่างกัน เมื่อนำสาย DNA ไปแยกขนาดในสนามกระแสไฟฟ้า (polyacrylamide gel electrophoresis) จะสามารถแปลผลด้วยการทำ Autoradiography และอ่านผลได้จากฟิล์ม X-ray โดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer จะได้รูปแบบของสาย DNA ที่มีการเรียงลำดับตามขนาดความยาว ซึ่งมีความสัมพันธ์กับรหัสพันธุกรรมบนสาย DNA ข้อมูลที่ได้คือสายรหัสพันธุกรรมของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) A, C, G, T หรือ N โดยสายรหัสพันธุกรรม DNA หรือลำดับนิวคลีโอไทด์อาจจะเป็นส่วนที่มีการสร้างโปรตีนหรือเป็นส่วนที่ไม่ได้มีการสร้างโปรตีนก็ได้ โดยขึ้นอยู่กับชิ้นส่วน DNA ที่

นำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ถ้าชิ้นส่วน DNA เป็น genomic DNA ก็จะพบทั้งในส่วน exon และ intron แต่ถ้าหากนำเอา RNA หรือ cDNA มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ก็จะพบเฉพาะในส่วน exon เท่านั้น ซึ่งประกอบด้วยรหัสพันธุกรรม (genetic code) ที่กำหนดการสร้างกรดอะมิโน

การวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis)

ทำการวิเคราะห์เรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* โดยใช้โปรแกรม Clustal W version 3.1 (<http://www.megasoftware.net>) เพื่อประเมินความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* โดยหาค่า nucleotide polymorphism และประเมินอัตราแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด (nonsynonymous substitution) และที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด (synonymous substitution) ซึ่งใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ MEGA หรือโปรแกรมอื่นที่เทียบเคียงกัน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการตรวจหาเชื้อปรสิตในอุจจาระภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ตัวอย่างอุจจาระที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ถูกเก็บรวบรวมได้จากนักเรียนในจังหวัดตาก จังหวัดราชบุรี ชุมชนจังหวัดนครศรีธรรมราชและจากผู้ป่วยที่ติดเชื้ซึ่งตรวจพบพยาธิปากขอในโรงพยาบาลจุฬา (ดังแสดงในตารางที่ 3) โดยในเดือนกันยายน พ.ศ. 2553 ได้ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากชุมชน อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวนทั้งหมด 44 คน เป็นเพศชาย 17 คน เพศหญิง 27 คน ภายในช่วงอายุตั้งแต่ 7-80 ปี จากการตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Simple smear และ Formalin-ether concentration technique พบพยาธิปากขอให้ผลบวก 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 29.55 นอกจากนี้ยังตรวจพบปรสิตอื่น ๆ ทั้งในกลุ่มของหนอนพยาธิตัวกลมและโปรโตซัว

ในปีเดียวกันเดือนพฤศจิกายนได้ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากนักเรียนโรงเรียนไม้กะพง อำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก พบว่านักเรียนส่งตรวจอุจจาระจำนวน 57 คน เป็นนักเรียนชาย 31 คน นักเรียนหญิง 26 คน ภายในช่วงอายุตั้งแต่ 7-15 ปี จากการตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบพยาธิปากขอให้ผลบวก 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.31 นอกจากนี้ยังได้ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากนักเรียนโรงเรียนบ้านปรอผาได้อ.อุ้มผาง จ.ตาก พบว่านักเรียนส่งตรวจอุจจาระจำนวน 25 คน เป็นนักเรียนชาย 12 คน นักเรียนหญิง 13 คน ภายในช่วงอายุตั้งแต่ 8-12 ปี จากการตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบพยาธิปากขอให้ผลบวก 9 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 36

ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2554 ได้ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากนักเรียนโรงเรียนสินแร่สยาม อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี พบว่านักเรียนส่งอุจจาระจำนวน 65 คน เป็นนักเรียนชาย 41 คน นักเรียนหญิง 24 คน ภายในช่วงอายุตั้งแต่ 7-15 ปี จากการตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบพยาธิปากขอให้ผลบวก 6 ตัวอย่างคิด เป็นร้อยละ 9.23

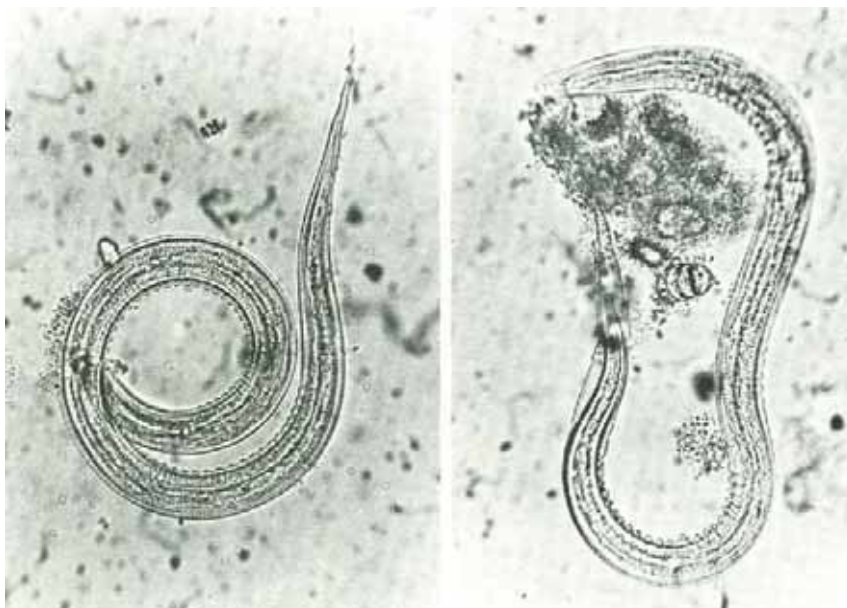
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ได้ส่งตรวจอุจจาระและผลการตรวจปรสิตด้วยวิธี Simple smear และ Formalin-ether concentration technique

ข้อมูล		รร. ไม้กะพง	รร. บ้านปรอผาโต้	รร. สิ้นแร้สยาม	ชุมชน อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช
เพศ	ชาย	31	12	41	17
	(จำนวนคน)				
	หญิง	26	13	24	27
	(จำนวนคน)				
	รวม	57	25	65	44
ช่วงอายุ	1-10	9	15	10	19
	11-20	48	10	55	6
	21-30	-	-	-	1
	31-40	-	-	-	4
	41-50	-	-	-	4
	51-60	-	-	-	5
	61-70	-	-	-	4
	71-80	-	-	-	1
ผลการ ตรวจเชื้อ ปรสิต	Hookworm	15	9	6	13
	ปรสิตอื่นๆ	1	1	3	3

ผลการเพาะเลี้ยงพยาธิปากขอระยะตัวอ่อน

นำตัวอย่างอุจจาระที่ให้ผลบวกจากการตรวจอุจจาระด้วยวิธี Simple smear และ Formalin-ether concentration technique มาทำการเพาะเลี้ยงโดยการนำไข่พยาธิปากขอที่ได้จากอุจจาระผู้ป่วยมาเพาะเลี้ยงให้เป็นระยะตัวอ่อนด้วยวิธี Polyethylene tube culture อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-8 วัน และตรวจสอบการเจริญเติบโตของพยาธิด้วยกล้อง inverted microscope จากนั้นทำการแยกตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะที่สามชนิด *Necator americanus* ออกจาก *Ancylostoma duodenale* (ดังแสดงในภาพที่ 9) โดยใช้รูปร่างทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิปากขอซึ่ง *N. americanus* มีขนาดสั้นและอ้วนกว่าเล็กน้อย มี mouth spear เห็นชัดกว่า *A. duodenale* sheath ที่หุ้มลำตัวมีลักษณะเป็นรอยย่นขีดขวาง (transverse striation) มองเห็นชัดเจนและลักษณะความยาวช่องว่างระหว่างปลายหางและเยื่อหุ้มตัวรวมถึงหางตอนปลายหางของ *N. americanus* จะมีลักษณะกางออกเป็นมุมกว้างและปลายสุดของหางจะแหลม แต่ *A. duodenale* ที่ปลายหางจะเรียวแหลมและไม่กางออกเป็นมุมกว้างเหมือน *N. americanus* (Beaver et al., 1984; Gilman, 2000) หลังจากนำตัวอย่างอุจจาระที่ให้ผลบวกจากการตรวจพบไข่พยาธิปากขอมาทำการเพาะเลี้ยงพบว่าตัวอย่างอุจจาระจากชุมชน อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราชที่ตรวจพบพยาธิปากขอให้ผลบวก 13 ตัวอย่าง สามารถเลี้ยงไข่พยาธิปากขอเป็นระยะตัวอ่อนชนิด *N. americanus* ได้จำนวน 8 ตัวอย่าง (ดังแสดงในตารางที่ 4) ตัวอย่างอุจจาระจากนักเรียนโรงเรียนไม้กะพง อำเภออุ้มผาง จังหวัดตากให้ผลบวก 15 ตัวอย่าง สามารถเลี้ยงไข่พยาธิปากขอเป็นระยะตัวอ่อนชนิด *N. americanus* จำนวน 13 ตัวอย่าง ตัวอย่างอุจจาระจากนักเรียนโรงเรียนบ้านปรอผาใต้ อ.อุ้มผาง จ.ตาก ให้ผลบวก 9 ตัวอย่างและสามารถเลี้ยงไข่พยาธิปากขอเป็นระยะตัวอ่อนชนิด *N. americanus* ได้จำนวน 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างอุจจาระจากนักเรียนโรงเรียนสินแร่สยาม อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี พบพยาธิปากขอให้ผลบวก 6 ตัวอย่าง สามารถเลี้ยงไข่พยาธิปากขอจนเป็นระยะตัวอ่อนชนิด *N. americanus* จำนวน 5 ตัวอย่าง

ตัวอย่างอุจจาระที่ตรวจพบพยาธิปากขอแต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เป็นระยะตัวอ่อนได้นั้น เนื่องจากไข่พยาธิปากขออาจสัมผัสกับความร้อนในช่วงระหว่างการขนส่งทำให้พยาธิปากขอไม่สามารถฟักออกมาจากไข่ได้ หลังจากได้ตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนแล้วทำการแยกตัวอ่อนพยาธิปากขอที่ได้ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัวต่อผู้ที่ติดเชื้อ 1 คน เพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอ



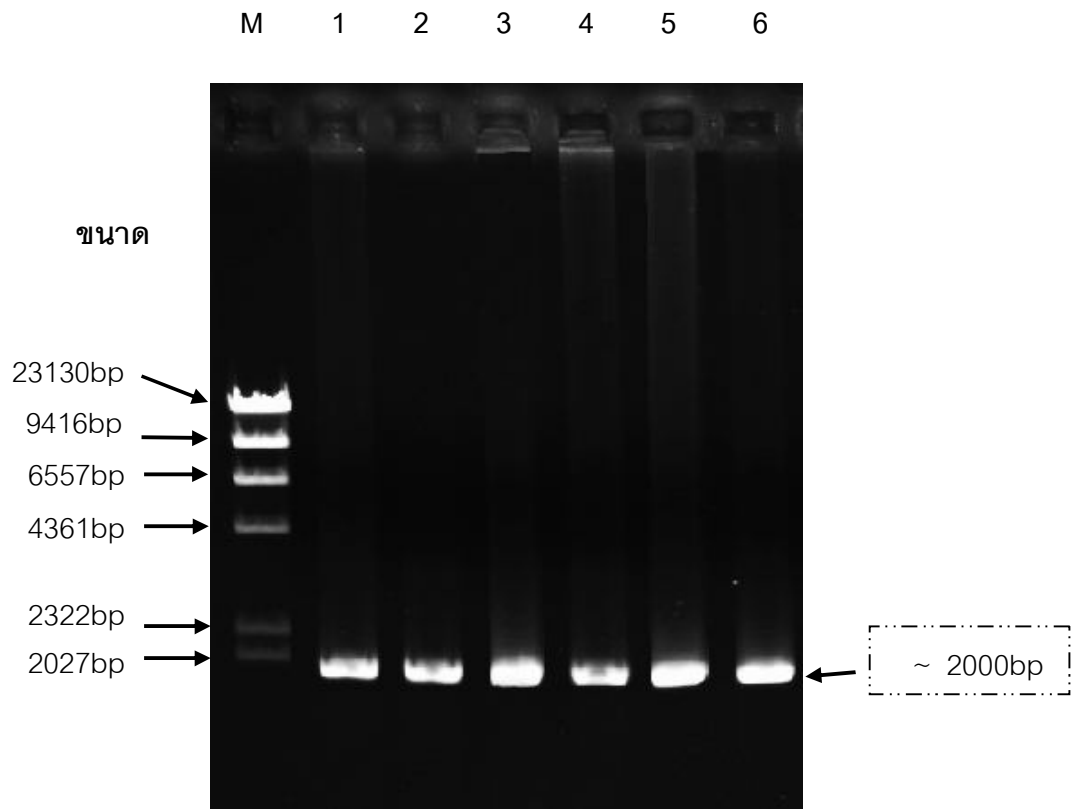
ภาพที่ 9 แสดงลักษณะระยะตัวอ่อนพยาธิปากขอชนิด *A. duodenale* (ซ้าย) และ *N. americanus* (ขวา) ที่มา (Komiya, 1985)

