

การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ คริปโตสปอริเดียม  
ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์  
โดยการหาลำดับดีเอ็นเอ

นางสาวรัตนา เตียงทิพย์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2543  
ISBN 974-13-0889-2  
ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC ANALYSIS OF *CRYPTOSPORIDIUM* FROM HUMAN  
IMMUNODEFICIENCY VIRUS-INFECTED PATIENTS IN KING  
CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL BY DNA SEQUENCING

Miss Rattana Tiengtip

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

Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic year 2000

ISBN 974-13-0889-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อคริปโตสปอริเดียมในผู้ป่วย  
ที่ติดเชื้อไวรัสภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์  
โดยการหาลำดับดีเอ็นเอ


โดย                              นางสาวรัตนา เตียงทิพย์

สาขาวิชา                      ประสาทวิทยาทางการแพทย์

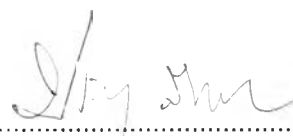
อาจารย์ที่ปรึกษา              รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์

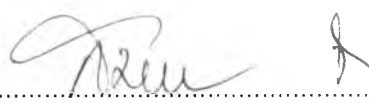
.....

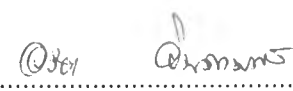
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

  
..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประเสริฐ สิทธีเจริญชัย)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อริยา จินดามพร)

รัตนา เตียงทิพย์: การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อคริปโตสปอริเดียมในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยการหาลำดับ ดีเอ็นเอ (GENETIC ANALYSIS OF *CRYPTOSPORIDIUM* FROM HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-INFECTED PATIENTS IN KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL BY DNA SEQUENCING)

อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.ดร.นพ.สมชาย จงวุฒิเวศย์, 73 หน้า. ISBN 974-13-0889-2

โรค cryptosporidiosis เป็นโรคติดเชื้อจากโปรโตซัวชนิดหนึ่งในกลุ่มคอคซิเดีย ใน genus *Cryptosporidium* ซึ่งพบการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะในผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ในปัจจุบันมีการจำแนกสปีชีส์ ของเชื้อ *Cryptosporidium* ได้ 10 สปีชีส์ โดยอาศัยคุณลักษณะความจำเพาะของโฮสต์ รูปร่าง ลักษณะของโอโอซิสต์ ตำแหน่งของการติดเชื้อ และการวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยา เนื่องจากในปัจจุบันไม่มียาสกัดที่ให้ผลในการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการป้องกันและการควบคุมการแพร่กระจายของโรคจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ปัจจุบันการศึกษาสปีชีส์ ของเชื้อ *Cryptosporidium* ในกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวียังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์ *Cryptosporidium* จำนวน 30 ตัวอย่างจากอุจจาระของผู้ป่วยเอชไอวี ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างปี ค.ศ.1966 ถึง ค.ศ. 2000 ผู้ป่วยทั้งหมดมีอาการท้องเสียเรื้อรัง และมีปริมาณลิมโฟไซต์ชนิด CD4+ ต่ำ (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ  $121.07 \pm 152.39$ ) การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยการย่อยด้วยโปรตีนเนสเค และการสกัดโปรตีนส่วนเกินออกโดย ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม หลังจากการทำให้โอโอซิสต์เข้มข้นขึ้นโดย การลอยตัวในสารละลายน้ำตาลแล้วทำการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA) โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งครอบคลุมความยาว 670 คู่เบส การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยการวิเคราะห์จาก 2 ทิศทาง ผลการศึกษาพบ *Cryptosporidium* ทั้งหมด 4 สปีชีส์ ได้แก่ *C. parvum* (human genotype) มีจำนวน 25 ราย *C. meleagridis* 3 ราย *C. muris* 1 ราย และ *C. felis* 1 ราย โอโอซิสต์ ของ *C. muris* และ *C. parvum* ไม่มีความแตกต่างจากการวัดความกว้างและความยาว อย่างไรก็ตาม โอโอซิสต์ของ *C. muris* มีขนาดใหญ่กว่า โอโอซิสต์ ของ *Cryptosporidium* species อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ โอโอซิสต์ ของ *C. felis* มีขนาดเล็กสุดเป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อ *C. meleagridis* และ *C. muris* พบในเด็กที่มีการติดเชื้อเอชไอวีส่วน *C. parvum* human genotype พบมากในผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อเอชไอวี แสดงว่าการแพร่กระจายระหว่างคนนั้นมีความสำคัญในกลุ่มผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อเอชไอวี ในประเทศไทยนอกจากนี้ในกลุ่มอายุที่แตกต่างกันจะพบการติดเชื้อจากสปีชีส์ ที่ต่างกัน และ/หรือ จากแหล่งที่มาของเชื้อที่ต่างกัน

ภาควิชา ประสาทวิทยา

สาขาวิชา ประสาทวิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนิสิต ..... รัตนา เตียงทิพย์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... รศ.ดร.นพ.สมชาย จงวุฒิเวศย์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4275246830: MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEY WORD: *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* / SEQUENCE / HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS /  
SMALL SUBUNIT RIBOSOMAL RNA

RATTANA TIENGTIP: GENETIC ANALYSIS OF *CRYPTOSPORIDIUM* FROM HUMAN  
IMMUNODEFICIENCY VIRUS-INFECTED PATIENS IN KING CHULALONGKORN  
MEMORIAL HOSPITAL BY DNA SEQUENCING.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D., Ph.D. 73 pp.  
ISBN 974-13-0889-2

Cryptosporidiosis, an infectious disease caused by a coccidian protozoa in the genus *Cryptosporidium*, has been recognized increasingly among immunocompromised patients, especially those infected with human immunodeficiency virus (HIV). At present, 10 species of *Cryptosporidium* have been considered to be valid based on host range, oocyst morphology, predilection site of infection and molecular analysis. Since no effective anti-cryptosporidial agents are available, prevention and control of disease transmission are of primary importance. To date, little has been known regarding species of *Cryptosporidium* infecting HIV-infected individuals. Therefore, 30 isolates of *Cryptosporidium* from diarrheal stools of HIV-infected patients attending King Chulalongkorn Memorial Hospital during 1996-2000 were recruited for analysis. All of these patients suffered from chronic diarrhea and had low level of CD4+ lymphocytes (mean  $\pm$  SD = 103.72  $\pm$  134.20). After sugar flotation, *Cryptosporidium* DNA was purified from each isolate by proteinase K digestion followed by phenol/chloroform extraction. Amplification of a polymorphic region encompassing 670 bp of the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene was performed by nested polymerase chain reaction (PCR). Direct sequencing of the amplified DNA was determined from both directions. Results have shown that 4 species of *Cryptosporidium* were identified, i.e., *C. parvum* (human genotype), *C. meleagridis*, *C. muris* and *C. felis* occurring in 25, 3, 1 and 1 isolates, respectively. Oocysts of *C. meleagridis* and *C. parvum* are indistinguishable based on their dimensions. However, *C. muris* possesses a significantly larger oocysts dimension than those of other species while oocysts of *C. felis* are the smallest. It is of note that only *C. meleagridis* and *C. muris* were found in HIV-infected children whereas *C. parvum* (human genotype) predominates among HIV-infected adults. These findings suggest that anthroponotic transmission plays an important role among HIV-infected adults and that different age groups of HIV-infected Thai patients are vulnerable to infection from different species of *Cryptosporidium* and/or from different sources.

Department Parasitology

Field of study Medical Parasitology

Academic year **2000**

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co- Advisor's signature.....



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งในความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือให้ความรู้ความเข้าใจ ข้อเสนอแนะในการแก้ปัญหาต่างๆ ตลอดจนการแก้ไขจุดบกพร่องต่างๆ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มาด้วยดีตลอด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินตามพร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ หัวหน้าสถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิกที่สนับสนุนการลาศึกษาต่อในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้อช่วยเหลือในด้านสถานที่ และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทำการวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่แผนกโสตทัศนศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการถ่ายภาพ และสไลด์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนงานวิจัยจากบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก ในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิทยาลัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และพี่ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำย่อ.....	ณ

### บทที่

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
2. สอบสวนเอกสาร.....	5
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
4. ผลการทดลอง.....	38
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	58
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	70
ประวัติผู้เขียน.....	73

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงผลการทดลองการเกิดการติดต่อของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> ระหว่างโฮสต์ต่างๆ (cross-transmission).....	9
2. แสดงการระบาดของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> จากแหล่งน้ำต่างๆ.....	23
3. แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง.....	39
4. แสดงผลการตรวจทางโลหิตวิทยา และปริมาณ CD4+ และ CD8+ Lymphocyte.....	41
5. แสดงอาการแทรกซ้อนและการตรวจพบเชื้ออื่นๆ ร่วมด้วย.....	42
6. แสดงอาการที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์.....	43
7. แสดงขนาดของ oocyst จากการวัด 30 oocyst ในแต่ละตัวอย่าง.....	47



## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1. วงชีวิตของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	24
2. แสดงโครงสร้างของ dRhodamine dye terminators.....	25
3. แสดงตัวอย่างลักษณะ oocyst ของ <i>Cryptosporidium</i> จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส HIV ย้อมด้วยสี modified Kinyoun acid fast.....	44
4. แสดงตัวอย่าง oocyst ของ <i>Cryptosporidium</i> ที่แยกออกจากอุจจาระ โดยวิธี Sheather sugar flotation.....	45
5. แสดงผลิตภัณฑ์ PCR รอบแรกบนอะกาโรสเจล 15 ตัวอย่างแรกความเข้มข้นร้อยละ 2... 48	48
6. แสดงผลิตภัณฑ์ PCR รอบสองบนอะกาโรสเจล 15 ตัวอย่างแรกความเข้มข้นร้อยละ 2... 48	48
7. แสดงผลิตภัณฑ์ PCR รอบแรกบนอะกาโรสเจล 15 ตัวอย่างหลังความเข้มข้นร้อยละ 2... 49	49
8. แสดงผลิตภัณฑ์ PCR รอบสองบนอะกาโรสเจล 15 ตัวอย่างหลังความเข้มข้นร้อยละ 2... 49	49
9. แสดงตัวอย่างของ electropherogram จากการใช้ primer P3.....	51
10. แสดงตัวอย่างของ electropherogram จากการใช้ primer P4.....	52
11. แสดงผลการวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสของ DNA ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> ในแต่ละตัวอย่าง.....	53
12. แสดงผลการวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสของ DNA ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> ในแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น.....	56
13. แสดงผลการวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสของ DNA ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> ในแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	57

## คำย่อ

bp	=	basepair
°C	=	degree celsius
DNA	=	deoxyribonucleic acid
Kda	=	Kilodalton
Kb	=	Kilobase
Mb	=	Megabase
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
PCR	=	polymerase chain reaction
RNA	=	ribonucleic acid
S	=	Svedberg unit
spp	=	species
SSU rRNA	=	small subunit ribosomal RNA
UV	=	ultraviolet
µl	=	microlitre
TX	=	Texas
UK	=	United Kingdom
US	=	United States
OR	=	Oregon