

การวิเคราะห์จีโนมไทป์ของอะแคนธามีบาที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานคร
และปริมณฑล



นางสาววริษา หนูประเสริฐ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENOTYPING ANALYSIS OF *Acanthamoeba* FROM FRESHWATER SAMPLES IN
BANGKOK AND NEARBY PROVINCES.



Miss Warisa Nupresert

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์จีโนมไทป์ของอะแคนธามีบาที่พบในแหล่งน้ำ
ต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล

โดย

นางสาววริษา หนูประเสริฐ

สาขาวิชา

ปรสติดวิทยาทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธพรทิพย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ณัฐรุต จันทชุม

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทราตุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธพรทิพย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ณัฐรุต จันทชุม)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงศักดิ์ ลิ้มปภิตติกุล)

วิชา หนูประเสริฐ : การวิเคราะห์จีโนไทป์ของอะแคนธามีบาที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ ในเขต กรุงเทพมหานครและปริมณฑล. (GENOTYPING ANALYSIS OF *Acanthamoeba* FROM FRESHWATER SAMPLES IN BANGKOK AND NEARBY PROVINCES.)

- อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. สมชาย จงวุฒิเวศย์,
 - อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์, รศ. ณัฐรุต จันทชุม,
- 99 หน้า.

อะมีบาที่ดำรงชีพอิสระในจีโนส *Acanthamoeba* หลายสปีชีส์สามารถก่อโรคได้ ทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลันในผู้ที่ร่างกายอ่อนแอและกระจกตาติดเชื้อในคนทั่วไป ถึงแม้ *Acanthamoeba* จะปรากฏอยู่ได้ทั่วไปแต่การศึกษาในประเทศไทยยังไม่เป็นที่ทราบถึงความชุกและการกระจายตัวของสปีชีส์ที่ก่อโรคได้ในสิ่งแวดล้อม การศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบ *Acanthamoeba* ที่ได้จากการสำรวจแหล่งน้ำ 347 ตัวอย่างจากบึงในธรรมชาติและที่ถูกสร้างขึ้น สระน้ำและคลองในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ซึ่งครอบคลุมถึงเหงือกปลาน้ำจืด 6 ตัวอย่าง จากการเพาะเลี้ยงบน 1.5% non-nutrient agar กับ inactivated *Escherichia coli*. สามารถแยก *Acanthamoeba* ได้ 16 ตัวอย่าง (4.3%) จึงทำการตรวจสอบลำดับเบสจาก small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) ด้วยวิธี nested PCR และหาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในแต่ละตัวอย่าง ลักษณะที่พบได้มากที่สุด ได้แก่ จีโนไทป์ T4 (75.00%) ตามด้วยจีโนไทป์ T8 (12.5%) จีโนไทป์ T11 (6.25%) และจีโนไทป์ T7 ร่วมกับ T9 (6.25%) เนื่องจากจีโนไทป์ T4 ซึ่งมีการติดเชื้อในกระจกตาเป็นส่วนมาก สามารถพบได้จากบริเวณผิวของแหล่งน้ำที่สำรวจในเขตกรุงเทพมหานครและบริเวณข้างเคียงจึงเป็นที่น่าสังเกตและติดตามในบริเวณอื่นเพิ่มเติมเพื่อหลีกเลี่ยงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ประสาทวิทยา..... ลายมือชื่อ นิสิต..... วิชา หนูประเสริฐ.....
 สาขาวิชา ประสาทวิทยาทางการแพทย์... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....
 ปีการศึกษา 2552..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5074825030 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORDS : *Acanthamoeba* / GENOTYPING ANALYSIS

WARISA NUPRASERT : GENOTYPING ANALYSIS OF *Acanthamoeba* FROM
FRESHWATER SAMPLES IN BANGKOK AND NEARBY PROVINCES.

THESIS ADVISOR : PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D, Ph.D,

THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. CHATURONG PUTAPORNTIP, Ph.D,

ASSOC. PROF. NUTAROS CHANTACHUME, 99 pp.

Pathogenic free-living amoebae in the genus *Acanthamoeba* comprise heterogeneous species and several of these are causative agents of granulomatous amoebic encephalitis affecting immunocompromised hosts and keratitis in immunocompetent individuals. Despite the wide-spread occurrence and ubiquity of acanthamoebae in environmental samples, the prevalence and distribution of pathogenic species in Thailand remains unknown. We have conducted a prospective survey of acanthamoebae among 374 freshwater samples collected from natural and artificial ponds, pools and canals in Bangkok and nearby provinces including 6 freshwater fish gills. Results have shown that 16 of these samples (4.3%) contained acanthamoebae as detected by cultivation method using 1.5% non-nutrient agar seeded with heat inactivated *Escherichia coli*. We further determined the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) sequences from either nested PCR-purified templates or from recombinant subclones of each isolate. Phylogenetic inference from the SSU rRNA gene reveals that the majority of isolates belonged to genotype T4 (75.00%), followed by genotype T8 (12.5%) and genotype T11 (6.25%) while one isolate contained mixture of genotypes T7 and T9. Because genotype T4 has been frequently implicated in corneal infections, the predominance of this genotype in surface water in Bangkok and surrounding areas highlights the importance of further surveillance in other environmental niche and risk awareness upon contact with these contaminated natural water resources.

Department : Parasitology.....

Field of Study : Medical Parasitology.....

Academic Year : 2009.....

Student's Signature Warisa Nuprasert

Advisor's Signature Somchai J.

Co-Advisor's Signature Chaturong Putaporn

Co-Advisor's Signature Nutaros Chantachume

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของศาสตราจารย์นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ข้อแนะนำในการแก้ปัญหาต่างๆ ในการศึกษาวิจัยและให้ความเมตตากรุณาต่อข้าพเจ้าเป็นอย่างดี ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรพิทย และรองศาสตราจารย์ณัฐรศ จันทขุม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ สนับสนุน ความคิดเห็นต่าง ๆ ในการศึกษาวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดียิ่ง ข้าพเจ้า ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงศักดิ์ ลิ้มปัทมทิฏฐ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณมาลี เจริญกร คุณอุรุษยา พัฒนวงศ์ คุณทวีศักดิ์ แซ่เตีย ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอาจารย์สุนีย์ สีธรรมใจ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือต่างๆ ตลอดจนความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา พี่น้อง และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความสนใจ คำปรึกษาและให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

ศูนย์วิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
อนุกรมวิธานของ <i>Acanthamoeba</i>	5
วงจรชีวิตและการเจริญเติบโตของ <i>Acanthamoeba</i>	8
Granulomatous Amebic Encephalitis, GAE	12
<i>Acanthamoeba</i> keratitis, AK	14
การเพาะเลี้ยง <i>Acanthamoeba</i>	17
อนุชีววิทยาของ <i>Acanthamoeba</i>	18
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
รูปแบบงานวิจัย.....	22
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	22
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	22
ขนาดของกลุ่มประชากร.....	22
เกณฑ์การเลือกสถานที่ในการสำรวจ.....	23
แผนที่ในการศึกษา.....	24
การเก็บตัวอย่างน้ำ.....	24
การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย.....	25
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	28
การแยกเชื้อ <i>Acanthamoeba</i>	29
การออกแบบ oligonucleotides สำหรับใช้เป็น PCR Primer.....	30

บทที่	หน้า
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยวิธีลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	31
การตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี gel electrophoresis.....	31
การ purify PCR product โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit.....	32
วิธีการทำโคลน (subclone).....	32
การวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA.....	34
4. ผลการทดลอง.....	35
การสำรวจ <i>Acanthamoeba</i> ในแหล่งน้ำ.....	35
รูปร่างลักษณะของ <i>Acanthamoeba</i>	38
ตัวอย่าง <i>Acanthamoeba</i> จากผู้ป่วยโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์.....	43
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 18S rRNA โดยวิธีลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	45
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA.....	46
5. อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	75
รายการอ้างอิง.....	79
ภาคผนวก.....	90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	99

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จีโนไทป์ใน <i>Acanthamoeba</i> ที่เกี่ยวข้องกับโรคกระจกตาอักเสบและโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน.....	21
2	แสดงสถานที่ในการสำรวจแหล่งน้ำในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล.....	36
3	แสดงสถานที่ ลักษณะทางกายภาพและลักษณะของกลุ่มซิสต์ของ <i>Acanthamoeba</i> ที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล	36
4	แสดงผลในเดือนที่มีการสำรวจพบ <i>Acanthamoeba</i> spp. จากแหล่งน้ำต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล.....	37



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3.....	7
2	<i>Acanthamoeba</i> ในระยะโทรโพซอยต์.....	8
3	<i>Acanthamoeba</i> ในระยะซิสต์.....	9
4	วงจรชีวิตของ <i>Acanthamoeba</i>	11
5	ring stromal infiltration.....	14
6	แสดงพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล.....	24
7	แสดงตำแหน่งของ primer ต่างๆ ที่ใช้ในทำ PCR	30
8	แสดงโทรโพซอยต์ของซิสต์กลุ่มที่ 1.....	38
9	แสดงลักษณะของซิสต์กลุ่มที่ 1.....	39
10	แสดงโทรโพซอยต์ของซิสต์กลุ่มที่ 2.....	40
11	แสดงลักษณะของซิสต์กลุ่มที่ 2.....	41
12	แสดงลักษณะของซิสต์กลุ่มที่ 2 (ต่อ).....	41
13	แสดงลักษณะของซิสต์กลุ่มที่ 2 (ต่อ).....	42
14	แสดงลักษณะซิสต์จากตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อที่กระจกตา.....	44
15	แสดงลักษณะซิสต์จากตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อทางสมอง.....	44
16	แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิตผล PCR	45
17	แสดง phylogenetic tree ในยีน 18S rRNA ของ <i>Acanthamoeba</i> ในการศึกษา.....	47
18	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ SSU rRNA gene ในกลุ่ม T7 และ T8.....	50
19	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ SSU rRNA gene ในกลุ่ม T10.....	53
20	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ SSU rRNA gene ในกลุ่ม T9.....	54
21	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ SSU rRNA gene ในกลุ่ม T11.....	56
22	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ SSU rRNA gene ในกลุ่ม T4.....	57
23	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ DF3 ในกลุ่ม T4.....	73
24	แสดง phylogenetic tree ในบริเวณ DF3 ของยีน 18S rRNA ของ <i>Acanthamoeba</i> ในการศึกษา.....	74

บทที่ 1

บทนำ

อะมีบาที่ดำรงชีพอิสระในธรรมชาติ (free-living amoeba, FLA) สามารถก่อโรคในคนได้ มีอยู่ด้วยกัน 4 ชนิด ได้แก่ *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* และ *Sappinia* sp. เมื่อเกิดการติดต่อก็จะเข้าทำลายระบบประสาทส่วนกลางทั้งในคนและสัตว์ เป็นเหตุถึงแก่ชีวิตได้ *Acanthamoeba* spp. และ *B. mandrillaris* ทำให้เกิดโรคสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน (granulomatous amebic encephalitis, GAE) มักพบในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันร่างกายบกพร่องหรือมีร่างกายอ่อนแอ นอกจากนี้ *Acanthamoeba* spp. ยังทำให้เกิดโรคผิวหนังอักเสบกึ่งเฉียบพลัน (cutaneous acanthamebiasis) และโรคกระจกตาอักเสบ (amebic keratitis) *N. fowleri* ทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองและเนื้อสมองอักเสบชนิดปฐมภูมิ (primary amebic meningoencephalitis, PAM) พบได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ที่มีร่างกายแข็งแรงโดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับแหล่งน้ำจืด (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Schuster & Visvesvara, 2004a; Visvesvara *et al.*, 2007) ในปี ค.ศ. 2001 มีรายงาน *S. diploidea* ก่อโรคในคน 1 ราย แต่ภายหลังได้รับการพิสูจน์ด้วยวิธี real-time PCR ว่า *Sappinia* ที่ทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบมีสาเหตุจาก *S. pedata* (Gelman *et al.*, 2001; Qvarnstrom *et al.*, 2009)

ในกลุ่มของอะมีบาที่ดำรงชีพอิสระในธรรมชาติ *Acanthamoeba* เป็นอะมีบาที่พบได้มากในดินและน้ำ โดยพบแพร่กระจายอยู่ทั่วโลกทั้งในเขตร้อนจนถึงทวีปอาร์คติก ในวงชีวิตมี 2 ระยะเวลาคือ ระยะเวลาโทรโฟซอยต์ (trophozoite) และระยะซิสต์ (cyst) ระยะเวลาโทรโฟซอยต์เป็นระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบ binary fission มีขนาด 15-50 ไมโครเมตร กินแบคทีเรีย สาหร่าย และยีสต์เป็นอาหาร บริเวณผิวมีโครงสร้างคล้ายหนามลักษณะใยยื่นออกมา เรียกว่า acanthopodia ช่วยให้มีการยึดเกาะกับพื้นผิว มีการเคลื่อนที่อย่างเชื่องช้าและใช้จับเหยื่อเป็นอาหาร เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีพโทรโฟซอยต์จะเปลี่ยนเป็นซิสต์ที่มีขนาด 10-25 ไมโครเมตร ผันแปรไปตามสปีชีส์และจีโนไทป์ (genotype) ซิสต์มีผนังหนา 2 ชั้น ประกอบด้วยผนังชั้นนอก (ectocyst) และผนังชั้นใน (endocyst) คงทนอยู่ในสภาพแวดล้อมได้หลายปี ซิสต์สามารถลอยไปในอากาศเนื่องจากมีขนาดเล็กทำให้มีการแพร่กระจายไปตามกระแสลม เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมซิสต์จะเปลี่ยนเป็นโทรโฟซอยต์อีกครั้งและมีการเจริญแบ่งตัวต่อไป (Khan, 2003; Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Schuster & Visvesvara, 2004a; Visvesvara *et al.*, 2007) ระยะเวลาซิสต์สามารถอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย มีการแยก *Acanthamoeba* ได้จากน้ำประปา น้ำกลั่น สระว่ายน้ำ น้ำแร่ น้ำทะเล ทะเลสาบน้ำจืดและน้ำเค็ม

แม่น้ำ ท่อระบายอากาศ ผิวน้ำ เครื่องปรับอากาศ สิ่งปฏิกูล ปุ๋ย ขยายขาด ผัก อากาศ เครื่องมือ ศัลยกรรม คอนแทคเลนส์และตลับเก็บที่มีการปนเปื้อน จากการเพาะเลี้ยง mammalian cell ในคนสามารถพบได้จากเยื่อบุโพรงจมูก เนื้อเยื่อปอดและสมอง ผิวหนังที่มีแผลเรื้อรัง น้ำไขสันหลัง และกระจกตา ในสัตว์พบได้ในปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลี้ยงคานและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นต้น

เชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายผ่านทางผิวหนังที่เป็นแผล ตา และระบบทางเดินหายใจ ก่อให้เกิดโรคสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน (granulomatous amebic encephalitis, GAE) โรคผิวหนังอักเสบกึ่งเฉียบพลัน (cutaneous acanthamebiasis) และโรคกระจกตาอักเสบ (*Acanthamoeba keratitis* หรือ *amebic keratitis*, AK)

โรคสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน (GAE) ที่มีสาเหตุจาก *Acanthamoeba* spp. พบได้ในคนที่ป่วยเป็นโรคเรื้อรังหรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น โรคเบาหวาน โรคพิษสุราเรื้อรัง และผู้ที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ รวมทั้งผู้ป่วยเอดส์ ในระยะเริ่มต้นอาการของโรคเป็นไปอย่างเฉื่อยช้า ระยะเวลาตั้งแต่ติดเชื้อจนแสดงอาการเป็นเวลาหลายอาทิตย์จนถึง 3 เดือน ผู้ป่วยจะมีอาการปวดศีรษะเป็นไข้คล้ายไข้หวัด คอแข็ง เจ็บคอ คลื่นไส้อาเจียน เมื่อเชื้อเข้าสู่สมองโดยผ่านทางกระแสเลือด อาการของโรคจะทวีความรุนแรงมากขึ้น เยื่อหุ้มสมองเกิดการอักเสบและมีหนอง ทำให้สมองบวม มีเนื้อตายหลายแห่งมีอาการชัก ประสาทหลอน มึนงง สับสน ง่วงซึมจนกระทั่งเสียชีวิต การวินิจฉัยโรคสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน (GAE) ยังคงเป็นปัญหาเนื่องจากมีอาการเหมือนการติดเชื้ออื่นๆ ทางระบบประสาทรวมถึงไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อรา การทำ CT scan หรือ MRI ช่วยให้เห็นบริเวณเนื้อเยื่อสมองที่ได้รับความเสียหายและการทดสอบทางเซรุ่มอาจมีประโยชน์ในข้อสันนิษฐานโรคสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน (GAE) แต่ไม่มีทางรักษาเนื่องจากผู้ป่วยเสียชีวิตก่อน

โรคผิวหนังอักเสบกึ่งเฉียบพลันพบมากในผู้ป่วยเอดส์ซึ่งมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1986 ขั้นตอนของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็วและรุนแรง อาจมีหรือไม่มีอาการทางประสาทร่วม ส่วนมากเสียชีวิตภายใน 1 เดือนหลังอาการทางประสาทปรากฏ นอกจากนี้ยังพบได้ในผู้ที่เป็โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและผู้ที่รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะหรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องทำให้เกิดแผลเรื้อรัง ผิวขรุขระ ขอบแผลไม่เรียบ ผู้ป่วยอาจได้รับการวินิจฉัยเป็นแผลติดเชื้อจากแบคทีเรียหรือภูมิแพ้ผิวหนัง ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แม้จะมีการใช้ยาหลายขนานร่วมกัน (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Khan, 2006)

โรคกระจกตาอักเสบมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1974 ที่สหราชอาณาจักรและในปี ค.ศ. 1975 ที่สหรัฐอเมริกา โดยผู้สวมใส่คอนแทคเลนส์เป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงในการเป็น *Acanthamoeba keratitis* เนื่องจากการล้างคอนแทคเลนส์ไม่สะอาด ตลับแช่คอนแทคเลนส์

มีการปนเปื้อนและบริเวณ corneal epithelial ที่ดวงตามีบาดแผลซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็น keratitis ได้ (Nagington *et al.*, 1974; Jones *et al.*, 1975) รวมทั้งการว่ายน้ำหรือล้างตาขณะที่ใส่คอนแทคเลนส์ ผู้ป่วยจะมีอาการเคืองตา น้ำตาไหล ปวดตาอย่างรุนแรง กระจกตาขุ่น ม่านตาอักเสบ มีหนองในตา การมองเห็นเริ่มไม่ชัด อาจถูกวินิจฉัยผิดว่าเกิดจาก herpes simplex virus อาการเป็นๆ หายๆ ระยะเวลาหนึ่งและทวีความรุนแรงขึ้น บริเวณตาจะปรากฏลักษณะคล้ายวงแหวนขึ้น (ring stromal infiltration) ซึ่งเป็นลักษณะที่ช่วยในการวินิจฉัยว่าเป็น Acanthamoebic keratitis ยืนยันผลด้วยการขูดชิ้นส่วนกระจกตาไปเพาะเลี้ยงและทดสอบด้วยเทคนิค PCR ซึ่งมีความจำเพาะสูง (Khan, 2006)

ในประเทศไทยมีการสำรวจพบ *Acanthamoeba* ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2531 ที่จังหวัดนครราชสีมาโดยมยุรัตน์และคณะ (มยุรัตน์ เทพมงคล, 2532) ในปี พ.ศ. 2541 ดวงพรและคณะได้ทำการสำรวจจะมีบาที่ดำรงชีพอิสระจากแหล่งดินและน้ำใน 14 จังหวัด จากทุกภาคของประเทศไทย ในเดือนมีนาคม-เมษายน สามารถพบ *Acanthamoeba* ใน 9 จังหวัด ได้แก่ ตาก สุโขทัย บุรีรัมย์ สระบุรี กรุงเทพฯ ปทุมธานี ราชบุรี เพชรบุรี และพัทลุงเป็นร้อยละ 46.4 จากตัวอย่างที่เป็นอะมีบาดำรงชีพแบบอิสระชนิดอื่นๆ 125 ตัวอย่าง (Nacapunchai *et al.*, 1999) และในปี พ.ศ. 2544 มีการสำรวจความชุกของ *Acanthamoeba* จากแหล่งน้ำในสิ่งแวดล้อมเป็นร้อยละ 36.7 (Nacapunchai *et al.*, 2001) ในปี พ.ศ. 2547 มีการค้นพบอะมีบาดำรงชีพแบบอิสระในบ่อน้ำพุร้อนเป็นครั้งแรกที่จังหวัดลพบุรี (Sukthana *et al.*, 2004) จึงมีการสำรวจบ่อน้ำพุร้อนเพิ่มเติมในปีถัดมาจำนวน 13 จังหวัดจากภาคกลางและภาคใต้ ได้แก่ สุราษฎร์ธานี พังงา ลพบุรี เพชรบูรณ์ และกำแพงเพชร มีความชุกของ *Acanthamoeba* ร้อยละ 13 (Lekkla *et al.*, 2005)

จากรายงานผู้ป่วยที่มีสาเหตุจาก *Acanthamoeba* ในประเทศไทยพบว่าผู้ป่วยโรคสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน (GAE) ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2530 (Jariya *et al.*, 1992) ต่อมาในช่วงปี พ.ศ. 2533-2535 มีรายงานผู้เสียชีวิตจาก GAE 4 ราย ในปี พ.ศ. 2539 นพ.สามารถ นิธินันท์ ตรวจพบผู้ป่วย GAE จากการพบในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยถึง 3 ราย (Nidhinandana & Leelayoova, 1998) ในปี พ.ศ. 2344 มีรายงานผู้ป่วย GAE 1 ราย จากการตรวจเนื้อเยื่อสมอง (Sithinamsuwan *et al.*, 2001) และในปี พ.ศ. 2548 มีรายงานผู้ป่วยติดเชื้ออะมีบาที่ดำรงชีพแบบอิสระ 2 ชนิดร่วมกันเป็นครั้งแรก คือ *Naegleria* และ *Acanthamoeba* จากตรวจหาเชื้อในโพรงจมูก โดยผู้ป่วยไม่มีอาการทางสมอง (Yaowalark *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานผู้ป่วยจากการติดเชื้อ *Acanthamoeba* ที่ดวงตาครั้งแรกในปี พ.ศ. 2531 เนื่องจากเศษดินกระเด็นเข้าตาขณะทำสวนในเขตชานเมืองกรุงเทพฯ ในปี พ.ศ. 2533 อีก 1 ราย มีสาเหตุจากน้ำกระเด็นเข้าตาซึ่งมีเดมมีบาดแผลอยู่ (Jongwutiwes *et al.*,

2000) และในปี พ.ศ. 2546 จำนวน 1 ราย เกิดจากเศษดินเข้าตา (Sansopha & Tulvatana, 2003)

ในธรรมชาติจึงมี *Acanthamoeba* อยู่ได้ทั่วไปโดยเฉพาะในแหล่งดินและน้ำซึ่งพบได้เป็นปกติและมีสภาพแวดล้อมใกล้ชิดกับคน สามารถติดต่อสู่คนและก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ซึ่งมีอาการและความรุนแรงของโรคแตกต่างกันไป บางชนิดมีความรุนแรงในการก่อโรคสูง บางชนิดก่อโรคได้น้อยหรือไม่ก่อโรค ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าความหลากหลายในระดับโมเลกุลของ *Acanthamoeba* ที่กระจายตัวอยู่ในธรรมชาติจะช่วยให้ทราบถึงลักษณะทางพันธุกรรมที่อาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรค ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์และมีความสำคัญเพื่อทราบถึงโอกาสและความเสี่ยงในการติดต่อสู่คนได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุกรมวิธานของ *Acanthamoeba* spp.

Kingdom Protista

Sub-kingdom Protozoa

Phylum Sarcomastigophora

Sub-phylum Sarcodina

Superclass Rhizopoda

Class Lobose

Subclass Gymnamoebia

Order Amoebida

Family Acanthamoebidae

Genus *Acanthamoeba*

Acanthamoeba มาจากคำว่า acanth ในภาษากรีกแปลว่า หนาม รวมเข้ากับคำว่า amoebae หมายถึง อะมีบาที่มีโครงสร้างคล้ายหนาม Castellani (1930) ได้ค้นพบอะมีบาจากปณเปื้อนในการเพาะเลี้ยง *Cryptococcus pararoseus* โดยอะมีบาดังกล่าวมีรูปร่างกลมรี เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 13.5-22.5 ไมโครเมตร มี pseudopodia หรือเท้าเทียม ระยะเวลาที่มีผนังสองชั้น เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9-12 ไมโครเมตร Douglas (1930) ได้จัดให้อะมีบาชนิดนี้อยู่ใน จินัส *Hartmannella* และตั้งชื่อว่า *Hartmannella castellani* ต่อมา Volkonsky (1931) ได้พิจารณาว่า จินัส *Hartmannella* ไม่ใช่ลักษณะของกลุ่มที่แท้จริงจึงทำการแบ่งจินัสใหม่ออกเป็น 3 จินัส ดังนี้

1. *Hartmannella* ระยะเวลาของอะมีบามีลักษณะกลม ผนังเรียบ
2. *Glaeseria* ระยะเวลาของอะมีบามีการแบ่งนิวเคลียส
3. *Acanthamoeba* ในการแบ่งเซลล์แบบ mitosis มี spindle fiber เป็นขั้วของเซลล์ ระยะเวลาที่มีผนัง 2 ชั้นและมีรูเปิดถึงกัน ผนังชั้นนอกมีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ

ดังนั้นจึงได้มีการจำแนกอะมีบาดังกล่าวจากจินัส *Hartmannella* มาอยู่ในจินัส *Acanthamoeba* และมีชื่อใหม่ว่า *Acanthamoeba castellani* Page (1967) ได้พิจารณาว่า อะมีบาที่ Puschkarew แยกได้จากฝุ่นในปี ค.ศ. 1913 ที่มีชื่อว่า *Amoeba polyphagus* นั้นมีลักษณะที่ตรงกับจินัส *Acanthamoeba* และได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Acanthamoeba polyphaga*

Sawyer และ Griffin (1975) ได้ตั้ง family Acanthamoebidae ขึ้นและ Page (1988) ได้ตั้ง suborder Acanthopodina ภายใต้ order Amoebida

Pussard และ Pons (1977) ได้พิจารณา *Acanthamoeba* ออกเป็น 3 กลุ่มโดยใช้ลักษณะ สัณฐานวิทยาของซิสต์เป็นเกณฑ์ โดยผนังชั้นในของซิสต์จะหดตัวเข้าไปทำให้เห็นเป็นแขนยื่น ออกมาชิดติดกับผนังชั้นนอกตามขนาดและจำนวนแขนภายในซิสต์ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 โทโรฟซอยต์และซิสต์มีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางของซิสต์โดย เฉลี่ยตั้งแต่ 18 ไมโครเมตร ขึ้นไป ผนังชั้นนอกและชั้นในของซิสต์มีระยะห่างออกจากกันมาก ผนังชั้นนอกของซิสต์มีผิวเรียบหรือหยักเป็นรอยย่นเล็กน้อย ผนังชั้นในของซิสต์มีลักษณะเป็นแฉก คล้ายดาว บริเวณที่ผนังชั้นนอกและชั้นในของซิสต์ชิดกันจะเห็นเป็นแขนหรือรัศมี มีฝาปิดอยู่ที่ ระบายเดียวกับผนังชั้นนอกของซิสต์ ดังรูป 1(a) ประกอบด้วย 4 สปีชีส์ ได้แก่ *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* และ *A. tubioshi* ซิสต์ของ *A. astronyxis* มีขนาด 16-28 ไมโครเมตร โดยเฉลี่ย 19.2 ไมโครเมตร มี 5-7 แขน ผนังซิสต์ชั้นในสัมผัสกับผนังซิสต์ชั้นนอกใน ระดับเดียวกัน ซิสต์ของ *A. comandoni* มีขนาด 21-30 ไมโครเมตร โดยเฉลี่ย 25.6 ไมโครเมตร มี 6-10 แขน ผนังซิสต์ชั้นในสัมผัสกับผนังซิสต์ชั้นนอกในหลายในระดับ ซิสต์ของ *A. echinulata* มีขนาด 18.4-29.9 ไมโครเมตร โดยเฉลี่ย 25 ไมโครเมตร มี 12-14 แขน ผนังซิสต์ชั้นในสัมผัสกับ ผนังซิสต์ชั้นนอกในหลายในระดับ และซิสต์ของ *A. tubioshi* มีเส้นผ่านศูนย์กลางซิสต์มากกว่า ตั้งแต่ 22.6 ไมโครเมตรขึ้นไป