ตารางที่ 4 แสดงผลการเพาะเลี้ยงพยาธิปากขอ

ข้อมูล	รร. ไม้กะพง	รร. บ้านปรอผาใต้	รร. สินแร่สยาม	ชุมชน อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช
ผลการตรวจเชื้อปรสิตให้ ผลบวก Hookworm	15	9	6	13
ผลการเพาะเลี้ยงได้ตัว อ่อนพยาธิปากขอชนิด <i>N. americanus</i>	13	6	5	8

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *Na-ASP-2* จาก genomic DNA โดยอาศัยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

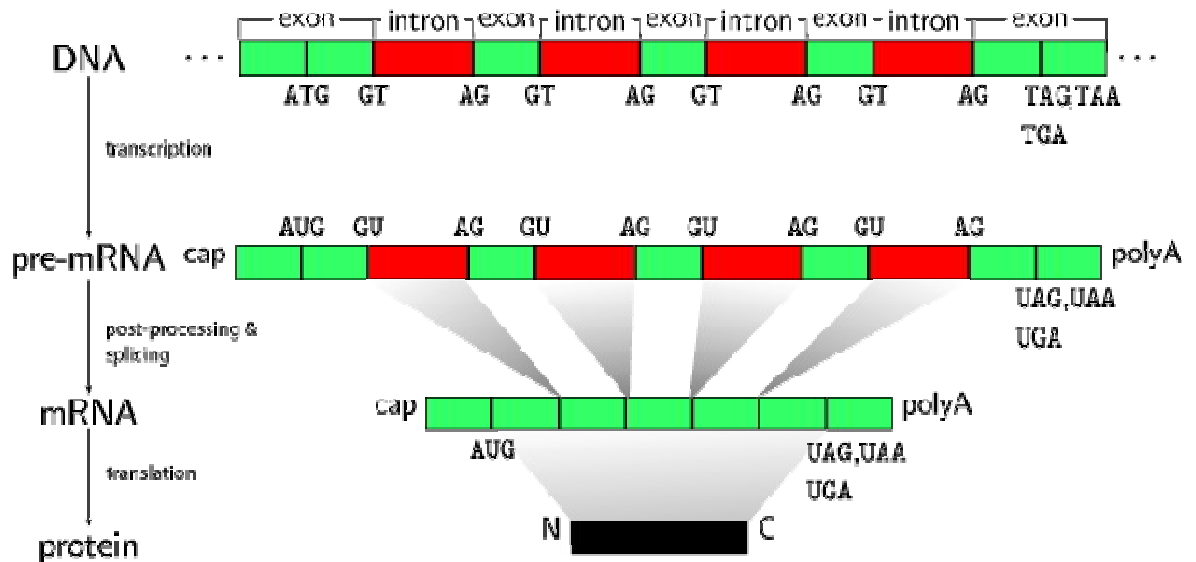
ขั้นตอนแรกได้นำตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนชนิด *N. americanus* ซึ่งได้มาจากผู้
ที่ติดเชื้อในจังหวัดต่างๆ ตัวอย่างละ 1 ตัว ใส่ในหลอดทดลองและทำการสกัดดีเอ็นเอจากนั้นทำ
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *Na-ASP-2* โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจากวิธี PCR ใช้
Primer NMAASP2F0 และ NMAASP2R0 ที่ออกแบบมาจากฐานข้อมูล GenBank Database ของ
ยีน *Na-ASP-2* คือ accession number AY288089 และทำการวิเคราะห์ผลผลิต PCR โดย
ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งใช้ agarose gel ความ
เข้มข้นร้อยละ 1 และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดคือ λ Hind III พบว่าผลผลิต
PCR ของตัวอย่างพยาธิปากขอที่นำมาวิเคราะห์ในระยะเริ่มต้นมีขนาดประมาณ 2,000 bp ซึ่งมี
ขนาดแตกต่างจากยีน *Na-ASP-2* ที่เป็น cDNA ใน GenBank Database ทำให้เกิดข้อสันนิษฐาน
ว่าผลผลิต PCR ที่ได้เป็น Fail positive หรืออาจจะเป็นส่วน intron ที่เพิ่มขึ้นมาเพราะได้ทำการ
สกัดมาจาก genomic DNA จึงได้ทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *Na-ASP-2*
ด้วยวิธี PCR ทั้งหมด เมื่อตรวจสอบผลผลิต PCR พบว่าผลผลิตที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมดมีขนาด
ประมาณ 2,000 bp เท่ากันทุกตัวอย่าง(ดังแสดงในภาพที่ 11) และไม่พบแถบดีเอ็นเอมากกว่า 1
แถบในตัวอย่างเดียวกันโดยพบว่ามีขนาดแตกต่างจากยีน *Na-ASP-2* ที่เป็น cDNA ใน GenBank
Database ประมาณ 1300 bp ซึ่งส่วนที่เพิ่มขึ้นมาอาจจะเป็นส่วนของ intron จึงต้องทำการ
วิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่าง genomic DNA กับ cDNA จากพยาธิปากขอระยะตัวอ่อน เพื่อ
ยืนยันผลยีน *Na-ASP-2* ในส่วน exon และ intron ของ genomic DNA



ภาพที่ 10 แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ของ genomic DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เรียงตามหมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 คือ ตัวอย่าง H1, H2, H20, H21, H22 และ H32 ตามลำดับ; ตัวอักษร M คือ ดีเอ็นเอบอกขนาด (marker) โดยใช้ λ Hind III

จากการศึกษาพบว่าพยาธิปากขอเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างเซลล์แบบยูคาริโอต (eukaryote) และมีเยื่อหุ้มนิวเคลียสทำให้หลังจากกระบวนการถอดรหัส (transcription) จะพบทั้งส่วน exon (coding sequences) และ intron (noncoding sequence) (ดังแสดงในภาพที่ 10) ดังนั้นในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *Na-ASP-2* ซึ่งมาจาก genomic DNA ของพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนจึงมีส่วน intron เพิ่มขึ้นมา แต่ในฐานข้อมูล GenBank Database ของยีน *Na-ASP-2* ที่ใช้ในการอ้างอิงเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น Complementary DNA (cDNA) ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นจากการใช้ Messenger RNA (mRNA) เป็นแม่แบบ โดยพบว่ามีเพียง 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์เท่านั้น คือ accession number AY288089 (Asojo et al., 2005) ซึ่งโมเลกุล mRNA ที่ได้ถูกตัด intron ออกไปในกระบวนการ RNA splicing คงเหลือไว้แต่ส่วน exon เพื่อให้สามารถเข้าสู่กระบวนการแปลรหัส (translation) เป็นกรดอะมิโนโปรตีน จากสาเหตุดังกล่าวทำให้ไม่ทราบ

ขนาดและความหลากหลายของยีน *Na-ASP-2* จากตัวอ่อนพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนชนิด *N. americanus* ที่ประกอบด้วยส่วน exon และ intron ใน genomic DNA

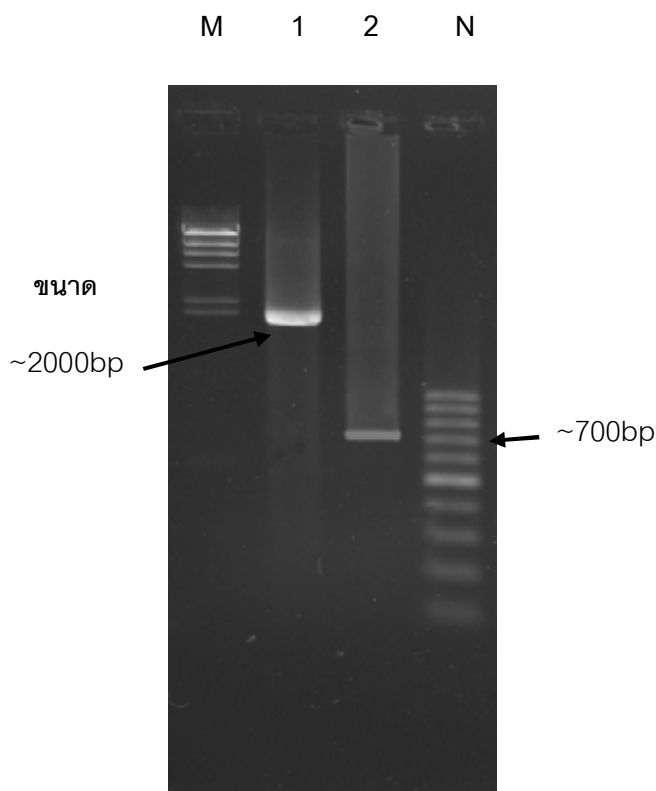


ภาพที่ 11 แสดงกระบวนการ transcription and translation ในยูคาริโอต

(<http://svmcompbio.tuebingen.mpg.de/splicing.html>)

เปรียบเทียบยีน *Na*-ASP-2 ที่ได้จาก genomic DNA กับ cDNA

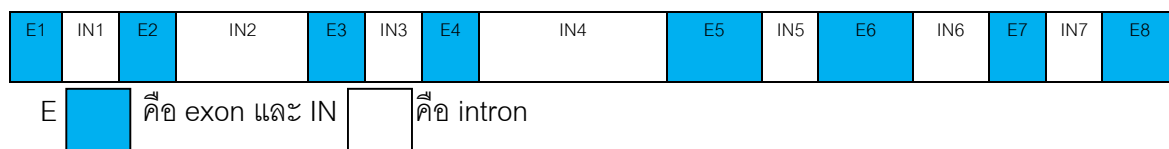
ทำการสังเคราะห์ mRNA ให้เป็น cDNA และเพิ่มปริมาณยีน *Na*-ASP-2 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเฉพาะในส่วน exon มาทำการวิเคราะห์กับ genomic DNA เพื่อยืนยันผลในส่วน exon และ intron โดยการนำพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนมาทำกระบวนการ Reverse transcription จะได้ cDNA หลังจากนั้นนำมาทำ PCR โดยใช้ Primers NMAASP2F0 และ NMAASP2R0 ที่จำเพาะต่อยีน *Na*-ASP-2 พบว่าโมเลกุลที่ได้จะถูกตัด intron ออกไปคงเหลือไว้แต่เฉพาะ exon เมื่อไปตรวจสอบดูขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดคือ λ Hind III และ Ladder 100 bp พบว่าผลิตภัณฑ์นำมาวิเคราะห์มีขนาดประมาณ 700 bp (ดังแสดงในภาพที่ 12) และไม่พบแถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ ซึ่งมีขนาดแตกต่างจากยีน *Na*-ASP-2 ที่เป็น genomic DNA ประมาณ 1300 bp



ภาพที่ 12 แสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างผลผลิต PCR ของ genomic DNA กับ cDNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เรียงตามหมายเลข 1 และ 2 คือ ตัวอย่าง H2 (genomic DNA), cDNA ตามลำดับ และตัวอักษร M คือดีเอ็นเอบอกขนาด (marker) โดยใช้ λ Hind III และตัวอักษร N คือดีเอ็นเอบอกขนาด (marker) โดยใช้ Ladder 100 bp

หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการนำยีน *Na*-ASP-2 ที่เป็น genomic DNA และ cDNA มาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่อง automated ABI Prism 310 ชุด ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na*-ASP-2 โดยใช้โปรแกรม Clustal W version 3.1 (<http://www.megasoftware.net>) จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na*-ASP-2 ที่ได้มาจากตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na*-ASP-2 ที่เป็น genomic DNA เมื่อทำการตัดในส่วน intron ออกทั้งหมดและเชื่อมเฉพาะส่วน exon เข้าด้วยกันมีผลตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่ได้จากการทดลองและจากฐานข้อมูล GenBank Database ของยีน *Na*-ASP-2 ที่มีเฉพาะส่วน exon นอกจากนี้ในบริเวณระหว่างรอยต่อ exon และ intron ของ genomic DNA ได้เป็นไปตามกฎ GT/AG rule ดังนั้นสามารถสรุปยืนยันได้ว่ายีน *Na*-ASP-2 ที่เป็น genomic DNA โดยอยู่ในช่วงที่ต้องการศึกษาและสามารถนำมาวิเคราะห์ข้อมูลได้ประกอบด้วย exon จำนวน 8 ส่วน และ intron จำนวน 7 ส่วน (ดังแสดงในภาพที่ 13 และ ภาพที่ 14)

ภาพที่ 13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na*-ASP-2 ที่มาจาก genomic DNA



ภาพที่ 14 แสดงตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na*-ASP-2 ที่มาจาก genomic DNA ในตัวอย่าง H2

โดยมีสัญลักษณ์ดังนี้ คือในส่วนที่ GG และขีดเส้นใต้ คือ exon ส่วนที่เหลี่ยม คือ intron

5' ULR คือ 5 untranslated leader sequence

3' UTR คือ 3 untranslated tailer sequence

5' ULR exon intron

GAAAAATCACAATGATGTCCTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
AACAGTGGTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
CTCTCGATTGCAGCGTACTCCAAAGCCGGTAGGTTTATTCTTGTGAAATTCTTCTTTACT
TTAGGGTTGCAAGCTTTGGTACATTTCTGTCAAATGGCTTTTACTTATGGTGCAATATTG
TGAGTTAATGAATGAGAGCGTATAACTGGTCCCTAGCTATGAGAGGGTTCTTTTTTCA