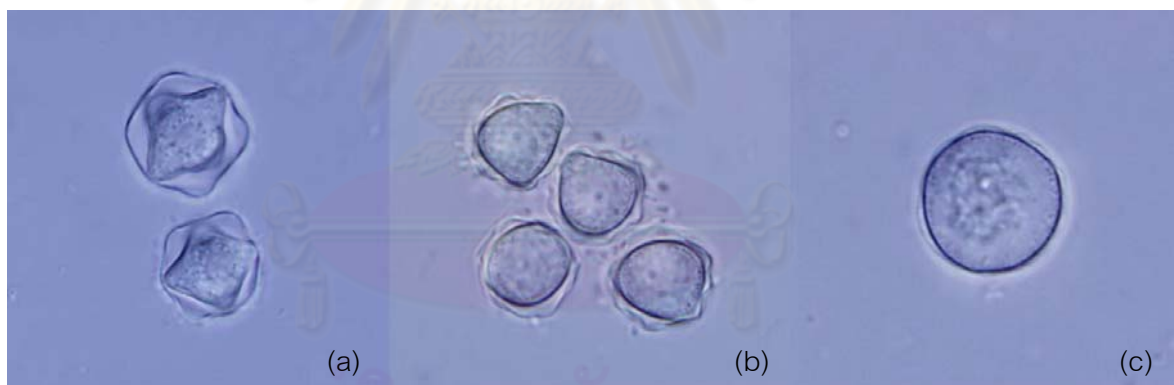
กลุ่มที่ 2 ซิสต์มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 18 ไมโครเมตร เป็นกลุ่มที่พบได้ มากที่สุดและแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ผนังชั้นนอกและผนังชั้นในอาจอยู่ชิดหรือห่างกัน ผนังชั้นนอกอาจหนาหรือบาง ผนังชั้นในมีทั้งรูปร่างหลายแบบ ทั้งสามเหลี่ยม หลายเหลี่ยม เป็น แฉก รูปร่างกลมหรือรูปไข่ มักจะเห็นแขนหรือแฉกไม่ชัดเจน ดังรูป 1(b) ฝาปิดที่รูเปิดด้านนอกเกิด จากการพับตัวของผนังชั้นนอกของซิสต์ ประกอบด้วย 11 สปีชีส์ ได้แก่ *A. mauritaniensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhyssodes*, *A. paradivionensis* และ *A. hatchetti*

กลุ่มที่ 3 ซิสต์มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 18 ไมโครเมตร ผนังชั้นนอกเรียบ และบางหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ผนังชั้นในมักกลมอาจเห็นเป็นมุม 3-5 มุม ดังรูป 1(c) ได้แก่ *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* และ *A. pustulosa* (Visvesvara, 1991; Khan, 2006)

จากลักษณะรูปร่างต่าง ๆ ของซิสต์เพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถแยกแยะระหว่างซิสต์ใน กลุ่มที่ 2 และ 3 ได้ (Visvesvara, 1991) เนื่องจากขนาดของซิสต์ในสภาวะการเพาะเลี้ยงนั้นมี ขนาดไม่แน่นอน (Stratford & Griffiths, 1978) จึงได้มีความพยายามที่จะจัดความสัมพันธ์ภายใน

จีโนมให้เป็นหมวดหมู่ โดยใช้วิธีการทางโมเลกุลมาเป็นเกณฑ์เพื่อพิจารณาเกี่ยวกับลักษณะของกลุ่มซิสต์ที่ Pussard และ Pons (1977) ได้แบ่งไว้ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสใน 18S rRNA gene, mitochondrial 16S rRNA gene, mitochondrial genome หรือ whole-cell DNA ด้วยเทคนิค PCR ต่าง ๆ เช่น standard PCR, real-time PCR, RAPD-PCR และ RFLP-PCR เป็นต้น (Schroeder *et al.*, 2001; Riviere *et al.*, 2006)

ปัจจุบันทางสมาคมนักโปรโตซัวระหว่างประเทศได้ยกเลิกการจัดหมวดหมู่ในระบบเดิมที่แบ่งเป็น “kingdom”, “phylum”, “class”, “sub-class”, “super-order” และ “order” โดยแทนที่ด้วยระบบใหม่ซึ่งมีความใกล้เคียงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา กระบวนการทางชีวเคมี และวิวัฒนาการทางโมเลกุลมากขึ้น ในการจัดรูปแบบใหม่ได้แบ่งยูคาริโอตออกเป็น 6 กลุ่ม (super groups) ได้แก่ Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata และ Excavata ด้วยระบบใหม่นี้ *Acanthamoeba* ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Amoebozoa (family Acanthamoebidae) (Adl *et al.*, 2005)

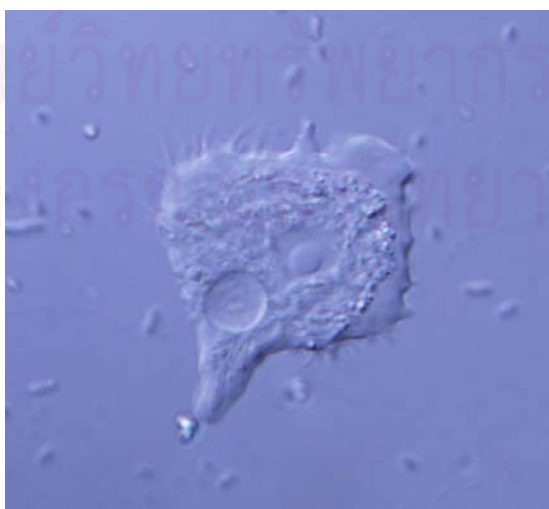


รูปที่ 1. ลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3
(a) ซิสต์กลุ่มที่ 1, (b) ซิสต์ในกลุ่มที่ 2 และ (c) ซิสต์ในกลุ่มที่ 3

วงจรชีวิตและการเจริญเติบโตของ *Acanthamoeba*

วงจรชีวิตของ *Acanthamoeba* ประกอบด้วย 2 ระยะคือ ระยะโทรโฟซอยต์และระยะซิสต์ ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 สามารถเข้าสู่ร่างกายผ่านทางผิวหนังที่เป็นแผล ตาและระบบทางเดินหายใจ ดังแสดงในรูปที่ 4 ปัจจุบันมีมากกว่า 24 สปีชีส์ *Acanthamoeba* ที่ก่อโรค ได้แก่ *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. astronyxis* และ *A. Divionensis* (Visvesvara et al., 2007)

ระยะโทรโฟซอยต์มีขนาด 15-50 ไมโครเมตร ภายในเซลล์ประกอบด้วยนิวเคลียส 1 อัน เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน มีปริมาณดีเอ็นเอร้อยละ 80 ถึง 85 ของดีเอ็นเอทั้งหมด มีไมโทคอนเดรียจำนวนมากไว้สร้างพลังงานสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึม รวมถึงการกินอาหาร การเคลื่อนที่ การสืบพันธุ์และหน้าที่อื่น ๆ ภายในเซลล์ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมที่มีไรโบโซมมาเกาะมีหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีน คอนแทรคไทล์แควคิวโอลควบคุมปริมาณน้ำและขับออกจากเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์มี lipophosphoglycan เป็นส่วนประกอบและมีโมเลกุลของน้ำตาลอยู่ทั้งสองฝั่ง ที่บริเวณผิวมีโครงสร้างคล้ายหนามและมีลักษณะใสยื่นออกมา เรียกว่า acanthopodia เกิดจากการหดตัวของไซโตพลาสซึม ใช้ในการยึดเกาะพื้นผิว การเคลื่อนที่และการจับเหยื่อ กินแบคทีเรีย สาหร่ายและยีสต์เป็นอาหาร ด้วยการกินแบบ phagocytosis หรือสร้าง food cup ซึ่งเป็นโครงสร้างชั่วคราวเพื่อนำอาหารเข้าไป มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแบ่งตัวแบบ binary fission ซึ่งใช้เวลาต่างกันในแต่ละชนิดและจีโนไทป์ ตั้งแต่ 8-24 ชั่วโมง เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมแก่การดำรงชีพ โทรโฟซอยต์จะมีกิจกรรมทางเซลล์ลดลง จะขับอาหาร น้ำและของเสียต่างๆ ออกมา แล้วหดตัวแน่นสร้างผนังขึ้นมาล้อมรอบตัวเอง 2 ชั้น มีรูปร่างกลม (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Khan, 2006; Visvesvara et al., 2007)



รูปที่ 2. *Acanthamoeba* ในระยะโทรโฟซอยต์

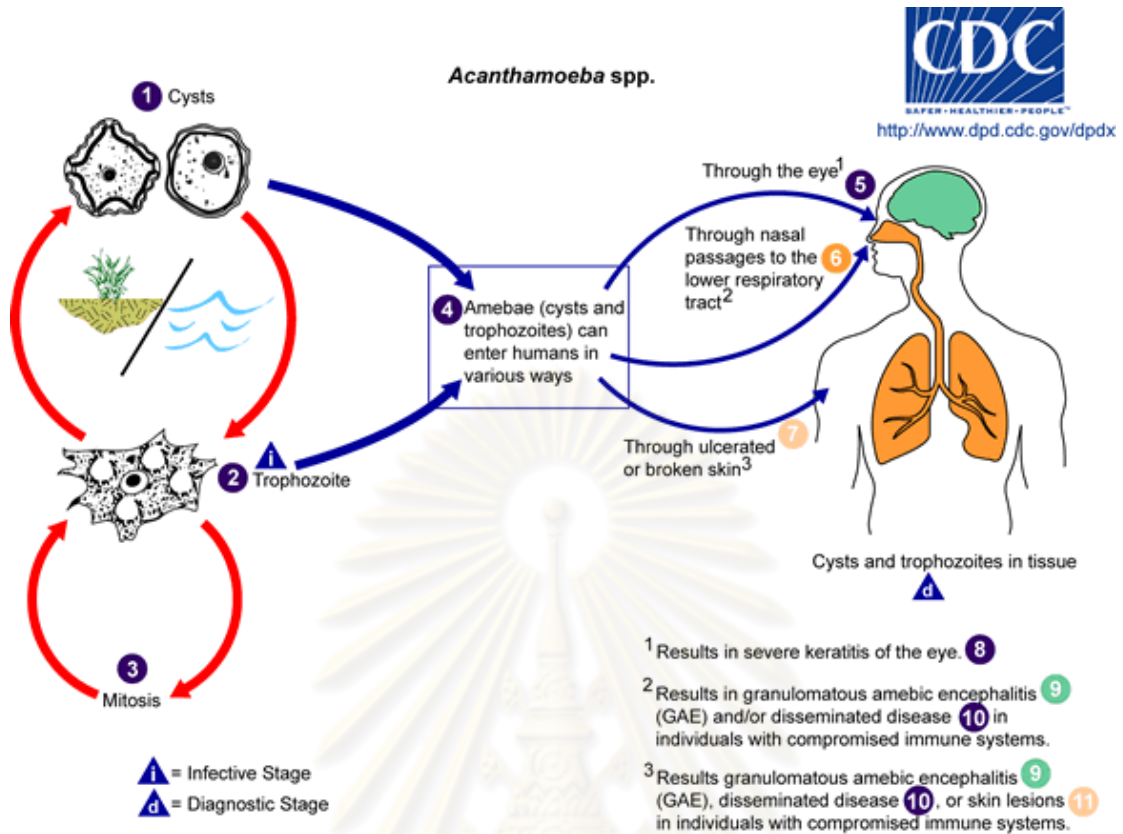
ระยะซิสต์มีขนาด 10-25 ไมโครเมตร มีผนัง 2 ชั้น ผนังชั้นนอก เรียกว่า ectocyst มีลักษณะเรียบหรือหยักเป็นคลื่นพับไปมา มีโปรตีนและไขมันเป็นองค์ประกอบ ผนังชั้นในเรียกว่า endocyst ประกอบด้วยเซลลูโลสซึ่งไม่พบในระยะโทรโฟซอยต์ ผนังชั้นในมีรูปร่างหลายแบบไม่แน่นอนตั้งแต่กลม รี หรือหลายเหลี่ยม ผนังซิสต์อาจอยู่ชิดหรือห่างออกจากกัน บริเวณที่สัมผัสกัน จะมีรูขนาดเล็กไว้ติดต่อกับสิ่งแวดล้อมภายนอก เรียกว่า ostiole เกิดจากผนังชั้นนอกเว้าเข้ามาและผนังชั้นในยื่นออกไปบรรจบกัน เป็นช่องสำหรับให้อะมีบาออกมาเจริญเป็นโทรโฟซอยต์ได้ใหม่ มีจำนวนแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ ระยะที่เพิ่งเข้าซิสต์จะยังคงเห็นคอนแทรคไทล์แควิโอล ซิสต์มีความทนทานต่อสภาพที่แห้งแล้ง ขาดแคลนอาหาร อุณหภูมิและช่วง pH ที่กว้าง ต้านทานต่อยาฆ่าเชื้อโรค น้ำยาคลอรีน และยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังทนต่อรังสี เช่น แกมมา (250 Krads) และยูวี (800 mJ/cm²) แต่สามารถถูกทำลายได้ด้วยคลื่นไมโครเวฟและการ autoclave (Ma *et al.*, 1990; Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Khan, 2006; Ibrahim *et al.*, 2007; Visvesvara *et al.*, 2007) ระยะซิสต์สามารถแพร่กระจายไปในสิ่งแวดล้อมได้ทางอากาศ ฤดูกาลที่มีฝุ่น โดยเฉพาะในฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วง จะช่วยทำให้เกิดการแพร่กระจายของซิสต์ไปในสิ่งแวดล้อม (Miyazaki *et al.*, 2007; Niyati *et al.*, 2009) ซิสต์สามารถอยู่รอดได้จากการเก็บรักษาไว้ในน้ำที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2 ปี ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานถึง 24 ปีและยังคงความสามารถในการก่อโรคได้ (Biddick *et al.*, 1984; Mazur *et al.*, 1995)



รูปที่ 3. *Acanthamoeba* ในระยะซิสต์

Acanthamoeba สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งสภาพที่เป็นกรดและเบส มีค่า pH ในช่วง 4-12 แต่การก่อโรคนั้นต้องอาศัยจังหวะและช่วงเวลาที่เหมาะสม (Khan, 2003) โดยสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้จะปรากฏ acanthopodia จำนวนมากและมีการสร้าง food cup มากขึ้น (Khan, 2001) อาศัยอยู่ได้ในดินและน้ำซึ่งมีแบคทีเรียเป็นอาหาร แหล่งน้ำที่มีอุณหภูมิอุ่นอาจช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ทนความร้อนได้ (Schuster & Visvesvara, 2004a) สามารถพบได้ทั้งบริเวณผิวน้ำ (Preston *et al.*, 2001) และตะกอนก้นแม่น้ำ (Lewis & Sawyer, 1979) โดยแบคทีเรียในแหล่งน้ำจะช่วยเพิ่มปริมาณอะมีบา (Tsvetkova *et al.*, 2004) โดยเฉพาะแหล่งน้ำที่มีแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Ettinger *et al.*, 2003)

ในธรรมชาติ *Acanthamoeba* ยังเป็นโฮสต์ให้แบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เช่น *Legionella pneumophila* ทำให้เกิดโรคลีเจียนแนร์ (Legionnaire's disease) (Rowbotham, 1980) *Escherichia coli* O157 ทำให้ท้องเสีย (Barker *et al.*, 1999) *Coxiella burnetti* ทำให้เป็น Q fever (La Scola & Raoult, 2001) *Pseudomonas aeruginosa* ทำให้กระจกตาติดเชื้อ (Micheal *et al.*, 1995) *Vibrio cholerae* ทำให้เป็นอหิวาต์ (Thom *et al.*, 1992) *Helicobacter pylori* ทำให้เป็นโรคกระเพาะ (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002) *Simkania negevensis* ทำให้เป็นปอดบวม (Kahane *et al.*, 2001) *Listeria monocytogenes* ทำให้เกิดโรคคลิสต์โรโอซิส (Ly & Muller, 1990) และ *Mycobacterium avium* ทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ (Krishna-Prasad & Gupta, 1978; Steinert *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่ามิไวรัสซึ่งมีขนาดใหญ่ (mimivirus) ถึง 1.2 Mb อาศัยอยู่ใน *Acanthamoeba polyphaga* มีชื่อว่า *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) (Raoult *et al.*, 2004)



รูปที่ 4. วงจรชีวิตของ *Acanthamoeba*

ที่มา <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/FreeLivingAmebic.htm>

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Granulomatous Amebic Encephalitis, GAE

โรคสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน (granulomatous amebic encephalitis, GAE) เกิดจากเชื้อปรสิตก่อโรค 2 ชนิด คือ *Acanthamoeba* spp. และ *Balamuthia mandrillaris* เข้าสู่ร่างกายโดยการหายใจผ่านเข้าทางโพรงจมูก ไปยังระบบประสาทส่วนกลางและสมองด้วยกระแสเลือดที่มาจากปอดหรือบาดแผลบนผิวหนัง นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายของอะมีบาที่อวัยวะอื่น ๆ ได้แก่ ตับ ตับอ่อน ไต ต่อมหมวกไต ต่อมลูกหมาก ต่อมน้ำเหลือง ไช้กระดูกและชั้นกล้ามเนื้อเรียบในผนังมดลูก

อาการของโรคในระยะเริ่มต้นเป็นไปอย่างเชื่องช้าและเริ่มรุนแรงจนเกิดอาการเรื้อรังเป็นเวลานานหลายอาทิตย์หรือหลายเดือน แต่ใน *B. mandrillaris* มีระยะการก่อโรคที่นานกว่าจนถึงประมาณ 2 ปี มีอาการคล้ายกับเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากไวรัส แบคทีเรียหรือวัณโรค ผู้ป่วยมีอาการทางจิตและพฤติกรรมเปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ อาการสับสนมึนงง หงุดหงิด ฉุนเฉียว เชื่องซึม ง่วงนอน และประสาทหลอน ปวดศีรษะ มีไข้ต่ำ คลื่นไส้อาเจียน เบื่ออาหาร ความดันภายในกะโหลกศีรษะเพิ่มขึ้น อัมพาตครึ่งซีก พูดไม่ได้ เกิดภาพหลอนและเบลอ ลูกตาบวม ชัก ไม่รู้สึกตัวและเสียชีวิตด้วยภาวะสมองอักเสบ

สมองมีลักษณะบวมและอ่อนนุ่ม บริเวณเยื่อหุ้มสมองอาจมีหนองไหล มีเซลล์ตายและเลือดออกหลายแห่ง พบรอยแผลได้ในบริเวณ midbrain, thalamas, brainstem, corpus callosum, cerebellum และคอในบริเวณไขสันหลัง มักแพร่ไปยัง olfactory bud และส่วนฐานของ frontal lobe ภายในเนื้อเยื่อพบอะมีบาได้ทั้งระยะโทรโฟซอยต์และซิสต์ อาจพบ multinucleated giant cell ที่มากินอะมีบา และพบอะมีบาจำนวนมากในบริเวณช่องว่างรอบหลอดเลือดที่มีการอักเสบในเนื้อเยื่อบริเวณนั้น ๆ หรือฝังอยู่ในผนังหลอดเลือด บางครั้งพบกลุ่มของโทรโฟซอยต์โดยไม่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อ (Martinez, 1991; Khan, 2005b; Khan, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007)

การวินิจฉัยสามารถนำน้ำไขสันหลังมาตรวจสอบโดยปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบต่ำ 250 x g เป็นเวลา 10 นาที แต่ไม่อาจพบเชื้อได้เสมอไป การย้อมด้วยสี Giemza-Wright โทรโฟซอยต์และซิสต์ที่ติดสีม่วงช่วยแยกแยะความแตกต่างระหว่าง lymphocyte erythrocyte และ polymorphology leukocyte ได้ (Martinez, 1991) ในน้ำไขสันหลังจะมีจำนวนเม็ดเลือดขาวมากกว่าปกติ (pleocytosis) ส่วนมากเป็น lymphocyte และมีจำนวน polymorphology leukocyte เพิ่มขึ้น มีระดับโปรตีนมากขึ้นแต่น้ำตาลลดลง (Marciano-Cabral & Cabral, 2003) การไม่ปรากฏไวรัสและแบคทีเรียช่วยยืนยันการติดเชื้อจากอะมีบาได้ (Khan, 2005b) *Balamuthia* มีการเคลื่อนไหวที่เชื่องช้า pseudopodia แผ่กว้าง มีนิวเคลียสได้ถึง 3 อัน ขณะที่ *Acanthamoeba* มีนิวเคลียส 1 อัน ซิสต์ของ *Balamuthia* มีผนัง 3 ชั้น ผนังชั้นในหนาผนังชั้นนอกบางและไม่เรียบ

ไม่เจริญเติบโตในเพลทวุ้นที่ปราศจากสารอาหารร่วมกับแบคทีเรีย มีเพียง *Acanthamoeba* เท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ (Visvesvara *et al.*, 1993; Martinez *et al.*, 2000)

Acanthamoeba ที่ฝังอยู่ในเนื้อเยื่อเมื่อย้อมด้วยสี Periodic acid-Schiff (PAS) จะเห็นผนังซิสต์ติดสีแดง สี Gomori methenamine silver ผนังซิสต์ติดสีดำ สี Wheatley Trichrome ผนังซิสต์ติดสีเขียว ไฮโดรฟลาสซิมติดสีม่วงปนเขียวและคาร์โบโซมติดสีแดง (Ma *et al.*, 1990) บางครั้งการย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin ไม่สามารถแยกอะมีบาทั้งสองออกจากกันได้ วิธีที่ใช้วินิจฉัยเพิ่มเติมในปัจจุบันได้แก่ การย้อมด้วย indirect immunofluorescent (IIF) และการทำ PCR ในยีน mitochondrial 16S rRNA (Laube & Kiderien, 2004; Tavare *et al.*, 2006)

ในคนปกติทั่วไปจะมีแอนติบอดีซึ่งสามารถต่อต้าน *Acanthamoeba* ได้ (Cursons *et al.*, 1980) โดยทำงานร่วมกับ neutrophil และ macrophage ในการกำจัดอะมีบาเพื่อยับยั้งการติดต่อกับ alternative complement pathway (Khan, 2006) มักพบโรคสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลันในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ที่มีอาการป่วยเรื้อรังและร่างกายอ่อนแอ เช่น เอ็ดส์ เบาทหวาน ปอดอักเสบ ไตวาย ตับแข็ง พิษสุราเรื้อรัง เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ระบบน้ำเหลืองผิดปกติ ระบบเลือดล้มเหลว โรค gammaglobulinemia โรคภูมิแพ้ตัวเอง (systemic lupus erythematosus, SLE) ภาวะพร่อง glucose-6-phosphate วัณโรค มะเร็ง หญิงตั้งครรภ์ รวมทั้งผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันเนื่องจากการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ที่ได้รับการฉายรังสี การใช้ยาสเตียรอยด์หรือมีกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อน (Khan, 2005b; Khan, 2006) ในขณะที่ *B. mandrillaris* พบทั้งในคนปกติและผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Matin *et al.*, 2008)

การรักษาเกิดจากการใช้ยาหลายตัวร่วมกันแต่ยาที่มีประสิทธิภาพในการทดลองไม่สามารถยืนยันได้ว่าจะให้ผลในการรักษาได้เสมอไป ยาตัวเดียวกันอาจรักษาผู้ป่วยได้รายหนึ่งแต่อาจรักษาไม่ได้ในอีกรายและโอกาสที่จะรักษาให้หายนั้นมีน้อยมาก (Schuster & Visvesvara, 2004a) ยาที่ใช้ในการรักษา เช่น ketoconazole, fluconazole, sulfadiazine, pentamidine, selenite, 5-fluorocytosine (flucytosine), amphotericin B, trifluoroperazine หรือ thioridazine, clarithromycin, azithromycin, itraconazole หรือ rifampin แต่ตัวยาค่อนข้างมีผลข้างเคียง (Khan, 2005b)

Acanthamoeba ที่ทำให้เกิดโรคสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน ได้แก่ *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* และ *A. divionensis* นอกจากนี้ยังสามารถก่อโรคได้ในระบบประสาทส่วนกลางของสัตว์ เช่น กอริลลา ลิงหางยาว สุนัข แกะ วัว ม้า จิงโจ้ และยังพบได้ในนก สัตว์เลี้ยงคละน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ปลา หรือแม้กระทั่งสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Visvesvara *et al.*, 2007)

Acanthamoeba keratitis, AK

Acanthamoeba สามารถก่อโรคที่กระจกตาได้ เรียกว่า *Acanthamoeba keratitis* หรือ AK ทำให้กระจกต้อกเสบ เกิดขึ้นได้กับคนทั่วไปในผู้ที่ใส่คอนแทคเลนส์และกระจกตามีบาดแผล มักเกิดกับตาเพียงข้างเดียวแต่สามารถเกิด keratitis ทั้งสองข้างได้ (bilateral keratitis) และไม่สามารถนำไปสู่การติดเชื้อที่สมองได้แม้จะมีอาการม่านต้อกเสบในผู้ป่วยสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน (Visvesvara *et al.*, 2007) อาการที่พบ ได้แก่ น้ำตาไหล ตาบวมแดงและอักเสบ แพ้แสง อาจมีการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมในภายหลัง ส่วนมากได้รับการวินิจฉัยผิดว่าเกิดจาก Herpes simplex virus (Khan, 2006) สามารถตรวจสอบผลด้วยการขูดกระจกตา คอนแทคเลนส์และน้ำยาเช็ดในตลับคอนแทคเลนส์มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและการทดสอบด้วยเทคนิค PCR (De Jonckere, 2003)

บนผิวของโทรโฟซอइटมี mannose binding protein (MBP) โดยจะไปยึดเกาะกับ mannosylated glycoproteins ที่อยู่บนรอยแผลของกระจกตาและปล่อยเอนไซม์มาย่อยเซลล์เยื่อบุผิวทำให้เกิดรอยแยกในชั้น Bowman's membrane ทะลุมายังชั้น collagen stroma แล้วรวมตัวกันที่บริเวณเส้นประสาททำให้เกิดเป็นรอยคล้ายวงแหวน (ring stromal infiltration) ดังแสดงในรูปที่ 5 ทำให้เกิดการอักเสบและปวดตาอย่างรุนแรง การทะลุมาจนสุดชั้น corneal endothelium นั้นพบได้น้อยมาก (Clarke & Niederkorn, 2006) ซีสต์จะไม่ยึดเกาะกับผิวกระจกตา ดังนั้นซีสต์จึงไม่ใช่ระยะติดต่อกัน (Dudley *et al.*, 2005) จุลชีพอื่น ๆ ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดกระจกต้อกเสบ ได้แก่ *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* (Giese & Weissman, 2002)



รูปที่ 5. ring stromal infiltration

ที่มา <http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/acanthamoeba/index.htm>

Acanthamoeba keratitis มีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1974 ที่ประเทศอังกฤษและปี ค.ศ. 1975 ที่สหรัฐอเมริกาตามลำดับ (Nagington *et al.*, 1974; Jones *et al.*, 1975) ซึ่งต่อมามีจำนวน การเกิดโรคเพิ่มขึ้นตามอัตราการใส่คอนแทคเลนส์ที่เพิ่มขึ้นและมากกว่าร้อยละ 85 พบในผู้ที่ใส่ คอนแทคเลนส์ซึ่งส่วนมากขาดการดูแลรักษาที่เหมาะสม (Nieder Korn, 1999) ปัจจัยเสี่ยงในการ เกิดโรค ได้แก่ การว่ายน้ำและล้างหน้าขณะใส่คอนแทคเลนส์ การใช้มือสกปรกใส่คอนแทคเลนส์ น้ำ ดินหรือฝุ่นกระเด็นเข้าตาที่มีบาดแผล การใช้น้ำประปา น้ำเกลือหรือน้ำยาฆ่าเชื้อที่ไม่มี ประสิทธิภาพในการล้างและแช่คอนแทคเลนส์ นอกจากนี้ในตลับคอนแทคเลนส์ที่สกปรกจะพบ biofilm ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียอยู่บนผิวน้ำจะเป็นแหล่งอาหารให้แก่ *Acanthamoeba* (Khan, 2006) รวมทั้งเหตุการณ์น้ำท่วมในฤดูร้อน โดยจะพบผู้ป่วย *keratitis* เป็นจำนวนมากในช่วงฤดูร้อน และต้นฤดูใบไม้ผลิ (Lane *et al.*, 1997)

อัตราการเกิด *Acanthamoeba keratitis* หรือ AK ในประเทศต่าง ๆ เช่น สหรัฐอเมริกาอยู่ที่ 1.36 คนต่อผู้ใส่คอนแทคเลนส์หนึ่งล้านคน (Stehr-Green *et al.*, 1989) สกอตแลนด์มีอัตราการ เกิดโรค 149 คนต่อผู้ใส่คอนแทคเลนส์หนึ่งล้านคน (Seal *et al.*, 1999) และฮ่องกงมีอัตราการเกิด โรค 33 คนต่อผู้ใส่คอนแทคเลนส์หนึ่งล้านคน (Lam *et al.*, 2002) ทั้งหมดเป็นเลนส์ชนิดนิ่ม (soft contact lens) ในอังกฤษมีผู้ที่เป็น *keratitis* ใช้เลนส์ชนิดนิ่มร้อยละ 88 และเลนส์ชนิดแข็ง (hard contact lens) ร้อยละ 12 (Radford *et al.*, 2002) ในญี่ปุ่นร้อยละ 89.7 ของผู้ใส่คอนแทคเลนส์ เป็นเลนส์ชนิดนิ่มร้อยละ 82.1 และเลนส์ชนิดแข็งร้อยละ 7.7 (Tachikawa *et al.*, 1995) ซึ่ง โทรโฟซอยต์สามารถยึดเกาะกับคอนแทคเลนส์ชนิดนิ่มที่เป็น silicone hydrogel ได้ดีกว่าเลนส์ชนิด แข็ง อาจเนื่องมาจากลักษณะโครงสร้างทางโพลีเมอร์หรือพื้นผิวของเลนส์ (Beattie *et al.*, 2003) คอนแทคเลนส์จะไปปิดกั้นการแลกเปลี่ยนออกซิเจนในอากาศทำให้ชั้นน้ำตาบางลงจึงไม่สามารถ ดำเนินการบูรณะของเชื้อโรคได้ (Khan, 2005a)

นอกจากนี้ในผู้ที่รักษาสายตาสั้นด้วยการใส่คอนแทคเลนส์แบบ Orthokeratology ซึ่งเป็น เลนส์ชนิดที่ค่อนข้างแข็ง โดยจะไปปรับเปลี่ยนความโค้งของกระจกตาให้แบนราบในเวลากลางคืน ขณะนอนหลับ การหลับตาจะทำให้เกิดภาวะพร่องออกซิเจน กระจกตาบวมและเป็นรอยได้จึงเป็น การเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อและเป็น *Acanthamoeba keratitis* (Himano & Kaufman, 1997; Hutchinson & Andrew, 2002)