AACGTCTTGTGTAGATACGTTGCAAGCACACAATGCGGAGACCACGAAACCTCAACG
ATTCTACCTTTTCATGACCCGTAATTTGTTCCGAAAAGATGTGATTGAAGTTTGCAACAG
CACTGCAAGAGAATTTTTTTTTTAATTCGAAAATCTTCAGGTTGTCCTGACAATGGAATG
TCAGAGGAAGCACGGCAAAAATTCCTTGAATTGCACAATTCGTTGAGGTATAATCTTCT
ACAGTATTGAGGAATATCATCTATATGAGCTGCACTACATTGTGAATTTCTATTCCAGA
AGTTCGGTTGCATTGGGACAGGCCAAGGATGGAGCTGGTGGAAATGCCCGAAAAGC
TGCTAAGATGAAGACGATGGTATAGCTCTTGTGAGATCCTAGAAACCTAACGTAACT
TCTACATGACAGTGAACCACAAAAGGTTGAAGCAGTCGTGTTAACTCTATTTTGTCTGA
TAAGTAAGTCAAAAACGACTAAAGCAAACGTTAGAATAGGGAGAGTAGATCTATGGAT
ATCTGAAAGACTTGGCATTGTTGCAATTTTTGCATTCTGGAAAATTCAGCGTACAGCCA
GTTCAATTGATTTTTCATTAGATGCCATTAGATCTGACAAATACATTAGATCTAACATTAGA
TGAAGACGATGGTATAGCTCTTGTGAGATCCTGTTGAGTTGAGATGTTGAGATTATTC
ATTTATCACTAGATCTACAAATCATTAGATCTAACAAGTACAACTTTTTTGAGTGAAATG
GACATTTTGAAGTTCAACTGACGAAAAAACATAAAATGTTACAAATATGAACGTTACATT
TGGTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTAATACTATACGTAATACTATACAGT
ATCTCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATTGCTATGTATATTCCA
GGAAGTGTAGGCATACGATTGCGAAGTTGAAAAGACTGCAATGAATAACGCGAAAC
AATGTGTATTCAAGCACTCGCAACCTAACCAAGGAAAGGATTGGGAGAGAATATATT
TATGTCTTCGGATAGCGGTATGGACAAAGCAAAGGCTGCTGAGCAGGTCTAACTTAAT
AATTTTGAAGCAAACCACAGTTAATATTAATAATATTCAATGATTAATTTAGGCTAGC
AAAGCTTGGTTCGGCGAACTTGCAGAAAAGGAGTTGGACAGAATCTTAAGCTTACAG
GAGGCTTGTTGAGCAGAGGAGTCGGACACTATACACAGGTATGCGGGCCGCTTTTTTC
CGACTGGATCCTGATATTTAGCGATATGAATTGATCACATCGATTTTCTTTAGATGGTA
TGGCAAGAAACCGTTAAGCTTGGATGCTATGTGGAAGCGTGCTCAAATATGTGTTATG
TGGTGTGCCAGTACGGTCCGCTACGTCCTCATTTAATCTATTGTTTTTGGATCGTTTT
TTTTTTTTCTTATTGACTTCCGAGGCAGAACAAATATGTTTAGTGGAAATATGATGGGCA
AGGATATCTACGAGAAAGGAGAACCGTGTTCGAAATGTGAGAATTGCGACAAGGAGA
AGGGACTCTGCAGTGCTTGAATTAGTTGTGTTGAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTT
TAACAAATCGTAGTGATCTGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAACATGATGCCAGC

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *Na-ASP-2* จากตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อน

หลังจากทำการวิเคราะห์ผลผลิต PCR จำนวน 32 ตัวอย่าง ที่เป็น genomic DNA โดยตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าผลผลิตที่นำมาวิเคราะห์มีขนาดประมาณ 2,000 bp ดังนั้นจะเห็นได้ว่าตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนชนิด *N. americanus* ที่ได้จากผู้ติดเชื้อจำนวน 32 ตัวอย่างสามารถทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *Na-ASP-2* ได้ทั้งหมด (ดังแสดงในตารางที่ 5) ประกอบด้วยตัวอย่างจากนักเรียนโรงเรียนไม้กะพงและโรงเรียนบ้านปรอผาใต้ อำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก จำนวน 19 ตัวอย่าง (H1-H19) ตัวอย่างจากชุมชน อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 8 ตัวอย่าง (H20-H27) และตัวอย่างจากนักเรียนโรงเรียนสินแร่สยาม อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง (H28-H32) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่อง automated ABI Prism 310 ชุด ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit และวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis) โดยทำการวิเคราะห์เรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* โดยใช้โปรแกรม Clustal W version 3.1 (<http://www.megasoftware.net>) เพื่อประเมินความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่มีผลทาง PCR

ลำดับที่	ชื่อ sample	เพศ	อายุ(ปี)	สถานที่
1	H1	ชาย	8	จ.ตาก
2	H2	หญิง	9	จ.ตาก
3	H3	ชาย	10	จ.ตาก
4	H4	ชาย	10	จ.ตาก
5	H5	หญิง	11	จ.ตาก
6	H6	ชาย	11	จ.ตาก
7	H7	หญิง	11	จ.ตาก
8	H8	ชาย	11	จ.ตาก
9	H9	หญิง	13	จ.ตาก
10	H10	ชาย	12	จ.ตาก
11	H11	หญิง	11	จ.ตาก
12	H12	ชาย	11	จ.ตาก
13	H13	ชาย	11	จ.ตาก

14	H14	ชาย	11	จ.ตาก
15	H15	หญิง	11	จ.ตาก
16	H16	ชาย	11	จ.ตาก
17	H17	ชาย	11	จ.ตาก
18	H18	หญิง	10	จ.ตาก
19	H19	ชาย	10	จ.ตาก
20	H20	ชาย	10	จ.นครศรีธรรมราช
21	H21	หญิง	64	จ.นครศรีธรรมราช
22	H22	หญิง	47	จ.นครศรีธรรมราช
23	H23	หญิง	7	จ.นครศรีธรรมราช
24	H24	ชาย	15	จ.นครศรีธรรมราช
25	H25	ชาย	4	จ.นครศรีธรรมราช
26	H26	หญิง	39	จ.นครศรีธรรมราช
27	H27	ชาย	22	จ.นครศรีธรรมราช
28	H28	ชาย	11	จ.ราชบุรี
29	H29	ชาย	11	จ.ราชบุรี
30	H30	หญิง	10.1	จ.ราชบุรี
31	H31	ชาย	12.3	จ.ราชบุรี
32	H32	หญิง	10.5	จ.ราชบุรี

ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์พยาธิปากขอระยะตัวอ่อนชนิด *N. americanus* ที่เป็น genomic DNA

1. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* เฉพาะในส่วนของ exon (ดังแสดงในตารางที่ 6) และแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* บริเวณเฉพาะ exon (ดังแสดงในภาพที่ 15)

ตารางที่ 6 แสดงตัวอย่างของยีน *Na-ASP-2* ในตำแหน่งที่เกิดการแทนที่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตัวอ่อนพยาธิ) บริเวณเฉพาะ exon เทียบกับฐานข้อมูล GenBank Database accession number AY288089

Isolates	source	nucleotide position	codon	amino acid	type of nucleotide substitution	
H20 และ H24	L3	109	<u>ITG</u>	Leu	nonsynonymous	transversion
			<u>ATG</u>	Met		
H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, H21, H22, H23, H24, H25, H26, H27, H28, H29, H30, H31 และ H32	L3	441	<u>GGG</u>	Gly	synonymous	transition
			<u>GGA</u>	Gly		
H1 และ H25	L3	486	<u>TGC</u>	Cys	synonymous	transition
			<u>TGI</u>	Cys		

ภาพที่ 15 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* บริเวณเฉพาะ exon เทียบกับฐานข้อมูล GenBank Database accession number AY288089 ซึ่งตัวอย่าง H2 เป็นตัวแทนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบเป็นส่วนมาก (N=28) ในกลุ่มตัวอย่าง

โดย * คือ ตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

คือ ตำแหน่งที่พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (substitution)

```

H2          ATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTTCTTCTCTCGATTGCAGCGTACTCCAAAGCCGGT
AY288089   ATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTTCTTCTCTCGATTGCAGCGTACTCCAAAGCCGGT
H25        ATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTTCTTCTCTCGATTGCAGCGTACTCCAAAGCCGGT
H1          ATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTTCTTCTCTCGATTGCAGCGTACTCCAAAGCCGGT
H20        ATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTTCTTCTCTCGATTGCAGCGTACTCCAAAGCCGGT
H24        ATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTTCTTCTCTCGATTGCAGCGTACTCCAAAGCCGGT
*****

H2          TGTCTTGACAATGGAATGTCAGAGGAAGCACGGCAAAAATTCCTTGAATTGCACAATTCG
AY288089   TGTCTTGACAATGGAATGTCAGAGGAAGCACGGCAAAAATTCCTTGAATTGCACAATTCG
H25        TGTCTTGACAATGGAATGTCAGAGGAAGCACGGCAAAAATTCCTTGAATTGCACAATTCG
H1          TGTCTTGACAATGGAATGTCAGAGGAAGCACGGCAAAAATTCCTTGAATTGCACAATTCG
H20        TGTCTTGACAATGGAATGTCAGAGGAAGCACGGCAAAAATTCCTTGAATTGCACAATTCG
H24        TGTCTTGACAATGGAATGTCAGAGGAAGCACGGCAAAAATTCCTTGAATTGCACAATTCG
*****

H2          TTGAGAAGTTCGGTTGCATTGGGACAGGCCAAGGATGGAGCTGGTGGAAATGCCCCGAAA
AY288089   TTGAGAAGTTCGGTTGCATTGGGACAGGCCAAGGATGGAGCTGGTGGAAATGCCCCGAAA
H25        TTGAGAAGTTCGGTTGCATTGGGACAGGCCAAGGATGGAGCTGGTGGAAATGCCCCGAAA
H1          TTGAGAAGTTCGGTTGCATTGGGACAGGCCAAGGATGGAGCTGGTGGAAATGCCCCGAAA
H20        TTGAGAAGTTCGGTTGCATTGGGACAGGCCAAGGATGGAGCTGGTGGAAATGCCCCGAAA
H24        TTGAGAAGTTCGGTTGCATTGGGACAGGCCAAGGATGGAGCTGGTGGAAATGCCCCGAAA
*****

H2          GCTGCTAAGATGAAGACGATGGCATAACGATTGCGAAGTTGAAAAGACTGCAATGAATAAC
AY288089   GCTGCTAAGATGAAGACGATGGCATAACGATTGCGAAGTTGAAAAGACTGCAATGAATAAC
H25        GCTGCTAAGATGAAGACGATGGCATAACGATTGCGAAGTTGAAAAGACTGCAATGAATAAC
H1          GCTGCTAAGATGAAGACGATGGCATAACGATTGCGAAGTTGAAAAGACTGCAATGAATAAC
H20        GCTGCTAAGATGAAGACGATGGCATAACGATTGCGAAGTTGAAAAGACTGCAATGAATAAC
H24        GCTGCTAAGATGAAGACGATGGCATAACGATTGCGAAGTTGAAAAGACTGCAATGAATAAC
*****

H2          GCGAAACAATGTGTATTCAAGCACTCGCAACCTAACCAAAGGAAAGGATTGGGAGAGAAT
AY288089   GCGAAACAATGTGTATTCAAGCACTCGCAACCTAACCAAAGGAAAGGATTGGGAGAGAAT
H25        GCGAAACAATGTGTATTCAAGCACTCGCAACCTAACCAAAGGAAAGGATTGGGAGAGAAT
H1          GCGAAACAATGTGTATTCAAGCACTCGCAACCTAACCAAAGGAAAGGATTGGGAGAGAAT
H20        GCGAAACAATGTGTATTCAAGCACTCGCAACCTAACCAAAGGAAAGGATTGGGAGAGAAT
H24        GCGAAACAATGTGTATTCAAGCACTCGCAACCTAACCAAAGGAAAGGATTGGGAGAGAAT
*****

H2          ATATTTATGTCTTCGGATAGCGGTATGGACAAAGCAAAGGCTGCTGAGCAGGCTAGCAAA
AY288089   ATATTTATGTCTTCGGATAGCGGTATGGACAAAGCAAAGGCTGCTGAGCAGGCTAGCAAA
H25        ATATTTATGTCTTCGGATAGCGGTATGGACAAAGCAAAGGCTGCTGAGCAGGCTAGCAAA
H1          ATATTTATGTCTTCGGATAGCGGTATGGACAAAGCAAAGGCTGCTGAGCAGGCTAGCAAA
H20        ATATTTATGTCTTCGGATAGCGGTATGGACAAAGCAAAGGCTGCTGAGCAGGCTAGCAAA
H24        ATATTTATGTCTTCGGATAGCGGTATGGACAAAGCAAAGGCTGCTGAGCAGGCTAGCAAA
*****

H2          GCTTGGTTCGGCGAACTTGCAGAAAAAGGAGTTGGACAGAATCTTAAGCTTACAGGAGGC
AY288089   GCTTGGTTCGGCGAACTTGCAGAAAAAGGAGTTGGACAGAATCTTAAGCTTACAGGAGGC
H25        GCTTGGTTCGGCGAACTTGCAGAAAAAGGAGTTGGACAGAATCTTAAGCTTACAGGAGGC
H1          GCTTGGTTCGGCGAACTTGCAGAAAAAGGAGTTGGACAGAATCTTAAGCTTACAGGAGGC
H20        GCTTGGTTCGGCGAACTTGCAGAAAAAGGAGTTGGACAGAATCTTAAGCTTACAGGAGGC
H24        GCTTGGTTCGGCGAACTTGCAGAAAAAGGAGTTGGACAGAATCTTAAGCTTACAGGAGGC
*****