การรักษา *Acanthamoeba keratitis* สามารถทำได้ในระยะโทรโฟซอยต์เนื่องจาก ถูกทำลายได้ด้วยยาต้านจุลชีพ โดยใช้ตัวยาร่วมกันหลายชนิด ได้แก่ chlorhexidine, polyhexamethylene biguanide (PHMB), propamidine isethionate, dibromopropamidine isethionate, neomycin, paromycin, polymyxin B, clotrimazole, ketoconazole, micronazole และ itraconazole เป็นต้น (Schuster & Visvesvara, 2004b) มีลักษณะการรักษา เช่น ให้ยา

0.02% polyhexamethylene biguanide (PHMB), 0.02% chlorhexidine digluconate (CHX) ร่วมกับสารประกอบ diamidine เช่น 0.01% propamidine (Brolene) หรือ 0.01% hexamidine (Desomedine) และให้ยา necomycin หรือ chloramphenicol เพื่อกำจัดแบคทีเรียโดยให้ยาเฉพาะที่ทุก ๆ ชั่วโมงตลอด 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 2-3 วัน และให้ยาทุกชั่วโมงในระหว่างวันเป็นเวลา 3-4 วัน แล้วลดเหลือเป็นทุก 2 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลาหลายเดือน จากนั้นให้ยา 6 ครั้งต่อวันเป็นเวลาหลายเดือนจนครบปีและอาจให้ยาสเตอรอยด์ 0.01% dexamethasone เพื่อบรรเทาอาการอักเสบ (Khan, 2006) แต่ซิสต์ที่ฝังตัวอยู่เมื่อเปลี่ยนเป็นโทรโฟซอยต์จะทำให้เกิดการติดต่อซ้ำได้ซึ่งจะทำให้เกิดการดื้อยาและประสิทธิภาพของยาลดลง ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษา ได้แก่ chlorhexidine gluconate, PHMB และ Brolene[®] ซึ่งประกอบด้วย propamidine isethionate และ dibromopropamidine isethionate (Visvesvara *et al.*, 2007) โดย PHMB ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 สามารถฆ่าอะมีบาได้ทั้งระยะซิสต์และโทรโฟซอยต์ โดยไม่เป็นพิษต่อร่างกายในขณะที่ propamidine isethionate เป็นพิษต่อร่างกายได้ (Illingworth & Cook, 1998) ในรายที่ต้องทำศัลยกรรมกระจกตานั้นต้องทำการรักษาด้วยยากำจัดเชื้ออะมีบาก่อนอย่างน้อย 6 เดือน (Azua-Blanco *et al.*, 1998)

Acanthamoeba ที่สามารถก่อโรคกระจกต้ออักเสบ ได้แก่ *A. castellani*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. rhyodes*, *A. lungdunesis*, *A. quina*, *A. griffini* (Niederkm, 1999), *A. griffini* (Ledee *et al.*, 1996) และ *A. triangularis* (Jongwutiwes *et al.*, 2000)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเพาะเลี้ยง (Cultivation)

การเพาะเลี้ยง *Acanthamoeba* ในห้องปฏิบัติการสามารถทำได้โดยการเลี้ยงในเพลทวุ้นที่ปราศจากสารอาหาร (non-nutrient agar plate) ร่วมกับแบคทีเรียแกรมลบ เป็นการเลี้ยงแบบ nonaxenic culture ได้แก่ *Escherichia coli* หรือ *Enterobacter aerogenes* (เดิมชื่อ *Klebsiella aerogenes*) เป็นอาหารให้แก่อะมีบา มีการแพร่พันธุ์และเพิ่มจำนวน สามารถเจริญเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) (Schuster & Visvesvara, 1998) เมื่อแบคทีเรียถูกกินจนหมดอะมีบาจะเข้าซิสต์ (encyst) (Visvesvara *et al.*, 2007) และออกจากซิสต์ (excyst) เมื่อมีอาหารอีกครั้งภายใน 2-3 วัน (Ma *et al.*, 1990)

Acanthamoeba สามารถเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงโดยปราศจากแบคทีเรีย เรียกว่า axenic culture โดยนำอะมีบาในระยะโทรโฟซอยต์จากเพลทวุ้นมาปั่นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือเพื่อกำจัดแบคทีเรีย นำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว (PYG medium) ซึ่งมี proteose peptone, yeast extract และ glucose เป็นส่วนประกอบและให้ยาปฏิชีวนะเพื่อฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียที่เหลืออยู่ ได้แก่ penicillin ร่วมกับ streptomycin หรือให้ gentamicin เพียงอย่างเดียว (Visvesvara *et al.*, 2007) บางสายพันธุ์ไม่สามารถเลี้ยงในอาหารเหลวหรือเจริญเติบโตได้ยากโดยเฉพาะอะมีบาที่มีลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 1 (Ubelaker, 1991) อาหารเลี้ยงเชื้ออื่น ๆ ได้แก่ Oxoid medium (Cline medium) ที่มีซีรัมและฮีมินเป็นส่วนประกอบด้วยซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง *Naegleria* (Marciano-Cabral, 1988) หรือเลี้ยงร่วมกับเซลล์ชนิดต่าง ๆ เช่น African green monkey kidney (Vero), human embryonic kidney (HEK), HeLa, B103 rat neuroblastoma, และ L929 fibroblasts เป็นต้น (Cursons & Brown, 1978; De Jonckheere, 1980; Pettit *et al.*, 1996)

อนุชีววิทยาของ *Acanthamoeba*

การจัดลำดับความสัมพันธ์ภายในจีนัส *Acanthamoeba* จากลักษณะสัณฐานวิทยาของ ซิสต์ Pussard และ Pons (1977) ได้พิจารณา *Acanthamoeba* จำนวน 18 สปีชีส์แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม แต่ลักษณะดังกล่าวในสภาวะการเพาะเลี้ยงมีความไม่แน่นอนซึ่งประจุไฟฟ้าในอาหารเหลว ทำให้รูปร่างของผนังซิสต์เปลี่ยนแปลงไป (Sawyer & Griffin, 1975) เมื่อ Costal และ Griffiths (1984) ได้พิจารณาลักษณะ isoenzyme ของ *A. echinulata* และ *A. comandoni* ที่มีลักษณะของซิสต์อยู่ในกลุ่มที่ 1 พบว่ามีความคล้ายกันมากและสอดคล้องกับการศึกษาของ De Jonckheere (1987) ว่า isoenzyme ของ *A. echinulata* มีความใกล้เคียงกับ *A. comandoni* และจากลักษณะ isoenzyme ของซิสต์ในกลุ่มที่ 2 พบว่า *A. paradivionensis* และ *A. divionensis* มีความใกล้เคียงกัน แต่มีความแตกต่างกันภายในสายพันธุ์ในกลุ่มของ *A. castellanii* อย่างไรก็ตาม isoenzyme ของ *A. mauritaniensis* กลับมีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ของ *Acanthamoeba* ในกลุ่มของ *A. castellanii* ขณะที่ isoenzyme ของ *A. divionensis* และ *A. quina* กลับแตกต่างออกไป นอกจากนี้ในกลุ่มของสายพันธุ์ใน *A. triangularis* ซึ่งมีลักษณะที่ไม่ก่อโรคและไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนั้นมีลักษณะ isoenzyme แตกต่างไปจาก *A. hatchetti* ซึ่งสามารถก่อโรคได้ในหนู mice และเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง แต่มีบางสายพันธุ์ของ *A. triangularis* สามารถก่อโรคได้ปานกลางและเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงนั้นมีลักษณะ isoenzyme คล้ายกับ *A. hatchetti*

Moura, Wallace และ Visvesvara (1982) ได้พบความลงตัวของระหว่างลักษณะ isoenzyme และกลุ่มของซิสต์ แต่ครอบคลุมเพียง isolated ของ *A. castellanii* Castellani ที่มีลักษณะของซิสต์ในกลุ่มที่ 2 เพียง isolated เดียว และจากลักษณะของซิสต์ในกลุ่มที่ 3 ขณะที่ Daggett, Sawyer และ Nerad (1982) พบว่า *A. culbertsoni* มีลักษณะ isoenzyme ที่แตกต่างไปจากสปีชีส์ที่เหลือ ซึ่ง De Jonckheere (1987) เห็นว่า *A. pustulosa* และ *A. palestinensis* มีลักษณะ isoenzyme ที่คล้ายกันแต่ Costal และ Griffiths (1984) พบว่า acid phosphatases และ esterase isoenzyme ของ 2 สปีชีส์นี้แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง ซิสต์แต่ละกลุ่มจึงมีลักษณะ isoenzyme ที่แตกต่างกันไปแม้จะเป็นซิสต์ภายในกลุ่มเดียวกันก็ตาม ดังนั้นลักษณะของ isoenzyme จึงไม่มีความลงตัวและไม่สามารถนำมารวมกับการแบ่งลักษณะของกลุ่มซิสต์ได้ (Visvesvara, 1991) การศึกษาลำดับเบสใน mitochondrial DNA เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับเบส สามารถใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์และสายพันธุ์ที่แบ่งโดยลักษณะรูปร่างของซิสต์ได้ดีแต่วิธี RFLP และ Isoenzyme มีข้อจำกัดเนื่องจากต้องใช้โทรฟิซอइटจากการเลี้ยงแบบ axenic ที่ปราศจากแบคทีเรียซึ่งบางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้และเป็นวิธีที่มีความยุ่งยาก

จึงได้มีการศึกษาใน mitochondrial 16S rRNA gene และ nuclear small-subunit rRNA gene (*RNS*) หรือ 18S rRNA gene ด้วยวิธี polymerase chain reaction หรือ PCR สามารถใช้ โพรบไพรเมอร์ที่เจริญเติบโตในเพลทเลี้ยงเชื้อได้ (De Jonckheere & Weekers, 1997; Kilvington *et al.*, 2004) โดย Vodkin และคณะ (1992) ได้ออกแบบไพรเมอร์ ACARNA1383 for และ ACARNA1655rev ที่จำเพาะต่อยีน 18S rRNA ของ *Acanthamoeba* ขยายลำดับเบสดำแหน่งที่ 1383 ถึง 1655 แต่สามารถตรวจสอบได้เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น Lehman และคณะ (1998) ได้ใช้ไพรเมอร์คู่ดังกล่าวและออกแบบไพรเมอร์ PIGP2379for และ PIGP2632rev ขยายลำดับเบสดำแหน่งที่ 1853 ถึง 2079 ในการพิสูจน์ *Acanthamoeba* จาก keratitis แต่จากการใช้ ACARNA1383-1655 และ PIGP2379-2632 พบว่าครอบคลุมไปถึงอะมีบาที่ดำรงชีพอิสระในสิ่งแวดล้อมใกล้เคียงคือ *Balamuthia* และ *Hartmannella* ดังนั้นไพรเมอร์สองคู่นี้จึงไม่จำเพาะต่อยีน *Acanthamoeba* (Schroeder *et al.*, 2001) และไพรเมอร์ 66-585 มีความจำเพาะต่อจีโนมไทป์ของ *Acanthamoeba* ที่มีลักษณะซิสต์จากกลุ่มที่ 2 และ 3 เท่านั้น (Kim *et al.*, 1997)

ภายในยีน 18S rRNA เป็นบริเวณที่ลำดับเบสมีความหลากหลายสูง Stothard และคณะ (1998) ได้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนดังกล่าวโดยใช้ไพรเมอร์ SSU1 และ SSU2 ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน *Acanthamoeba* มีความยาวทั้งหมดประมาณ 2,300 - 2,700 คู่เบส โดย *Acanthamoeba* ที่มีลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 2 และ 3 มีความยาวประมาณ 2,300 คู่เบสและ *Acanthamoeba* ที่มีลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ *A. astronyxis*, *A. castellani* และ *A. tubioshi* มีความยาวประมาณ 2,600 - 2,700 คู่เบส สามารถแบ่ง *Acanthamoeba* ออกเป็นลักษณะตามความแตกต่างของลำดับเบสอย่างน้อยร้อยละ 5 ขึ้นไปได้ 12 กลุ่มหรือจีโนมไทป์ซึ่งปัจจุบันมีถึง 15 จีโนมไทป์ จากการค้นพบของ Horn, Gast และ Hewett สามารถแยกจีโนมไทป์ที่ T13, T14 และ T15 ได้ตามลำดับ (Horn *et al.*, 1999; Gast *et al.*, 2001; Hewett *et al.*, 2003) ความหลากหลายของยีน 18S rRNA ใน *Acanthamoeba* แบ่งเป็นบริเวณใหญ่ๆ ได้ 3 บริเวณ คือ diagnosis fragment (DF) 1, 2 และ 3 ในตำแหน่งเบสที่ 178-335 (DF1), ตำแหน่งที่ 705-926 (DF2) และตำแหน่งที่ 1175-1379 (DF3) ตามลำดับ Schoeder และคณะได้ศึกษาตำแหน่งย่อยภายในยีน 18S rRNA คือ ASA.S1 ซึ่งอยู่ในตำแหน่งเบสที่ 1271-1383 ภายในบริเวณ DF3 โดยใช้ไพรเมอร์ JDP1-JDP2 สามารถตรวจหา *Acanthamoeba* ได้ 11 จีโนมไทป์จากทั้งหมด 12 จีโนมไทป์ คือ T1-T8 และ T10-T12 (Schoeder *et al.*, 2001) พบว่าเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูงโดยเฉพาะภายในจีโนมไทป์ T4 (Booton *et al.*, 2002; Di Cave *et al.*, 2008) ในปี ค.ศ. 2006 ได้มีการริเริ่มทำ real-time PCR ในยีน 18S rRNA โดย Rivere และคณะ (2006) ไพรเมอร์และตัวตรวจสอบที่ใช้ถูกออกแบบให้พบได้ในลำดับเบสที่ทำให้เกิด keratitis 6 ชนิด และมีความจำเพาะต่อ *A. castellanii* ATCC 30234 ทั้งในระยะโทรฟอยต์และระยะซิสต์ (Rivere *et al.*, 2006)

เมื่อจัดกลุ่มของลักษณะซิสต์เข้ากับชนิดของจีโนไทป์พบว่า ซิสต์กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย จีโนไทป์ T7, T8 และ T9 ซิสต์กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยจีโนไทป์ T3, T4 และ T11 และซิสต์กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยจีโนไทป์ T1, T2, T5, T6, T10 และ T12 โดยจีโนไทป์ส่วนใหญ่มีลักษณะของซิสต์จาก กลุ่มที่ 2 และ 3 (Stothard et al., 1998) Booton และคณะ (2005) ได้จัดให้จีโนไทป์ T14 และ T15 อยู่ในซิสต์กลุ่มที่ 3 และจีโนไทป์ T1 อยู่ในซิสต์กลุ่มที่ 2 โดยแต่ละจีโนไทป์ที่แพร่กระจายไปใน สิ่งแวดล้อม มีความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงแตกต่างกัน จีโนไทป์ที่พบมากที่สุดทั่วโลก ได้แก่ จีโนไทป์ T4 แต่ในอิหร่านกลับพบจีโนไทป์ T2 มากที่สุด รองลงมาเป็นจีโนไทป์ T4 (Booton et al., 2004; Maghsood et al., 2005) มากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วย *Acanthamoeba keratitis* เป็นสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับจีโนไทป์ T4 และยังเป็นจีโนไทป์หลักที่ก่อโรคสมองอักเสบชนิด เรื้อรังหรือเฉียบพลันและโรคผิวหนังอักเสบกึ่งเฉียบพลัน (Khan, 2006) และพบมากในสัตว์ เช่น จากปลาน้ำจืดและกระรอกป่า เป็นต้น (Taylor, 1977; Dykova et al., 1999; Dykova & Lom, 2004; Lorenzo-Morales et al., 2007) สปีชีส์ที่มีจีโนไทป์ T4 ได้แก่ *A. castellanii* และ *A. polyphaga* เป็นจีโนไทป์ที่พบก่อโรคในคนมากที่สุด (Booton et al., 2002, 2005) ปัจจุบันมี จีโนไทป์ที่สามารถก่อโรคได้ คือ T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T10, T11, T12 และ T15 (Khan, 2006; Visvesvara et al., 2007; Di Cave et al., 2008; Walochnik et al., 2008) โดยจีโนไทป์ที่มีความเกี่ยวข้องกับ keratitis ได้แก่ T2, T3, T4, T5, T6, T11 และ T15 ส่วนจีโนไทป์ที่ทำให้เกิดโรค สมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน ได้แก่ T1, T2 (strain BS04), T4, T7, T10 และ T12 ดัง แสดงในตารางที่ 1 (Ledee et al., 1996; Stothard et al., 1998; Walochink et al., 2000; Khan et al., 2002; Maghsood et al., 2005; Spanakos et al., 2006; Di Cave et al., 2008)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1. จีโนไทป์ใน *Acanthamoeba* ที่เกี่ยวข้องกับโรคกระจกตาอักเสบและโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน (ดัดแปลงตารางจาก Khan, 2006)

<i>Acanthamoeba</i> genotype	Human disease association
T1	Encephalitis
T2 (BS04)	Encephalitis (Walochnik <i>et al.</i> , 2008)
T2A†	Keratitis
T2B† (CCAP 1501/3c)	NA
T3	Keratitis
T4*	Encephalitis, Keratitis
T5	Keratitis
T6	Keratitis
T7	Encephalitis (Visvesvara <i>et al.</i> , 2007)
T8	NA
T9	NA
T10	Encephalitis
T11	Keratitis
T12	Encephalitis
T13	NA
T14	NA
T15	Keratitis (Di Cave <i>et al.</i> , 2008)

† จีโนไทป์ T2 ถูกแบ่งเป็น T2A และ T2B โดย Maghsood และคณะ (2005)

* จีโนไทป์ที่พบบ่อยที่สุดทั้ง 2 โรค

NA ยังไม่พบโรคที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (descriptive study)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความหลากหลายของ *Acanthamoeba* ที่การกระจายตัวอยู่ในธรรมชาติจากแหล่งน้ำในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลและทำการแยกจีโนมไทป์ที่ค้นพบเทียบกับ *Acanthamoeba* ที่พบก่อโรคในคนจากผู้ป่วยติดเชื้อที่รับการวินิจฉัยจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือ ตัวอย่าง *Acanthamoeba* ที่พบจากแหล่งน้ำในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลและบางตัวอย่างจากผู้ป่วย

ประชากรตัวอย่าง (population sample) คือ *Acanthamoeba* ที่ได้จากแหล่งน้ำในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลและจากตัวอย่างผู้ป่วยโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอนไซม์จำเพาะเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ขนาดของกลุ่มประชากร

การคำนวณตัวอย่างอาศัยข้อมูลจากการสำรวจจะมีบาที่ดำรงชีพอิสระจากแหล่งดินและน้ำในประเทศไทยในช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน พ.ศ.2541 โดยดวงพรและคณะ (2001) ซึ่งพบ *Acanthamoeba* spp. ในแหล่งน้ำจืดภายในเขตกรุงเทพมหานคร ร้อยละ 30 ดังนั้นจึงกำหนดให้

มีอัตราความชุกของอะแคนธามีบา 30% ($P = 0.3$)

และกำหนดให้มีค่าความคลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน 5% ($d = 0.05$)

กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูล 95%

$$\text{สูตร } Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = 1.96 \text{ (two tail)}$$

$$P = \text{อัตราความชุก} = 0.30$$

$$Q = 1 - 0.30 = 0.70$$

$$d = \text{acceptable error} = 0.05$$

n = ขนาดตัวอย่าง

$$\text{แทนค่าสูตร} \quad n = Z^2 \alpha_2 PQ/d^2$$

$$n = (1.96)^2 (0.30)(0.70)/(0.05)^2$$

$$n = 323 \text{ ตัวอย่าง}$$

เกณฑ์การเลือกสถานที่ในการสำรวจ

การสำรวจแหล่งน้ำในเขตกรุงเทพและปริมณฑลได้จำแนกสถานที่ตามลักษณะ ดังนี้

1. สวนสาธารณะ
2. สถานศึกษา
3. ชุมชน
4. คลอง

โดยลักษณะของแหล่งน้ำแบ่งได้เป็นแหล่งน้ำปิด เช่น บึง สระน้ำหรือคูน้ำและแหล่งน้ำไหล ได้แก่ คลอง เป็นต้น ทำการเก็บตัวอย่างซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งในสถานที่ที่มีการพบหรือสถานที่ซึ่งมีความใกล้เคียงกับลักษณะแหล่งน้ำที่พบ *Acanthamoeba* โดยเก็บตัวอย่างน้ำไม่ต่ำกว่า 2 ตัวอย่างจากแหล่งน้ำแต่ละแหล่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนที่ในการศึกษา



รูปที่ 6. แสดงพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานคร ได้แก่ เขตบางเขน

เขตจตุจักร เขตลาดพร้าว เขตบึงกุ่ม เขตมีนบุรี เขตวังทองหลาง เขตบางกะปิ เขตดินแดง

เขตปทุมวัน เขตลาดกระบัง เขตประเวศ เขตตลิ่งชัน เขตบางขุนเทียนและปริมณฑล ได้แก่ จังหวัด

ปทุมธานีและนนทบุรี

การเก็บตัวอย่างน้ำ

เตรียมขวดพลาสติกเปล่าสะอาดขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการเก็บน้ำบริเวณผิวน้ำ ปิดฝาขวดให้แน่น พร้อมวัดค่า pH และอุณหภูมิ ณ แหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย

ในระหว่างการศึกษานี้จะทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากผู้ป่วยทุกรายที่ส่งตรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัย อณูชีววิทยาของมาลาเรียและปรสิตควยโอกาส

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิและเวลาได้ (high speed refrigerated microcentrifuge, Tomy)

เครื่องปั่นความเร็วสูงขนาดเล็ก

เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียดอ่านค่าได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส

ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติ (automatic adjustable micropipette) ขนาด 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร

กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกลับ (Inverted microscope)

เครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (PCR cycle)

เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอโดยกระแสไฟฟ้า

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)

ตู้เลี้ยงเชื้อพร้อมเครื่องเขย่า

ตู้อบสำหรับเพาะเชื้อ

ตู้อบแห้ง

เทอร์โมมิเตอร์

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง

หน้ากากกันแสงอุลตราไวโอเล็ต

แหล่งกำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต

กล้องถ่ายภาพดิจิทัล

เครื่องยิงกระแสไฟฟ้า (*E.coli* pulser)

นาฬิกาจับเวลา
 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ
 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
 เครื่องไมโครเวฟ
 Vortex mixer

วัสดุ

กระบอกตวง ขนาด 10, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร
 กล่องโฟมใส่น้ำแข็ง
 กระดาษติดฉลาก
 กล่องพลาสติก
 ขวดเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว
 ขวดสำหรับใส่สารเคมี
 ขวดสำหรับเก็บน้ำ ขนาด 500 มิลลิลิตร
 ถังมือยาง
 ถังพลาสติก
 ที่วางหลอดทดลอง สำหรับหลอดขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
 แท่งแก้วสำหรับคน
 ปากกา label
 บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100, 200, 500, 1000 มิลลิลิตร
 ปิเปตต์ทิพ (pipette tip) ขนาด 10, 100, 1000 ไมโครลิตร
 ปิเปตต์แก้ว (plastic pipette)
 ไม้ขีดผ้าตัด
 พาราฟิล์ม
 เพลทพลาสติก
 ไม้จิ้มฟัน
 หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิด (microtube) ขนาด 0.1, 0.5, 1.5 มิลลิลิตร
 สำลี
 หนังยาง

สารเคมี

1. สารเคมีทั่วไป

absolute ethanol
absolute methanol
agar
agarose
agarose, low gelling temperature
calcium chloride
cleaning solution
disodium ethylenediamine tetracetic acid (EDTA)
disodium hydrogen phosphate
double distilled water
ethidium bromide
ferric ammonium sulfate
glucose
glycerol
magnesium sulfate
mineral oil
potassium phosphate, dibasic
potassium phosphate, monobasic
proteose peptone
sodium oxaloacetate
sodium chloride
sodium citrate
sodium phosphate, dibasic
yeast extract

2. สารเคมีที่เป็น Reagent Kit

QIAGEN DNA Extraction Kit
QIAGEN DNA Purification Kit
QIAGEN Gel Extraction Kit

PCR Reagent Kit

pGEM[®] – T Easy Vector System

ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

3. เอนไซม์

proteinase K

Ex *Taq* polymerase

T4 DNA ligase

4. Oligonucleotides

ACAN 18S F0 : 5'- TCCTGCCAGTAGTCATATGC -3'

ACAN 18S F1 : 5'- GCTTGTCTCAAAGATTAAGC -3'

ACAN 18S F2 : 5'- ACAATACAGGCGCTCGATAA -3'

ACAN 18S F3 : 5'- CAGAGGTGAAATTCTTGG -3'

ACAN 18S F4 : 5'- AACGAGACCTTAACCTGC -3'

ACAN 18S R0 : 5'- CTTCTCCTTCCTCTAAATGGT -3'

5. ดีเอ็นเอมาตรฐาน

λ *Hind* III marker

การแยกเชื้อ *Acanthamoeba*

การเพาะเลี้ยงเชื้อใน 1.5% non-nutrient agar plate

นำตัวอย่างน้ำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 2,600 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้ เติลงบนเพลทวุ้นที่ปราศจากสารอาหารจากนั้นเติม *Escherichia coli* ที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยเติลงบนผิวหน้าวุ้น ทำการตรวจสอบเพลททุกวันด้วย กล้อง Inverted microscope เป็นระยะเวลาต่อเนื่อง 1 สัปดาห์ เมื่อพบ *Acanthamoeba* ให้ทำการ แยกเชื้อจนไม่มีสิ่งมีชีวิตอื่นปะปนและนำระยะโทรโฟซอยต์ที่แยกได้ไปสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างจากเหงือกปลาให้ตัดเหงือกปลาเป็นชิ้นเล็ก ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ลงในภาชนะและเติมน้ำกลั่นให้ท่วม ทำการผสมให้น้ำและเหงือกปลาให้เข้ากัน นำน้ำที่ได้ไปเลี้ยงในเพลทเลี้ยงเชื้อ

ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เป็นคอนแทคเลนส์และตลับคอนแทคเลนส์ นำน้ำกลั่นล้างคอนแทคเลนส์และภายในตลับคอนแทคเลนส์ให้ทั่ว นำน้ำที่ได้ไปเลี้ยงต่อในเพลทเลี้ยงเชื้อ

การสกัดดีเอ็นเอ

1. นำโทรไฟซอยต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ปิดส่วนใสทิ้งไป
2. ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ ชุดสกัดของบริษัท QIAGEN โดยการดูดน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีโทรไฟซอยต์ 20 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ ATL 160 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
3. เติม Proteinase K 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง หรือจนกว่าตัวอย่างจะถูกละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
4. นำหลอดที่ปั่นไว้มาเติมบัฟเฟอร์ AL 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. เติม เอทานอล (96-100%) 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
6. ดูดสารละลายในหลอด ใส่ลงใน QIAamp spin column แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp spin column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่
7. เติม บัฟเฟอร์ AW1 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp spin column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่
8. เติม บัฟเฟอร์ AW2 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 14000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp spin column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 14000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
9. นำ QIAamp spin column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่ เติม บัฟเฟอร์ AE แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
10. ดูดดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดกลาง 0.5 มิลลิลิตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำ PCR ต่อไป

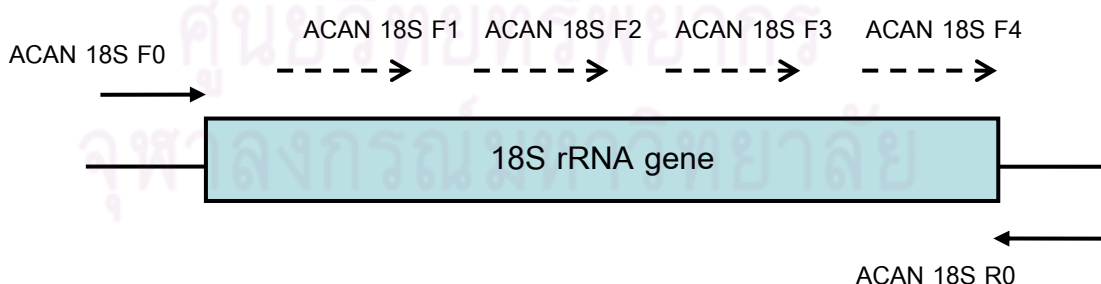
การออกแบบ oligonucleotides สำหรับใช้เป็น PCR Primer

การออกแบบ Primer โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ nuclear small-subunit rRNA gene (*RNS*) หรือ 18S rRNA gene ของจีโนมไทป์ T1-T15 เป็นต้นแบบ โดยอ้างอิงข้อมูลจาก www.ncbi.nlm.nih.gov หมายเลข U07416 ของ *A. castellanii* strain Neff ATCC 50373 ทำการออกแบบ primer โดยคำนวณจากสูตรอุณหภูมิหลอมตัว (Melting temperature, T_m) ของ primer

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

ข้อควรระวังในการออกแบบ primer คือ

1. ต้องคำนึงถึงความยาวของ primer ซึ่งควรมีความยาว 20-30 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยเบสชนิด guanine และ cytosine ประมาณร้อยละ 50-60 ขึ้นไป และมีการกระจายตัวของเบสต่างๆ เหมือนกันกับลำดับเบสที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน
2. ควรหลีกเลี่ยงการใช้ primer ที่มี polypurines หรือ polypyrimidine
3. ในส่วนบริเวณปลาย 3' ของ primer ไม่ควรมีลำดับเบสที่เป็น complementary กัน เพื่อป้องกันการจับคู่กันเองของ primer (primer-dimer)
4. การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer แต่ละส่วนไม่ควรมีลำดับเบสที่เหมือนกันเมื่ออ่านจากทิศทาง 5' ไปทาง 3' และ 3' ไปทาง 5' เพื่อป้องกันปลาย 3' งอมาจับกับ primer สายเดียวกันเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure)
5. ค่า T_m ของ primer ควรใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วง 50-80 องศาเซลเซียส