```

```

H2          TTGTTTCAGCAGAGGAGTCGGACACTATACACAGATGGTATGGCAAGAAACCGTTAAGCTT
AY288089   TTGTTTCAGCAGAGGAGTCGGGCACTATACACAGATGGTATGGCAAGAAACCGTTAAGCTT
H25        TTGTTTCAGCAGAGGAGTCGGACACTATACACAGATGGTATGGCAAGAAACCGTTAAGCTT
H1         TTGTTTCAGCAGAGGAGTCGGACACTATACACAGATGGTATGGCAAGAAACCGTTAAGCTT
H20        TTGTTTCAGCAGAGGAGTCGGACACTATACACAGATGGTATGGCAAGAAACCGTTAAGCTT
H24        TTGTTTCAGCAGAGGAGTCGGACACTATACACAGATGGTATGGCAAGAAACCGTTAAGCTT
*****

H2          GGATGCTATGTGGAAGCGTGCTCAAATATGTGTTATGTGGTGTGCCAGTACGGTCCTGCT
AY288089   GGATGCTATGTGGAAGCGTGCTCAAATATGTGTTATGTGGTGTGCCAGTACGGTCCTGCT
H25        GGATGTTATGTGGAAGCGTGCTCAAATATGTGTTATGTGGTGTGCCAGTACGGTCCTGCT
H1         GGATGTTATGTGGAAGCGTGCTCAAATATGTGTTATGTGGTGTGCCAGTACGGTCCTGCT
H20        GGATGCTATGTGGAAGCGTGCTCAAATATGTGTTATGTGGTGTGCCAGTACGGTCCTGCT
H24        GGATGCTATGTGGAAGCGTGCTCAAATATGTGTTATGTGGTGTGCCAGTACGGTCCTGCT
*****

H2          GGAAATATGATGGGCAAGGATATCTACGAGAAAGGAGAACCCTGTTTCGAAATGTGAGAAAT
AY288089   GGAAATATGATGGGCAAGGATATCTACGAGAAAGGAGAACCCTGTTTCGAAATGTGAGAAAT
H25        GGAAATATGATGGGCAAGGATATCTACGAGAAAGGAGAACCCTGTTTCGAAATGTGAGAAAT
H1         GGAAATATGATGGGCAAGGATATCTACGAGAAAGGAGAACCCTGTTTCGAAATGTGAGAAAT
H20        GGAAATATGATGGGCAAGGATATCTACGAGAAAGGAGAACCCTGTTTCGAAATGTGAGAAAT
H24        GGAAATATGATGGGCAAGGATATCTACGAGAAAGGAGAACCCTGTTTCGAAATGTGAGAAAT
*****

H2          TCGGACAAGGAGAAGGGACTCTGCAGTGCTTGA
AY288089   TCGGACAAGGAGAAGGGACTCTGCAGTGCTTGA
H25        TCGGACAAGGAGAAGGGACTCTGCAGTGCTTGA
H1         TCGGACAAGGAGAAGGGACTCTGCAGTGCTTGA
H20        TCGGACAAGGAGAAGGGACTCTGCAGTGCTTGA
H24        TCGGACAAGGAGAAGGGACTCTGCAGTGCTTGA
*****

```

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na*-ASP-2 ที่สกัดมาจากพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* ระยะเวลาอันยาวนานทั้งหมด 32 ตัวอย่าง เฉพาะในส่วนของ exon เปรียบเทียบกับยีน *Na*-ASP-2 จากฐานข้อมูล GenBank Database accession number AY288089 ซึ่งเป็นต้นแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เคยมีการศึกษาพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดทั้งยีนยาว 753 bp โดยใน ส่วนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน Open reading frame (ORF) หรือ Coding region มีความยาว 630 bp เทียบเท่ากับกรดอะมิโน 210 ตัว จากการวิเคราะห์ในแต่ละส่วนของยีน *Na*-ASP-2 พบว่าการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (substitution) 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 109, 441, และ 486 ในตำแหน่งที่ 109 ซึ่งเป็นส่วนของ exon 3 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก T เป็น A ส่งผลให้ codon เปลี่ยนจาก ITG เป็น ATG โดย codon ทั้ง 2 ชนิดเป็นรหัสที่ใช้ในการสร้างกรดอะมิโนต่างชนิดกัน ดังนั้นเมื่อมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ตามลำดับดังกล่าว จะทำให้เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนจาก Leucine เป็น Methionine ซึ่งพบในตัวอย่าง H20 และ H24 สำหรับตำแหน่งที่ 441 ซึ่งเป็นส่วนของ exon 6 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A ส่งผลให้ codon เปลี่ยนจาก GGG เป็น GGA แต่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (Glycine) มีจำนวน 32 ตัวอย่างซึ่งพบในตัวอย่าง H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17,

H18, H19, H20, H21, H22, H23, H24, H25, H26, H27, H28, H29, H30, H31 และ H32 ในตำแหน่งที่ 486 ซึ่งเป็นส่วนของ exon 7 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T ทำให้ codon เปลี่ยนจาก TGC เป็น TGI แต่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (Cysteine) ซึ่งพบในตัวอย่าง H1 และ H25 และจากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank Database ทำให้ทราบว่ายีน *Na-ASP-2* ที่ได้มาจากพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนนั้นมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำ

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* เฉพาะในแต่ละส่วนของ intron

ในส่วนของ intron เป็นส่วนที่ไม่มีความสำคัญในการถอดรหัสเป็นโปรตีนและยังไม่มีรายงานหน้าที่ที่ชัดเจนแต่อาจจะมีส่วนช่วยในการแปลงเป็นโปรตีน และจากการวิเคราะห์ยีน *Na-ASP-2* เฉพาะในส่วนของ intron พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงแบบ substitution, insertion และ deletion เกิดขึ้น (ดังแสดงในภาพที่ 16 ถึง 22) โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด ประกอบด้วยตัวอย่างที่สกัดมาจากตัวอ่อนพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* จำนวน 32 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์แยกตามในแต่ละส่วนของ intron ซึ่งมีทั้งหมด 7 ส่วนพบว่า

บริเวณ intron 1

ภาพที่ 16 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intron 1 ที่เหมือนกันในทุกตัวอย่าง โดยมีขนาดความยาว 80 bp

```
GTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTGAACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAG
AATATGATTTAG
```

บริเวณ intron 2

ภาพที่ 17 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intron 2 โดยตัวอย่าง H2 เป็นตัวแทนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (N=14) ในกลุ่มตัวอย่าง และตัวอย่าง H9 เป็นตัวแทนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (N=17) ในกลุ่มตัวอย่างแต่พบว่าตัวอย่าง H25 ที่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นในบริเวณ intron 2

โดย * คือ ตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

□ คือ ตำแหน่งที่พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (substitution) และมีนิวคลีโอไทด์ขาดหายไป (deletion)

```

H25      GTAGGTTTATTCTTGTGAAATTCTCTTTACTTTAGGGTTGCAAGCTTTGGTACATTTCT
H9       GTAGGTTTATTCTTGTGAAATTCTCTTTACTTTAGGGTTGCAAGCTTTGGTACATTTCT
H2       GTAGGTTTATTCTTGTGAAATTCTCTTTACTTTAGGGTTGCAAGCTTTGGTACATTTCT
*****

H25      GTCAAATGGCTTTTACTTATGGTGAATATTGTGAGTTAATGAATGAGAGCGTATAACTG
H9       GTCAAATGGCTTTTACTTATGGTGAATATTGTGAGTTAATGAATGAGAGCGTATAACTG
H2       GTCAAATGGCTTTTACTTATGGTGAATATTGTGAGTTAATGAATGAGAGCGTATAACTG
*****

H25      GTCCCTAGCTATGAGAGGGTCTTTTTTTCAAACGCTTGTGTAGATACGTTGCAAGCAC
H9       GTCCCTAGCTATGAGAGGGTCTTTTTTTCAAACGCTTGTGTAGATACGTTGCAAGCAC
H2       GTCCCTAGCTATGAGAGGGTCTTTTTTTCAAACGCTTGTGTAGATACGTTGCAAGCAC
*****

H25      ACAATGCGGAGACCACGAAACCTCAACGATTCTATCTTTTCATGACCCGTAATTTGTTCCG
H9       ACAATGCGGAGACCACGAAACCTCAACGATTCTATCTTTTCATGACCCGTAATTTGTTCCG
H2       ACAATGCGGAGACCACGAAACCTCAACGATTCTATCTTTTCATGACCCGTAATTTGTTCCG
*****

H25      AAAAGATGTGATTGAAGTTTGCAACAGCACTGCAAGAGAATTTTTTTTTTAAATTCGAAAA
H9       AAAAGATGTGATTGAAGTTTGCAACAGCACTGCAAGAGAATTTTTTTTTTAAATTCGAAAA
H2       AAAAGATGTGATTGAAGTTTGCAACAGCACTGCAAGAGAATTTTTTTTTTAAATTCGAAAA
*****

H25      TCTTCAG
H9       TCTTCAG
H2       TCTTCAG
*****

```

โดยพบว่าในตำแหน่งที่ 353 (นับตำแหน่งจากจุดเริ่มต้น exon) ของกลุ่มตัวอย่าง มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือตัวอย่าง H1, H4, H6, H7, H8, H9, H12, H15, H18, H19, H20, H21, H22, H23, H24, H25, H27 และ H31 เป็นเบส T ตัวอย่าง H2, H3, H5, H10, H11, H13, H14, H16, H17, H26, H28, H29, H30 และ H32 เป็นเบส C และในตำแหน่งที่ 428 พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ขาดหายไป (deletion) คือ เบส T พบในตัวอย่าง H25 โดยในส่วน intron 2 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 307 bp

บริเวณ intron 3

ภาพที่ 18 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบในทุกตัวอย่างของบริเวณในส่วน intron 3 ซึ่งพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นและมีขนาดความยาว 71 bp

```

GTATAATCTTCTACAGTATTGAGGAATATCATCTATATGAGCTGCACTACATTGTGAATTCCTATTCC
AG

```

บริเวณ intron 4

ภาพที่ 19 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intron 4 โดยตัวอย่าง H2 เป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน (N=18) และตัวอย่าง H19 เป็นตัวแทนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (N=13) ในกลุ่มตัวอย่าง แต่พบว่าตัวอย่าง H4 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นในหลายตำแหน่ง

โดย * คือ ตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

□ คือ ตำแหน่งที่พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (substitution) และมีนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้น (insertion)

```

H2          GTATAGCTCTTGTGAGATCCTAGAAACCTAACGTAAACTTCTACATGACAGTGAACCAC
H19         GTATAGCTCTTGTGAGATCCTAGAAACCTAACGTAAACTTCTACATGACAGTGAACCAC
H4          GTATAGCTCTTGTGAGATCCTAGAAACCTAACGTAAACTTCTACATGACAGTGAACCAC
*****

H2          AAAAGGTTGAAGCAGTCGTGTTAACTCTATTTTCTCTGATAAGTAAAGTCAAAAACGACTA
H19         AAAAGGTTGAAGCAGTCGTGTTAACTCTATTTTCTCTGATAAGTAAAGTCAAAAACGACTA
H4          AAAAGGTTGAAGCAGTCGTGTTAACTCTATTTTCTCTGATAAATGAGTCAAGAACGACTA
*****

H2          AAGCAAACGTTAGAAATAGGGAGAGTAGATCTATGGATATCTGAAAGAC-----
H19         AAGCAAACGTTAGAAATAGGGAGAGTAGATCTATGGATATCTGAAAGAC-----
H4          AAGCAAACGTTAGAAATAGGGAGAGTAGATCTATGGATATCTGAAAGATCACTTCCCACGA
*****

H2          -TTGGCATTGTTGCAATTTTTGCAATCTGGAAAATTCAGCGTACAGCCAGTTCATTGATT
H19         -TTGGCATTGTTGCAATTTTTGCAATCTGGAAAATTCAGCGTACAGCCAGTTCATTGATT
H4          GTTAGCATTGTTGCAATTTTTGCAATCTGGAAAATTCAGCGTACAGCCAGTTCATTGATT
*****

H2          TTTCATTAGATGCCATTAGATCTGACAAATACATTAGATCTAACATTAGATGAAGACGAT
H19         TTTCATTAGATGCCATTAGATCTGACAAATACATTAGATCTAACATTAGATGAAGACGAT
H4          TTTCATTAGATGCCATTAGATCTGACAAATACATTAGATCTAACATTAGATGAAGACGAT
*****

H2          GGTATAGCTCTTGTGAGATCCTGTTGAGTTGAGATGTTGAGATTATTCATTTATCATTA
H19         GGTATAGCTCTTGTGAGATCCTGTTGAGTTGAGATGTTGAGATTATTCATTTATCATTA
H4          GGTATAGCTCTTGTGAGATCCTGTTGAGTTGAGATGTTGAGATTATTCATTTATCATTA
*****

H2          GATCTACAAATCATTAGATCTAACAAAGTACAACTTTTTTGAGTGAAATGGACATTTTGAG
H19         GATCTACAAATCATTAGATCTAACAAAGTACAACTTTTTTGAGTGAAATGGACATTTTGAG
H4          GATCTACAAATCATTAGATCTAACAAAGTACAACTTTTTTGAGTGAAATGGACATTTTGAG
*****

H2          TTCAACTGACGAAAAAACATAAAATGTTACAAATATGAACGTTACATTTGGTGTAGATG
H19         TTCAACTGACGAAAAAACATAAAATGTTACAAATATGAACGTTACATTTGGTGTAGATG
H4          TTCAACTGACGAAAAAACATAAAATGTTACAAATATGAACGTTACATTTGGTGTAGATG
*****

H2          GCATCTGTTGCATCTCGTACTACACAGTACTATACGTAAGTAAGTATCTCAGTAAGA
H19         GCATCTGTTGCATCTCGTACTACACAGTACTATACGTAAGTAAGTATCTCAGTAAGA
H4          GCATCTGTTGCATCTCGTACTACACAGTACTATACGTAAGTAAGTATCTCAGTAAGA
*****
    
```