รูปที่ 7. แสดงตำแหน่งของ primer ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ PCR

ACAN 18S F0 : 5'- TCCTGCCAGTAGTCATATGC -3' (ตำแหน่งเบสที่ 9-28)
 ACAN 18S F1 : 5'- GCTTGTCTCAAAGATTAAGC -3' (ตำแหน่งเบสที่ 27-46)
 ACAN 18S F2 : 5'- ACAATACAGGCGCTCGATAA -3' (ตำแหน่งเบสที่ 553-572)
 ACAN 18S F3 : 5'- CAGAGGTGAAATTCTTGG -3' (ตำแหน่งเบสที่ 1120-1137)
 ACAN 18S F4 : 5'- AACGAGACCTTAACCTGC -3' (ตำแหน่งเบสที่ 1639-1656)
 ACAN 18S R0 : 5'- CTTCTCCTTCCTCTAAATGGT -3' (ตำแหน่งเบสที่ 2236-2256)

โดยในขั้นตอนการทำ PCR จะใช้ ACAN 18S F0 และ ACAN 18S R0 ส่วนในขั้นตอนการหาลำดับเบส (sequencing) จะใช้ primer ทั้ง 4 แบบ ดังแสดงในรูปที่ 6

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR)

1. นำดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับทำ PCR โดยจะต้องใช้องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ในปริมาณสารละลายสุทธิ 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอที่สกัดไว้ ความเข้มข้น 10 ng primer ทั้ง forward และ reverse ที่ความเข้มข้น 30 pmol 10X PCR Buffer, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP เพื่อเป็นสารตั้งต้นของการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ Ex Taq DNA polymerase 5 units/μ เพื่อใช้เป็นเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาและน้ำกลั่น

2. นำหลอดที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีและที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.4 นาที เข้าสู่ขั้นตอนการทำให้ primer จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.3 นาที ที่อุณหภูมิ 74 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งทำปฏิกิริยาทั้งหมด 40 รอบ จากนั้นนำ PCR products ที่ได้นำไปตรวจผลผลิต PCR

การตรวจผลผลิต PCR โดยวิธี gel electrophoresis

เตรียมอะกาโรสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 1X TBE 300 มิลลิลิตร ใน electrophoresis chamber นำผลผลิต PCR ที่เตรียมไว้ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมเจล ซึ่งใช้ λ Hind III เป็นดีเอ็นเอบอกขนาด (marker) เพื่อใช้เปรียบเทียบกับผลผลิต PCR โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย

ethidium bromide 15 นาที นำไปดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต และถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาด

การ purify PCR product โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit

1. ใส่ 5 เท่าของ PB buffer ต่อปริมาตร 1 เท่า PCR product และเขย่าให้เข้ากัน
ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน QIAquick spin column บั่น 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง
1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ใน collecting tube ไป และใส่กลับที่เดิม
2. เติม PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใน column และบั่น 13,000 rpm ที่
อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ใน collecting tube และใส่หลอด
กลับที่เดิม
3. บั่นให้ QIAquick spin column แห้งที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
จากนั้นทิ้งหลอดที่อยู่ด้านล่าง QIAquick spin column ไป นำหลอด 1.5 มิลลิลิตรมา
ใส่แทน
4. เติม EB buffer 30 ไมโครลิตร ตรงกลาง membrane ของ QIAquick spin column
ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที และนำไปบั่น 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

วิธีการทำโคลน (subclone)

1. การตัดแยกดีเอ็นเอโดยใช้ QIAquick gel extraction kit

- 1.1 นำผลผลิต PCR มาทำ gel electrophoresis โดยใช้เจลแบบ low melting
จากนั้นตัดชิ้นส่วนของอะกาโรสเจลบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใส่ในหลอด
ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และบั่นที่กขนาดของน้ำหนักชิ้นเจล
- 1.2 เติม QG-buffer 3 เท่าของปริมาณเจล (1 มิลลิกรัม = 1 ไมโครลิตร)
- 1.3 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จนเจลละลาย
- 1.4 ถ่ายสารละลายใส่ QIAquick spin column นำไปบั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็ว
สูง 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 1.5 ทิ้งสารละลายใน collecting tube แล้วเติม QG-buffer 500 ไมโครลิตร
นำไปบั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 1.6 ทิ้งสารละลายใน collecting tube แล้วเติม PE-buffer 750 ไมโครลิตร
นำไปบั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

- 1.7 ทิ้งสารละลายใน collecting tube แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 1.8 เติม EB-buffer 30 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick spin column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 1.9 ดูดดีเอ็นเอที่ได้ใส่ในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาไว้ภายใต้ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปเชื่อมเข้าสู่พลาสมิด

2. การเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิด

- 2.1 เติม 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligation ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2.2 เติม pGEM[®] - T Easy Vector ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 2.3 เติมดีเอ็นเอปริมาณ 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 2.4 เติม T4 DNA Ligation ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง

3. การตกตะกอนดีเอ็นเอลูกผสม

- 3.1 เติม absolute EtOH + 3M NaOH ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมง
- 3.2 นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 3.3 ดูดสารละลายเหนือตะกอนดีเอ็นเอในหลอดทิ้งอย่างเบามือ
- 3.4 เติม cold 70% EtOH ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 3.5 ดูดสารละลายเหนือตะกอนดีเอ็นเอในหลอดให้เหลือไว้ประมาณ 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
- 3.6 ดูดสารละลายเหนือตะกอนดีเอ็นเอในหลอดทิ้งจนหมด
- 3.7 เปิดฝาหลอด วางทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- 3.8 เติมน้ำกลั่น 6 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ แล้วเก็บรักษาไว้ภายใต้ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การจำลองดีเอ็นเอลูกผสมและการคัดเลือก

- 4.1 นำดีเอ็นเอลูกผสมปริมาณ 3 ไมโครลิตร ผสมกับ *Escherichia coli* ที่ทำให้เป็น competent cell ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ถ่ายลงสู่ cuvette ที่แช่เย็นในน้ำแข็ง
- 4.2 ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 1.8 กิโลโวลต์ เข้าสู่ cuvette
- 4.3 ดูดเชื้อทั้งหมดใน cuvette ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB broth) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าเชื้อภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 4.4 นำเชื้อที่ได้ ปริมาณ 200-300 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงบนเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสม ampicillin บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
- 4.5 คัดเลือกโคโลนีของเชื้อและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis

การหาลำดับเบสของ DNA

การหาลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (automated DNA sequencing) เป็นวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ dideoxy chain termination แตกต่างกันตรงที่การติดฉลาก ดีเอ็นเอจะใช้สารเรืองแสง เช่น dRhodamine dye terminator แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี โดยอาศัยการติดตามการเรืองแสงของสีต่างๆ กัน 4 ชนิด สำหรับเบส 4 ตัว คือ A C G T สีที่ใช้ในการติดฉลากแต่ละตัว เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ จะเรืองแสงในช่วงความยาวคลื่นแตกต่างกัน และแสงที่ปรากฏจะแตกต่างกัน โดยจะเห็นเป็นสีเขียว สีดำ สีน้ำเงิน และสีแดงตามลำดับ ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer เมื่อได้ผลของลำดับเบสทั้งหมดของยีน 18S rRNA นำมาศึกษาลำดับเบสโดยการทำ alignment ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Bioedit และ ClustalX เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับเบสที่เกิดขึ้นในยีน 18S rRNA

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การสำรวจ *Acanthamoeba* ในแหล่งน้ำ

จากการสำรวจแหล่งน้ำต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลได้แบ่งลักษณะของแหล่งน้ำทั้งที่เป็นบึงตามธรรมชาติและที่ถูกสร้างขึ้นออกเป็นสวนสาธารณะ สถานศึกษา ชุมชนและคลอง ดังแสดงในตารางที่ 2 ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจำนวน 369 ตัวอย่างและปลาในแหล่งน้ำจำนวน 6 ตัวอย่าง พบ *Acanthamoeba* ในเดือนกุมภาพันธ์จำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.11 เดือนมีนาคมพบ 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.70 เดือนพฤษภาคมพบ 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 7.84 และเดือนธันวาคมพบ *Acanthamoeba* จำนวน 1 ตัวอย่างจากทั้งหมด 2 ตัวอย่าง ส่วนในเดือนมิถุนายนพบ *Acanthamoeba* จากเหงือกปลา 3 ดังแสดงในตารางที่ 3 สามารถแยก *Acanthamoeba* จากการเพาะเลี้ยงบน 1.5% non-nutrient agar กับ heat-inactivated *Escherichia coli* ได้ 16 ตัวอย่างจากแหล่งน้ำ 9 แห่งจากสนามกีฬาแห่งชาติหัวหมาก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน บึงลำพังพวย เมืองทองธานี หมู่บ้านเพอร์เฟกเพลส หมู่บ้านส้มมากร และคลองรังสิต ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยแหล่งน้ำที่พบเชื้อมีลักษณะน้ำค่อนข้างใส นิ่งหรือมีคลื่นเล็กน้อย ค่า pH ค่อนข้างเป็นด่างมีค่า 8.3 อุณหภูมิเฉลี่ย 31 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยไม่พบ *Acanthamoeba* ในแหล่งน้ำที่มีเป็นลักษณะสีเขียว

Acanthamoeba ที่พบสามารถแบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะของซิสต์ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 3 ตัวอย่างและลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 2 จำนวน 13 ตัวอย่าง น้ำจากบึงลำพังพวยและสนามกีฬาแห่งชาติหัวหมากสามารถพบ *Acanthamoeba* ได้ทั้ง 2 กลุ่ม และ *Acanthamoeba* จากเหงือกปลามีลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 2 ดังตารางที่ 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2. แสดงสถานที่ในการสำรวจแหล่งน้ำในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล

สวนสาธารณะ	สถานศึกษา	ชุมชนและคลอง
สวนลุมพินีวัน	โรงเรียนบางกอกศึกษา	บึงชุมชนมักกะสัน
สวนจตุจักร	โรงเรียนสาธิตประสานมิตร	บึงโรงพยาบาลรถไฟ
สนามกีฬาแห่งชาติหัวหมาก	โรงเรียนสตรีวิทย์ 2	บึงลำพังพวย
อุทยานเบญจสิริ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน	บึงน้ำเมืองทองธานี
สวนหลวง ร.๙	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	หมู่บ้านเพอร์เฟคเพลส
สวนสมเด็จพระเจ้า เขตบางขุนเทียน	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	หมู่บ้านนวธานี
สวนเซ็นทรัลพระราม 2		หมู่บ้านสัมมากร
สวนเสรีไทย		คลองแสนแสบ
สวนรถไฟ		คลองประเวศบุรีรมย์
สวนเบญจกิติ		คลองหัวหมาก
		คลองรังสิต
		คลองตลิ่งชัน

ตารางที่ 3. แสดงผลในเดือนที่มีการสำรวจพบ *Acanthamoeba* จากแหล่งน้ำต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล

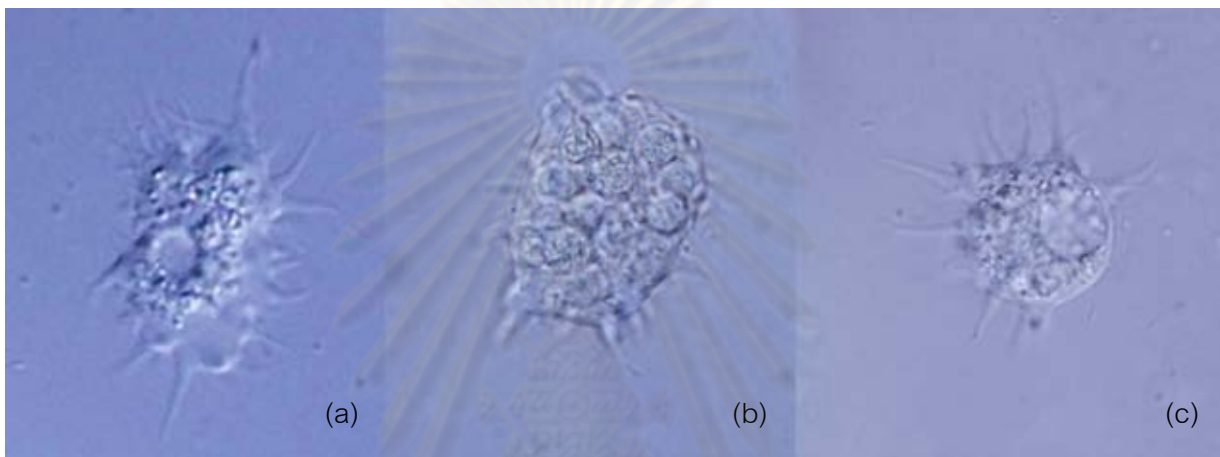
เดือนที่พบตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ	จำนวนตัวอย่างที่พบ	ร้อยละ (%)
กุมภาพันธ์	36	4	11.11
มีนาคม	46	4	8.70
พฤษภาคม	51	4	7.84
มิถุนายน	43	0	0.00
ธันวาคม	2	1	50.00
รวม	178	13	

ตารางที่ 4. แสดงสถานที่ ลักษณะทางกายภาพและลักษณะของกลุ่มซิสต์ของ *Acanthamoeba* ที่พบ
ในแหล่งน้ำต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล

สถานที่	จำนวน แหล่งน้ำ	อุณหภูมิ (°C)	ค่า pH	ตัวอย่าง	ลักษณะของกลุ่มซิสต์
บึงลำพังพวย	1	29.5	8.0	Ac_E1	I
				Ac_E2	I
				Ac_F1	II
				Ac_F2	II
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน	2	31.5	7.9	Ac_E3	II
				Ac_E4	II
บึงเก็บน้ำ เมืองทองธานี	1	34.0	9.4	Ac_E5	II
หมู่บ้านเพอร์เฟคเพส รามคำแหง	1	31.0	9.0	Ac_F3	II
รังสิต คลอง 6	1	24.0	8.0	Ac_E6	II
สนามกีฬาแห่งชาติหัวหมาก	1	32.5	8.0	Ac_E7	II
				Ac_E8	II
				Ac_E9	I
				Ac_E10	II
หมู่บ้านส้มมากร รามคำแหง	2	32.0	8.2	Ac_E11	II
				Ac_E12	II
				Ac_E13	II
รวม / เฉลี่ย	9	30.6	8.4	16	

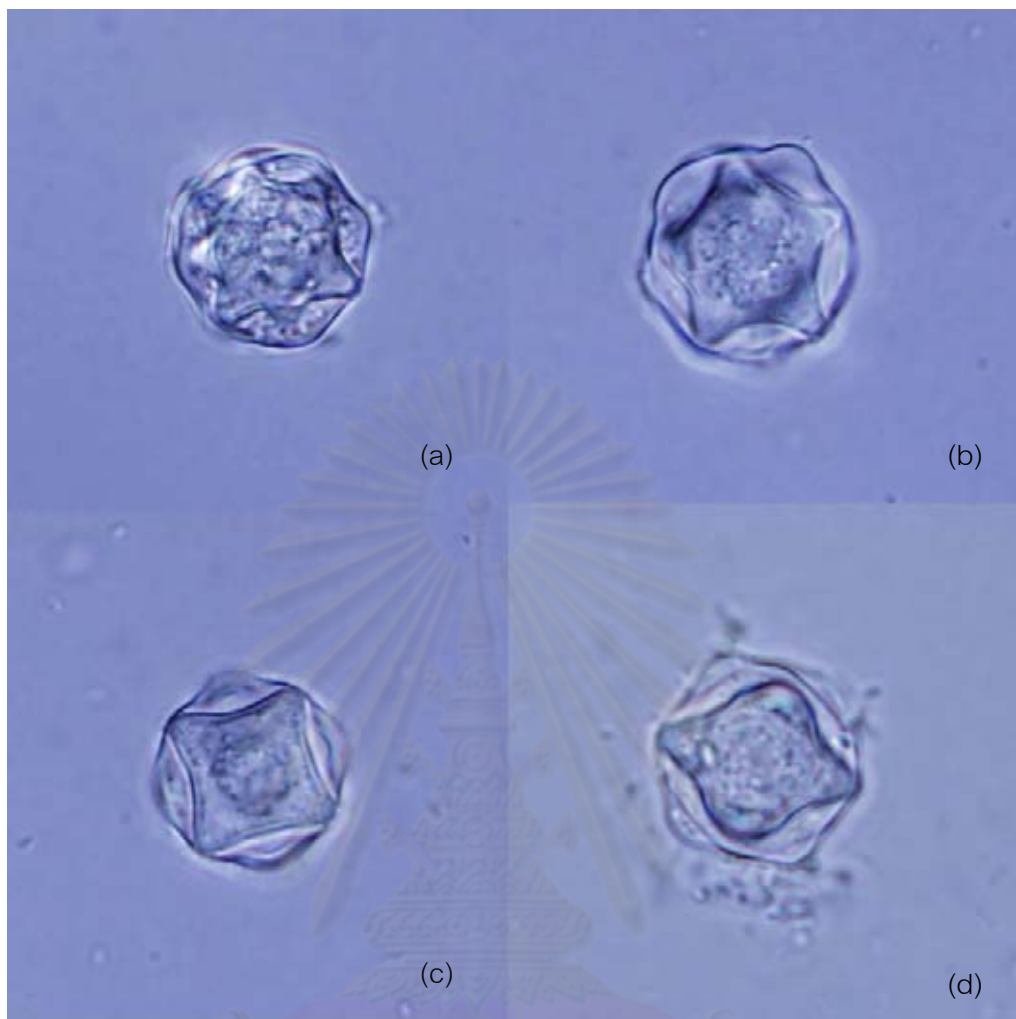
รูปร่างลักษณะของ *Acanthamoeba*

โทรโฟซอยต์ปรากฏนามแหลมและมีลักษณะใส มีรูปร่างไม่แน่นอน *Acanthamoeba* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ Ac_E1, Ac_E2 และ Ac_E9 มีซิสต์และโทรโฟซอยต์ขนาดใหญ่ ลักษณะรูปร่างของซิสต์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 13-25 ไมโครเมตร โดยเฉลี่ยมากกว่า 18 ไมโครเมตร ผนังชั้นนอกมีผิวเรียบมีระยะห่างออกจากผนังชั้นในอย่างชัดเจนและสัมผัสเพียงบางส่วนเป็นแฉกคล้ายดาวมีแขนหรือรัศมีตั้งแต่ 4 แขนขึ้นไป ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8



รูปที่ 8. โทรโฟซอยต์ของซิสต์กลุ่มที่ 1, (a) ระยะเวลาโทรโฟซอยต์มีนามแหลมและใสยื่นออกมา, (b) ภายในโทรโฟซอยต์มีออกแกเนลล์และอาหารจำนวนมาก, (c) โทรโฟซอยต์ที่เพิ่งออกจากซิสต์ ยังคงมีลักษณะกลม ปรากฏแวลคิวโอลขนาดใหญ่

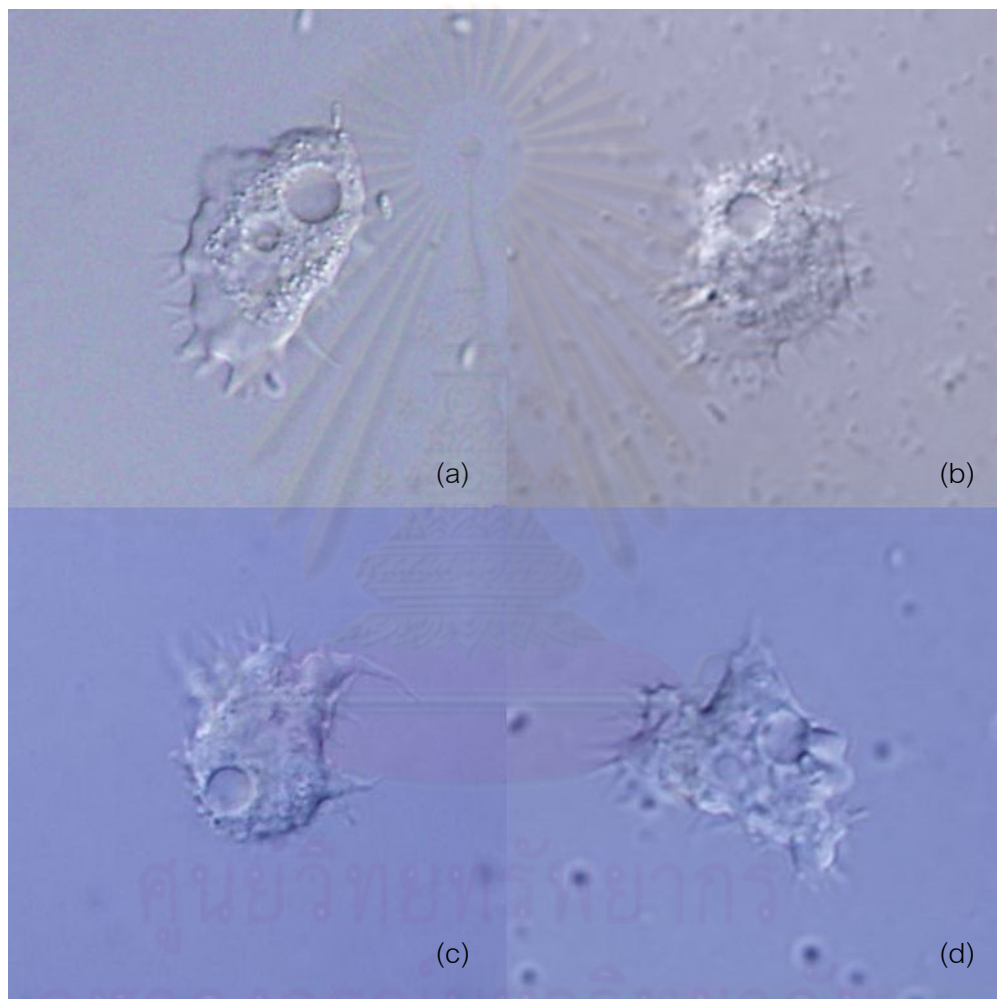
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9. ลักษณะของซิสต์กลุ่มที่ 1, (a) ซิสต์มีมากกว่า 6 แขนขึ้นไป, (b) ซิสต์มี 5 แขน, (c) ซิสต์มี 4 แขนเท่ากัน, (d) ซิสต์มี 4 แขนขนาดไม่เท่ากัน

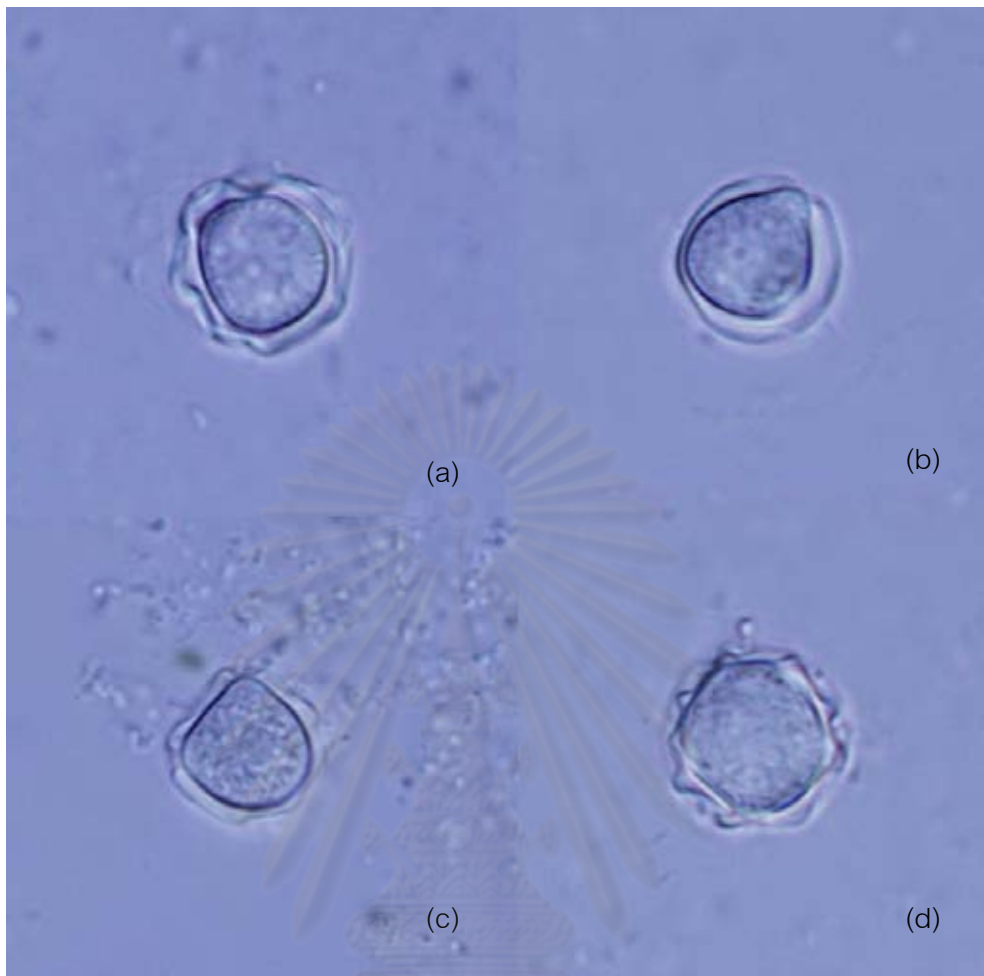
ศูนย์วิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acanthamoeba ที่ได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างเหงือกปลา ได้แก่ Ac_E3, Ac_E4, Ac_E5, Ac_E6, Ac_E7, Ac_E8, Ac_E10, Ac_E11, AC_E12, Ac_F1, Ac_F2 และ Ac_F3 มีขนาดซิสต์และโทรโฟซอยต์เล็กกว่าซิสต์กลุ่มที่ 1 ลักษณะรูปร่างของซิสต์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ผนังชั้นนอกพบทั้งผิวหนาและผิวบางมีลักษณะหยักเป็นคลื่น ผนังชั้นในมีรูปร่างหลายแบบ ไม่แน่นอน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 7-18 ไมโครเมตร โดยเฉลี่ยน้อยกว่า 18 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 10 ถึง 13

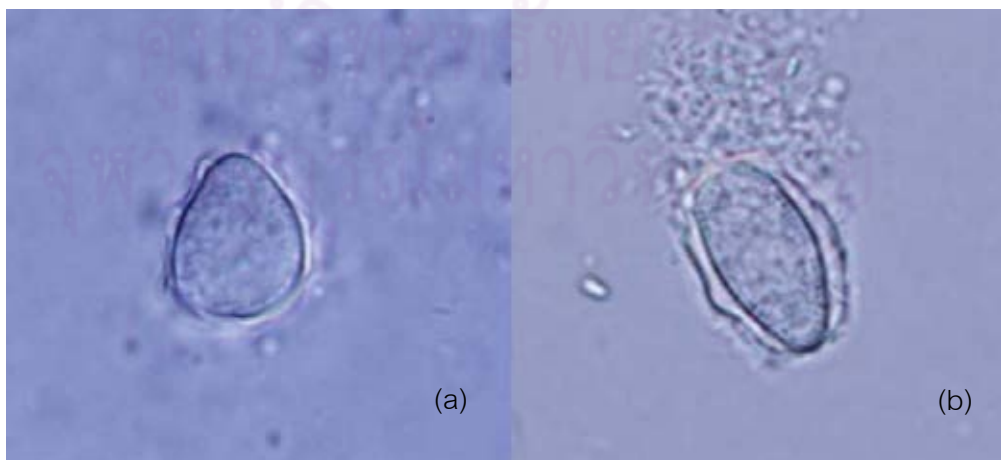


รูปที่ 10. โทรโฟซอยต์ของซิสต์กลุ่มที่ 2

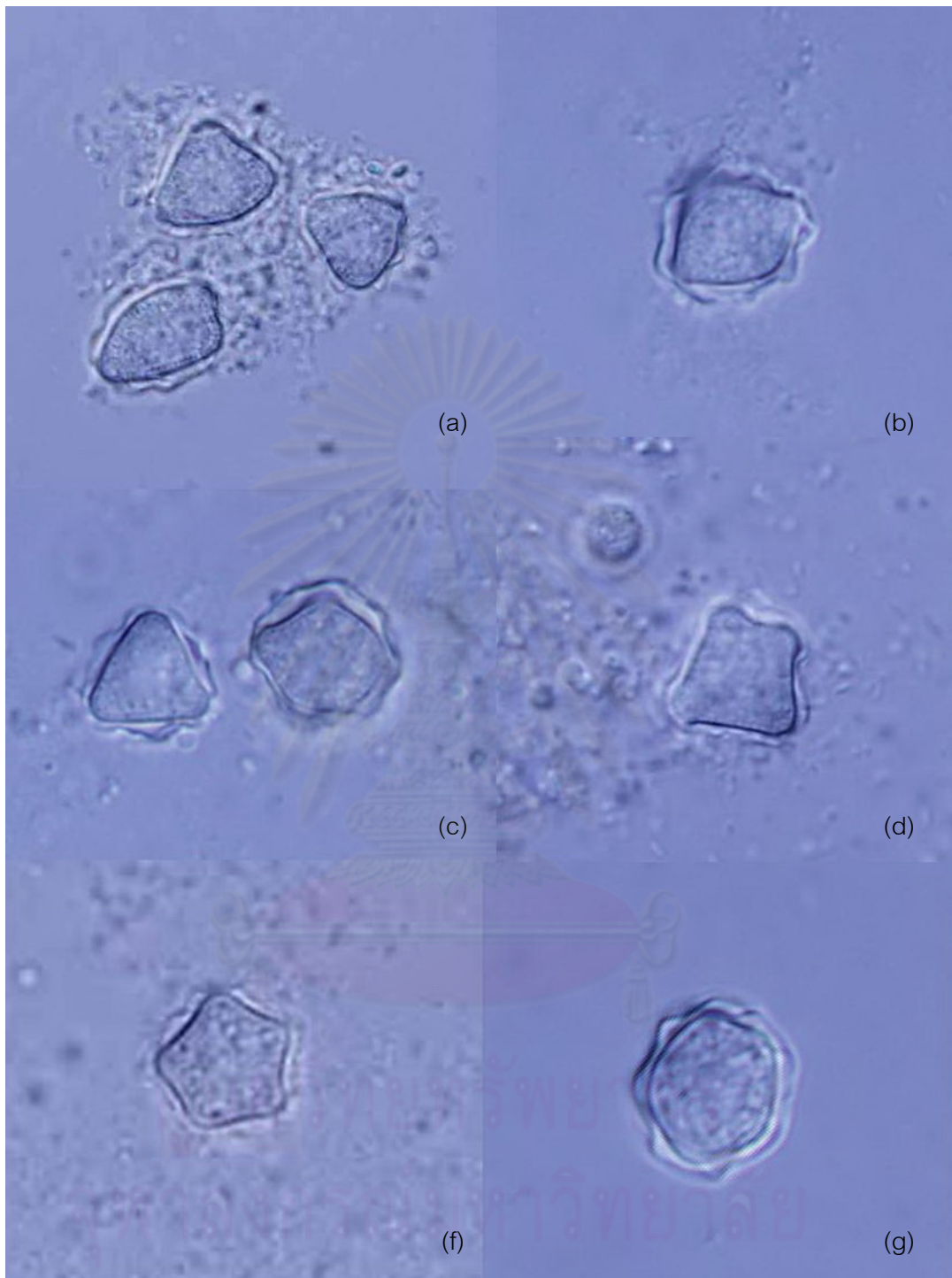
(a-d) โทรโฟซอยต์มีขนาดเล็กกว่าโทรโฟซอยต์ของซิสต์กลุ่ม 1