H2	TCTTGAATTTTTTACAGTTTTTTCCCTTTGCTATTCGTATGTATATCCAGGAACGTGTTT
H19	TCTTGAATTTTTTACAGTTTTTTCCCTTTGCTATTCGTATGTATATCCAGGAACGTGTTT
H4	TCTTGAATTTTTTACAGTTTTTTCCCTTTGCTATTCGTATGTATATCCAGGAACGTGTTT

H2	AG
H19	AG
H4	AG
	**

โดยพบว่าตัวอย่าง H4 มีนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงหลายตำแหน่งส่งผลให้ลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากตัวอย่างอื่นๆ คือ ตำแหน่งที่ 753 (นับตำแหน่งจากเริ่ม exon) มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A ตำแหน่งที่ 762 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A ตำแหน่งที่ 764 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G ตำแหน่งที่ 771 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G ตำแหน่งที่ 793 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G ตำแหน่งที่ 802 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G ตำแหน่งที่ 803 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A ตำแหน่งที่ 806 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น C ตำแหน่งที่ 811 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น C ตำแหน่งที่ 827 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 828 ถึงตำแหน่งที่ 840 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมา (insertion) จำนวน 13 เบส คือ CACTTCCCACGAG ตำแหน่งที่ 843 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A ตำแหน่งที่ 935 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G และตำแหน่งที่ 941 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น T

ในตำแหน่งที่ 1017 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มตัวอย่างแบ่งแยกออกเป็น 2 กลุ่ม คือตัวอย่าง H2, H3, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H16, H17, H26, H28, H29, H30, H31 และ H32 เป็นเบส C ตัวอย่าง H1, H4, H6, H8, H15, H18, H19, H20, H21, H22, H23, H24, H25 และ H27 เป็นเบส T

มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวที่สุด 602 bp และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้นที่สุด 589 bp

บริเวณ intron 5

ภาพที่ 20 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบในส่วน intron 5 ของทุกตัวอย่างโดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นและมีขนาดความยาว 66 bp

GTCTAACTTAATAATTTTGAAGCAAACCCACAGTTAATATTAATAATATTCAATGATTAATTTAG

บริเวณ intron 6

ภาพที่ 21 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณในส่วน intron 6 โดยตัวอย่าง H2 เป็นตัวแทนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (N=29) ในกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งพบในตัวอย่าง H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H16, H17, H18, H19, H20, H21, H22, H23, H24, H26, H27, H28, H29, H30, H31 และ H32 อย่างไรก็ตามพบตัวอย่างที่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้น

โดย * คือ ตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

□ คือ ตำแหน่งที่พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (substitution)

```

H25      GTATG□GGGCC□TTT□TTTCCGACTGGATCCTGGTATTTTAGCGATATAACTTTAATCACAT
H15      GTATG□GGGCC□TTT□TTTCCGACTGGATCCTGGTATTTTAGCGATATAACTTTAATCACAT
H1       GTATG□GGGCC□TTT□TTTCCGACTGGATCCTGGTATTTTAGCGATATAACTTTAATCACAT
H2       GTATG□GGGCC□TTT□TTTCCGACTGGATCCTGGTATTTTAGCGATATAACTTTGATCACAT
*****
H25      CGATTTTCTTT□CAG
H15      CGATTTTCTTT□CAG
H1       CGATTTTCTTT□CAG
H2       CGATTTTCTTT□TAG
*****

```

โดยตำแหน่งที่ 1585 (นับตำแหน่งจากเริ่ม exon) พบว่าตัวอย่าง H25 และ H15 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T และ ในตัวอย่าง H25, H15 และ H1 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 1591 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น C ตำแหน่งที่ 1592 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T ตำแหน่งที่ 1612 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G ตำแหน่งที่ 1627 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A ตำแหน่งที่ 1629 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น C ตำแหน่งที่ 1632 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A และตำแหน่งที่ 1650 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก T เป็น C โดยในส่วน intron 6 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 73 bp

บริเวณ intron 7

ภาพที่ 22 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณในส่วน intron 7 โดยตัวอย่าง H2 เป็นตัวแทนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (N=19) ในกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งพบในตัวอย่าง H2, H3, H4, H5, H6, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H16, H17, H26, H28, H29, H30, H31 และ H32 แต่พบว่ามี การขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นในหลายตัวอย่าง

โดย * คือ ตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

□ คือ ตำแหน่งที่พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (substitution) และมีนิวคลีโอไทด์ขาดหายไป (deletion)

```

H7          GTACGTCCTCATTTAATCTATTGTTTTGGATCGTTTTTTTTTTTCTTATTCGACTTCC
H15         GTACGTCCTCATTTAATCTATTGTTTTGGATCGTTTTTTTTTTCTTATTCGACTTCC
H25         GTACGTCCTCATTTAATCTATTGTTTTGGATCGTTTTTTTTTTCTTATTCGACTTCC
H1          GTACGTCCTCATTTAATCTATTGTTTTGGATCGTTTTTTTTTTCTTATTCGACTTCC
H23         GTACGTCCTCATTTAATCTATTGTTTTGGATCGTTTTTTTTTTCTTATTCGACTTCC
H2          GTACGTCCTCATTTAATCTATTGTTTTGGATCGTTTTTTTTTTCTTATTCGACTTCC
*****

H7          GAGGCAGAACGATATGTTTAG
H15         GAGGCAGAACGATATGTTTAG
H25         GAGGCAGAACGATATGTTTAG
H1          GAGGCAGAACGATATGTTTAG
H23         GAGGCAGAACAATATGTTTAG
H2          GAGGCAGAACAATATGTTTAG
*****

```

ในช่วงระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1781 ถึง 1784 (นับตำแหน่งจากเริ่ม exon) พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ขาดหายไป (deletion) ในหลายตัวอย่าง คือ

เบส T ขาดหายไป 4 ตัวในตัวอย่าง H25, H15, H1, H8, H18 และ H7

เบส T ขาดหายไป 2 ตัวในตัวอย่าง H20, H27, H23, H19, H22, H24 และ H21

ในตำแหน่งที่ 1809 พบว่าตัวอย่าง H25, H15, H1 และ H7 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G โดยพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวที่สุด 81 bp และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้นที่สุด 77 bp

ผลการวิเคราะห์ลักษณะอัลลีลที่พบในยีน *Na-ASP-2*

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* ทั้งหมด 32 ตัวอย่าง ทั้งในส่วน exon และ intron ของ genomic DNA พบว่าเมื่อเรียงลำดับตามลักษณะความแตกต่างของอัลลีลสามารถแบ่งกลุ่มอัลลีลได้ดังนี้

1. เฉพาะในส่วน exon เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank Database ของยีน *Na-ASP-2* คือ accession number AY288089 เมื่อเรียงลำดับตามลักษณะความแตกต่างของอัลลีลสามารถแบ่งกลุ่มอัลลีลเป็น 4 แบบ (ดังแสดงในตารางที่ 7)
2. เฉพาะในส่วน intron เมื่อเรียงลำดับตามลักษณะความแตกต่างของอัลลีลสามารถแบ่งกลุ่มอัลลีลเป็น 10 แบบ (ดังแสดงในตารางที่ 7)
3. ทั้งในส่วน exon และ intron เมื่อเรียงลำดับตามลักษณะความแตกต่างของอัลลีลสามารถแบ่งกลุ่มอัลลีลเป็น 11 แบบ (ดังแสดงในตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดง Haplotypes of Na-ASP-2 among field and published sequences

Region	Haplotype	Positions of nucleotide substitutions*	Positions of indels	Isolates	
		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1111		
		3 4 7 7 7 7 7 8 8 8 8 8 8 9 9 0 5 5 5 5 6 6 6 6 6 6 8	4 88888888888888 7777		
		5 9 5 6 6 7 9 0 0 1 2 4 3 4 1 6 8 9 9 1 2 2 3 5 8 0	2 22333333333334 8888		
		3 6 3 2 4 1 3 2 3 6 1 7 3 5 1 7 7 5 1 2 2 7 9 2 0 5 9	8 8901234567890 1234		
Exons	1	T	G	C	AY288089
	2	A	A	C	H20, H24
	3	T	A	C	Remaining isolates
	4	T	A	T	H25, H1
Introns	1	t g g a a a a g g a c g a a t	c g c a g a g t a	t ----- tt--	H19, H20, H21, H22, H23, H24, H27
	2	t g g a a a a g g a c g a a t	t c t g a c a c g	- ----- ----	H25
	3	t g g a a a a g g a c g a a t	c g c a g a g t a	t ----- ----	H8, H18
	4	c g g a a a a g g a c g a a c	c g c a g a g t a	t ----- tttt	H2, H3, H5, H10, H11, H13, H14, H16, H17, H26, H28, H29, H30, H32
	5	t g g a a a a g g a c g a a t	c g c a g a g t a	t ----- tttt	H6
	6	t g g a a a a g g a c g a a t	c c t g a c a c g	t ----- ----	H1
	7	t g g a a a a g g a c g a a c	c g c a g a g t a	t ----- tttt	H9, H12, H31
	8	t a a g g g g a c c t a g t t	c g c a g a g t a	t cacttcccacgag tttt	H4
	9	t g g a a a a g g a c g a a c	c g c a g a g t g	t ----- ----	H7
	10	t g g a a a a g g a c g a a t	t c t g a c a c g	t ----- ----	H15
All	1	t A g g a a a a g g a c g a a t	A c g c a g a g t C a	t ----- tt--	H20, H24
	2	t T g g a a a a g g a c g a a t	A c g c a g a g t C a	t ----- tt--	H19, H21, H22, H23, H27
	3	t T g g a a a a g g a c g a a t	A t c t g a c a c T g	- ----- ----	H25
	4	t T g g a a a a g g a c g a a t	A c g c a g a g t C a	t ----- ----	H8, H18
	5	c T g g a a a a g g a c g a a c	A c g c a g a g t C a	t ----- tttt	H2, H3, H5, H10, H11, H13, H14, H16, H17, H26, H28, H29, H30, H32
	6	t T g g a a a a g g a c g a a t	A c g c a g a g t C a	t ----- tttt	H6
	7	t T g g a a a a g g a c g a a t	A c c t g a c a c T g	t ----- ----	H1
	8	t T g g a a a a g g a c g a a c	A c g c a g a g t C a	t ----- tttt	H9, H12, H31
	9	t T a a g g g g a c c t a g t t	A c g c a g a g t C a	t cacttcccacgag tttt	H4
	10	t T g g a a a a g g a c g a a c	A c g c a g a g t C g	t ----- ----	H7
	11	t T g g a a a a g g a c g a a t	A t c t g a c a c C g	t ----- ----	H15

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* ทั้งหมด 32 ตัวอย่าง ทั้งในส่วน exon และ intron ของ genomic DNA พบว่าเมื่อเรียงลำดับตามลักษณะความแตกต่างของอัลลีลทั้งหมดในส่วน exon รวมกับ intron สามารถแบ่งกลุ่มอัลลีลเป็น 11 แบบ (ดังแสดงในภาพที่ 23) มีรายละเอียดดังนี้

อัลลีลที่ 1 คือ H20 และ H24 โดยพบว่าในตำแหน่งที่ 496 ซึ่งเป็นส่วนของ exon 3 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก T เป็น A และในส่วน intron 7 ตำแหน่งที่ 1783 และ 1784 เบส T ขาดหายไป 2 ตัว

อัลลีลที่ 2 คือ H19, H21, H22, H23 และ H27 โดยพบว่าในส่วน intron 7 ตำแหน่งที่ 1783 และ 1784 เบส T ขาดหายไป 2 ตัว

อัลลีลที่ 3 คือ H25 โดยพบว่าในส่วน intron 2 ตำแหน่งที่ 428 มีนิวคลีโอไทด์ขาดหายไป (deletion) คือ เบส T ในส่วน intron 6 ตำแหน่งที่ 1585 มีการแสดงเบส T แทนที่เบส C ตำแหน่งที่ 1591 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส G ตำแหน่งที่ 1592 มีการแสดงเบส T แทนที่เบส C ตำแหน่งที่ 1612 มีการแสดงเบส G แทนที่เบส A ตำแหน่งที่ 1627 มีการแสดงเบส A แทนที่เบส G ตำแหน่งที่ 1629 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส A ตำแหน่งที่ 1632 มีการแสดงเบส A แทนที่เบส G และตำแหน่งที่ 1650 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส T ในตำแหน่งที่ 1685 ซึ่งเป็นส่วนของ exon 7 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T ในส่วน intron 7 ตำแหน่งที่ 1781 ถึงตำแหน่งที่ 1784 เบส T ขาดหายไป 4 ตัว และในตำแหน่งที่ 1809 มีการแสดงเบส G แทนที่เบส A