รูปที่ 11. ลักษณะซิสต์ของกลุ่มที่ 2 (a-d) ผนังซิสต์ชั้นในมีรูปร่างกลม



รูปที่ 12. ลักษณะซิสต์ของกลุ่มที่ 2 (a), (b) ผนังซิสต์ชั้นในเป็นทรงรีหรือรูปไข่



รูปที่ 13. ลักษณะซิสต์ของกลุ่มที่ 2 (a-g) ผนังซิสต์ชั้นในมีรูปร่างหลายเหลี่ยม

ตัวอย่าง *Acanthamoeba* จากผู้ป่วยโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ในช่วงเวลาวันที่ 14 ธันวาคม พ.ศ.2550 ถึง 29 พฤษภาคม พ.ศ.2552 มีตัวอย่างส่งตรวจหาการติดเชื้อ *Acanthamoeba* ที่กระจกตาจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 14 ราย โดยใน 1 รายมีการติดเชื้อเพิ่มที่สมอง โดยการนำชิ้นส่วนกระจกตา น้ำล้างตา คอนแทคเลนส์หรือน้ำยาแช่ในตลับคอนแทคเลนส์และน้ำไขสันหลังมาเพาะเลี้ยงบน 1.5% non-nutrient agar ร่วมกับ heat-inactivated *E. coli* ทำการบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องและตรวจสอบเพลทวุ้นเลี้ยงเชื้อด้วยกล้อง Inverted microscope พบการติดเชื้อ *Acanthamoeba* จำนวน 4 ตัวอย่างจากผู้ป่วย 3 ราย ดังนี้

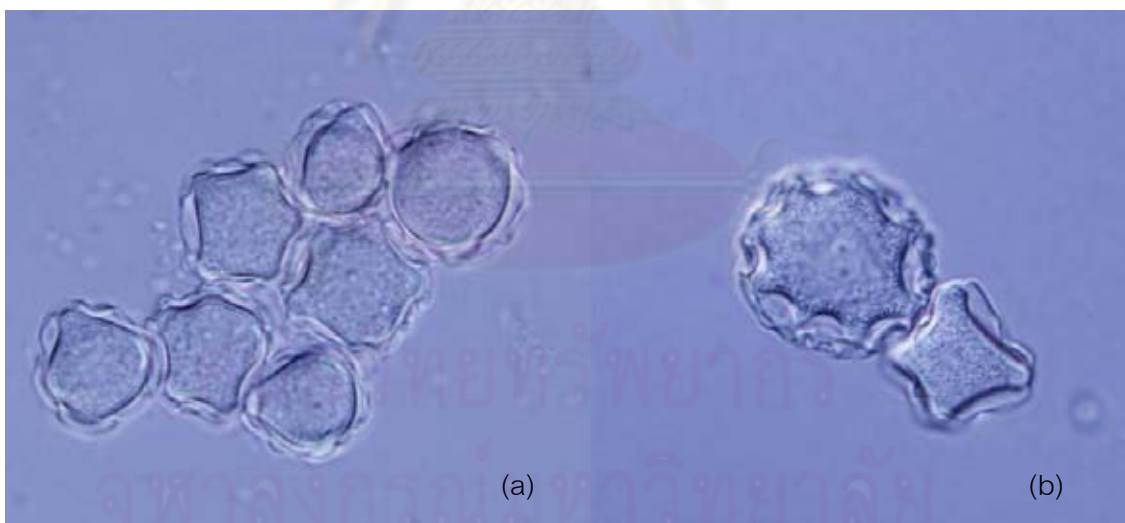
ผู้ป่วย keratitis รายที่ 1 (Ac_PCN3) เป็นเพศหญิง อายุ 16 ปี ติดเชื้อจากการใส่คอนแทคเลนส์ว่ายน้ำในสระว่ายน้ำในกรุงเทพฯ ผู้ป่วยรายที่ 2 (Ac_PCN4) เป็นเพศชาย อายุ 35 ปี ก่อนการติดเชื้อมีอาการต้อหินเป็นเวลา 5 ปี ทำงานในสภาพแวดล้อมที่มีฝุ่นจากการปรับปรุงที่พักโฮมสเตย์และลงเล่นน้ำคลองใน ตำบลอัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม ได้รับการวินิจฉัยในเบื้องต้นว่าเกิดจากเชื้อราและรักษาด้วยยาหยอดตาที่เป็นสเตอรอยด์แต่อาการไม่ดีขึ้น ผู้ป่วยรายที่ 3 (Ac_PCN12 และ Ac_PCS12) เป็นเพศหญิง อายุ 31 ปี มีภูมิลำเนาในจังหวัดสุพรรณบุรี พบการติดเชื้อที่กระจกตาจากการใส่คอนแทคเลนส์มาเป็นเวลา 4-5 ปีและติดเชื้อที่สมองโดยไม่มีประวัติเกี่ยวข้องในการว่ายน้ำ

เมื่อพิจารณาลักษณะซิสต์ของ *Acanthamoeba* ที่แยกได้จากผู้ป่วย keratitis 3 รายซึ่งมีการติดเชื้อทางสมองด้วย 1 ราย พบว่ามีลักษณะของซิสต์ในกลุ่มที่ 2 และ 3 โดยขนาดของซิสต์จากผู้ป่วย Ac_PCN4 มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ส่วนลักษณะซิสต์ที่พบในผู้ป่วย Ac_PCS12 นั้นมีความหลากหลายของลักษณะซิสต์สูง ดังแสดงในรูปที่ 14 และ 15 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



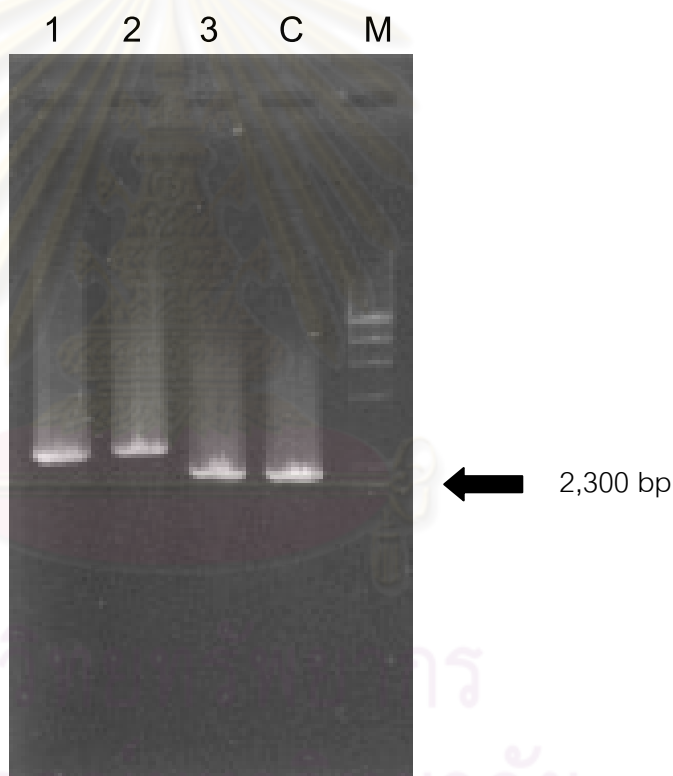
รูปที่ 14. ลักษณะซิสต์จากตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อที่กระจกตา (Ac_PCN4)



รูปที่ 15. (a), (b) ลักษณะซิสต์จากตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อทางสมอง (Ac_PCS12)

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 18S rRNA โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 18S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ ACAN 18S F0 และ ACAN 18S R0 ซึ่งครอบคลุมยีน 18S rRNA เมื่อตรวจจอบการวิเคราะห์ผล PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาด λ Hind III พบว่าขนาดของดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 1 จะมีขนาดประมาณ 2,500 คู่เบส และกลุ่มที่มีลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 2 มีขนาดประมาณ 2,300 คู่เบส เมื่อใช้ดีเอ็นเอของผู้ป่วย keratitis ตัวอย่างที่ Ac_PCN4 ซึ่งมีลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 3 มีขนาดประมาณ 2,300 คู่เบส เป็น positive control



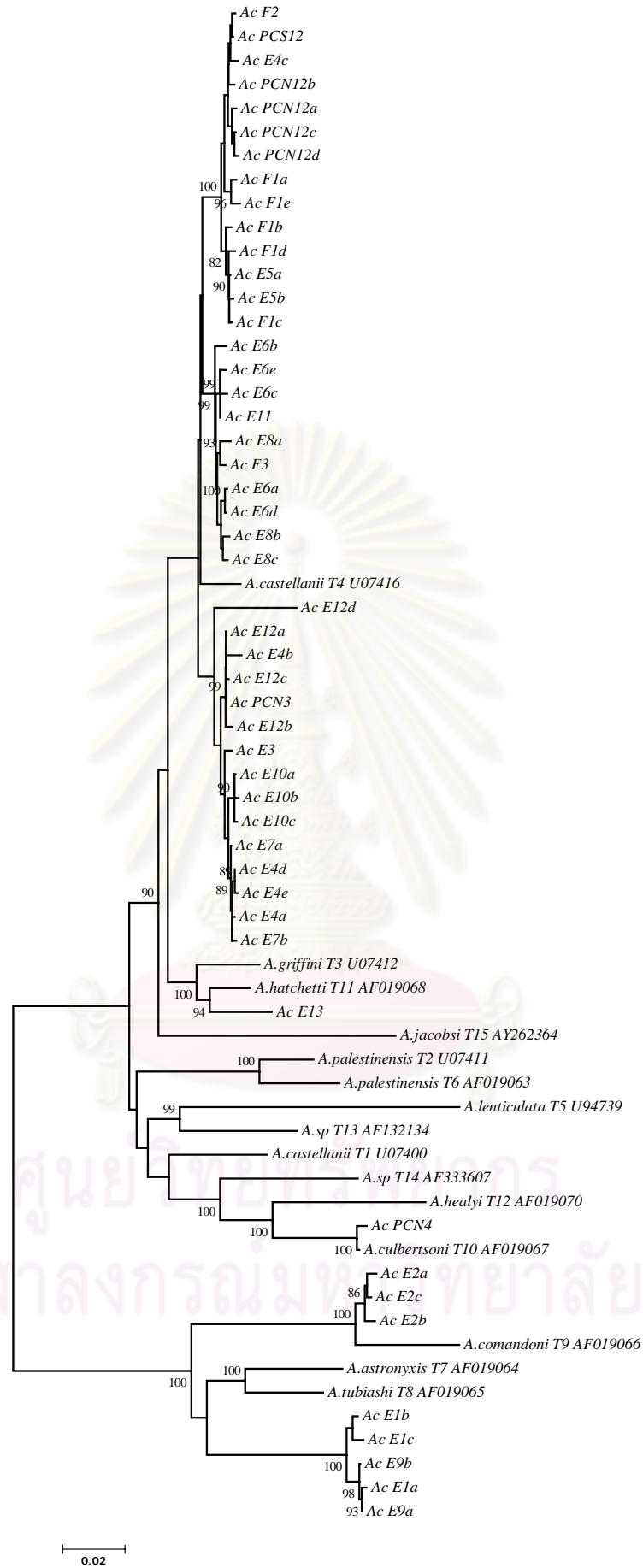
รูปที่ 16. แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เรียงตามหมายเลข 1, 2 และ 3 คือตัวอย่าง Ac_E1, Ac_E2, Ac_E3 ตามลำดับ C คือ Ac_PCN4 เป็น positive control และ M คือ ดีเอ็นเอบอกขนาด (marker) โดยใช้ λ Hind III

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากตัวอย่างที่ทำการศึกษาพบว่ามีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถใช้แยกชนิดของ *Acanthamoeba* ออกเป็นชนิดต่าง ๆ ตามจีโนไทป์ที่มีอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจาก *Acanthamoeba* ที่แยกได้จากธรรมชาติและจากผู้ป่วยบางตัวอย่างมีการปะปนของเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ จึงทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการ subclone และพบรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างในธรรมชาติได้ 42 โคลนและ 7 โคลนโดยพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Acanthamoeba* ที่นำมาวิเคราะห์เทียบกันในระหว่างโคลนและสายพันธุ์มาตรฐาน T1-T15 จาก www.ncbi.nlm.nih.gov

เมื่อทำการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน 18S rRNA ของ *Acanthamoeba* ดังแสดงในรูปที่ 17 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จัดอยู่ในกลุ่มของ *Acanthamoeba* ดังจีโนไทป์ T4, T7, T8, T9, T10 และ T11 โดยมีรายละเอียดดังนี้ ตัวอย่างที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *A. astronyxis* (T7) และ *A. tubiashi* (T8) จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ Ac_E1 และ Ac_E9 ประกอบด้วยโคลน ได้แก่ Ac_E1a, Ac_E1b, Ac_E1c, Ac_E9a และ Ac_E9b เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง ดังหมายเลข AF019057 (T7) และ AF019058 (T8) ได้พบบริเวณที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (variable region) ทั้งหมด 10 บริเวณ เมื่อพิจารณาโคลนทั้ง 5 ในบริเวณที่ 2-4 และ 7-10 พบว่าไม่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ชัดเจน ส่วนบริเวณที่ 6 (ตำแหน่งเบสที่ 1,331-1,384) จะพบความแตกต่างของลำดับเบสแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย Ac_E1a, Ac_E9a และ Ac_E9b กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย Ac_E1b และ Ac_E1c เนื่องจากแขนง phylogenetic tree ของตัวอย่าง Ac_E1 และ Ac_E9 แยกออกจากสายพันธุ์ T7 และ T8 ที่ค่าความเชื่อมั่น 100 ดังนั้น *Acanthamoeba* ตัวอย่าง Ac_E1 และ Ac_E9 จึงมีจีโนไทป์ที่ต่างจาก T7 และ T8 ขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาในส่วนของ DF3 ซึ่งครอบคลุม variable region ในบริเวณที่ 7 จะพบความแตกต่างระหว่างโคลนที่ศึกษากับ T7 และ T8 อย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 18

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17. แสดง phylogenetic tree ในยีน 18S rRNA ของ *Acanthamoeba* ที่ทำการศึกษา

ตัวอย่าง Ac_PCN4 ที่แยกได้จากกระจกตาผู้ป่วยมีรูปแบบของนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *A. culbertsoni* (T10) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับ AF019067 จะพบความแตกต่างของเบสทั้งหมด 17 ตำแหน่ง โดยมี deletion-insertion จำนวน 8 เบส ดังแสดงในรูปที่ 19 ในตำแหน่งที่ 526(A), 731 (TTT), 761 (AA), 1657 (A), 1788 (G/A), 1,664 (C/T), 1717 (A/G), 1745 (G/A), 2219 (T/C) เมื่อทำการวิเคราะห์ในบริเวณ DF3 ของ Ac_PCN4 และ T10 พบความแตกต่างของเบสเพียงตำแหน่งเดียว ดังนั้น Ac_PCN4 จึงจัดอยู่ในจีโนไทป์ T10 ซึ่งลักษณะของซิสตีในกลุ่มที่ 3

ตัวอย่าง Ac_E2 มีรูปแบบของลำดับเบสต่างกัน 3 โคลน คือ Ac_E2a, Ac_E2b และ Ac_E2c เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *A. comandoni* (T9) ในลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง AF019057 โดยตำแหน่งที่ 1-1269 เป็นบริเวณที่มีความแตกต่างของลำดับค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับจีโนไทป์ T9 แต่ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างทั้ง 3 โคลน นอกจากนี้ยังพบความหลากหลายที่เกิดจาก deletion-insertion จำนวน 3 เบส คือ TGC ในโคลน Ac_E2a ในตำแหน่งที่ 187 และตำแหน่งที่ 1270-2569 เป็นบริเวณที่เหมือนกันสูง เมื่อพิจารณาในบริเวณ DF3 จะพบความแตกต่างของเบสต่างจาก *A. comandoni* (T9) เพียง 3 ตำแหน่ง ดังแสดงในรูปที่ 20 จึงจัดได้ว่าไม่มีความแตกต่างกันของสายพันธุ์

ตัวอย่าง Ac_E13 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับ *A. hatchetti* (T11) จากการเปรียบเทียบพบว่ามีเบสที่เปลี่ยนไปในบางตำแหน่ง โดยมีอัตราความเหมือนกันกับจีโนไทป์ T11 คิดเป็นร้อยละ 96.5 ส่วนบริเวณ DF3 พบว่ามีความหลากหลายมากกว่าบริเวณอื่น ดังแสดงในรูปที่ 21

จากแขนงบนสุดของ phylogenetic tree พบ 39 โคลน ที่มีความใกล้เคียงกับจีโนไทป์ T4 ด้วยค่าความเชื่อมั่นที่ต่างกัน *Acanthamoeba* ที่พบในกลุ่มนี้จึงมีความหลากหลายสูง สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ถึง 13 กลุ่ม จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มย่อยนี้เปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง U07416 จะพบบริเวณที่เป็น variable region ทั้งหมด 4 บริเวณ บริเวณแรกอยู่ในช่วงลำดับเบสตำแหน่งที่ 266 -300 บริเวณที่ 2 อยู่ในตำแหน่งที่ 792-813 บริเวณที่ 3 อยู่ในตำแหน่งเบสที่ 1306-1361 ซึ่งตรงกับบริเวณ DF3 และบริเวณที่ 4 ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1935-1972 ดังแสดงในรูปที่ 22 จากตัวอย่างทั้ง 39 โคลนนี้จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความสามารถในการก่อโรคได้และมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์มากในบริเวณ DF3 ดังแสดงในรูปที่ 23 การศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนนี้จึงมีความสำคัญ เมื่อพิจารณาในส่วนดังกล่าวนี้สามารถแบ่งกลุ่มตามความคล้ายคลึงของลำดับเบสได้ 5 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ Ac_F2, Ac_PCS12, Ac_PCN12a, Ac_PCN12b, Ac_PCN12c และ Ac_PCN12d

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ Ac_E5a, Ac_E5b, Ac_F1b, Ac_F1c, Ac_F1d และ Ac_E4c

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ Ac_E4c และ Ac_F1e

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ Ac_E6a, Ac_E6d, Ac_E8b, Ac_E8c, Ac_E6e, Ac_E11, Ac_E6c, Ac_E8a, Ac_F3 และ Ac_E6b

กลุ่มที่ 5 ได้แก่ Ac_E12a, Ac_E12d, Ac_PCN3, Ac_E12c, Ac_E4b, Ac_E12b, Ac_E12d, Ac_E3, Ac_E4a, Ac_E4e, Ac_E7a, Ac_E7b, Ac_E10a, Ac_E10b และ Ac_E10c

อย่างไรก็ตามเมื่อทำวิเคราะห์ phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะในส่วน
ของบริเวณ DF3 จะพบว่าตัวอย่างโคลนที่มีลักษณะเทียบเคียงกับจีโนม T4 นั้นได้แยกกลุ่มออก
จากสายพันธุ์มาตรฐานด้วยค่าความเชื่อมั่นที่ 80 และแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มจากเดิม 13 กลุ่ม ดัง
แสดงในรูปที่ 24



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18. แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SSU rRNA gene ในกลุ่ม T7 และ T8 ของเชื้อ *Acanthamoeba* ที่ได้จากธรรมชาติ จุดหมายถึงเบสที่เหมือนกันในแต่ละตำแหน่ง ขีดหมายถึงการขาดหายไปของเบส อักษรย่อ Ac = *Acanthamoeba*

[] แสดงบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความหลากหลาย

แสดงบริเวณของ DF3, ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งลำดับเบสที่มีความแตกต่างออกเป็น 2 กลุ่มจากสายพันธุ์มาตรฐาน