อัลลีลที่ 4 คือ H8 และ H18 โดยพบว่าในส่วน intron 7 ตำแหน่งที่ 1781 ถึงตำแหน่งที่ 1784 เบส T ขาดหายไป 4 ตัว

อัลลีลที่ 5 คือ H2, H3, H5, H10, H11, H13, H14, H16, H17, H26, H28, H29, H30 และ H32 โดยพบว่าในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* ตำแหน่งที่ 353 (นับตำแหน่งจากจุดเริ่มต้น exon) ของบริเวณ intron 2 มีการแสดงเบส C แตกต่างจากอัลลีลอื่น ๆ ที่แสดงเบส T และในตำแหน่งที่ 1017 ของบริเวณ intron 4 มีการแสดงเบส C ทำให้มีลักษณะแตกต่างไปจากอัลลีลอื่น ๆ

อัลลีลที่ 6 คือ H6 โดยพบว่าในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2* ตำแหน่งที่ 353 (นับตำแหน่งจากจุดเริ่มต้น exon) ของบริเวณ intron 2 มีการแสดงเบส T และในตำแหน่งที่ 1017 ของบริเวณ intron 4 มีการแสดงเบส T ทำให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากอัลลีลที่ 1 และ 2 ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มอัลลีลได้

อัลลีลที่ 7 คือ H1 โดยพบว่าในส่วน intron 6 ตำแหน่งที่ 1591 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส G ตำแหน่งที่ 1592 มีการแสดงเบส T แทนที่เบส C ตำแหน่งที่ 1612 มีการแสดงเบส G

แทนที่เบส A ตำแหน่งที่ 1627 มีการแสดงเบส A แทนที่เบส G ตำแหน่งที่ 1629 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส A ตำแหน่งที่ 1632 มีการแสดงเบส A แทนที่เบส G และตำแหน่งที่ 1650 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส T ในตำแหน่งที่ 1685 ซึ่งเป็นส่วนของ exon 7 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T ในส่วน intron 7 ตำแหน่งที่ 1781 ถึงตำแหน่งที่ 1784 เบส T ขาดหายไป 4 ตัว และในตำแหน่งที่ 1809 มีการแสดงเบส G แทนที่เบส A

อัลลีลที่ 8 คือ H9, H12 และ H31 โดยพบว่าในตำแหน่งที่ 1017 ของบริเวณ intron 4 มีการแสดงเบส C

อัลลีลที่ 9 คือ H4 โดยพบว่าในส่วน intron 4 มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากอัลลีลอื่นๆ คือ ตำแหน่งที่ 753 มีการแสดงเบส A แทนที่เบส G ตำแหน่งที่ 762 มีการแสดงเบส A แทนที่เบส G ตำแหน่งที่ 764 มีการแสดงเบส G แทนที่เบส A ตำแหน่งที่ 771 มีการแสดงเบส G แทนที่เบส A ตำแหน่งที่ 793 มีการแสดงเบส G แทนที่เบส A ตำแหน่งที่ 802 มีการแสดงเบส G แทนที่เบส A ตำแหน่งที่ 803 มีการแสดงเบส A แทนที่เบส G ตำแหน่งที่ 806 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส G ตำแหน่งที่ 811 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส A ตำแหน่งที่ 827 มีการแสดงเบส T แทนที่เบส C ในช่วงระหว่างตำแหน่งที่ 828 กับตำแหน่งที่ 840 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมา (insertion) จำนวน 13 เบส คือ CACTTCCCACGAG ตำแหน่งที่ 843 มีการแสดงเบส A แทนที่เบส G ตำแหน่งที่ 935 มีการแสดงเบส G แทนที่เบส A และตำแหน่งที่ 941 มีการแสดงเบส T แทนที่เบส A

อัลลีลที่ 10 คือ H7 โดยพบว่าในตำแหน่งที่ 1017 ของบริเวณ intron 4 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส T ในส่วน intron 7 ตำแหน่งที่ 1781 ถึงตำแหน่งที่ 1784 เบส T ขาดหายไป 4 ตัว และในตำแหน่งที่ 1809 มีการแสดงเบส G แทนที่เบส A

อัลลีลที่ 11 คือ H15 โดยพบว่าในส่วน intron 6 ตำแหน่งที่ 1585 มีการแสดงเบส T แทนที่เบส C ตำแหน่งที่ 1591 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส G ตำแหน่งที่ 1592 มีการแสดงเบส T แทนที่เบส C ตำแหน่งที่ 1612 มีการแสดงเบส G แทนที่เบส A ตำแหน่งที่ 1627 มีการแสดงเบส A แทนที่เบส G ตำแหน่งที่ 1629 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส A ตำแหน่งที่ 1632 มีการแสดงเบส A แทนที่เบส G และตำแหน่งที่ 1650 มีการแสดงเบส C แทนที่เบส T ในส่วน intron 7 ตำแหน่งที่ 1781 ถึงตำแหน่งที่ 1784 เบส T ขาดหายไป 4 ตัว และในตำแหน่งที่ 1809 มีการแสดงเบส G แทนที่เบส A

จากการวิเคราะห์ตามลักษณะความแตกต่างของอัลลีลพบว่าอัลลีลที่ 5 พบได้มากที่สุด จำนวน 14 ตัวอย่างจากกระยะตัวอ่อนพยาธิปากขอ

ภาพที่ 23 แสดงตำแหน่งของแต่ละอัลลีลตามลักษณะความแตกต่าง

โดย

E

 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน exon

IN

 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intron

E

 คือ ตำแหน่งที่มีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์

อัลลีลที่ 1 (N=2) โดยเป็นตัวอย่างจาก จ.นครศรีธรรมราช

E1	IN1	E2	IN2	E3	IN3	E4	IN4	E5	IN5	E6	IN6	E7	IN7	E8
----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

อัลลีลที่ 2 (N=5) โดยเป็นตัวอย่างจาก จ.ตาก 1 ตัวอย่าง และ จ.นครศรีธรรมราช 4 ตัวอย่าง

E1	IN1	E2	IN2	E3	IN3	E4	IN4	E5	IN5	E6	IN6	E7	IN7	E8
----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

อัลลีลที่ 3 (N=1) โดยเป็นตัวอย่างจาก จ.นครศรีธรรมราช

E1	IN1	E2	IN2	E3	IN3	E4	IN4	E5	IN5	E6	IN6	E7	IN7	E8
----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

อัลลีลที่ 4 (N=2) โดยเป็นตัวอย่างจาก จ.ตาก

E1	IN1	E2	IN2	E3	IN3	E4	IN4	E5	IN5	E6	IN6	E7	IN7	E8
----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

อัลลีลที่ 5 (N=14) โดยเป็นตัวอย่างจาก จ.ตาก 9 ตัวอย่าง จ.นครศรีธรรมราช 1 ตัวอย่าง และ จ.ราชบุรี 4 ตัวอย่าง

E1	IN1	E2	IN2	E3	IN3	E4	IN4	E5	IN5	E6	IN6	E7	IN7	E8
----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

อัลลีลที่ 6 (N=1) โดยเป็นตัวอย่างจาก จ.ตาก

E1	IN1	E2	IN2	E3	IN3	E4	IN4	E5	IN5	E6	IN6	E7	IN7	E8
----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

อัลลีลที่ 7 (N=1) โดยเป็นตัวอย่างจาก จ.ตาก

E1	IN1	E2	IN2	E3	IN3	E4	IN4	E5	IN5	E6	IN6	E7	IN7	E8
----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

อัลลีลที่ 8 (N=3) โดยเป็นตัวอย่างจาก จ.ตาก 2 ตัวอย่าง และ จ.ราชบุรี 1 ตัวอย่าง

E1	IN1	E2	IN2	E3	IN3	E4	IN4	E5	IN5	E6	IN6	E7	IN7	E8
----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

อัลลีลที่ 9 (N=1) โดยเป็นตัวอย่างจาก จ.ตาก

E1	IN1	E2	IN2	E3	IN3	E4	IN4	E5	IN5	E6	IN6	E7	IN7	E8
----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

อัลลีลที่ 10 (N=1) โดยเป็นตัวอย่างจาก จ.ตาก

E1	IN1	E2	IN2	E3	IN3	E4	IN4	E5	IN5	E6	IN6	E7	IN7	E8
----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

อัลลีลที่ 11 (N=1) โดยเป็นตัวอย่างจาก จ.ตาก

E1	IN1	E2	IN2	E3	IN3	E4	IN4	E5	IN5	E6	IN6	E7	IN7	E8
----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

จากการวิเคราะห์ยีน *Na-ASP-2* ทั้งในส่วน exon และ intron พบว่าอัลลีลที่ 5 พบได้มากที่สุดจำนวน 14 ตัวอย่าง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ปัจจุบันโรคพยาธิปากขอยังคงเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขและสุขภาพของประชากรทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศที่มีภูมิอากาศแบบร้อนชื้นทำให้มีผู้ติดเชื้อปากขอเป็นจำนวนมากและส่งผลทำให้เกิดการเจ็บป่วยและเสียชีวิตตามมา สำหรับประเทศไทยพบผู้ที่ติดเชื้อพยาธิปากขอในบริเวณภาคใต้ของประเทศเป็นส่วนใหญ่เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของพยาธิปากขอ พยาธิปากขอสามารถทำให้เกิดโรคได้ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนเริ่มไชเข้าสู่ผิวหนังจนถึงลำไส้และยังพบว่ามีการปล่อยโปรตีนชนิดต่างๆ เพื่อช่วยให้พยาธิเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายยิ่งขึ้นรวมถึงการมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานานหลายปีโดยสามารถหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายผู้ที่ติดเชื้อได้ พยาธิปากขอในระยะตัวเต็มวัยจะเกาะผนังลำไส้และดูดเลือดมาเป็นอาหารจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ที่ติดเชื้อเกิดโรคโลหิตจางเนื่องจากการขาดธาตุเหล็กและภาวะทุพโภชนาการขึ้นได้ โดยโรคนี้พบได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่แต่พบการแพร่ระบาดอย่างมากในเด็ก (Taweethavonsawat et al., 2006) ถึงแม้ว่าอัตราการเสียชีวิตของประชากรที่ติดโรคพยาธิปากขอจะไม่สูงมากนัก แต่ผลเสียต่อสุขภาพและคุณภาพชีวิตของประชากรโดยรวมจัดเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการพัฒนาประเทศทั้งในด้านแรงงาน เศรษฐกิจ และสังคม โดยปัญหาที่เป็นอุปสรรคสำคัญต่อการรักษาป้องกันและควบคุมโรคพยาธิปากขอ คือ การแพร่กระจายเชื้อของผู้ที่เป็นโรค การขาดความรู้ของประชากรรวมถึงการติดเชื้อพยาธิปากขอซ้ำหลังจากที่ได้มีการรักษาไม่กี่เดือน ถึงแม้ว่าจะมีมาตรการป้องกันและควบคุมโรคพยาธิปากขอ เช่น การหากลุ่มเสี่ยง พื้นที่ที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคพยาธิปากขอรวมถึงการให้สุขศึกษาที่ดีแก่ชุมชน มาตรการดังกล่าวนั้นสามารถที่จะควบคุมโรคพยาธิปากขอให้ลดลงไปได้แต่อย่างไรก็ตามยังคงพบโรคพยาธิปากขออยู่ในระดับที่ต้องมีการแก้ไขปัญหา

จากที่ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างอุจจาระของนักเรียนในโรงเรียนและชุมชนที่อยู่ในพื้นที่ที่มีความชุกของพยาธิปากขอสูงพบว่านักเรียนและคนในชุมชนยังคงมีการติดเชื้อพยาธิปากขออยู่ในอัตราไม่สูงมากอาจเนื่องมาจากตัวอย่างที่ได้ส่งตรวจมีจำนวนน้อย โดยคิดเป็นร้อยละ 26.33 ในจังหวัดตาก ร้อยละ 29.55 ในจังหวัดนครศรีธรรมราช และร้อยละ 9.23 ในจังหวัดราชบุรี โดยมีค่าใกล้เคียงสอดคล้องกับผลการศึกษาต่างๆ ซึ่งได้มีการสำรวจโดยการตรวจอุจจาระตั้งแต่ปี พ.ศ.2494 จนถึงปัจจุบัน พบว่าพยาธิปากขอชุกชุมในทุกภาคและภาคใต้ในบาง

พื้นที่ที่มีความชุกสูงสุดถึงร้อยละ 49.2 (Jongsuksantikul et al., 1992) และจากการสำรวจเด็กนักเรียนในบางพื้นที่ของจังหวัดนครศรีธรรมราชและจังหวัดเชียงใหม่พบว่ามีการติดเชื้อมะเร็งปากช่องสูงถึงร้อยละ 80 และร้อยละ 26.3 ตามลำดับ นอกจากนี้จากการสำรวจโรคหนองพยาธิของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบความชุกของพยาธิปากช่องในระดับหมู่บ้านของภาคใต้สูงถึงร้อยละ 38.1 ซึ่งปัจจุบันโรคพยาธิปากช่องได้ถูกจัดอยู่ในงานป้องกันควบคุมโรค หนองพยาธิของแผนพัฒนาการสาธารณสุขแห่งชาติ (ฐิติมา วงศาโรจน์ และคณะ, 2552) สาเหตุส่วนใหญ่ที่นักเรียนยังคงมีปัญหามะเร็งปากช่องอยู่อาจเนื่องมาจากการมีอุปนิสัยไม่สวมใส่รองเท้าในบางเวลา เช่น ช่วงเวลาที่มีการเล่นกีฬาในบริเวณที่เป็นพื้นดิน รวมถึงนักเรียนส่วนใหญ่ที่ทำการสำรวจพบว่าไม่มีการกินยาฆ่าพยาธิในช่วง 1 ปีที่ผ่านมา นอกจากนี้คนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีอาชีพที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ เช่น ทำสวน ทำไร่ และมักไม่สวมรองเท้าเวลาทำงานจึงทำให้ตัวอ่อนของพยาธิมีโอกาสไชเข้าสู่ผิวหนังได้ง่ายและประชากรส่วนใหญ่ยังขาดความรู้เรื่องโรคพยาธิ รวมถึงบริเวณโรงเรียนและชุมชนมีสิ่งแฉะลื้อมที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของไข่และตัวอ่อนพยาธิ และจากการสำรวจพบว่าพบผู้ที่ติดเชื้อมะเร็งปากช่องส่วนใหญ่พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงและส่วนมากพบในเด็กอายุ 9-13 ปี ซึ่งเพศชายเป็นเพศที่มีการดำรงชีวิตและพฤติกรรมต่างๆ ที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมากกว่าเพศหญิง เช่น เวลาเข้าไปทำสวนมักไม่สวมรองเท้า ถ้าอยู่กลางแจ้งจะไม่ถูกสุขลักษณะบริเวณพื้นดินและมีกิจกรรมต่างๆ ที่อยู่ตามบริเวณพื้นดินเป็นส่วนมากเช่น ทำงานหรือเล่นกีฬา ดังนั้นมาตรการอันหนึ่งที่น่าจะเพิ่มประสิทธิภาพของการควบคุมการแพร่กระจายของโรคพยาธิปากช่องได้คือการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคพยาธิปากช่อง ซึ่งวัคซีนที่ดีและมีประสิทธิภาพควรจะมีองค์ประกอบของเชื้อพยาธิปากช่องในหลายระยะของวงจรชีวิต

Na-ASP-2 เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่พบเป็นส่วนใหญ่ในระยะที่ตัวอ่อนพยาธิปากช่องชนิด *N. americanus* ไช้เข้าสู่ผิวหนัง แม้จะยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจนแต่อาจมีส่วนสำคัญในการให้พยาธิสามารถมีชีวิตอยู่ในร่างกายของผู้ที่ติดเชื้อได้ จากการศึกษาทดลองพบว่ายีน *Na-ASP-2* มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีน (vaccine candidate) เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านการติดเชื้อมะเร็งปากช่องได้ (Goud et al., 2005) ซึ่งมีข้อมูลยืนยันประสิทธิภาพของโปรตีน ASP-2 จากการทดลองในสัตว์และจากการศึกษาในประชากรของประเทศบราซิลและจีนซึ่งมีการระบาดของโรคติดเชื้อมะเร็งปากช่องจำนวนมากพบว่าการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ ASP-2 มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงของการติดเชื้อมะเร็งปากช่อง (Diemert et al., 2008) จากการศึกษาโครงสร้างและลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าโปรตีน *Na-ASP-2* ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank Database คือ accession number AY288089 (Asojo et al., 2005) มีเพียง 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์เท่านั้น ดังนั้นปัจจุบันจึงไม่

ทราบว่าโปรตีนดังกล่าวมีความหลากหลายในลำดับกรดอะมิโนหรือไม่ การศึกษาค้นคว้าจึงเป็นการศึกษาค้นคว้าครั้งแรกโดยใช้ตัวอย่างพยาธิปากขอจากประเทศไทย เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลาย (variation) ของยีน *Na-ASP-2* จากตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนที่ 3 ที่ได้จากผู้ติดเชื้อทั่วไป พบว่ายีน *Na-ASP-2* ในรูปแบบ genomic DNA มีส่วนของ intron (noncoding sequence) เพิ่มขึ้นมาจากส่วน exon จำนวน 7 ส่วน และมีขนาดความยาวประมาณ 13 kb สำหรับการวิเคราะห์ในส่วน exon (coding sequences) ซึ่งเป็นส่วนที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนหรือโปรตีนพบว่าความหลากหลายของยีนดังกล่าวอยู่ในระดับต่ำ เนื่องจากพบการเปลี่ยนแปลงในลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบ point mutation เพียง 3 ตำแหน่งเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *Na-ASP-2* จากฐานข้อมูล GenBank Database accession number AY288089 ซึ่งเป็นต้นแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เคยมีการศึกษา และเมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนพบว่ามีเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (nonsynonymous) ส่วนอีก 2 ตำแหน่งไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous) ซึ่งการแทนที่ในตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่มีผลต่อการเปลี่ยนกรดอะมิโนในส่วน exon จากตัวอย่างพยาธิปากขอระยะตัวอ่อนที่เกิดขึ้นนั้นเป็นการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก T เป็น A ส่งผลให้มีเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนจาก Leucine เป็น Methionine โดยทั้ง 2 กรดอะมิโนเป็นกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้ว (non-polar) และไม่มีประจุ (no-charge) เหมือนกันจึงไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนคุณสมบัติแตกต่างไปจากเดิม จากการศึกษาพบว่าถ้ากรดอะมิโนมีการเปลี่ยนชนิดแตกต่างไปจากเดิมซึ่งอยู่ในขั้วหรือประจุเดียวกันอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโปรตีนเกิดขึ้นน้อยหรือไม่เกิดขึ้นเลย แต่ถ้ามีการเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นหมู่ที่มีขั้วประจุสุทธิเป็นบวกอาจส่งผลให้ความผิดปกติเกิดขึ้นมากเพราะการเปลี่ยนแปลงของประจุทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไป (สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ และคณะ, 2552) ดังนั้นการแทนที่ในตำแหน่งดังกล่าวจึงไม่มีผลทำให้ยีน *Na-ASP-2* ซึ่งเป็นองค์ประกอบของวัคซีนมี epitope ที่ต่างไปจากประชากรพยาธิปากขอ และจากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของยีน *Na-ASP-2* เปรียบเทียบกับโมเลกุล ASP-2 ของพยาธิปากขอในจิ้งนัส *Ancylostoma* ชนิดต่างๆ พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันปานกลางประมาณร้อยละ 58-65 เท่านั้น (Goud et al., 2005)

ในส่วน intron ของยีน *Na-ASP-2* พบว่าส่วนใหญ่ในแต่ละบริเวณของ intron มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันแต่มีบางตัวอย่างที่นิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงส่งผลให้ลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากตัวอย่างอื่นๆ จากผลการศึกษาเมื่อวิเคราะห์รวม exon และ intron จะพบอัลลีลทั้งหมด 11 รูปแบบ โดยพบทั้งการเปลี่ยนแปลงแบบ substitution และ insertion/deletion ซึ่งการเปลี่ยนแปลงแบบ substitution มี 24 ตำแหน่ง insertion มี 13 ตำแหน่ง และ deletion มี 5 ตำแหน่ง โดยรูปแบบที่พบเป็นส่วนมากคืออัลลีลที่ 5 ซึ่งพบว่ามีตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์

เหมือนกันมากที่สุด 14 ตัวอย่าง ประกอบด้วย H2, H3, H5, H10, H11, H13, H14, H16, H17, H26, H28, H29, H30, H32 รองลงมาคืออัลลีลที่ 2 มี 5 ตัวอย่างประกอบด้วย H19, H21, H22, H23 และ H27 และอัลลีลที่ 8 มี 3 ตัวอย่าง คือ H9, H12 และ H29 ดังนั้นพอจะสรุปได้ว่ารูปแบบยีน *Na-ASP-2* ที่ประกอบด้วยส่วน exon และ intron อาจจะเป็นรูปแบบที่ 5 อย่างไรก็ตาม เนื่องจากผู้ทดลองใช้จำนวนตัวอย่างน้อยอาจมีผลไม่ชัดเจนควรมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อใช้ยืนยันข้อมูลให้แม่นยำยิ่งขึ้น ซึ่งความหลากหลายที่พบในส่วน intron อาจไม่มีผลต่อกระบวนการสร้างโปรตีนเพราะไม่ใช่ส่วนที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน แต่ความหลากหลายใน intron อาจมีประโยชน์ในการเป็น genetic marker เพื่อติดตามพันธุกรรมประชากรของพยาธิปากขอหรือใช้ศึกษาความหลากหลายของประชากรพยาธิปากขอได้

ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าในส่วน exon ของยีน *Na-ASP-2* ที่สกัดมาจากตัวอ่อนพยาธิปากขอชนิด *N. americanus* ระยะ Filariform larva ในพื้นที่ที่ทำการศึกษาในประเทศไทยพบว่ามี ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำ (polymorphism) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน *Na-ASP-2* ที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีนมีบริเวณหรือ epitope ที่อาจใช้เป็น antigen กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ผลิตแอนติบอดีออกมาต่อต้านพยาธิปากขอขณะบุกรุกเข้าไปในร่างกายได้ จึงไม่น่าจะเป็นอุปสรรคของการนำมาเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคพยาธิปากขอที่พบในผู้ที่ติดเชื้อทั่วไป นอกจากนี้ก็นำโปรตีน *Na-ASP-2* ไปใช้ร่วมกับโปรตีนชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนได้ดียิ่งขึ้น การพบความหลากหลายของยีน *Na-ASP-2* ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาองค์ประกอบของวัคซีนเพื่อต่อต้านการติดเชื้อพยาธิปากขอต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาในแง่ของ HLA (human leukocyte antigen system) supertypes พบตัวอย่างที่เกิดการแทนที่เหมือนกับการแทนที่ในตำแหน่งของยีน *Na-ASP-2* ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งมีผลทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด โดย HLA ใน class 1 พบว่าเมื่อเกิดการแทนที่มีผลทำให้การตอบสนองลดลงไปจำนวนมาก โดยอาจส่งผลต่อ CD4+ lymphocyte เมื่อความจำเพาะกับตำแหน่งที่จับกับ T cell epitope ลดลง แต่ใน class 2 เมื่อเกิดการแทนที่ในตำแหน่งดังกล่าวกลับมีผลทำให้การตอบสนองลดลงไปเพียงเล็กน้อยจึงส่งผลไม่แตกต่างไปจากเดิม อย่างไรก็ตามการตอบสนองของ HLA supertypes เมื่อเกิดการแทนที่กรดอะมิโนเป็นเพียงการทำนายที่คาดว่าจะเกิดขึ้นเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรง epitopes จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาในหลอดทดลองเพื่อทดสอบและยืนยันความถูกต้องที่เกิดขึ้น

2. การศึกษาโดยใช้จำนวนตัวอย่างเชื้อพยาธิปากขอที่มากขึ้นอาจทำให้พบความหลากหลายของยีน *Na-ASP-2* ได้มากยิ่งขึ้น หรือทำให้ทราบขอบเขตของความหลากหลายได้ดีขึ้นและอาจทำให้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างได้ดียิ่งขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ในการเข้าใจกลไกทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดความหลากหลายดังกล่าวต่อไป

3. การศึกษาโดยหาค่าประกอบของวัคซีนชนิดต่างๆ ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตของวงจรชีวิตพยาธิปากขอเมื่ออยู่ในร่างกายของคนจะมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันพยาธิปากขอได้ดียิ่งขึ้น โดยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีนไม่ควรมีความหลากหลายสูงมากจนเกินไปรวมถึงสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ จึงจะมีประสิทธิภาพในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของพยาธิปากขอได้อย่างสมบูรณ์และยังส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถคงอยู่ได้เป็นระยะเวลาานาน

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชูเกียรติ ศิริวิชยกุล, ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ, และประยงค์ ระดมยศ, บรรณาธิการ. 2549. ตำราปรสิตวิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : เมติคัล มีเดีย.

นิมิตร มรกต, และเกตุรัตน์ สุขวัจน์, บรรณาธิการ. 2546. ปรสิตวิทยาทางการแพทย์: โปรโตซัวและหนอนพยาธิ. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : โครงการตำรา คณะแพทยศาสตร์.

สมชาย จงวุฒิเวศย์, อุษา ทิสยากร, โอฟ้า พรหมมาลิขิต, และอัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์, บรรณาธิการ. 2554. วัคซีนป้องกันโรคปรสิต. วัคซีน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : นพชัยการพิมพ์.

ฐิติมา วงศาโรจน์ และคณะ. 2552. รายงานผลการศึกษาศักยภาพการวินิจฉัยโรคหนอนพยาธิและโปรโตซัวของประเทศไทย พ.ศ. 2552. กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. (อัดสำเนา).

สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ และคณะ. 2552. ทางเลือกสำหรับผู้ป่วยด้วยโรคทางกรรมพันธุ์. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ปีที่ 9. (อัดสำเนา).