#A.astronyxis_T7_AF019064	TCATATGCTT	GTCTCAAAGA	TTAAGCCATG	CATGTCTAAG	TATAAACTGA	TATTT---AT	ACGGTGAGAC	TGCGGATGCC	TCATTAATC	AGTTATAGTT	TATTTGATGG	TCCTTTTFTT	TTTTT--ACT	ACTTGATAA	CCGTGGTAAT
#A.tubiashi_T8_AF019065
#Ac_E1a
#Ac_E9a
#Ac_E9b
#Ac_E1b
#Ac_E1c
#A.astronyxis_T7_AF019064	TCTAGAGCTA	ATACATGCGT	AAGGTCCGGA	CCTGCCGCC--	-----	--GTGTGGGT	GTTCA-----	---CGCACTT	-GGCGCGGTT	TTGCTGGAAA	GGGATGTATT	TATTAGGTAA	AAAAACCGGC	GCGGCACTTC	TCTCTCGGGA
#A.tubiashi_T8_AF019065
#Ac_E1a
#Ac_E9a
#Ac_E9b
#Ac_E1b
#Ac_E1c
#A.astronyxis_T7_AF019064	GGGGTGTCTA	CAAATGCAGT	TTTTCTCTTC	TTTCTTGGGG	GGGGAGAGCT	GATCTCTGGT	GATTCATAGT	AACTCTTTCC	GATCGCAATT	TAC-ACAGCC	GCCTCGTCGC	AAGGCGGGGC	GGCGGCGACG	ATTCATTCAA	ATTTCTGCCC
#A.tubiashi_T8_AF019065
#Ac_E1a
#Ac_E9a
#Ac_E9b
#Ac_E1b
#Ac_E1c
#A.astronyxis_T7_AF019064	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGAGGCC	ACCATGCTCG	TAACGGGTAA	CGGAGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA	ATGGCTACCA	CTTCTAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAAAT	ACCCAATCCC	GACACGGGGA
#A.tubiashi_T8_AF019065
#Ac_E1a
#Ac_E9a
#Ac_E9b
#Ac_E1b
#Ac_E1c
#A.astronyxis_T7_AF019064	GGTAGTGACA	ATAAATAACA	ATACAGGTCT	CGACAAGAGT	CTTGTAAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAACC	CCTTAACGAG	TAACAATTGG	AGGGCAAGTC	TG-GTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATTCACGCT	CCAATAGCGT	ATATTAAGT
#A.tubiashi_T8_AF019065
#Ac_E1a
#Ac_E9a
#Ac_E9b
#Ac_E1b
#Ac_E1c
#A.astronyxis_T7_AF019064	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGGATT	TAGGGGCGAC	ACCGTCTTTC	GTGTCTGCA	CGTCCGCCAC	CCGGTCTCTC	TCTTTTTC	CTCAGCGGC	GGCGGGGTCA	TACCCGTTT	TTCCTGGGG	GGGGGGGGA	GTGCTGTGCC
#A.tubiashi_T8_AF019065
#Ac_E1a
#Ac_E9a
#Ac_E9b
#Ac_E1b
#Ac_E1c


```

#A.astronyxis_T7_AF019064 GGAGTGATTT GTCTGGTTAA TTCGGTTAAC GAACGAGACC TTAACCTGCT AAATAGCCGC GCTCATCCTT GGCCATCCAA AGCCCCGATG TGTCTTTTTA AACGGCCTGC GCGTGGTTCT TTGTCCTGT TTGCCAGCA ATGGCGCGCA
#A.tubiashi_T8_AF019065 .....T.....TG.....A.....
#Ac_E1a .....C.....G.GG.C.TG..T-----A...
#Ac_E9a .....C.....G.GG.C.TG..T-----A...
#Ac_E9b .....C.....G.GG.C.TG..T-----A...
#Ac_E1b .....C.....G..C.TG..T-----A...
#Ac_E1c .....T.....C.....G.GG.C.TG..T-----A...

#A.astronyxis_T7_AF019064 AGCAAAATG TTTGGCGGA GGGCAGGCC CATGGCGCGC GTGCATGTGC GGGTGGTCGG ATGGCGCTTC TCGCCTCTT AGAGGGACTG TCTGCGCTTA GCAGACGGAA GTTTGAGGCA ATAACAGTCT TGTGATGCC TTAGATGTTT
#A.tubiashi_T8_AF019065 .....A.T..G-----CA.....
#Ac_E1a .....T..A..C A.C.....
#Ac_E9a .....T..A..C A.C.....
#Ac_E9b .....T..A..C A.C.....
#Ac_E1b .....T..A..C A.C.....C.....
#Ac_E1c .....T..A..C A.C.....

#A.astronyxis_T7_AF019064 TGGGCCGCAC GCGCGCTACA CTGATTAATT CAACGAGTTC CACTGCGCTT GTCGTTTTTT GGGTGGG?CG TC---GTGCT TCGGTCGCAA GGCTGA-GGT GCGGCCTC-T GCCTGGG---CGGGCGCG CTCGTCCCTG GGCCGATAGG
#A.tubiashi_T8_AF019065 .....G.CG.....G.....CT.....G.....G.....
#Ac_E1a .....C.C.CTT.TCTC.A.TTGG.G.GC.T.....GGTT.C.T.T..GGG.AGC..GAG G-.....
#Ac_E9a .....C.C.CTT.TCTC.A.TTGG.G.GC.T.....GGTT.C.T.T..GGG.AGC..GAG G-.....
#Ac_E9b .....C.C.CTT.TCTC.A.TTGG.G.GC.T.....GGTT.C.T.T..GGG.AGC..GAG G-.....
#Ac_E1b .....C.C.CTT.TCTC.A.TTGG.G.GC.T.....GGTT.CTT.T..GGG.AGC..GGG GG-.....
#Ac_E1c .....C.C.CTT.TCTC.A.TTGG.G.GC.T.....GGTT.C.T.T..GGG.AGC..GAG G-.....

#A.astronyxis_T7_AF019064 TCTGGGTAAT CTTTGTGAAA TTTAATCGTG CTGGGGATAG ATCATTGTAA TTATTGATCT TCAACGAGGA ATTCTAGTA AGCGCGAGTC ATCAGCTCGC GTTGATTACG TCCCTGCCCT TTGTACACAC CGCCCGTCGC TCCTACCGAT
#A.tubiashi_T8_AF019065 .....
#Ac_E1a .....
#Ac_E9a .....
#Ac_E9b .....
#Ac_E1b .....
#Ac_E1c .....

#A.astronyxis_T7_AF019064 TGAATGGTCC GGTGAAATCC CCGGAGCC?T GGCCCTCTCTG TCACCCAGGG GTCTTTCCCC TTTGGCTTC CCTTTACGGG GGGGCCATTT GGGAGCATGG GGGTTTTCTG TTGAGAGGCC TCT-ATCAGG CGAAGCCGAT TGAACCTTAC
#A.tubiashi_T8_AF019065 .....T.....AC.CT..C.T.TC.C.....G.....-C.....-G.....
#Ac_E1a .....T.....-C.C.C...T C.....G T...C..C..CA.....G.AGG...-C.....G....T.T.....
#Ac_E9a .....T.....-C.C.C...T C.....G T...C..C..CA.....G.AGG...-C.....G....T.T.....
#Ac_E9b .....T.....-C.C.C...T C.....G T...C..C..CA.....G.AGG...-C.....G....T.T.....
#Ac_E1b .....T.....-C.C.C...T C.....C.G T...C..C..CA.....A.G.G.G...-C.....G....T.T.....
#Ac_E1c .....T.....-C.C.C...T C.....G T...C..C..CA.....G.AGG...-C.....G....T.T.....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 19. แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SSU rRNA gene ในกลุ่ม T10 ของเชื้อ *Acanthamoeba* ที่ได้จากผู้ป่วย จุดหมายถึงเบสที่เหมือนกันในแต่ละตำแหน่ง ชีดหมายถึงการขาดหายไปของเบส อักษรย่อ Ac = *Acanthamoeba*

แสดงบริเวณของ DF3

#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	TCATATGCTT GTCTCAAAGA TTAAGCCATG CATGTCTAAG TATAAGCTTG TTTATACGGC GAGACTGCGG ATGGCTCATT AAATCAGTTA TAGTTTATTT GATGGTCTCT TTA	CTTTG TCAGAGTTAC CCTACTTGGG TAACCGTGGT
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	AATTCTAGAG CTAATACATG CGCAAGGTCC CGAGCGCGGG GCAAAGGAGT GTAAAAAGCT TCTTTGTCTG TCATTCAGTG CAGAGGGATG TATTTATTAG GTTAAAAACC AGCACACTTT ATCAAACTGG TGATTCATAA TA	ACTCTTTC
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	GGATCGCATA TTAATATCC TCCTTGTGAG GATGGCGACG ATTCATTCAA ATTTCTGCCC TATCAACTTT CGATGGTAGG ATAGAGGCTT ACCATGGTCG TAACGGGTAA CGGAGAATTA GGGTTCGATT CCGGAGAGGG AGCCTGAGAA	
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	ATGGCTACCA CTCTAAGGA AGGCAGCAGG CGCGCAAATT ACCCAATCCC GACACGGGGA GGTAGTGACA ATAAAATAAC AATACAGGCG CTCGACAAGA GTCTTGAAT TGGAAATGAGT ACAATTTAAA CCCCTTAACG AGTAACAATT	
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	GGAGGGCAAG TCTGGTGCCA GCAGCCGCGG TAATCCAGC TCCAATAGCG TATATTAAG TTGTTGCAGT TAAAAAGCTC GTAGTTGGAT TTAGGGATGC GCAATTCATT TTTTAATGAC GNNTCTYNN	TTTGTCTTT ATGTCAAAGT
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	AAAGGCAAAA AATGAGATGT TGTGGGCTCG GTCCACTGGA GGACCAGTGT GTCGCGGCC CACCCATCCC CTCCTCTGCG ATTCCCATT	CTGTATTGA GTTAGTGGG ATGTCACAG GAATTGATAG TCATCGCAAG GTGATTATGA
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	ATTCCTGGGG CCCAGATCGT TTACCGTGAA AAAATTAGAG TGTTCAAAGC AGGCAGATTT AACCATCTCT CCACCAATA CATTAGCATG GGATAATGAA ATAGACCCTT GTCCTCCTAT TTACGTGTTG GTTTTTGAGG ACCAGGGTAA	
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	TGATTAATAG GGATAGTTGG GGGCATTAA ATTTAATTGT CAGAGGTGAA ATTCTTGGAT TTATGAAAGA TTAACCTCTG CGAAAGCATC TGCCAAGGAT GTTTTCATTA ATCAAGAACG AAAGTTAGGG GATCGAAGAC GATCAGATAC	
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	CGTCGTAGTC TTAACCATAA ACGATGCCGA CCAGCGATTA GGAGACGTTG AATACAAAAC ACCATCCATT TAGCAYGGTC GTTTTCAAAT ATTCCTTTTT GCGAAGGTTG TTTGGGAACG ATTCGTCCTG ATGGATCTGG TGAATGACTC	
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	CCCTAGCAGC TTGTGAGAAA TCATAAGTCT TTGGGTTCCG GGGGGAGTAT GGTGCAAGG CTGAAACTTA AAGGAATTGA CGGAAGGGCA CCACCAGGAG TGGAGCCTGC GGCTTAATTT GACTCAACAC GGGGAAACTT ACCAGGTCCG	
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	GACATAGTAA GGATTGACAG ATTGATAGCT CTTTCTTGAT TCTATGGGTG GTGGTGCATG GCCGTTCTTA GTTGGTGGAG TGATTTGTCT GGTTAATTC	GTTAACGAAC GAGACCTTAA CCTGCTAAAT ATGCCCGCTT AACCCGTCCA
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	TCAAAA-CCC ATACGTGGCC TTTGAGATCC GCTGCATTAG TGATGAGGCG CGTTCGCGCG CGCTTTATCA TTAGTCCCGC CTGGTCCAG GTGCGTATGG CCGGTAGGGT TCGGCGTTTG TGCTTCTTAG AGGGACT-CT GCGCCTAGT	
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	CAGCGGAAGT TTGAGGCAAT AACAGTCTG TGATGCCCTT AGATGTTCTG GGCCGCACGC GCGCTACACT GATTAATTCA ACGAGTCCGC TTCAATCGAG CCGTAGATTA GTTTTGTTTT GGTAACACAA ACAAGACTAT TTCTGCTGTC	
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	CTTGATCGCG CCTGGGCCGA TAGGTCTGGG TAATCTTTGC AAATTTAATC GTGCTGGGGA TAGATCATTG TAATTATTGA TCTTCAACGA GGAATTCCTA GTAAGCGCGA GTCATCAGCT CGCGTTGATT ACGTCCCTGC CCTTTGTACA	
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	CACCGCCCGT CGCTCCTACC GATTGAATGG TCCGGTGAAA TCCTCGGAGC CGTGGCCTCT AYGCAATCCG GGCAACCGGG TTGTGAGGTC GTGGGTGGCT TGAGAGTGGC AACACTCTTA GGTGCCCTG CCGGTAAG TCGATTGAAC	
#A.culbertsoni_T10_AF019067 #Ac_PCN4	CTTACCATT AGAGGAAGGA GAAG	

รูปที่ 20. แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SSU rRNA gene ในกลุ่ม T9 ของเชื้อ *Acanthamoeba* ที่ได้จากธรรมชาติ จุดหมายถึงเบสที่เหมือนกันในแต่ละตำแหน่ง ขีดหมายถึงการขาดหายไปของเบส อักษรย่อ Ac = *Acanthamoeba*

แสดงบริเวณของ DF3

#A.comandoni_T9_AF019066	TCATATGCTT	GTCTCAAAGA	TTAAGCCATG	TATGTCTAAG	TATAAACTGA	ATTTATACGG	TGAGACTGTG	GATGGCTCAT	TAAATCAGTT	ATAGTTTATT	TGATGGTCTT	TTTTTTTCTT	TTTTACTACT	TGGATAACTG	TGGTAATTCT
#Ac_E2a	C.....
#Ac_E2b	C.....	G.....
#Ac_E2c	C.....
#A.comandoni_T9_AF019066	AGAGCTAATA	CATGTGTAAG	GTCCTGATCT	GCCTGG--T	TTTTTGTTTC	ATTGTGTACC	AGTGTGTTG	CACTGGTGCA	CAGGTGGGCC	TTTGGTAGAA	AGGGATATAT	TTATTAGGTA	AAAAAACCCAG	TGTGGCATT	CCCTTCGTGG
#Ac_E2a
#Ac_E2b
#Ac_E2c
#A.comandoni_T9_AF019066	GGAAGTGTCT	ACAAATGTGG	CCCCTGCGG	GGCCGSTCTC	TGGTGATTCA	TAGTAACTCT	TTCGGATCGC	AATTTAACAA	TATAGTCGCC	TCGTTGCAAG	GCGGGGCGGT	GGTGATGATT	CATTCAAAT	TCTGCCCTAT	CAACTTTCGA
#Ac_E2a
#Ac_E2b
#Ac_E2c
#A.comandoni_T9_AF019066	TGGTAGGATA	GAGGCTTACC	ATGATTGTAA	TGGATAATGG	AGAATTAGGG	TTTGATTCTG	GAGATGGAGC	CTGAGAAATG	GCTACCACCT	CTAAGGAAGG	CAGCAGGTGT	GCAAATTACC	CAATCCCAC	ACGGGGAGGT	AGTGACAATA
#Ac_E2a
#Ac_E2b
#Ac_E2c
#A.comandoni_T9_AF019066	AATAACAATA	CAGGTCTTGA	CAAGAGTCTT	GTAATTGGAA	TGAGTACAAT	TTAAACCCTT	TAATGAGTAA	CAATTAGAGG	GCAAGTCTGG	TGCCAGCAGC	TGCGGTAATT	CCAGTCCAA	TAGTGTATAT	TAAAGTTGTT	GCAGTTAAAA
#Ac_E2a
#Ac_E2b
#Ac_E2c
#A.comandoni_T9_AF019066	AGCTTGTAGT	TGGATTTAGG	GATGACACCG	TCTTCTGTGT	GTGCCGTGGT	GGCGCTTGCT	CAGGCTT--C	TGCCTGGGCA	GGCGTGCATG	TGGTGCATGC	AAGGGTGCCT	GCTTTCAGTG	TGCAAGGTGA	CTTGACATG	GCATGAGGAG
#Ac_E2a
#Ac_E2b
#Ac_E2c
#A.comandoni_T9_AF019066	AGCTTGGTCC	GCTACTCTAC	CATTGTGCAT	GCAGTAAAG	GTGCATTGTG	TGCAGTTGGG	G-TGTGCACT	GGCCTGCCTG	CTCCCTCCTT	CTGGATTCTT	GTCCTCAGTA	TTTGGCTATT	AACTTAGCCC	TAGGGGCACC	TAGGGCAGTG
#Ac_E2a
#Ac_E2b
#Ac_E2c
#A.comandoni_T9_AF019066	TGTGCCTAAA	CAGTGTGCAT	TTTCTGGGG	CATCTGTGTC	TTTGTGATGC	CAGGTGTTGG	AGCCCGAATT	GTTTACTGTG	AAAAAATTAG	AGTGTTCAAA	GCAGGCAGAT	ATTTC--ATA	CTGCCACTGA	ATACATTAGC	ATGGGATAAT
#Ac_E2a
#Ac_E2b
#Ac_E2c
#A.comandoni_T9_AF019066	GGAATAAGAC	CTTGTCTTTT	ATGTTTTTGTG	TTGGTTGTGC	CATGTGCATG	CACTTCGCGG	TGTGTGCATG	TGGCATGGTT	TTGTCTAAAG	GAGGACCAGG	GTAATGATTA	ATAGAGATAG	TTGGGGGCAT	TAATATTTAA	TTGTCAGAGG
#Ac_E2a
#Ac_E2b
#Ac_E2c

```

#A.comandoni_T9_AF019066 TGAAATTCTT GGATTATGA AAGATTAAC TCTGCGAAA CATCTGCCAA GGATGTTTT ATTAATCAAG AACGAAAGTT AGGGGATCGA AGACGATTAG ATACCCTCGT AGTCTTAACC ATAAACCATG CCGACCAGCG ATTGGGAGAC
#Ac_E2a .....
#Ac_E2b .....
#Ac_E2c .....

#A.comandoni_T9_AF019066 GTTTCACACG GGGGTGGTCC CCATGGGGAG AGTGCCTGGG GGTGGCCGCT TCATGCGGTG GCCTCCTCGC CTTTCCTTTT GGGGGGCTGC TOCCACTAAA GGATGACTCC CCCAGCAGCT TGTGAGAAAT CATCAAGTCT TTGGGTCCCG
#Ac_E2a .....
#Ac_E2b .....
#Ac_E2c .....

#A.comandoni_T9_AF019066 GGGGAGATG GGTGCAAGG CTGAAACTTA AAGGAATTGA CGGAAGGGCA CCACCAGGAG TGGAGCTGCG GGCTTAATTT GACTCAACAC GGGGAAACTT ACCAGTCCG GACATAGTAA GGATTGACAG ATTGATAGCT CTTTCTTGAT
#Ac_E2a .....
#Ac_E2b .....
#Ac_E2c .....

#A.comandoni_T9_AF019066 TCTATGGGTG GTGGTGCATG GCCGTTCTTA GTTGGTGGAG TGATTTGTCT GGTTAATTCC GTTAACGAAC GAGACCTTAA CCTGTAAAT AGCCGCGCTC ATCCTTGGCC ATCCAAAGCC CGCGTATGTT TTTAATACG GTCTGC-CGT
#Ac_E2a .....
#Ac_E2b .....
#Ac_E2c .....

#A.comandoni_T9_AF019066 GGCCGCCTCT CCGCTGCGTC CAAAAGCGCA --GCGGGCGG GCGGCCATGG CCGCGGTGCA TGCGCGGGTG GTCGGATGG- CGTCTGCGCT TCTTAGAGGG ACTGTCTGCG CTTAGCAGAC GGAAGTTTGA GGCAATAACA GGTCTGTGAT
#Ac_E2a .....
#Ac_E2b .....
#Ac_E2c .....

#A.comandoni_T9_AF019066 GCCCTTAGAT GTTCTGGGCC GCACGCGCGC TACACTGATT AATTCAACGA GTTCCACTGC GCTTTGTCTG GCGCGTTGGC CGTCTGCTG ---TGCTCGG TCGCAAGACC GGGTGCGGTG CGCGC--GGT TGGCGCTGCG GCGGCGCTCG
#Ac_E2a .....
#Ac_E2b .....
#Ac_E2c .....

#A.comandoni_T9_AF019066 TCCCTGGGCC GATAGTCTG GGTAACTTTT GTGAAATTTA ATCGTGCTGG GGATAGATCA TTGTAATTAT TGATCTTCAA CGAGGAATTC CTAGTAAGCG CGAGTCATCA GCTCGCGTTG ATTACGTCCC TGCCCTTTGT ACACACCGCC
#Ac_E2a .....
#Ac_E2b .....
#Ac_E2c .....

#A.comandoni_T9_AF019066 CGTCGCTCCT ACCGATTGAA TGGTCCGGTG AAATCCCCGG AGCCTGGCCT CTCTGTCACC CAGTGTCCC TTTCTCTCTC TTCCTTCGCG GGTGGAGGGG GAGGGCCACT GTTGAGAGGC CTCITTCAGG CGAAGCCGAT TGAACCTTAC
#Ac_E2a .....
#Ac_E2b .....
#Ac_E2c .....

#A.comandoni_T9_AF019066 CATTTAGAGG AAGGAGAAG
#Ac_E2a .....
#Ac_E2b .....
#Ac_E2c .....

```

รูปที่ 21. แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SSU rRNA gene ในกลุ่ม T11 ของเชื้อ *Acanthamoeba* ที่ได้จากธรรมชาติ จุดหมายถึงเบสที่เหมือนกันในแต่ละตำแหน่ง ชีดหมายถึงการขาดหายไปของเบส อักษรย่อ Ac = *Acanthamoeba*

แสดงบริเวณของ DF3

#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	TCATATGCTT	GTCCTCAAAGA	TTAAGCCATG	CATGTCTAAG	TATAAGCTTG	TTTATACGGC	GAGACTGCGG	ATGGCTCATT	AAATCAGTTA	TAGTTTATTT	GATGCTCTCT	TTTCTATATT	--TTACCTAC	TTGGATAACC	GTGGTAATTC
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	TAGAGCTAAT	ACATGCGCAA	GGTCCCAGC	GCGAGGGGCG	GGGTCTCACA	AGGATCTCGT	CCCTGCATGC	GCAGAGGGAT	GTATTTATTA	GGTTAAAAAC	CAGCAGCGTC	AGCAATGGCG	TTTCA-CACA	ACTGGTGATT	CATAGTAACT
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	CTTTCGGATC	GCATTGATGT	CCTCCTTGTG	GGGACGGCGA	CGATTCAATC	AAATTTCTGC	CCTATCAACT	TTCGATGSTA	GGATAGAGGC	CTACCATGGT	CGTAACGGGT	AACGGAGAAT	TAGGGTTCGA	TTCCGGAGAG	GGAGCCTGAG
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	AAATGGCTAC	CACTTCTAAG	GAAGGCAGCA	GCGCGCAAA	TTACCCAATC	CCGACACGGG	GAGGTAGTGA	CAATAAATAA	CAATACAGCC	GCTCGATAAG	AGTCTTGTA	TTGGAATGAG	TACAATTTAA	ACCCCTTAAC	GAGTAACAAT
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	TGGAGGGCAA	GTCGTGGTCC	AGCAGCCCGC	GTAATCCAG	CTCCAATAGC	GTATATTA	GTTGTTGCAG	TTAAAAAGCT	CGTAGTTGGA	TCTAGGGACG	CGCATTTCAA	CGCTCCGCAC	TATCGGGTCA	AACCGGTAGT	GCCT-GCCGT
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	TGCGGGCTCG	GTCGGTTGGT	GCCCACTAAA	GCATCAGCGT	GTCAACCGCC	CGGCCCTGCC	CCTCCTTCTG	GATTCGCCGT	CCTGCTATTG	AGTTAGTGGG	GACGTCACAG	GGGGTCCATC	GTCGGTACG	AATGGCCGGC	GGTGGATCCC
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	TGGGGCCAG	ATCGTTTACC	GTGAAAAAAT	TAGAGTGTTG	AAAGCAGGCA	GATCCAATTT	TCTGCCACCG	AATACATTAG	CATGGGATAA	TGGAATAGGA	CCCTGTCTCT	CTATTTTTCAG	TTGGTTTTGG	CACGCGAGGA	CCAGGGTAAT
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	GATTAATAGG	GATAGTTGGG	GGCATTAAATA	TTTAATTGTC	AGAGGTGAAA	TTCTTGGATT	TATGAAAAGAT	TAAGTCTGTC	GAAAGCATCT	GCCAAGGATG	TTTTCAATTA	TCAAGAACGA	AAGTTAGGGG	ATCGAAGACG	ATCAGATACC
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	GTCGTAGTCT	TAACCATAAA	CGATGCCAGC	CAGCGATTAG	GAGACGTTGA	ATACAAAACA	CCACCATCGG	TGCGGTGCTC	CTTGGCGC--	GTCGTGGCTT	G--CTGCGGC	--GTGCGAGG	GCGGTTTAGC	CTGATGG-CA	TCCGGTGAATG
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	ACTCCCTAG	CAGCTTGTGA	GAAATCATAA	GTCTTTGGGT	TCCGGGGGGA	GTATGGTCCG	AAGGCTGAAA	CTTAAAGGAA	TTGACGGAA	GGCACACAGG	GAGTGGAGCC	TGCGGCTTAA	TTTACTCAA	CACGGGGAAA	CTTACCAGGT
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	CCGGACATAG	TAAGGATTGA	CAGATTGATA	GCTCTTCTCT	GATTCATATG	GTGGTGGTGC	ATGGCCGTTT	TAGTTGGTG	GAGTGATTG	TCTGGTTAAT	TCCGTTAACG	AACGAGACCT	TAACCTGCTA	AATATGCCGC	GCTAACCCTG
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	CCATCAAAC	CCATGCGCG	CTCACGCGGT	CGCTGCGAG	ACAGTCCCGC	CTCGCGGTG	TGCTGTTCTG	CGCGCAGGGC	CGGGCTCTGT	GTGGGCGGTA	GGGTTCCGGC	TCCGTGCTTC	TTAGAGGGAC	TGCTGCGCGC	CTAGCCAGCG
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	GAAGTTTGAG	GCAATAACAG	GTCTGTGATG	CCCTTAGATG	TTCTGGGCGC	CAGCGCGGCT	ACACTGATTA	ATCCAACGAG	TCCGCTTCAA	TTGAGGCCGT	-AGCCGTGTG	TGGGGTCAA	CCCATGCGCG	GTCTG---C	TGCTCTCGAT
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	CGCGCCTGGG	CCGATAGGTC	CGGGTAATCT	TTGCAAATTT	AATCGTGCTG	GGGATAGATC	ATTGTAATTA	TTGATCTTCA	ACGAGGAATT	CCTAGTAAGC	GCGAGTCATC	AGCTCGCGTT	GATTACGTCC	CTGCCCTTTG	TACACACCCG
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	CCGTGCTGCC	TACCGATTGA	ATGGTCCGGT	GAAATCCTCG	GAGCCGTGGC	CTCTACGCAA	TCCGGGCAAC	CGGGTTGTGA	GGTCTCCCCC	ATTTGGCGGC	GAAGTCGATT	GAACCTTACC	ATTTAGAGGA	AGGAGAAGTC	GTAACAAGGT
#A.hatchetti_T11_AF019068 #Ac_E13	CTCCGCTAG														

รูปที่ 22. แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SSU rRNA gene ในกลุ่ม T4 ของเชื้อ *Acanthamoeba* ที่ได้จากธรรมชาติและผู้ป่วย จุดหมายถึงเบสที่เหมือนกันในแต่ละตำแหน่ง ขีดหมายถึงการขาดหายไปของเบส อักษรย่อ Ac = *Acanthamoeba*

[] แสดงบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความหลากหลาย

แสดงบริเวณของ DF3

```

#A.castellanii_T4_U07416 TCCTGCCAGT AGTCATATGC TTGTCTCAAA GATTAAGCCA TGCATGTCTA AGTATAAGCT TGTTTATACG GCGAGACTGC GGATGGCTCA TAAATCAGT TATAGTTTAT TTGATGGTCT CTTTGTCTT TTTT---AC CTA CTACTGGAT
#Ac_F2 .....
#Ac_PCS12 .....
#Ac_PCN12a .....
#Ac_PCN12b .....
#Ac_PCN12c .....
#Ac_PCN12d .....
#Ac_E5a .....
#Ac_E5b .....
#Ac_F1b .....
#Ac_F1c .....
#Ac_F1d .....
#Ac_E4c .....
#Ac_F1a .....
#Ac_F1e .....
#Ac_E6a .....
#Ac_E6d .....
#Ac_E8b .....
#Ac_E8c .....
#Ac_E6e .....
#Ac_E11 .....
#Ac_E6c .....
#Ac_E8a .....
#Ac_F3 .....
#Ac_E6b .....
#Ac_E12a .....
#Ac_E12d .....
#Ac_PCN3 .....
#Ac_E12c .....
#Ac_E4b .....
#Ac_E12b .....
#Ac_E4d .....
#Ac_E3 .....
#Ac_E4a .....
#Ac_E4e .....
#Ac_E7a .....
#Ac_E7b .....
#Ac_E10a .....
#Ac_E10b .....
#Ac_E10c .....

```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


```

#A.castellanii_T4_U07416 TGGTGATTCA TAGTAACTCT TTCGGATCGC ATTCATGTCC TCCTT-GTGG GGACGGCGAC GATTCATTCA AATTCTGCC CTATCAACTT TCGATGCTAG GATAGAGGCC TACCATGGTC GTAACGGGTA ACGGAGAATT AGGGTTCGAT
#Ac_F2 .....C.....
#Ac_PCS12 .....C.....
#Ac_PCNI2a .....C.....
#Ac_PCNI2b .....C.....
#Ac_PCNI2c .....C.....
#Ac_PCNI2d .....C.....
#Ac_E5a .....C.....
#Ac_E5b .....C.....
#Ac_F1b .....C.....
#Ac_F1c .....C.....
#Ac_F1d .....C.....
#Ac_E4c .....C.....
#Ac_F1a .....C.....
#Ac_F1e .....C.....
#Ac_E6a .....C.....
#Ac_E6d .....C.....
#Ac_E8b .....C.....
#Ac_E8c .....C.....
#Ac_E6e .....C.....
#Ac_E11 .....C.....
#Ac_E6c .....C.....
#Ac_E8a .....C.....
#Ac_F3 .....C.....
#Ac_E6b .....C.....
#Ac_E12a .....G.....
#Ac_E12d .....A.....
#Ac_PCNI3 .....-.....
#Ac_E12c .....-.....
#Ac_E4b .....-.....
#Ac_E12b .....T.....
#Ac_E4d .....-.....
#Ac_E3 .....-.....
#Ac_E4a .....-.....
#Ac_E4e .....-.....
#Ac_E7a .....-.....
#Ac_E7b .....C.....
#Ac_E10a .....-.....
#Ac_E10b .....-.....
#Ac_E10c .....-.....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

#A.castellanii_T4_U07416 TCCGGAGAGG GAGCCTGAGA AATGGCTACC ACTTCTAAGG AAGGCAGCAG GCGCGCAAAT TACCCAATCC CGACACGGGG AGGTAGTGAC AATAAATAAC AATACAGGCG CTCGATAAGA GTCTTGTAAAT TGG-AATGAG TACAATTTAA
#Ac_F2 .....
#Ac_PCS12 .....
#Ac_PCN12a .....
#Ac_PCN12b .....
#Ac_PCN12c .....
#Ac_PCN12d .....
#Ac_E5a .....
#Ac_E5b .....A.....
#Ac_F1b .....
#Ac_F1c .....G.....
#Ac_F1d .....
#Ac_E4c .....
#Ac_F1a .....
#Ac_F1e .....
#Ac_E6a .....
#Ac_E6d .....
#Ac_E8b .....
#Ac_E8c .....
#Ac_E6e .....
#Ac_E11 .....
#Ac_E6c .....
#Ac_E8a .....
#Ac_F3 .....
#Ac_E6b .....C.....G.....
#Ac_E12a .....G.....
#Ac_E12d .....G.....
#Ac_PCN3 .....
#Ac_E12c .....
#Ac_E4b .....
#Ac_E12b .....
#Ac_E4d .....
#Ac_E3 .....
#Ac_E4a .....
#Ac_E4e .....G.....
#Ac_E7a .....
#Ac_E7b .....
#Ac_E10a .....
#Ac_E10b .....
#Ac_E10c .....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

#A.castellanii_T4_U07416 ACCCCCTTAA- CGAGTAACAA TTGGAGGGCA AGTCTGGTGC CAGCAGCCGC GGTAATTCCA GCTCCAATAG CGTATATTAA AGTTGTTGCA GTTAAAAAGC TCGTAGTTGG ATCTAGGGAC GCGCATTCA AGCGCCCGTG TCGTCGGGTC
#Ac_F2 ..... C.A.....
#Ac_PCS12 ..... C.A.....
#Ac_PCN12a ..... C.A.....
#Ac_PCN12b C..... C.A.....
#Ac_PCN12c ..... C.A.....
#Ac_PCN12d ..... C..... C.A.....
#Ac_E5a .....
#Ac_E5b .....
#Ac_F1b ..... A..... A.....
#Ac_F1c .....
#Ac_F1d ..... A.....
#Ac_E4c ..... C.A.....
#Ac_F1a .....
#Ac_F1e ..... C.....
#Ac_E6a ..... C.A.....
#Ac_E6d ..... C.A.....
#Ac_E8b ..... C.A.....
#Ac_E8c ..... G..... C.A.....
#Ac_E6e .....
#Ac_E11 .....
#Ac_E6c ..... A..... G.....
#Ac_E8a .....
#Ac_F3 ..... C.....
#Ac_E6b .....
#Ac_E12a ..... T.....
#Ac_E12d ..... T.....
#Ac_PCN3 ..... T.....
#Ac_E12c ..... T.....
#Ac_E4b ..... T.....
#Ac_E12b ..... T.....
#Ac_E4d ..... T.....
#Ac_E3 ..... T.....
#Ac_E4a ..... A..... T.....
#Ac_E4e ..... T.....
#Ac_E7a ..... T.....
#Ac_E7b ..... T.....
#Ac_E10a ..... T.....
#Ac_E10b ..... T.....
#Ac_E10c ..... T.....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

#A.castellanii_T4_U07416 AAACCGGCGA CTGCGTTGGC GTTGC GGCTC CGTCCGTCG GTGGACCCCTC GT-GGTCTTA ATCGSCGTGT CAACCGGCC CCCTGCCCTC TCCTTCTGGA TTCCCGTTCC TGCTATTGAG TTAGTGGGGA CGTCACAGGG GGCTCATCGT
#Ac_F2 .....T.G ..... .CC.A.---AAAAGC. .... .C.....
#Ac_PCS12 .....T.G ..... .CC.A.---AAAAGC. .... .C.....
#Ac_PCN12a .....T.G ..... .CCTA.---AAAAGC. -.T..... .TC.....
#Ac_PCN12b .....T.G ..... .CC.A.---AAAAGC. .... .C.....
#Ac_PCN12c .....T.G ..... .CCTA.---AAAAGC. -.T..... .TC.....
#Ac_PCN12d .....T.G ..... .CCTA.---AAAAGC. -.T..... .TC.....
#Ac_E5a ..... .CC.AT. AA-AAAAGC. .... .TC.....
#Ac_E5b ..... .CC.AT. AA-AAAAGC. .... .TC.....
#Ac_F1b ..... .CC.AT. AA-AAAAGC. .... .TC.....
#Ac_F1c ..... .CC.AT. AA-AAAAGC. .... .TC.....
#Ac_F1d ..... .CC.AT. AA-AAAAGC. .... .TC.....
#Ac_E4c .....T.G ..... .CC.A.---AAAAGC. .... .TC.....
#Ac_F1a ..... .C..... .CCTA.---AAAAGC. .... .G..... .C.....
#Ac_F1e ..... .CCTA.---AAAAGC. .... .C.....
#Ac_E6a .....T.G ..... .CCA.T---AAAAGC. -CT..... .C.....
#Ac_E6d .....T.G ..... .CCA.T---AAAAGC. -CT..... .C.....
#Ac_E8b .....T.G ..... .CCG.---AAAAGC. .... .C.....
#Ac_E8c .....T.G ..... .CCA.---AAAAGC. .... .C.....
#Ac_E6e .....C..... .CCA.---AAAAGC. -CT..... .C.....
#Ac_E11 ..... .CCA.---AAAAGC. -CT..... .C.....
#Ac_E6c ..... .CCA.---AAAAGC. -CT..... .C.....C.....
#Ac_E8a ..... .CCA.T---AAAAGC. .... .C.....
#Ac_F3 ..... .CCG.T---AAAAGC. .... .C.....
#Ac_E6b ..... .CCA.---AAAAGC. -CT..... .C.....
#Ac_E12a .....A..... .GT.C.A.A. A-AA.GGCC .CT.....
#Ac_E12d .....A..... .GT.C.A.A. A-AA.GGCC .CT.....
#Ac_PCN3 .....A..... .GT.C.A.A. A-AA.GGCC .CT.....
#Ac_E12c .....A..... .GT.C.A.A. A-AA.GGCC .CT.....
#Ac_E4b .....A..... .GT.C.A.A. A-AA.GGCC .CT.....
#Ac_E12b .....A..... .GT.C.A.A. A-AA.GGCC .CT.....
#Ac_E4d .....A..... .C.A.A. ACAA.GGCC .CT.....
#Ac_E3 .....A..... .GT.C.A.A. A-AA.GGCC .CT..... .TC.....
#Ac_E4a .....A..... .C.A.A. ACAA.GGCC .CT.....
#Ac_E4e .....A..... .C.A.A. ACAA.GGCC .CT.....
#Ac_E7a .....A..... .G.C.A.A. A-AA.GGCC .CT.....
#Ac_E7b .....A..... .C.A.A. A-AA.GGCC .CT.....
#Ac_E10a .....A..... .C.A.A. A-AA.GGCC .CT.....
#Ac_E10b .....A..... .C.A.A. A-AA.GGCC .CT.....
#Ac_E10c .....A..... .C.A.A. A-AA.GGCC .CT.....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

#A.castellanii_T4_U07416 CG-TCATGCA AATGG-CGGC GGTGGGTCCG TGGGGCCAG ATCGTTTACC GTGAAAAAT TAGAGTGTTC AAAGCAGGCA GATCCAATTT TCTGCCACCG AATACATTAG CATGGGATAA TGGAAATAGGA CCCTGTCCTC CTATTTTCAG
#Ac_F2 ..-.....A-.....T.....
#Ac_PCS12 ..-C.....-.....T.....
#Ac_PCN12a ..-C.....-.....T.....
#Ac_PCN12b ..-C.....-.....T.....
#Ac_PCN12c ..-C.....-.....T.....
#Ac_PCN12d ..-C.....-.....T.....
#Ac_E5a ..-.....-.....T.....
#Ac_E5b ..-.....-.....T.....
#Ac_F1b ..-.....-.....T.....
#Ac_F1c ..-.....-.....T.....
#Ac_F1d ..-.....-.....T.....
#Ac_E4c ..-.....-.....T.....
#Ac_F1a ..-.....-.....T.....
#Ac_F1e ..-.....-.....T.....
#Ac_E6a ..-.....-.....C.....
#Ac_E6d ..-.....-.....C.....
#Ac_E8b ..-.....-.....C.....
#Ac_E8c ..-.....-.....C.....
#Ac_E6e ..-.....-.....T.....C.....
#Ac_E11 ..-.....-.....C.....
#Ac_E6c ..-.....-.....C.....
#Ac_E8a ..-.....-.....C.....
#Ac_F3 ..-.....-.....G.....C.....
#Ac_E6b ..-.....-.....C.....
#Ac_E12a ..-..CA.....C.....
#Ac_E12d ..-..CA.....C.....
#Ac_PCN3 ..-..CA.....C.....
#Ac_E12c ..-..CA.....C.....
#Ac_E4b ..-..CA.....C.....
#Ac_E12b ..-..CA.....C.....
#Ac_E4d ..-..A..G.....C..G.....
#Ac_E3 ..-..G.....C.....
#Ac_E4a ..-..A..G.....C..G.....
#Ac_E4e ..-..A..G.....C..G.....
#Ac_E7a ..-..A..G.....C..G.....
#Ac_E7b ..-..A..G.....C..G.....G.....
#Ac_E10a ..-..A..G.....C..G.....
#Ac_E10b ..-..A..G.....C..G.....
#Ac_E10c ..-..A..G.....C..G.....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

#A.castellanii_T4_U07416 TTGTTTTGG CAGCGCGAGG ACTAGGGTAA TGATTAATAG GGATAGTTGG GGGCATTAAAT ATTTAATTGT CAGAGGTGAA ATTCTTGGAT TTATGAAAGA TTAACCTCTG CGAAAGCATC TGCCAAGGAT GTTTTCATTA ATCAAGAACG
#Ac_F2 .....
#Ac_PCS12 .....
#Ac_PCN12a .....
#Ac_PCN12b .....
#Ac_PCN12c .....
#Ac_PCN12d .....
#Ac_E5a .....
#Ac_E5b .....A.....C.....
#Ac_F1b .....
#Ac_F1c .....
#Ac_F1d .....
#Ac_E4c .....
#Ac_F1a .....
#Ac_F1e .....
#Ac_E6a .....
#Ac_E6d .....C.....
#Ac_E8b .....
#Ac_E8c .....A.....
#Ac_E6e .....
#Ac_E11 .....
#Ac_E6c .....
#Ac_E8a .....
#Ac_F3 .....
#Ac_E6b .....
#Ac_E12a .....
#Ac_E12d .....
#Ac_PCN3 .....
#Ac_E12c .....
#Ac_E4b .....GCGA.A.....
#Ac_E12b .....G.....
#Ac_E4d .....
#Ac_E3 .....
#Ac_E4a .....
#Ac_E4e .....
#Ac_E7a .....
#Ac_E7b .....
#Ac_E10a .....
#Ac_E10b .....
#Ac_E10c .....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


```

#A.castellanii_T4_U07416 AAAGTTAGGG GATCGAAGAC GATCAGATAC CGTCGTAGTC TTAACCATAA ACGATGCCGA CCAGC-GATT AGGAGACGTT GAATACAAAA CACCAC---C ATCGGC-GCG GTCGTCCTTG GCGTCTGTCC CTTTCAACGG GGGCAGGC9C
#Ac_F2 .....C---TG G.C.TC-AA AA..CA...
#Ac_PCS12 .....T-.....TG G.C.TC-AA AA..CA...
#Ac_PCN12a .....T-.....TG G.C.TC-AA AA..CA...
#Ac_PCN12b .....T-.....TG G.C.TC-AA AA..CA...
#Ac_PCN12c .....T-.....TG G.C.TC-AA AA..CA..G
#Ac_PCN12d .....T-.....TG G.C.TC-AA AA..CA..G
#Ac_E5a .....T-...A.....-T-G G.C.TGCAAA A..CA..-G
#Ac_E5b .....T-...A.....-T-G G.C.TGCAAA A..CA..-G
#Ac_F1b .....T-...A.....-T-G G.C.TGCAAA A..C..CG
#Ac_F1c .....T-...A.....-T-G G.C.TGCAAA A..CA..-G
#Ac_F1d .....T-...A.....-T-G G.C.TGCAAA A..CA..-G
#Ac_E4c .....T-...A.....-T-G G.C.TC-AA AA..CA..-G
#Ac_F1a .....T-...A.....-T-G G.C.TC-AA AA..CA...
#Ac_F1e .....T-...A.....-T-G G.C.TC-AA AA..CA...
#Ac_E6a .....T-...T.....-G G...G--- --C...
#Ac_E6d .....T-...T.....-G G...G--- --C...
#Ac_E8b .....T-...T.....-G G...G--- --C...
#Ac_E8c .....T-...T.....-G G...G--- --C...
#Ac_E6e .....T-...CT..T.....-G G...G--- --C...
#Ac_E11 .....T-...CT..T.....-G G...G--- --C...
#Ac_E6c .....T-...CT..T.....-G G...G--- --C...
#Ac_E8a .....T-...T.....-G G...G--- --C...
#Ac_F3 .....T-...T.....-G G...G--- --C...
#Ac_E6b .....T-...T.....-G G...G--- --C...
#Ac_E12a .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E12d .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_PCN3 .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E12c .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E4b .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E12b .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E4d .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E3 .....TT.....A.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E4a .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E4e .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E7a .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E7b .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E10a .....TT.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E10b .....TT.....C.....C.ACC.....-C G G...G--- --C G...
#Ac_E10c .....TT.....-C G G...G--- --C G...

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

#A.castellanii_T4_U07416 --GAGGGCGG TTTAGCCCGG TGGCACCGGT GAATGACTCC CCTAGCAGCT TGTGAGAAAT CATAAGTCTT TGGGTTCCGG GGGGAGTATG GTCGCAAGGC TGAAACTTAA AGGAATTGAC GGAAGGGCAC CACCAGGAGT GGAGCCTGCG
#Ac_F2 GC.G..... C.....
#Ac_PCS12 --.G...T.. C.....
#Ac_PCN12a -C.G...T.. C.....
#Ac_PCN12b --.G...T.. C.....
#Ac_PCN12c -C.G...T.. C.....
#Ac_PCN12d -C.G...T.. C.....
#Ac_E5a -C.G...T.. C.....
#Ac_E5b -C.G...T.. C.....
#Ac_F1b -C.G...T.. C.....
#Ac_F1c -C.G...T.. C...A...
#Ac_F1d -C.G...T.. C.....
#Ac_E4c -C.G...T.. C.....
#Ac_F1a GC.G..... C.....
#Ac_F1e GC.G..... C.....
#Ac_E6a --.G...T.. C.....
#Ac_E6d --.G...T.. C.....
#Ac_E8b --.G..AT.. C.....G...
#Ac_E8c --.G..AT.. C.....
#Ac_E6e --.G..AT.. C.....
#Ac_E11 --.G..AT.. C.....
#Ac_E6c --.G..AT.. C.....
#Ac_E8a --.G..AT.. C.....
#Ac_F3 --.G..AT.. C.....
#Ac_E6b --.G...T.. C.....A...
#Ac_E12a GC.G..AT.. C.....
#Ac_E12d GC.G..AT.. C.....
#Ac_PCN3 GC.G..AT.. C.....
#Ac_E12c GC.G..AT.. C.....
#Ac_E4b GC.G..AT.. C.....
#Ac_E12b GC.G..AT.. C.....
#Ac_E4d GC.G..A... G...
#Ac_E3 GC.G..AT.. C.....
#Ac_E4a GC.G..A... G...
#Ac_E4e GC.G..A... G...
#Ac_E7a GC.G..A... G...
#Ac_E7b GC.G..A... G...
#Ac_E10a GC.G..AT.. C.....
#Ac_E10b GC.G..AT.. C.....
#Ac_E10c GC.G..AT.. C.....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

#A.castellanii_T4_U07416 GCTTAATTTG ACTCAACACG GGGAAACTTA CCAGGTCCGG ACATAGTAAG GATTGACAGA TTGATAGCTC TTTCTTGATT CTATGGGTGG TGGTGCATGG CCGTTCCTAG TTGGTGGAGT GATTGTCTG GTTAATTCCG TTAACGAACG
#Ac_F2 .....
#Ac_PCS12 .....
#Ac_PCN12a .....
#Ac_PCN12b .....
#Ac_PCN12c .....
#Ac_PCN12d .....
#Ac_E5a .....
#Ac_E5b .....
#Ac_F1b .....
#Ac_F1c .....
#Ac_F1d .....
#Ac_E4c .....
#Ac_F1a .....
#Ac_F1e .....
#Ac_E6a .....
#Ac_E6d .....
#Ac_E8b .....
#Ac_E8c .....
#Ac_E6e .....
#Ac_E11 .....
#Ac_E6c .....
#Ac_E8a .....C.....C.....
#Ac_F3 .....
#Ac_E6b .....
#Ac_E12a .....
#Ac_E12d .....
#Ac_PCN3 .....
#Ac_E12c .....
#Ac_E4b .....
#Ac_E12b .....
#Ac_E4d .....
#Ac_E3 .....
#Ac_E4a .....
#Ac_E4e .....G.....
#Ac_E7a .....
#Ac_E7b .....
#Ac_E10a .....
#Ac_E10b .....
#Ac_E10c .....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

#A.castellanii_T4_U07416 AGACCTTAAC CTGCTAAATA TGCCGCGCTA ACCCGTCCAT CAAAACCCAT GCGTGGCTCA CGCGGTCCGC TGCGGGGTGG TGTCGCTTCG CGGCGACGTC ATCCC GCCCG CAGGGCCCCG GTCCCGTGTGG GCGGTAGGGT TCGGCGTCCG
#Ac_F2 .....
#Ac_PCS12 .....
#Ac_PCN12a .....
#Ac_PCN12b .....
#Ac_PCN12c .....
#Ac_PCN12d .....
#Ac_E5a .....
#Ac_E5b .....
#Ac_F1b .....
#Ac_F1c .....
#Ac_F1d .....
#Ac_E4c .....
#Ac_F1a .....
#Ac_F1e .....
#Ac_E6a .....
#Ac_E6d .....
#Ac_E8b .....
#Ac_E8c .....
#Ac_E6e .....
#Ac_E11 .....
#Ac_E6c .....
#Ac_E8a .....
#Ac_F3 .....
#Ac_E6b .....
#Ac_E12a .....
#Ac_E12d .....
#Ac_PCN3 .....
#Ac_E12c .....
#Ac_E4b .....
#Ac_E12b .....
#Ac_E4d .....
#Ac_E3 .....
#Ac_E4a .....
#Ac_E4e .....
#Ac_E7a .....
#Ac_E7b .....
#Ac_E10a .....
#Ac_E10b .....
#Ac_E10c .....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

#A.castellanii_T4_U07416 TGCTTCTTAG AGGGACTGCT GCGCGCCTAG CCAGCGGAAG TTTGAGGCAA TAACAGGTCT GTGATGCCCT TAGATGTTCT GGGCCGCACG CCGCTACAC TGATTAATCC AACGAGTCCG CTTCAATCGA GCGCGCATG- CCGTT--GGG
#Ac_F2 .....T.G..G .T.G.GC...
#Ac_PCS12 .....T.G..- .T.G.GC...
#Ac_PCN12a .....T.G..- .T.G.GC...
#Ac_PCN12b .....T.G..G .T.G.GC...
#Ac_PCN12c .....T.G..- .T.G.GC...
#Ac_PCN12d .....T.G..G .T.G.GC...
#Ac_E5a .....T.G..- .T.G.GC...
#Ac_E5b .....T.G..- .T.G.GC...
#Ac_F1b .....T.G..- .T.G.GC...
#Ac_F1c .....T.G..- .T.G.GC...
#Ac_F1d .....C.....T.G..G .T.G.GC...
#Ac_E4c .....T.G..- .T.G.GC...
#Ac_F1a .....T.G..G .T.G.GC...
#Ac_F1e .....T.G..G .T.G.GC...
#Ac_E6a .....AGC- .T.G.GC...
#Ac_E6d .....AGC- .T.G.GC...
#Ac_E8b .....AGC- .T.G.GC...
#Ac_E8c .....AGC- .T.G.GC...
#Ac_E6e .....T.....AGC- .T.G.GC...
#Ac_E11 .....AGC- .T.G.GC...
#Ac_E6c .....AGC- .T.G.GC...
#Ac_E8a .....G.....AGC- .T.G.GC...
#Ac_F3 .....AGC- .T.G.GC...
#Ac_E6b .....AGC- .T.G.GC...
#Ac_E12a .....C.....TG..GTC...
#Ac_E12d .....T.....CGG.GT.....CGTT T..T-----
#Ac_PCN3 .....C TG..GTC...
#Ac_E12c .....C TG..GTC...
#Ac_E4b .....C TG..GTC...
#Ac_E12b .....C TG..GTC...
#Ac_E4d .....T.GC- .T.G.-C...
#Ac_E3 .....T.GC.C TG..GTC...
#Ac_E4a .....T.GC- .T.G.-C...
#Ac_E4e .....T.GC- .T.G.-C...
#Ac_E7a .....T.GC- .T.G.-C...
#Ac_E7b .....T.GC- .T.G.-C...
#Ac_E10a .....T.GC- .T.G.-C...
#Ac_E10b .....G.....T.GC- .T.G.-C...
#Ac_E10c .....T.GC- .T.G.-C...

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

#A.castellanii_T4_U07416 GTCAAACCCA -ACTGT---G TCGCTGTCCT CGATCGCGCC TGGGCCGATA GGTCGGGGTA ATCTTTGCAA ATTTAATCGT GCTGGGGATA GATCATTGTA ATTATTGATC TTCAACGAGG AATTCCTAGT AAGCGCGAGT CATCAGCTCG
#Ac_F2 .....G TG.C..GCCA .....
#Ac_PCS12 .....G TG.C..GC-A .....
#Ac_PCN12a .....G TG.C..GC- .....
#Ac_PCN12b .....G T...GCCA .....
#Ac_PCN12c .....G TG.C..GC-A .....
#Ac_PCN12d .....G T...GC-A .....
#Ac_E5a .....G T..CA.GC-A .....
#Ac_E5b .....G T..CA.GC-A .....
#Ac_F1b .....G TG.C..GC-A C.....
#Ac_F1c .....G T..CA.GC-A .....
#Ac_F1d .....G TG.CA.GCCA .....
#Ac_E4c .....G TG.C..GC-A C.....
#Ac_F1a .....G TG.CA.GCCA .....
#Ac_F1e .....G TG.CA.GCCA .....
#Ac_E6a .....G T..C.C-GC..T.....
#Ac_E6d .....G T..C.C-GC..T.....
#Ac_E8b .....G T..C.C-GC..T.....
#Ac_E8c .....G T..C.C-GC..T.....
#Ac_E6e .....G T..C.C-GC..T.....
#Ac_E11 .....G T...C-GC..T.....
#Ac_E6c .....G T...C-GC..T.....
#Ac_E8a .....G T..C.CCGC..T.....
#Ac_F3 .....G T..C.CCGC..T.....
#Ac_E6b .....G TG.C.C-GC..T.....
#Ac_E12a .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E12d -----T.C.....G.....C..CATG...C.CCG...A.....C.....G.....A.....
#Ac_PCN3 .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E12c .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E4b .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E12b .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E4d .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E3 .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E4a .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E4e .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E7a .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E7b .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E10a .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E10b .....G AT.C.C--- .....
#Ac_E10c .....G AT.C.C--- .....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


```

#A.castellanii_T4_U07416 CGTTGATTAC GTCCTGCCC TTTGTACACA CCGCCCGTCG CTCCTACCGA TTGAATGGTC CGGTGAAATC CTCGGAGCCG TGGCCTCTAC GCAAT-CCGG GCAACCGGGT TGTGAGGTCT CCCCTTTTGG CGGC-GAAGT CGATTGAACC
#Ac_F2 .....
#Ac_PCS12 .....
#Ac_PCN12a .....
#Ac_PCN12b .....
#Ac_PCN12c .....
#Ac_PCN12d .....
#Ac_E5a .....
#Ac_E5b .....
#Ac_F1b .....
#Ac_F1c .....
#Ac_F1d .....
#Ac_E4c .....
#Ac_F1a .....
#Ac_F1e .....
#Ac_E6a .....
#Ac_E6d .....
#Ac_E8b .....
#Ac_E8c .....
#Ac_E6e .....
#Ac_E11 .....
#Ac_E6c .....
#Ac_E8a .....
#Ac_F3 .....
#Ac_E6b .....
#Ac_E12a .....
#Ac_E12d .....
#Ac_PCN3 .....
#Ac_E12c .....
#Ac_E4b .....
#Ac_E12b .....
#Ac_E4d .....
#Ac_E3 .....
#Ac_E4a .....
#Ac_E4e .....
#Ac_E7a .....
#Ac_E7b .....
#Ac_E10a .....
#Ac_E10b .....
#Ac_E10c .....

```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#A.castellanii_T4_U07416 TTACCATTTA GAGGAAGGAG AAG
#Ac_F2
#Ac_PCS12
#Ac_PCN12a
#Ac_PCN12b
#Ac_PCN12c
#Ac_PCN12d
#Ac_E5a
#Ac_E5b
#Ac_F1b
#Ac_F1c
#Ac_F1d
#Ac_E4c
#Ac_F1a
#Ac_F1e
#Ac_E6a
#Ac_E6d
#Ac_E8b
#Ac_E8c
#Ac_E6e
#Ac_E11
#Ac_E6c
#Ac_E8a
#Ac_F3
#Ac_E6b
#Ac_E12a
#Ac_E12d
#Ac_PCN3
#Ac_E12c
#Ac_E4b
#Ac_E12b
#Ac_E4d
#Ac_E3
#Ac_E4a
#Ac_E4e
#Ac_E7a
#Ac_E7b
#Ac_E10a
#Ac_E10b
#Ac_E10c



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23. แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DF3 ใน SSU rRNA gene ในกลุ่ม T4 ของเชื้อ *Acanthamoeba* ที่ได้จากธรรมชาติและผู้ป่วย จุดหมายถึงเบสที่เหมือนกันในแต่ละตำแหน่ง ซึ่งหมายถึงการขาดหายไปของเบส อักษรย่อ Ac = *Acanthamoeba*