ภาษาอังกฤษ

Asojo, O. A., et al. 2005. X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, *Necator americanus*, and a vaccine antigen for human hookworm infection. J Mol Biol 346(3): 801–814.

Albonico, M., et al. 1995. Rate of reinfection with intestinal nematodes after treatment of children with mebendazole or albendazole in a highly endemic area. Trans R Soc Trop Med Hyg 89(5): 538-541.

Bethony, J. M., et al. 2011. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. Immunol Rev 239: 237-270.

Bethony, J. M., et al. 2008. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the Na-ASP-2 hookworm vaccine in unexposed adults. Vaccine 26(19): 2408-2417.

Bethony, J., et al. 2006. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. Lancet 367(9521):1521-1532.

- Bethony, J., et al. 2005. Antibodies against a secreted protein from hookworm larvae reduce the intensity of hookworm infection in humans and vaccinated laboratory animals. Faseb J 19(12): 1743–1745.
- Bundy, D. A., Chan, M. S., and Savioli, L. 1995. Hookworm infection in pregnancy. Trans R Soc Trop Med Hyg 89: 521–522.
- Beaver, P. C., Jung, R. C., and Cupp, E. W. 1984. Clinical Parasitology. 9 th ed. Philadelphia: Lea and Febiger : 277-287.
- Cappello, M., Hawdon, J. M., Jones, B. F., Poindexter Kennedy, W., and Hotez, P. J. 1996. *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: cloning by PCR and expression of soluble, active protein in *E.coli*. Mol Biochem Parasitol 80(1): 113-117.
- Diemert, D. J., Bethony, J. M., and Hotez, P. J. 2008. Hookworm Vaccines. Clin Infect Dis 46(2): 282-288.
- Del Valle, A., Jones, B. F., Harrison, L. M., Chadderdon, R. C., and Cappello, M. 2003. Isolation and molecular cloning of a secreted hookworm platelet inhibitor from adult *Ancylostoma caninum*. Mol Biochem Parasitol 129(2): 167-177.
- Fujiwara, R. T., et al. 2005. Immunogenicity of the hookworm *Na*-ASP-2 vacca candidate: characterization of humoral and cellular responses after vaccination in the sprague dawley rat. Hum Vaccin 1(3): 123–128.
- Geiger, S. M., Massara, C. L., Bethony, J., Soboslay, P. T., and Correa-Oliveira, R. 2004. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. Clin Exp Immunol 136: 334-340.
- Goud, G. N., et al. 2005. Expression of the *Necator americanus* hookworm larval antigen *Na*-ASP-2 in *Pichia pastoris* and purification of the recombinant protein for use in human clinical trials. Vaccine 23(39): 4754–4764.
- Goud, G. N., et al. 2004. Cloning, yeast expression, isolation, and vaccine testing of recombinant *Ancylostoma*-secreted protein (ASP)-1 and ASP-2 from *Ancylostoma ceylanicum*. J infect Dis 189(5): 919–929.

- Gilman, R. H. 2000. Intestinal nematodes that migrate through skin and lung. In: Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. 8th ed. Pennsylvania: W.B. Saunders Co: 730-740.
- Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J., and Jacobson, J. 2008. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. J Clin Invest 118:1311-1321.
- Hotez, P. J., et al. 2004. Hookworm infection. N Engl J Med 351: 799-807.
- Hotez, P. J., et al. 2003. Progress in the development of a recombinant vaccine for human hookworm disease: the Human Hookworm Vaccine Initiative. Int J Parasitol 33(11): 1245–1258.
- Henriksen, A., et al. 2001. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily. Proteins: Struct. Funct. Genet 45(4): 438–448.
- Harrison, L. M., Cordova, J. L., and Cappello, M. 2001. Ancylostoma caninum anticoagulant peptide-5: immunolocalization and in vitro neutralization of a major hookworm anti-thrombotic. Mol Biochem Parasitol 115(1): 101-107.
- Jongwutiwes, S., Charoenkorn, M., Sitthichareonchai, P., Akaraborvorn, P., and Putaporntip, C. 1999. Increased sensitivity of routine laboratory detection of Strongyloides stercoralis and hookworm by agar-plate culture. Trans R Soc Trop Med Hyg 93: 398-400.
- Jongsuksantikul, P., Chaeychomsri, W., Techamontrikul, P., Jeradit, P., and Suratanavanit, P. 1992. Study on Prevalence and intensity of intestinal helminthiasis and opisthorchiasis in Thailand. J Trop Med Parasitol 15: 80-95.
- Jones, B. F., and Cappello, M. 2004. Hookworm infection: molecular mechanisms of disease and targets for control. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms 1(2): 217- 222.
- Loukas, A., Constant, S. L., and Bethony, J. M. 2005. Immunobiology of hookworm infection. FEMS Immunol Med Microbiol 43(2): 115-124.

- Matsusaki, G. 1963. Influence of low temperature, sunshine, desiccation and human excreta upon the eggs of *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus*. Part I low temperature. Yokohama Med. Bull 14: 73–79.
- Mendez, S., et al. 2005. Effect of combining the larval antigens *Ancylostoma* secreted protein 2 (ASP-2) and metalloprotease 1 (MTP-1) in protecting hamsters against hookworm infection and disease caused by *Ancylostoma ceylanicum*. Vaccine 23: 3123–3130.
- Maxwell, C., et al. 1987. The clinical and immunologic responses of normal human volunteers to low dose hookworm (*Necator americanus*) infection. Am J Trop Med Hyg 37:126-34.
- Ogilvie, B. M., et al. 1978. Antibody responses in self-infections with *Necator americanus*. Trans R Soc Trop Med Hyg 72: 66–71.
- Taweethavonsawat, P., Suriyakhun, N., and Chungpiwat, S. 2006. Virulence factor of hookworm infection. J. Thai Vet. Med. Assoc. 57: 73-85.
- Raknam, T., Kedsoontorn, V., Srinukham, S., and Sanguankiat, S. 2010. Nutritional Status of Schoolchildren with Hookworm Infection in Tha Sala District, Nakhon Si Thammarat Province, Thailand. J Trop Med Parasitol 33: 62-68.
- Williamson, A. L., et al. 2004. A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. J Biol Chem 279(34): 35950-35957.
- World Health Organization. 1978. Prevention and control of intestinal parasitic infection. WHO Tech Rep Ser 749:1-86.
- Xiao, S., et al. 2008. The evaluation of recombinant hookworm antigens as vaccines in hamsters (*Mesocricetus auratus*) challenged with human hookworm, *Necator americanus*. Exp Parasitol 118(1): 32-40

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แสดงรหัสพันธุกรรม (genetics code)

Second Position

	U	C	A	G	
U	UUU UUC Phe UUA Leu UUG	UCU UCC Ser UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA* Stop UAG* Stop	UGU Cys UGC UGA* Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU CUC Leu CUA CUG	CCU CCC Pro CCA CCG	CAU CAC His CAA Gln CAG	CGU CGC Arg CGA CGG	U C A G
A	AUU AUC Ile AUA AUG ⁺ Met	ACU ACC Thr ACA ACG	AAU AAC Asn AAA Lys AAG	AGU AGC Ser AGA Arg AGG	U C A G
G	GUU GUC Val GUA GUG	GCU GCC Ala GCA GCG	GAU GAC Asp GAA Glu GAG	GGU GGC Gly GGA GGG	U C A G

* chain termination, or "nonsense," codon

⁺ the initiator codon

ภาคผนวก ข

แสดงรหัสและตัวย่อสำหรับกรดอะมิโน

Amino acid	Three-letter abbreviation	One-letter symbol
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	val	V

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 0.5 EDTA (pH 8.0)

EDTA 186.1 g.

double distilled water 800 ml.

นำส่วนผสมทั้ง 2 อย่างนี้มาควนด้วย magnetic stirrer จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้มีค่า pH = 8 และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อ*

การเตรียม TBE buffer (10x)

Tris base 108 g.

Boric acid 55 g.

EDTA 7.4 g.

ปรับค่า pH และปริมาตรให้เท่ากับ 8.3 และ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน*

การเตรียม marker

DNA marker 20 μ l.

Dye 80 μ l.

TE buffer 360 μ l.

การเตรียม TE buffer (10x)

1 M Tris 800 ml.

0.5 M EDTA 200 ml.

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อก่อนที่จะใช้*

การเตรียม 1 M Tris (pH 7.8)

Tris base	121.1 g.
น้ำกลั่น	800 ml.

นำส่วนผสมทั้ง 2 มาละลายให้เป็นเนื้อเดียวด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl ให้มีค่า pH เท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร โดยใช้ น้ำกลั่น และนำไปนิ่งด้วยหม้อปลดเชื้อก่อนที่จะนำไปใช้*

* ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

การเตรียม gel-loading buffers

bromophenol blue	0.25 g.
xylene cyanol FF	0.25 g.
glycerol in water	30 g.

ละลายในน้ำกลั่น โดยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร

ภาคผนวก ง

ข้อมูลแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Na-ASP-2*

H20 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H8 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H2 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H3 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H17 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H14 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H11 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H29 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H30 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H26 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H28 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H16 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H32 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H13 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H10 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H5 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H9 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H7 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H31 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H12 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H4 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H6 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H23 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H19 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H22 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H24 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H21 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H27 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H18 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H25 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H15 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG
 H1 GAAAATCACAATGATGTCTTCTATCACATGTTTGGTGAGTTTTATCCCAAGAACTATTTG

 H20 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H8 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H2 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H3 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H17 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H14 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H11 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H29 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H30 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H26 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H28 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H16 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H32 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H13 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H10 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H5 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H9 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H7 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H31 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H12 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H4 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H6 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H23 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT
 H19 AACAGTGGTTTAAGTAAGGTAAATTCCTCATTCAAGGAAAAGAATATGATTTAGGTTCTT

H1 CATTTTGAGTTCAACTGACGAAAAAACATAAAATGTTACAAATATGAACGTTACATTTG

H20 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H8 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H2 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H3 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H17 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H14 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H11 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H29 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H30 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H26 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H28 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H16 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H32 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H13 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H10 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H5 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H9 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H7 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H31 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H12 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H4 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H6 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H23 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H19 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H22 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H24 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H21 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H27 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H18 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H25 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H15 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA
 H1 GTGTAGATGGCATCTGTTGCATCTCGTACTACACACGTA

H20 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H8 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H2 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H3 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H17 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H14 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H11 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H29 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H30 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H26 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H28 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H16 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H32 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H13 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H10 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H5 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H9 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H7 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H31 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H12 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H4 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H6 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H23 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H19 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H22 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H24 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H21 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT
 H27 TCAGTAAGATCTTGAATTTTTTACAGTTTTTCCCTTTGCTATT

H28 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H16 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H32 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H13 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H10 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H5 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H9 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H7 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H31 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H12 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H4 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H6 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H23 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H19 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H22 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H24 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H21 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H27 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H18 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H25 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H15 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC
H1 TGATTAGTTGTGTTTCAGTGAAGCTCATTACGCTCACATACTTTAACAAATCGTAGTGATC

H20 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAACTNNNNCCCCACCAA-----
H8 TGTAGTTGCTTTAATATTC-----
H2 -----
H3 -----
H17 -----
H14 -----
H11 -----
H29 -----
H30 -----
H26 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCNN-----
H28 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCNN-----
H16 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCNN-----
H32 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCNN-----
H13 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCNN-----
H10 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCNN-----
H5 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCNN-----
H9 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCNN-----
H7 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCA-----
H31 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCNN-----
H12 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCNN-----
H4 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACATGATGCCAGCNN-----
H6 -----
H23 TGTAGTTGCTTTAAA-----
H19 TGTAGTTGCTTTAAANNNGGGGCTTGAAANACACANTGTTTCGNCGTATTCATAGNGCT
H22 TGTAGTTGCTTTAAAAAN-----
H24 TGTAGTTGCTTTAAAAANNAAN-----
H21 TGTAGTTGCTTTAAAAA-----
H27 -----
H18 -----
H25 TGTAGTTGCTTTAAAA-----
H15 TGTAATTTGCTTTAAAAAAAATTTTTTTTNNANN-----
H1 TGTAGTTGCTTTAATATTCAAATAAAACAT-----

H20 -----
H8 -----
H26 -----
H28 -----
H16 -----
H32 -----
H13 -----

H10	-----
H5	-----
H9	-----
H7	-----
H31	-----
H12	-----
H4	-----
H6	-----
H23	-----
H19	CTTTTCANACTTCNCAATCNTATGCGTANNNAAATCCGGGGATATNCNTNNAATTCNAG
H22	-----
H24	-----
H21	-----
H27	-----
H18	-----
H25	-----
H15	-----
H1	-----

H12	-----
H4	-----
H6	-----
H23	-----
H19	GGGNAAAAAATGTNAAAATTCACGATCTTTCTNNTATACTGTATGNTACGTAAANTCCGG
H22	-----

H20	---
H8	---
H2	---
H3	---
H17	---
H14	---
H11	---
H29	---
H30	---
H26	---
H28	---
H16	---
H32	---
H13	---
H10	---
H5	---
H9	---
H7	---
H31	---
H12	---
H4	---
H6	---
H23	---
H19	NGN
H22	---

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายเจริญชัย อึ้งเจริญสุข เกิดเมื่อวันที่ 11 มกราคม 2529 จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2551 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552