```

T4          GGC-GCGGTC GTCCTTGGCG TCTGTCCCTT TCAACGGGGG CAGGCGC--G AGGGCGGT
G1          ..T-..... C--..TGG.C .TC--AAAA. .CA...GC. G.....C
.....- -..... -.....T...
.....- -..... -.....T...
.....- -..... G-.....
G2          ..T-..... A..... ---T.-GG.C .TGCAAAA. .CA...G-C. G...T..C
..... .G..C.....
.....--..A. ....
G3          ..T-..... C--..TGG.C .TC--AAAA. .CA...GC. G.....C
G4          ..T-..... .T..... ----..GG.. ..G----- .C.....- G.....C
.....AT...
.....CT .....AT...
G5          ..TT..... --C..GG.. ..G----- .C..G..GC. G..AT..C
.....C...
.....A.....

```

G1 = F2, PCS12, PCN12a, PCN12b, PCN12c, PCN12d

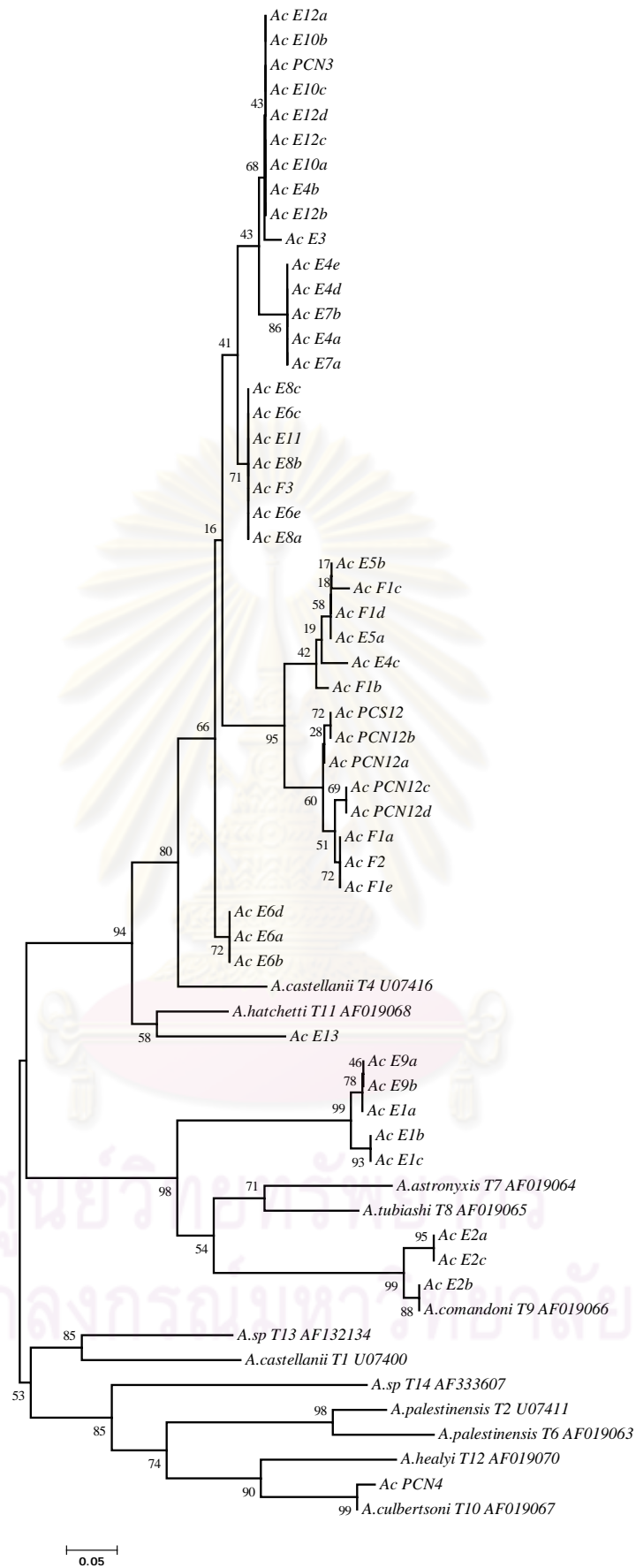
G2 = E5a, E5b, F1b, F1c, F1d, E4c

G3 = E4c, F1e

G4 = E6a, E6d, E8b, E8c, E6e, E11, E6c, E8a, F3, E6b

G5 = E12a, E12d, PCN3, E12c, E4b, E12b, E4d, E3, E4a, E4e, E7a, E7b, E10a, E10b, E10c

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24. แสดง phylogenetic tree ในบริเวณ DF3 ของยีน 18S rRNA ของ *Acanthamoeba* ที่ทำการศึกษา

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจแหล่งน้ำต่าง ๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล *Acanthamoeba* ที่มีการตรวจพบค่อนข้างรวมตัวอยู่ในพื้นที่บริเวณเขตมีนบุรีและรามคำแหงและกระจายตัวไปยังพื้นที่ในเขตจังหวัดปทุมธานีและนนทบุรี ซึ่งเป็นเขตชานเมืองและปริมณฑล มีการพบเชื้อ *Acanthamoeba* จากแหล่งน้ำได้ในช่วงที่มีสภาพอากาศแล้ง ได้แก่ กุมภาพันธ์ มีนาคม พฤษภาคม และธันวาคม โดยไม่พบเชื้อจากแหล่งน้ำในช่วงฤดูฝนและมีสภาพอากาศชื้น ซึ่งมีปริมาณน้ำในแหล่งน้ำมาก อะมีบาที่อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำอาจถูกรบกวนจากน้ำฝนและถูกชะล้างลงสู่ระดับน้ำที่ลึกลง เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิและค่า pH ผลปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างจากแหล่งน้ำที่พบและไม่พบเชื้อ ซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ย 31 องศาเซลเซียส ค่า pH ประมาณ 8.4 และมีสภาพเป็นด่าง ดังนั้นฤดูกาลจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการพบเชื้อจากธรรมชาติมากกว่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างของแหล่งน้ำโดยทั่วไป นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ *Acanthamoeba* ได้จากเหงือกปลาซึ่งเป็นการศึกษาในระดับอนุชีวโมเลกุลเป็นครั้งแรกในประเทศไทย

Acanthamoeba ที่พบในการสำรวจครั้งนี้จำนวน 16 ตัวอย่างเมื่อพิจารณาจากลักษณะซิสต์ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มซึ่งมีลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 3 ตัวอย่างจาก Ac_E1, Ac_E2 และ Ac_E9 ลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 2 จำนวน 13 ตัวอย่างจาก Ac_E3, Ac_E4, Ac_E5, Ac_E6, Ac_E7, Ac_E8, Ac_E10, Ac_E11, Ac_E12, Ac_E13, Ac_F1, Ac_F2 และ Ac_F3 แต่ลักษณะซิสต์ที่พบจากผู้ป่วยนั้นมีลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 2 ได้แก่ Ac_PCN3, Ac_PCN12 และ Ac_PCS12 ส่วน Ac_PCN4 มีลักษณะซิสต์ในกลุ่มที่ 3

รูปร่างลักษณะของ *Acanthamoeba* ที่เป็นลักษณะของซิสต์ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ผนังชั้นนอกและผนังชั้นในมีการสัมผัสกันเป็นบางบริเวณ บริเวณที่ไม่ได้สัมผัสกันจะเห็นผนังทั้งสองแยกออกจากกันอย่างเห็นได้ชัดทำให้มีลักษณะเป็นแฉกคล้ายดาว เนื่องจากซิสต์มีลักษณะเป็นทรงกลมเมื่อมีการหมุนระนาบจะทำให้เห็นจำนวนแขนหรือรัศมีของผนังชั้นในเปลี่ยนแปลงไป ซิสต์กลุ่มนี้แยกได้จากแหล่งน้ำในบึงลำพังพวยและสนามกีฬาแห่งชาติหัวหมาก และ *Acanthamoeba* ที่เป็นลักษณะของซิสต์ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 สามารถแยกได้จากแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน เมืองทองธานี หมู่บ้านเพอร์เฟคเพสรามคำแหง รังสิตคลอง 6 สนามกีฬาแห่งชาติหัวหมาก หมู่บ้านสัมมากรรามคำแหงและตัวอย่างปลาจากบึงลำพังพวยและหมู่บ้านเพอร์เฟคเพสรามคำแหง มีผนังซิสต์ชั้นนอกหยักเป็นคลื่น ผนังซิสต์ชั้นในมีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม รี หรือหลายเหลี่ยมมีลักษณะไม่แน่นอน มักเห็นเป็นแฉกไม่ชัดเจนซึ่งตรงกับลักษณะของซิสต์ในกลุ่มที่ 2 และพบได้มากที่สุดจากการสำรวจครั้งนี้ถึง 13 ตัวอย่าง โดยไม่พบ *Acanthamoeba* ที่

มีลักษณะของซิสต์กลุ่มที่ 3 เนื่องจากผนังชั้นนอกของซิสต์กลุ่มนี้มีลักษณะที่บางอาจเห็นเป็นริ้วขนาดเล็ก ผนังซิสต์ชั้นในกลม การสังเกตลักษณะของซิสต์กลุ่มนี้จึงทำได้ยากและอาจสับสนได้กับซิสต์ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งผนังชั้นในมีรูปร่างกลม โดยพบว่าซิสต์ในกลุ่มที่ 2 และ 3 มีการแพร่กระจายไปในสิ่งแวดล้อมและมีก่อโรคในคนได้มากที่สุด (Stothard *et al.*, 1998) แต่สปิซิสที่อยู่ในกลุ่มดังกล่าวยังประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค อีกทั้งขนาดและลักษณะของซิสต์ที่ไม่ชัดเจนทำให้เกิดความสับสนในการจัดแบ่งกลุ่ม ดังนั้นการพิจารณาลักษณะซิสต์และการตั้งชื่อสปิซิสจึงไม่สัมพันธ์กับความหลากหลายของ *Acanthamoeba* ที่มีอยู่ในธรรมชาติ (Visvesvara, 1991) การจัดความสัมพันธ์ภายในจีนัส *Acanthamoeba* จึงไม่สามารถอาศัยลักษณะของซิสต์เป็นเกณฑ์ได้เนื่องจากลักษณะดังกล่าวมีความผันแปรไปตามสภาวะการเจริญเติบโตและปัจจัยอื่น ๆ แม้จะเป็นเชื้อชนิดเดียวกันก็ตาม (Jongwutives *et al.*, 2000) เมื่อมีการศึกษาโดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลพบว่ามีประสิทธิภาพในการจัดหมวดหมู่ เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S mitochondrial rRNA หรือ 18S rRNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสพบว่าสามารถใช้จำแนกชนิดและความหลากหลายของ *Acanthamoeba* ได้ (De Jonckere & Weekers, 1997; Kilvington *et al.*, 2004) จากการศึกษาของ Stothard และคณะ (1998) พบว่าซิสต์ในกลุ่มที่ 1 มีความยาวประมาณ 2,600 - 2,700 คู่เบสโดยในตัวอย่าง Ac_E1, Ac_E2 และ Ac_E9 มีขนาดใกล้เคียงกันที่ความยาวประมาณ 2,500 คู่เบส และจากตัวอย่าง Ac_E3, Ac_E4, Ac_E5, Ac_E6, Ac_E7, Ac_E8, Ac_E10, Ac_E11, Ac_E12, Ac_E13, Ac_F1, Ac_F2, Ac_F3, AC_PCN3, Ac_PCS12 และ Ac_PCN12 ที่มีลักษณะตรงกับซิสต์ในกลุ่มที่ 2 และ Ac_PCN4 ที่มีลักษณะตรงกับซิสต์ในกลุ่มที่ 3 มีขนาดเท่ากันประมาณ 2,300 คู่เบส *Acanthamoeba* ในสปิซิสหนึ่งสามารถมีรูปร่างและขนาดของซิสต์ได้หลายแบบ แต่จากวิเคราะห์ลำดับเบสช่วยยืนยันได้ว่าความหลากหลายนั้นเป็นชนิดเดียวกัน

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Acanthamoeba* จากตัวอย่างที่พบในธรรมชาติสามารถแบ่งตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้เป็น 15 กลุ่มหรือจีโนไทป์ (T1-T15) การศึกษาครั้งนี้ได้รวบรวมตัวอย่างจากแหล่งน้ำภายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล พบการกระจายตัวของจีโนไทป์ T4, T7, T8, T9 และ T11 โดยมีจำนวนของจีโนไทป์ T4 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 75 (12/16) รองลงมาคือ T8 ร้อยละ 12.5 (2/16) ตามด้วย T11 ร้อยละ 6.25 (1/16) และมีการปะปนระหว่าง T7 และ T9 จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.25 (1/16) *Acanthamoeba* ที่แยกได้จากเหงือกปลาเพียงจีโนไทป์ T4 เท่านั้น จีโนไทป์ T7, T8 และ T9 สามารถแยกได้จากตัวอย่างน้ำแต่ไม่พบจากตัวอย่างเหงือกปลา ส่วนจีโนไทป์ที่พบในผู้ป่วยจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้แก่ T4 และ T10

จากตัวอย่างในธรรมชาติที่ทำการศึกษาพบว่าบางตัวอย่างมีการปะปนกันมากกว่า 1 สายพันธุ์จึงได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการ subclone และทำการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของยีน 18S rRNA พบว่าตัวอย่าง Ac_E1 และ Ac_E9 สามารถเทียบเคียงได้กับจีโนไทป์ T7 และ T8 มีลักษณะของความแตกต่างที่แยกออกจากสายพันธุ์มาตรฐานอย่างชัดเจน และเมื่อทำการเปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อมูลใน Gen Bank พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Acanthamoeba tubiashi* OC-15C ดังหมายเลข AF019065 แต่มีความแตกต่างกันมากกว่าร้อยละ 20 ซึ่งอาจเป็นจีโนไทป์ชนิดใหม่ จากตัวอย่าง Ac_E2 ที่มีการปะปนระหว่าง T7 และ T9 เมื่อทำ phylogenetic tree ปรากฏว่ามีลักษณะเทียบเคียงได้กับจีโนไทป์ T9 และอยู่คนละแขนงกับจีโนไทป์ T7 โดยไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างโคลนแต่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์มาตรฐาน ในกลุ่มของจีโนไทป์ T7, T8 และ T9 มีความใกล้เคียงกันมากกว่าจีโนไทป์ T4, T10 และ T11 ตัวอย่าง Ac_E13 มีอัตราความเหมือนกันกับจีโนไทป์ T11 คิดเป็นร้อยละ 96.5 และในกลุ่มที่มีจีโนไทป์ T4 ซึ่งมีการแพร่กระจายไปในสิ่งแวดล้อมและก่อโรคได้นั้น มีความหลากหลายในระหว่างจีโนไทป์สูงซึ่งประกอบด้วยหลายกลุ่มย่อยในบริเวณ DF3 และเมื่อทำการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าวพบว่ามี ความแตกต่างกันในระหว่างโคลนที่น้อยลงจาก 13 กลุ่มย่อยเหลือเพียง 6 กลุ่ม

ความหลากหลายของ *Acanthamoeba* ที่มีการกระจายตัวอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นมีความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกัน การติดเชื้อทางสมองที่ทำให้เกิดโรคสมองอักเสบชนิดเรื้อรังหรือเฉียบพลัน (granulomatous amebic encephalitis, GAE) มีอัตราการติดต่อค่อนข้างต่ำ มักพบในผู้ที่ภูมิคุ้มกันร่างกายบกพร่อง เนื่องจากอาการของโรคมีความใกล้เคียงกับจุลชีพก่อโรคทางสมองโดยทั่วไป จึงทำให้มีการวินิจฉัยล่าช้าเมื่อเนื้อสมองเริ่มถูกทำลายผู้ป่วยจะมีอาการทางประสาทและเสียชีวิตลง มักทราบว่าติดเชื้อโดย *Acanthamoeba* ภายหลังการพิสูจน์เนื้อเยื่อสมองเมื่อเสียชีวิต แต่การติดเชื้อทางตาสามารถพบได้โดยทั่วไปได้มากกว่าการติดเชื้อทางสมอง เมื่อเนื้อเยื่อกระจกตามีบาดแผลจะเปิดโอกาสให้เชื้อที่แพร่กระจายไปในอากาศ ในดินหรือน้ำแหล่งน้ำเข้าสู่ตาได้ โดยมีผู้ติดเชื้อทางตามากขึ้นตามความนิยมใส่คอนแทคเลนส์ การรักษาไม่อาจรักษาให้หายขาดได้หากยังมีเชื้อในระยะซิสต์ฝังตัวอยู่ในกระจกตา ทำให้เชื้อสามารถกลับมาก่อโรคได้อีกและมีอาการต้อตา ผู้ป่วยอาจต้องทำการเปลี่ยนกระจกตาหรือต้องสูญเสียดวงตาในรายที่มีอาการรุนแรง ซึ่ง *Acanthamoeba* ที่มีลักษณะจีโนไทป์ T4 สามารถก่อโรคได้ทั้งทางกระจกตาและทางสมองซึ่งเป็นจีโนไทป์ที่มีการกระจายตัวอยู่ในธรรมชาติมากที่สุดจึงมีโอกาในการก่อโรคในคนได้สูง (Booton *et al.*, 2004 ; Maghsood *et al.*, 2005) แต่ตัวอย่าง Ac_PCN4 จากผู้ป่วย keratitis พบว่ามีลักษณะจีโนไทป์ T10 ซึ่งเคยพบก่อโรคที่สมอง (Khan, 2006)

ในการศึกษาโดยการวิเคราะห์จีโนมไทยนี้ช่วยให้ทราบถึงการแพร่กระจายของเชื้อที่อยู่ในธรรมชาติและอาจก่อโรคในคนได้ จึงเป็นการศึกษาครั้งแรกในระดับจีโนมไทยเพื่อเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับเชื้อ *Acanthamoeba* ในประเทศไทย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

มยุรัตน์ เทพมงคล และคณะ. ปรสิตวิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร: ห้างหุ้นส่วนจำกัดเสริมกิจ, 2532.

ภาษาอังกฤษ

Adl, S. M.; et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. J. Eukaryot. Microbiol. 52 (2005): 399-541.

Azuara-Blanco, A.; Sadiq, A. S.; Hussain, M.; Loyd, J. H.; and Dua, H. S. Successful medical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Int. Ophthalmol. 21 (1998): 223-227.

Barker, J.; Humphery, T. J.; and Brown, M. W. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. FES. Microbiol. Lett. 173 (1999): 291-295.

Beattie, T. K.; Tomlinson, A.; McFadyen, A. K.; Seal, D. V.; and Grimason, A. M. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? Ophthalmol. 110 (2003): 765-771.

Biddick, C. J.; Rogers, L. H.; and Brown, T. J. Viability of pathogenic and non pathogenic free-living amoebae in long-term storage at a range of temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 48 (1984): 859-860.

Boon, G. C.; et al. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species Isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home Water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. J Clin. Microbiol. 40 (2002): 1621-1625.

Boon, G. C.; et al. Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental Isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *acanthamoeba* keratitis. J. Eukaryot. Microbiol. 51(2004): 192-200.

Boon, G. C.; et al. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis Infections. J. Clin. Microbiol. 43 (2005): 1689-1693.

- Castellani, A. An amoeba found in culture of yeast. J. Trop. Med. Hyg. 33 (1930): 160.
- Cursons, R. T.; Brown, T. J.; Keys, E. A.; Moriarty, K. M.; and Till, D. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. Infect. Immun. 29 (1980): 401-407.
- Costal, I. M.; and Griffiths, A. J. The esterases and acid-phosphatases of *Acanthamoeba* (Amoebida, Acanthamoebidae). Protistologica. 20 (1984): 33-41.
- Clarke D. W.; and Niederkorn J. Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. Trends. Parasitol. 22 (2006): 175-180.
- Cursons, R. T.; and Brown, T. J. Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. J. Clin. Pathol. 31 (1978): 1-11.
- Daggett, P. M.; Sawyer, T. K.; and Nerad, T. A. Distribution and possible interrelationships of pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* from aquatic environments. Microbial. Ecology. 8 (1982): 371-386.
- Di Cave, D.; Monno, R.; Bottalico, P.; Guerriero, S.; D'Amelio, S.; D'Orazi, C.; and Berrilli, F. *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. (2008) doi:10.1007/s10096-008-0682-4.
- De Jonckheere, J. F. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. Appl. Environ. Microbiol. 39 (1980): 681-685.
- De Jonckheere, J. F. Amphizoic amoebae human pathology. Padua, Italy: Piccin Nuova Libreria, (1987): 25-48.
- De Jonckheere, J. F.; and Weekers, P. H. Differences in isoenzyme patterns of axenically and monoxenically grown *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. Antonie van Leeuwenhoek. 71 (1997): 231-237.
- De Jonckheere, J. F. Epidemiological typing of *Acanthamoeba* strains isolated from keratitis cases in Belgium. Bull. Soc. belge Ophtalmol. 287 (2003): 27-33.
- Douglas, M. Notes on the classification of the amoebae found by Castellani on culture of yeast-like fungus. J. Trop. Med. Hyg. 33 (1930): 258-259.

- Dudley, R.; Matin, A.; Alsam, S.; Sissons, J.; Maghsood, A. H.; and Khan, N. A. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. Acta. Tropica. 95 (2005):100–108.
- Dykova, I.; Lom, J.; Schoeder-Diedrich, J. M.; Booton, G. C.; and Byers T. J. *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. J. Parasitol. 85 (1999): 1106-1113.
- Dykova, I.; and Lom, J. Advances in the knowledge of amphizoic amoebae infecting fish. Folia Parasitologica. 51 (2004): 81-97.
- Ettinger, M. R.; Webb, S. R.; Harris, S. A.; Mcininch, S. P.; Garman, G. C.; and Brown, BL. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. Parasitol. Res. 89 (2003): 6-15.
- Gast, R. J. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. J. Eukaryot. Microbiol. 48 (2001): 609–615.
- Gelman, B. B.; Rauf, S. J.; Nader, R.; et al. Amebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. JAMA. 285 (2001): 2450-2451.
- Giese, M. J.; and Weissman, B. A. Contact lens associated corneal infections. Where do we go from here? Clin. Exp. Optom. 85 (2002): 141–148.
- Hewett, M. K.; et al. Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). Acta. Protozool. 42 (2003): 325-329.
- Horn M.; Fritsche, T. R.; Gautom, R. K.; Schleifer, K-H.; and Wagner, M. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. Environ. Microbiol. 1 (1999): 357–367.
- Himano, H.; and Kaufman, H. E. Corneal physiology and disposable contact lenses. Boston: Butterworth-Heinemann, 1997.
- Hutchinson, K.; and Andrew, A. Infectious keratitis in orthokeratology. Clin. Exp. Ophthalmol. 30 (2002): 49-51.
- Ibrahim, Y. W.; Boase, D. L.; and Cree, I. A. Factor affecting the epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis. Ophthal. Epidemiol. 14 (2007): 53-60.

- Illingworth, C. D.; and Cook, S. D. *Acanthamoeba* keratitis. Surv. Ophthalmol. 42 (1998): 493-508.
- Jariya, P.; Lertlaituan, P.; and Warachoon, K. *Acanthamoeba* spp.: A cause of chronic granulomatous amoebic meningoencephalitis. Siriraj. Hosp. Gaz. 44 (1992): 148-153.
- Jones, B. R.; Visvesvara, G. S.; and Robinson, N. M. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. Trans. Ophthalmol. Soc. UK. 95 (1975): 221-232.
- Jongwutiwes, S.; Pariyakanok, L.; Charoenkorn, M.; Yagita, K.; and Endo, T. Heterogeneity in cyst morphology within isolates of *Acanthamoeba* from keratitis patients in Thailand. Trop. Med. Int. Health. 5 (2000): 335-340.
- Kahane, S.; Dvoskin, B.; Mathias, M.; and Friedman, M. G. Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001): 4789-4795.
- Khan, N. A. Pathogenicity, morphology and differentiation of *Acanthamoeba*. Curr. Microbiol. 43 (2001): 391-395.
- Khan, N. A.; Jarroll, E. L.; and Pager, T. A. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. Curr. Microbiol. 45 (2002): 197-202.
- Khan, N. A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. Macrob. Pathog. 34 (2003): 277-85.
- Khan, N. A. The immunological aspects of *Acanthamoeba* infections. Am. J. Immunol. 1 (2005a): 24-30.
- Khan, N. A. Granulomatous amoebic encephalitis: clinical diagnosis and management. Am. J. Infect. Dis. 1 (2005b): 79-83.
- Khan, N. A. *Acanthamoeba* : biology and increasing importance in human health. FEMS. Microbiol. Rev. 30 (2006): 564-595.
- Kilvington, S.; Gray, T.; Dart, J.; Morlet, N.; Beeching, J. R.; Frazer, D. G.; and Matheson, M. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. IOVS. 45 (2004): 165-169.

- Kim, K. S.; Mathers, W. D.; Alexandrakis, G.; Sutphin, J. E.; and Wiles, C. D. Polymerase chain reaction for *Acanthamoeba* keratitis, primer selection and inhibitory factors. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 38 (1997):5016.
- Krishna-Prasad, B. N.; and Gupta, S. K. Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas. Curr. Sci. 47 (1978): 245–247.
- La Scola, B.; and Raoult, D. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. Clin. Microbiol. Infect. 7 (2001): 75-79.
- Lane, J. A.; Mathers, W. D.; and Sutphin, J. E. Variation in cases per month of *Acanthamoeba*, a waterborne pathogen. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 38 (1997): S424.
- Lam, D. S.; Houang, E.; Fan, D. S.; Lyon, D.; Seal, D.; and Wong, E. Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: comparison with Europe and North America. Eye. 16 (2002): 608-618.
- Laube, U.; and Kiderien, A. F. *Balamuthia mandrillaris*, an opportunistic agent of granulomatous amebic encephalitis, infects the brain via the olfactory nerve pathway. Parasitol. Res. 94 (2004): 49-52.
- Ledee, D. R.; et al. *Acanthamoeba griffini* Molecular characterization of a new corneal pathogen. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 37 (1996): 544-550.
- Lehmann, M. O.; et al. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 39 (1998): 1261–1265.
- Lekkla, A.; Sutthikornchai, C.; Bovornkitti, S.; and Sukthana, Y. Free-living amoebae contamination in natural hot springs in Thailand. Southeast Asian. J. Trop. Med. Public. Health. 36 (2005): 5-6.
- Lewis, E. J.; and Sawyer, T. K. *Acanthamoeba tubiashi* n. sp., A new species of fresh-water amoebida (Acanthamoebidae). Trans. Amer. Micros. Soc. 98 (1979): 543-549.

- Lorenzo-Morales, J.; Ortega-Rivas, A.; Martinez, E.; Khoubbane, M.; Artigas, P.; Periago, M. V.; Foronda, P.; Abreu-Acosta, N.; Valladares, B.; and Mas-Coma, S. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region Egypt. Acta. Propica. 100 (2006): 63-69.
- Lorenzo-Morales, J.; Lopez-Darias, M.; Martinez-Carretero, E.; and Valladares, B. Isolation of potentially pathogenic strains of *Acanthamoeba* in wild squirrels from the Canary Islands and Morocco. Exp. Parasitol. 117 (2007): 74–79.
- Ly, T. M.; and Muller, H. E. Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. J. Med. Microbiol. 33 (1990): 51–54.
- Ma, P.; Visvesvara, G. S.; Martinez, A. J.; Theodore, F. H.; Daggett, P. M.; and Sawyer, T.K. *Naegleria* and *Acanthamoeba* Infections: review. Rev. Infect. Dis. 12 (1990): 490-513.
- Maghsood, A. H.; et al. *Acanthamoeba* genotype T4 from UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. J. Med. Microbiol. 54 (2005): 755-759.
- Marciano-Cabral, F. Biology of *Naegleria* spp. Microbiol. Rev. 52 (1988): 114–133.
- Marciano-Cabral, F.; and Cabral, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. J. Clin. Microbiol. Rev. 16 (2003): 273-307.
- Martinez, A. J. Infections of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. Rev. Infect. Dis. 13 (1991): S399-S402.
- Martinez, M. S.; Gonzalez-Mediero, G.; Santiago, P.; Rodriguez de Lope, A.; Diz, J.; Conde, C.; and Visvesvara, G. S. Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. J. Clin. Microbiol. 38 (2000): 3892-3895.
- Matin, A. M.; Siddiqui, R.; Jayasekera, S.; and Khan, N. A. Increasing importance of *Balamuthia mandrillaris*. Clin. Microbiol. Rev. 21 (2008): 435-448.
- Mazur, T.; Hadas, E.; and Iwanicka, I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. Trop. Med. Parasitol. 46 (1995): 106–108.

- Micheal, R.; Burghardt, H.; and Bergman, H. *Acanthamoeba* naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in the hospital. Zentralbl. Hyg. Umweltmed. 196 (1995): 532-544.
- Miyazaki, T.; Yagita, K.; Yanagi, T.; Uemura, H.; and Kanbara, H. Seasonal fluctuation of *Acanthamoeba* spp. contamination in water containers placed indoors and outdoors. Acta. Med. Nagasaki. 52 (2007): 13-18.
- Moura, H.; Wallace, S.; and Visvesvara, G. S. *Acanthamoeba healyi* n. sp. and the isoenzyme and immunoblot profiles of *Acanthamoeba* spp., Groups 1 and 3. J. Protozool. 39 (1992): 573-583.
- Nacapunchai, D.; Lamon, C.; Rungsittichai, C.; and Sriwichai, P. Isolation of free-living amoebae from soil and water resources in Thailand. J. Trop. Med. Parasitol. 22 (1999): 22-26.
- Nacapunchai, D.; Kihho, H.; Ruangsitticha, C.; Sriwichai, P.; Ishih, A.; and Terada, M. A brief survey of free-living amoebae in Thailand and Hamamatsu District, Japan. Southeast Asian. J. Trop. Med. Public. Health. 32 (2001): 179-186.
- Nagington, J.; Watson, P. G.; Playfair, T. J.; McGill J.; Jones B. R. and Steele, A. D. Amoebic infection of the eye. Lancet. ii (1974): 1537-1540.
- Nidhinandana, S.; and Leelayoova, S. Report of three cases of *Acanthamoeba* meningoencephalitis and literature review. RTA. Med. J. 51 (1998): 235-239.
- Niederhorn, J. Y.; Alizadeh, H.; Leher, H.; and McCulley, J. P. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. Microbes. Infect. 1 (1999): 437-443.
- Niyayati, M.; Lorenzo-Morales, J.; Rahimi, F.; Motevalli-Haghi, A.; Martin-Navarro, C. M.; Farnia, S.; Valladares, B.; and Rezaeian, M. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from dust sources in Iran. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (2009): 1-3.
- Page, F. C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. J. Parasitol. 14 (1967): 709-724.
- Page, F. C. A new key to fresh water and soil amoebae. Cumbria, UK: Fresh Water Biological Association Scientific, 1988.

- Pettit, D. A.; Williamson, J.; Cabral, G. A.; and Marciano-Cabral, F. In vitro destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: a transmission and scanning electron microscopy study J. Parasitol. 82 (1996): 769–777.
- Preston, T. M.; Richards, H.; and Wotton, R. S. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. FEMS. Microbiol. Lett. 94 (2001): 143-147.
- Pussard, M.; and Pons, R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). Protistologica. 13 (1977): 557-598.
- Qvarnstrom, Y.; da Silva, A. J.; Schuster, F. L. Gelman, B. B.; and Visvesvara, G. S. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. J. Infect. Dis. 199 (2009): 1139-1142.
- Raoult, D.; Audic, S.; Robert, C.; Abergel, C.; Renesto, P.; Ogata, H.; La Scola, B.; Suzan, M.; and Claverie, J. M. The 1.2-megabase genome sequence of mimivirus. Science. 306 (2004): 1344-1350.
- Radford, C. F.; Dart, J.; and Minaissian, D. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome and risk factors. Br. J. Ophthalmol. 86 (2002): 536-542.
- Riviere, D.; Szczebara, F. M.; Berjeaud, J. M.; Frere, J.; and Hechard, Y. Development of a real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. J. Microbiol. Methods. 64 (2006): 78–83.
- Rowbotham, T. J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoeba. J. Clin. Pathol. 33 (1980): 1179-1183.
- Sansopha, L.; and Tulvatana, W. A non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. Chula. Med. J. 47 (2003): 661-666.
- Sawyer, T. K.; and Griffin, J. L. A proposed new family, Acanthamoebidae new family (order Amoebida), for certain cyst-forming filose amoebae. Trans. Am. Microsc. Soc. 94 (1975): 93-98.
- Schuster, F. L.; and Visvesvara, G. S. Efficacy of novel antimicrobials against clinical isolates of opportunistic amebas. J. Euk. Microbiol. 45 (1998): 612–618.
- Schuster, F. L.; and Visvesvara, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int. J. Parasitol. 34 (2004a): 1001–1027.

- Schuster, F. L.; and Visvesvara, G. S. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. Drug Resistance Update. 7 (2004b): 41-51.
- Schroeder, J. M.; et al. Use of 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and sewage sludge. J. Clin. Microbiol. 39 (2001): 1903-1911.
- Seal, D. V.; Kirkness, C. M.; and Bennett, H. G. B. Population-based cohort study of microbial keratitis in Scotland: incidence and features. Contact lens Anterior Eye. 22 (1999): 49-57.
- Sithinamsuwan, P.; Sangruchai, T.; Chiewvit, P.; and Pongvarin, N. Free-living amoeba infections of the central nervous system in Thailand : report of two patients and review of literature. Int. Med. J. Thai. 17 (2001): 350-360.
- Spanakos, G.; Tzanetou, K.; Miltsakakis, D.; Patsoula, E.; Malamou-Lada, E.; and Vakalis, N. C. Genotyping of pathogenic *Acanthamoebae* isolated from clinical samples in Greece-Report of a clinical isolate presenting T5 genotype. Parasitol. Int. 55 (2006): 147-149.
- Stehr-Green, J. K.; Bailey, T. M.; and Visvesvara, G. S. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the united states. Am. J. Ophthalmol. 107 (1989): 331-336.
- Steinert, M.; Birkness, K. K.; White, E.; Fields, B.; and Quinn, F. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998): 2256-2261.
- Stothard, D. R. ; et al. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the Identification of eight new 18S rRNA gene sequence type. J. Euk. Microbiol. 45 (1998): 45-54.
- Stratford, M. P.; and Griffiths, A. J. Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. J. Gen. Microbiol. 108 (1978): 33-37.
- Sukthana, Y.; et al. Study of natural hot springs in Lop Buri Province. Intern. Med. J. Thai. 20 (2004): 211-214.
- Tachikawa, T.; Ishibashi, Y.; Fujisawa, S.; Takazawa, S.; Nyunt, A. K.; and Miyanaga, Y. A nation-wide survey on the occurrence of amebic keratitis in Japan. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 99 (1995): 68-75.

- Tavare, M.; et al. Diagnosis of first case of *Balamuthia* amoebic encephalitis in portugal by immunofluorescence and PCR. J. Clin. Microbiol. 44 (2006): 2660-2663.
- Taylor, P. W. Isolation and experimental infection of free-living amoeba in freshwater samples fishes. J. Parasitol. 63 (1977): 232-237.
- Thom, S.; Warhurst, D.; and Drasar, B. S. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. J. Med. Microbiol. 36 (1992): 303-306.
- Tsvetkova, N.; Schild, M.; Panaiotov, S.; Kurdova-Mintcheva, R.; Gottstein, B.; Walochnik, J.; Aspöck, H.; Lucas, M. S.; and Müller, N. The identification of free-living environment isolates of amoebae from Bulgaria. Parasitol. Res. 92 (2004): 405-413.
- Ulbelaker, J. E. *Acanthamoeba* spp.: "Opportunistic pathogens". Trans. Am. Microsc. Soc. 110 (1991) : 289-299.
- Volkonsy, M. *Hartmannella castellanii* Douglas et classification des *Hartmannelles*. Arch. de Zool. Exp. Gen. 72 (1931): 317-339.
- Visvesvara, G. S. Classification of *Acanthamoeba*. Rev. Infect. Dis. 13 (1991): 369-372.
- Visvesvara, G. S.; Schuster, F. L.; and Martinez, A. J. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N. Sp., agent for amebic meningoencephalitis in humans and other animals. J. Eukaryot. Microbiol. 40 (1993): 504-514.
- Visvesvara, G. S.; Moura, H.; and Schuster, L. Pathogenic and opportunistic free-living amoeba: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 50 (2007): 1-26.
- Vodkin, M. H.; Howe, D. K.; Visvesvara, G. S.; and McLaughlin, G. L. Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the Polymerase Chain Reaction. J. Protozool. 39 (1992): 378-385.
- Walochnik, J.; Obwaller, A.; and Aspöck, H. Correlations between morphological, molecular biological and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000): 4408-4413.
- Winięcka-Krusnell, J.; Wreiber K, von Euler, A.; Engstrand, L.; and Linder, E. Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. Scand. J. Infect. Dis. 34 (2002): 253-256.

Walochnik, J.; Aichelburg, A.; Assadian, O.; Steuer, A.; Visvesvara, G.; Vetter, N.; and Aspöck, H. Granulomatous Amoebic Encephalitis Caused by *Acanthamoeba* Amoebae of Genotype T2 in a Human Immunodeficiency Virus-Negative Patient. J. Clin. Microbiol. 46 (2008): 338-340.

Yaowalark, S.; Mario R.; Chutatip, S.; Teerachai, K.; Chalermchai, C.; and Boonchu, K. An exotic sinusitis. Trans. Roy. Soc. of Trop. Hyg. 99 (2005): 555-557.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
รูปสถานที่แหล่งน้ำ



รูปที่ 1. สนามกีฬาแห่งชาติหัวหมาก



รูปที่ 2. บึงลำพังพวย



รูปที่ 3. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน 1



รูปที่ 4. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน 2



รูปที่ 5. เมืองทองธานี



รูปที่ 6. หมู่บ้านส้มมากร 1



รูปที่ 7. หมู่บ้านสัมมากร 2



รูปที่ 8. หมู่บ้านเพอร์เฟคเพส รามคำแหง



รูปที่ 9. รังสิต คลอง 6



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม Page's ameba saline (10x)

Sodium chloride (NaCl)	1.20 g
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.04 g
Potassium phosphate, dibasic (Na_4HPO_4)	1.42 g
Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.04 g
Double distilled water to	1,000 ml

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อ* เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ 4°C

การเตรียม Nonnutrient agar (NNA)

10x ameba saline	100.0 ml
Agar	15.0 g
Double-distilled water	900.0 ml

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อ*

การเตรียม Peptone-yeast extract-glucose (PYG) mudium

Proteose Peptone	20.0 g
Yeast extract	2.0 g
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.980 g
Calcium chloride (CaCl_2)	0.059 g
Sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.02 g
Ferric ammonium sulfate [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	0.02 g
Potassium phosphate, monobasic (KH_2PO_4)	0.34 g
Sodium phosphate, dibasic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.355 g
Glucose	18.0 g

เติม CaCl_2 ปรับ pH 6.5 ± 0.2

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อ* เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ 4°C

การเตรียม 0.5 EDTA (pH 8.0)

EDTA	186.1 g.
------	----------

double distilled water	800 ml.
------------------------	---------

นำส่วนผสมทั้ง 2 อย่างนี้มาคนด้วย 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 และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อก่อนที่จะนำไปใช้*

* ภายใต้วความดัน 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



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิชา หนูประเสริฐ เกิดเมื่อวันที่ 5 ตุลาคม 2526 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย