

6-1-1984

การศึกษาเอ็นซิมม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไฮโซเมอเรส ใน *Trichomonas vaginalis*

ฉาดดา สิบหลินวงศ์

สุภาภรณ์ ชิวชานานนท์

เสาวนิต ชาญเขียว

สดศรี ไทยทอง

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal>

 Part of the [Medicine and Health Sciences Commons](#)

Recommended Citation

สิบหลินวงศ์, ฉาดดา; ชิวชานานนท์, สุภาภรณ์; ชาญเขียว, เสาวนิต; and ไทยทอง, สดศรี (1984) "การศึกษาเอ็นซิมม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไฮโซเมอเรส ใน *Trichomonas vaginalis*," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 28: Iss. 6, Article 8.
Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol28/iss6/8>

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

นิพนธ์ค้นฉบับ

การศึกษาเอ็นไซม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ใน *Trichomonas vaginalis*

ธาดา สืบหลินวงศ์* สภาภรณ์ ชีวชนานนท์**
เสาวนิต ชานูเขียว*** สดศรี ไทยทอง****

Sueblinvong T, Shevatananont S, Chanchiew S, Thaithong S. A study of the glucose phosphate isomerase in *Trichomonas vaginalis*. Chula Med J 1984 Jun; 28(6): 629-638.

The isozyme patterns of glucose phosphate isomerase (GPI) in T. vaginalis were investigated for the purposes of using its variable patterns to differentiate T. vaginalis clones into various types. The 100 isolates of T. vaginalis were collected from female patients with leukorrhea attending gynecological outpatient at Chulalongkorn Hospital, Dindaeng Health Care Center and Bangrak Hospital within the Bangkok Metropolitan area. All isolates were cultured and subcultured in an asenic condition using CPLM-NA (CPLM-Non Agar) media. After cloning, 2-4 colonies of different features were selected for a further subculture of 48 hours before being used in the study of the isozyme pattern.

Starch gel electrophoresis was utilised in the separation of glucose phosphate isomerase in T. vaginalis lysates, and the isozyme patterns were visualized by the glucose phosphate isomerase activity staining. There were nine isozyme bands of the GPI in T. vaginalis and all moved anodally and grouped into 8 patterns. The 100 isolates of T. vaginalis which had been cloned into 300 clones were then classified into 8 types according to the isozyme patterns found within the parasites namely ; GPI₁₋₈.

- * ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ** สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าฯ วิทยาเขตบางมด
- *** กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข
- **** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นับตั้งแต่ Alfred Donn⁽¹⁾ ค้นพบ *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) และ Trussell⁽²⁾ ยืนยันว่าพยาธิตัวนี้เป็นสาเหตุของโรค trichomoniasis แสดงอาการในหญิงที่พบได้แก่ อาการคันบริเวณอวัยวะเพศ ช่องคลอด และตกขาวลักษณะเป็นฟอง ๆ เป็นต้น ได้มีการศึกษาค้นคว้าวิทยาของพยาธิกลุ่มนี้ในหลาย ๆ ด้าน การศึกษารูปร่างและแหล่งที่อยู่อาศัยทำให้จำแนก trichomonas ที่พบในคนออกเป็น 3 ชนิด คือ *T. tenax*, *T. hominis* และ *T. vaginalis* โดยเฉพาะ *T. vaginalis* เมื่อศึกษาค้นคว้าในวิทยาค่ายวิธี แอวกุลติเนชันและคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน จะแบ่ง *T. vaginalis* ออกเป็น 4 เซอโรไทป์คือ TLR, TN, TRT และ TR⁽³⁾ แต่การจำแนกสัณฐานออกเป็น สปีชีส์ สับสปีชีส์ สเตรอน และไทป์ ที่ได้รับความนิยมนั้นในปัจจุบัน ได้แก่การจำแนกโดยอาศัยรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ที่พบในเซลล์ด้วยเทคนิคของเอ็นซัยม์อิเล็กโตรฟอริซิส Takayanaki และคณะ⁽⁴⁾ ศึกษาเอ็นซัยม์อะมัยเลสใน *T. vaginalis* โดยเซลล์ไลโซสเจลอิเล็กโตรฟอริซิสสามารถแบ่ง *T. vaginalis* 258 สายพันธุ์บริสุทธิ์ออกเป็น 9 ไทป์ตามรูปแบบของอะมัยเลสไอโซซัยม์ ผู้วิจัยจึงประสงค์จะทำการศึกษารูปแบบ ไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซ

เมอเรส (glucosephosphate isomerase, GPI, EC. 5.3.1.9) ซึ่งเป็นเอ็นซัยม์ที่พบมากในซัยโทซอลของ *T. vaginalis* และมีประสิทธิภาพในการทำงานสูง ตรวจพบได้ง่าย เพื่อใช้รูปแบบ ไอโซซัยม์ที่ได้ในการแยกไทป์ของ *T. vaginalis* ที่แพร่กระจายในผู้ป่วยในเขตกรุงเทพมหานคร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยต่อไปเกี่ยวกับ *T. vaginalis* ในแง่อื่น ๆ เช่น อาการแทรกซ้อน หรือ ภาวะดื้อยา เป็นต้น

วัสดุและวิธีการ

T. vaginalis ที่ใช้ในการศึกษาเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยหญิงซึ่งมารับการตรวจรักษาด้วยปัญหาอาการตกขาว 30 รายจากผู้ป่วยนอก แผนกสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยาของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย 20 รายจากศูนย์บริการสาธารณสุขสุขดินแดง กรุงเทพมหานคร อีก 50 ตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา โรงพยาบาลบางรักซึ่งเป็นเชื้อที่เก็บจากโพสิทีฟคัลเจอร์ ที่ได้จากผู้ป่วยโดยตรง

1. การเก็บตัวอย่าง *T. vaginalis*

ตัวอย่างเชื้อ *T. vaginalis* ซึ่งได้จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และศูนย์บริการสาธารณสุขสุขดินแดงนั้น ได้จากผู้ป่วยโดยตรงโดยแพทย์ผู้ตรวจใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วสอดไปที่ช่องคลอดบริเวณ posterior fornix ในผู้ป่วยหญิงที่ตรวจพบ *T. vaginalis*

จาก wet smear preparation แล้วจุ่มไม้พัน
สำลีลงในหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วน
ตัวอย่างที่ได้จากโรงพยาบาลบางรักนั้นบรรจุ
อยู่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จะถูกนำมา
เพาะเลี้ยงต่อไป

2. การเพาะเลี้ยง *T. vaginalis* ใน
หลอดทดลอง

คัดเลือกตัวอย่างเชื้อ *T. vaginalis* ที่เก็บจาก
ผู้ป่วยซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 มล. ใส่
หลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่โดยวิธี
สเตอไรล์ นำไปพักตัวในตู้บอดูณหภูมิ 37
องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหาร
เลี้ยงเชื้อใหม่ทุก 48 ชั่วโมง แต่เนื่องจาก
ตัวอย่าง *T. vaginalis* ที่เก็บจากผู้ป่วยโดย
ตรงหรือที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากโรงพยาบาล
บางรักนั้น มักจะมีแบคทีเรียและเชื้อราปนอยู่
ก่อนจะแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ ต้องกำจัดแบคที-
เรียและราโดยใช้เพนนิซิลิน 5,000 ยูนิต
ไคฮัยโครสเตรปโตมัยซิน 5,000 ไมโครกรัม
และนัยโคสแตติน 300 ไมโครกรัมต่ออาหาร
เลี้ยงเชื้อ 1 มล. ซึ่งจะใส่ยาเพียง 2-3 ครั้งก็
กำจัดได้หมด จึงนำเชื้อที่ได้ไปแยกสายพันธุ์
บริสุทธิ์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้
ตัดแปลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM (cystein-
peptone-liver-maltose)⁽⁵⁾ โดยไม่ใส่วันและ
ลดปริมาณซีรั่มเหลือเพียง 0.5 มล. ต่ออาหาร

เลี้ยงเชื้อ 8 มล. จึงเรียก CPLM-NA ซึ่งจะ
ประกอบด้วย 2.4 กรัม cystein monohydro-
chloride 32.0 กรัม Bacto-peptone 1.6 กรัม
Maltose 320.00 มล. Bactoliver infusion
(เตรียมจาก 20 กรัม Bacto-liver ในน้ำกลั่น
330 มล. ต้มที่ 50 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
เพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที
กรอง) และ Ringer's solution⁽⁶⁾ 960.0 มล.
ปรับ pH เป็น 5.8-6.0 เติมน้ำ 0.5% Methylene
blue 0.7 มล. แบ่งใส่หลอดเลี้ยงเชื้อหลอดละ
8 มล. และนึ่งฆ่าเชื้อ ซีรั่มและยาปฏิชีวนะจะ
เติมใส่หลอดก่อนใช้ เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อได้
นาน 14 วันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์

นำ 0.5 มล. ของเชื้อ *T. vaginalis* ที่
เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองจนปราศจากเชื้อ
แบคทีเรียและราอายุ 48 ชั่วโมงมาผสมกับ
อาหารแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ชั้นบน (ผ่านการ
นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) ซึ่งประกอบด้วย 0.8% วันใน
5 มล. ของ CPLM⁽⁷⁾ เพนนิซิลิน 5,000 ยูนิต
และไคฮัยโครสเตรปโตมัยซิน 5,000 ไมโคร
กรัมต่อ มล.อาหาร ซีรั่มคน (อุ่นที่ 56 องศา
เซลเซียส 30 นาที เพื่อทำลายคอมพลีเมนต์
แล้ว) 1 มล. และอุ่นจนได้ 40 องศาเซลเซียส
เทอาหารแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ชั้นบนลงใน
จานแก้วเลี้ยงเชื้อขนาด 20 มล. ที่มีอาหาร

แยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ชั้นล่างแข็งตัวอยู่แล้วโดยเร็ว บิดฝา นำจานแก้วแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์วางในเตสติกเคเตอร์ จุดเทียนไข บิดฝาเตสติกเคเตอร์ เมื่อเทียนดับปิด stopcock จะทำให้คาร์บอนไดออกไซด์ในเตสติกเคเตอร์สูงเกินร้อยละ 2⁽⁸⁾ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อาหารแข็งตัว อาหารแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ชั้นล่างประกอบด้วย 1.6% วุ้นใน CPLM 10.0 มล. เพนนิซิลิน 5,000 ยูนิตและไคฮัยโตรสเตอโรปโซมัยซิน 5,000 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มล. หนึ่งฆ่าเชื้อและเก็บในหลอดแก้วปิดจุกไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเมื่อจะใช้ต้องนำไปอุ่นที่ 40 องศาเซลเซียส เทใส่จานแก้ว ทั้งให้แข็งตัวในเตสติกเคเตอร์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 2 เมื่ออาหารทั้งชั้นบนและชั้นล่างแข็งตัวแล้ว นำเตสติกเคเตอร์ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3-5 วัน จะเห็นโคโลนีเป็นจุดขาวเล็กขนาด 0.5-1 มม. เลือกโคโลนีที่รูปร่างต่างกัน 2-4 โคโลนีใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุ CPLM-NA 2-4 หลอด ใช้สเตอริไลซ์ปาสเตอร์-ปีเปตต์ให้โคโลนีแยกจากกัน เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองสำหรับใช้ศึกษาเอ็นซัยม์ต่อไป

4. การศึกษาเอ็นซัยม์โดยสตาร์ชเจลดิวเทคโตรฟอริซิส

T. vaginalis ที่แยกสายพันธุ์บริสุทธิ์และอยู่ใน CPLM-NA ซึ่งปราศจากเชื้อ

แบคทีเรีย รา อายุได้ 48 ชั่วโมงครั้งละ 12 สายพันธุ์บริสุทธิ์จะถูกนำมาปั่น 2,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนน้ำ นำตะกอนปรสิติที่ได้มาล้างด้วย 0.15M NaCl 1.0 มล. บั่น 2,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที รวม 3 ครั้ง คุดส่วนน้ำทั้ง ทำให้ *T. vaginalis* ใน 0.5 มล. น้ำเกลือแตกตัวโดยเติม 30 ไมโครลิตรของ 1% triton X-100 ใน EDTA-Tris-HCl buffer, pH 7.4 ใช้ปาสเตอร์-ปีเปตต์คุดสารละลายชั้นลง 1-2 ครั้ง คุดซับสารละลายปรสิตินี้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 7×5 มิลลิเมตรแผ่นละ 1 สายพันธุ์บริสุทธิ์ นำไปใส่ในหลอดที่เจาะไว้แล้วบนสตาร์ชเจลดิวเทคโตรฟอริซิส

สตาร์ชเจลดิวเทคโตรฟอริซิสที่เตรียมจาก 9% แป้งมันสำหรับิเล็กโตรฟอริซิสใน 250 มล. ของสารละลายเจือจาง 1:25 ของ 0.45 M tris/0.16 M citric acid, pH 6.0⁽⁹⁾ ต้มจนแป้งสุกใน suction flask ขนาด 1 ลิตรที่มีแขนค้ำข้างเมื่อแป้งสุกใส่ดีแล้ว คุดฟองอากาศ (degas) ในเนื้อแป้งจนหมดด้วย vacuum pump เทแป้งที่ปราศจากฟองอากาศลงในแบบพิมพ์ซึ่งประกอบด้วยกรอบพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาดภายใน 18×18 ซม. หนา 6 มม. ซึ่งวางทาบบนแผ่นกระดาษเรียบขนาด 24×24 ซม. ตั้งไว้

ที่อุณหภูมิห้อง 1/2 ชั่วโมง เมื่อเจลเริ่มแข็งตัว นำเข้าเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมงจึงจะนำไปใช้ได้

อิเล็กโทรโฟรีซิสทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีระบบน้ำเย็นไหลวน (cooling system) ระบายความร้อนจากแผ่นเจลตลอดเวลาที่ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 75 มิลลิแอมแปร์ คงที่นาน 4 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายเจือจาง 1:2 ของ 0.45 M tris/0.16 M citric acid, pH 6.0 เป็นอิเล็กโทรลิตบัฟเฟอร์⁽⁹⁾ แผ่นเจลที่ผ่านกระแสไฟฟ้าแยกไอโซซัยม์แล้วจะถูกนำมาผ่าผ่านครึ่งหนาแผ่นละ 3 มม. เมื่อได้ถึงกระดาษกรองที่ดูดซับตัวอย่างออกแล้ว ใช้ด้านหน้าตัดรอยผ่านของเจลครึ่งใดครึ่งหนึ่งสำหรับย้อมสี วิธีย้อมสีที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นการย้อมซึ่งดูประสิทธิภาพการทำงานของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสโดยเฉพาะ แอเปอไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GPI จะปรากฏบนแผ่นเจลภายใน 20-30 นาทีเมื่อย้อมด้วยสีซึ่งประกอบด้วย disodium fructose-6-phosphate 50 มก., glucose-6-phosphate dehydrogenase (140 units/ml) 10 μ l, NADP (disodium salt), MTT และ PMS อย่างละ 5 มก. Noble agar 400 มก. ใน 50 มล. 0.05 M Tris/HCl, pH 8.0⁽¹⁰⁾ เมื่อแอเปอไอโซซัยม์ของ GPI ปรากฏชัดแล้ว

นำแผ่นเจลไปถ่ายภาพและบันทึกผลโดยใช้แผ่นพลาสติกใสทาบบนเจล ลอกแถบไอโซซัยม์ วัฏระยะทางของแต่ละแถบจากจุดเริ่มต้นและนับจำนวนแถบของแต่ละตัวอย่าง *T. vaginalis* สายพันธุ์บริสุทธิ์

ผลการทดลอง

T. vaginalis 30 ตัวอย่างที่เก็บจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และ 20 ตัวอย่างจากศูนย์บริการสาธารณสุข ดินแดง รวม 50 ตัวอย่างแยกเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ไว้ 100 สายพันธุ์บริสุทธิ์ การเก็บตัวอย่างจะได้โดยเฉลี่ยสัปดาห์ละ 2-3 ตัวอย่าง ซึ่งจะทยอยเพาะเลี้ยงและแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์พร้อมทั้งศึกษาเอ็นซัยม์ไปพร้อมๆกัน แต่ละตัวอย่างเชื้อที่เก็บจากผู้ป่วยจะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อแบคทีเรียและราได้ใน 8-10 วัน ใช้เวลาในการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงอีก 1 สัปดาห์จึงนำมาศึกษาเอ็นซัยม์ได้ ขณะเดียวกันจะเก็บสายพันธุ์บริสุทธิ์ไว้เปรียบเทียบรูปแบบเอ็นซัยม์หรือนำมาแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ซ้ำในกรณีที่เกิดปัญหาโดยวิธีเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (subculture) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุก 48 ชั่วโมง ดังนั้น *T. vaginalis* ที่นำมาศึกษาเอ็นซัยม์จะถูกเพาะเลี้ยงในภาวะปราศจากแบคทีเรียและรา (aseptic condition) สายพันธุ์บริสุทธิ์อย่างน้อย 3-10 วันก่อนศึกษาเอ็นซัยม์

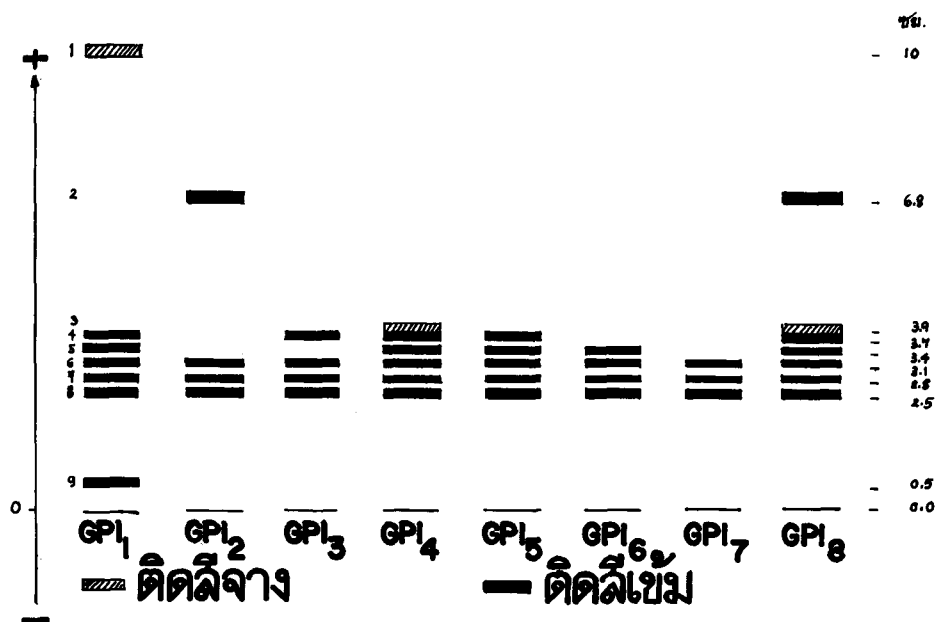
ผลการศึกษาไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสใน 100 สายพันธุ์บริสุทธิ์ของ *T. vaginalis* พบไอโซซัยม์ทั้งหมด 9 แถบ เคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกทั้งหมด เรียกชื่อเป็น ไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสแถบที่ 1-9 โดยให้แถบที่อยู่ห่างจากจุดเริ่มต้นที่สุดระยะทาง 10 ซม. เป็นไอโซซัยม์ของ GPI แถบที่ 1 ส่วนแถบที่ 9 อยู่ห่างจุดเริ่มต้นเพียง 0.5 ซม. (รูปที่ 1 และ 2) ไอโซซัยม์ทั้ง 9 แถบใน *T. vaginalis* 100 สายพันธุ์บริสุทธิ์ มีการจัดเรียงตัวเป็นรูปแบบของเอ็นซัยม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรสที่พบในปรสิตนี้ได้ทั้งหมด 7 รูปแบบเรียกเป็น GPI₁₋₇ ดังปรากฏในแผนภาพและรูปภาพถ่ายจากเจล (รูปที่ 1 และ 2)

ตัวอย่างเชื้อ *T. vaginalis* อีก 50 ตัวอย่างที่ได้จากห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา โรงพยาบาลบางรัก ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยเช่นกัน ได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย รา แล้วแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ ตัวอย่างเชื้อปรสิตจากผู้ป่วยหนึ่งรายจะเลือก 4 โคโลนีจากงานเพาะเลี้ยง *T. vaginalis* ตั้งแต่ได้รับตัวอย่างจนกระทั่งศึกษาเอ็นซัยม์ประมาณ 8-10 วัน จำนวนตัวอย่างที่ได้รับจากโรงพยาบาลบางรักโดยเฉลี่ยอาทิตย์ละ 2-3 ตัวอย่าง จึงทยอยเพาะเลี้ยงและศึกษาเอ็นซัยม์

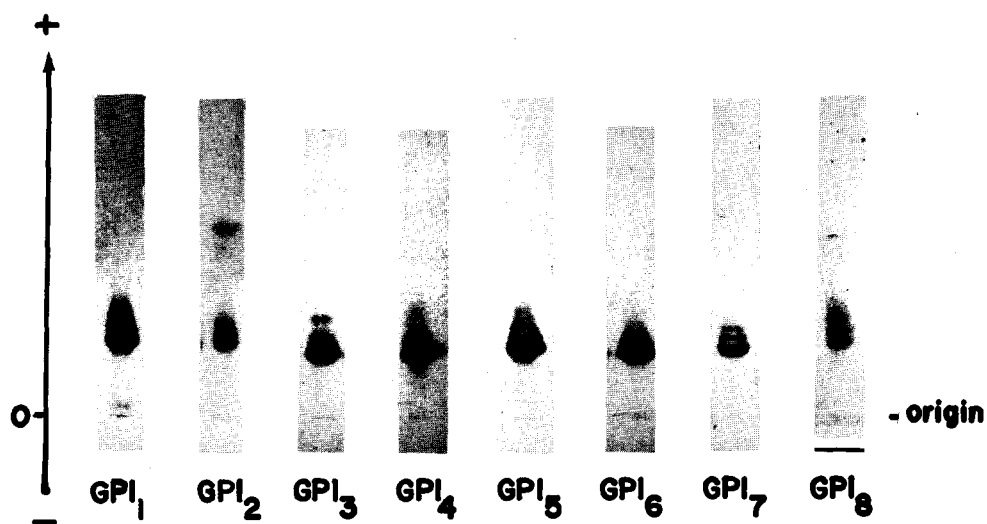
จนครบ 50 ตัวอย่าง หรือ 200 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ผลการแยกไอโซซัยม์ พบแถบไอโซซัยม์ลักษณะการเคลื่อนที่ตลอดจนระยะทางของแต่ละไอโซซัยม์ที่เคลื่อนห่างจุดเริ่มต้นเป็นแบบเดียวกับใน 100 สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ศึกษาก่อนหน้านี้ การจัดเรียงตัวของแถบไอโซซัยม์ พบรูปแบบที่ต่างจากเดิมเพิ่มอีก 1 รูปแบบ จึงเรียกเป็น GPI₈ (รูปที่ 1 และ 2) ดังนั้นการศึกษาไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสใน *T. vaginalis* 100 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บเชื้อปรสิตจากผู้ป่วย 100 ราย ในเขตกรุงเทพมหานคร จึงทำให้ถูกแบ่งออกเป็นไทป์ได้ 8 ไทป์ ตามรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส

วิจารณ์

แถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสทั้ง 9 แถบที่พบใน *T. vaginalis* มีประสิทธิภาพในการทำงานมากน้อยต่างกัน ความแตกต่างนี้เห็นได้จากการติดสีย้อม ถ้าติดสีเข้มชัดแสดงว่ามีประสิทธิภาพการทำงานสูง ติดสีจางแสดงว่าประสิทธิภาพต่ำ (รูปที่ 1) ซึ่งได้แก่แถบที่ 1 ใน GPI₁ และแถบที่ 3 ใน GPI₄ ของ *T. vaginalis* สำหรับ GPI₁ นั้นไม่เป็นปัญหาในการวิเคราะห์ผลเนื่องจากรูปแบบต่างจากอันอื่นอย่างเด่นชัด แต่ GPI₄ และ GPI₈ นั้น การจำแนกต้องระมัดระวังมากเนื่องจากไอโซซัยม์แถบที่ 3



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงรูปแบบไอโซซัยม์ของกลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ใน *T. vaginalis*



รูปที่ 2 ภาพถ่ายจากสตาร์จเจลแสดงรูป 8 แบบไอโซซัยม์ของกลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ใน *T. vaginalis*

(รูปที่ 1) ใน GPI₄ มีประสิทธิภาพการทำงานต่ำ ทำให้อาจจำแนกผิดเป็น GPI₅ ได้ ดังนั้นการแยก T. vaginalis ออกเป็นไทพ์ GPI₄ และ GPI₅ จึงต้องทำซ้ำหลายครั้งจนได้ผลตรงกัน 3 ครั้งติดต่อกันในแต่ละสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงไว้จึงเชื่อถือได้ นอกจากนี้รูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสชนิด GPI₄, GPI₅, GPI₆ และ GPI₇ ซึ่งมีส่วนของแถบไอโซซัยม์ที่คล้ายคลึงกัน จึงทำให้เข้าใจได้ว่าสายพันธุ์ที่แยกได้อาจไม่ใช่สายพันธุ์บริสุทธิ์ ในกรณีเช่นนี้มักต้องทำการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ซ้ำอีกครั้งโดยวิธีเดิม⁽⁷⁾ แต่จะเจือจางปรสิติยงขึ้น เพื่อให้โคโลนีที่ได้กระจายห่างกันมากขึ้น ป้องกันการปะปนขณะแยกโคโลนีออกมาใส่หลอดเพาะเลี้ยง การแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยวิธีเพาะเลี้ยง T. vaginalis ในระหว่างชั้นวุ้น⁽⁷⁾ Takayanaki และคณะ⁽⁴⁾ พบว่าเป็นวิธีแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้ผลเชื่อถือได้ โดยที่ Takayanaki และคณะ⁽⁴⁾ ก็ใช้วิธีดังกล่าวนี้ในการศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์อะมัยเลสใน T. vaginalis ที่เก็บจากผู้ป่วย 65 รายแยกเป็น 258 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ผลการศึกษาพบแถบไอโซซัยม์ 7 แถบ แบ่งปรสิติออกเป็น 9 ไทพ์ คล้ายคลึงกับผลการศึกษาเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสครั้ง^๕

GPI แบบที่ 8 หรือ GPI₈ ที่พบใน T. vaginalis เป็นอีกรูปแบบที่อาจก่อให้เกิดข้อข้องใจว่า รูปแบบที่ได้เป็น mixed infections ของ T. vaginalis ไทพ์ GPI₂ และไทพ์ GPI₄ แต่จากการทดลองทำการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์และศึกษาเอ็นซัยม์ซ้ำให้ผลยืนยันว่าไม่ใช่ mixed infections จึงเรียกเป็น GPI₈ การพบ mixed infections ในที่นี้หมายถึงผู้ป่วยหนึ่งรายที่ติดเชื้ T. vaginalis เมื่อนำมาแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์แล้ว พบรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสต่างรูปแบบกันใน 2 สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ เช่น พบสายพันธุ์บริสุทธิ์หนึ่งเป็นไทพ์ GPI₇ อีกสายพันธุ์บริสุทธิ์เป็นไทพ์ GPI₂ เป็นต้น จากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย 100 ราย พบอุบัติการณ์ของ mixed infections เพียง 2 รายเท่านั้น แต่แสดงว่า mixed infections ของ T. vaginalis ที่ต่างไอโซซัยม์ไทพ์นั้นพบได้ในผู้ป่วย ซึ่งควรจะได้ศึกษาความสำคัญด้านคลินิก การทำนายและภาวะแทรกซ้อนต่อไป ส่วนรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสที่พบบ่อยที่สุดได้แก่ GPI₄ พบได้ร้อยละ 53.35 รองลงมาได้แก่ GPI₅ พบร้อยละ 14.5 GPI₇ ร้อยละ 12.5 GPI₆ ร้อยละ 12 GPI₃ ร้อยละ 4 GPI₈ ร้อยละ 1.6 ส่วน GPI₁ และ GPI₂ ร้อยละ 1 ทั้งสองรูปแบบ

เมื่อเปรียบเทียบผลการแยก *T. vaginalis* ออกเป็นไทป์ตามรูปแบบไอโซซัยม์กับการแยกไทป์โดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา⁽³⁾ จะพบว่าการแยกโดยรูปแบบไอโซซัยม์ทำได้ละเอียด และเป็นการศึกษาชีวโมเลกุลของปรสิตโดยตรง และเทคนิคนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการจำแนกไทป์ของโปรโตซัว^(4,11,12) ส่วนการศึกษาทางอิมมูโนวิทยานั้นเป็นการศึกษาที่ต้องผ่านปฏิกิริยาของโฮสต์ต่อปรสิต จึงอาจจำแนกได้ไม่ละเอียดนักถ้าโฮสต์และปรสิตมีปฏิกิริยาตอบโต้กันน้อย รูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ใน *T. vaginalis* ที่เลี้ยงใน asenic condition ซึ่งเป็นภาวะฝืดธรรมชาติสำหรับ *T. vaginalis* จากการศึกษาสามารถคงรูปแบบของแต่ละไทป์ได้นานถึง 1 ปี มี *T. vaginalis* 42 สายพันธุ์บริสุทธิ์ซึ่งถูกเลี้ยงใน asenic condition นาน 3 ปี และเปลี่ยนรูปแบบไอโซซัยม์จาก GPI₅, GPI₆, GPI₇, เป็น GPI₄ ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการผ่าเหล่า (mutation) ขึ้น ส่วนความสำคัญของไทป์ต่างๆ ต่ออาการทางคลินิก การต้านยาและภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ เป็นสิ่งที่ควรจะได้ศึกษาต่อไป

สรุป

T. vaginalis จำนวน 300 สายพันธุ์บริสุทธิ์ซึ่งเก็บตัวอย่างปรสิตจากผู้ป่วยหญิงใน

เขตกรุงเทพมหานคร 100 ราย ถูกเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA จนอายุ 48 ชั่วโมงในภาวะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย แล้วนำไปศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส พบแถบไอโซซัยม์ 9 แถบแบ่งเป็น 8 รูปแบบ จึงสามารถจำแนก *T. vaginalis* ออกเป็น 8 ไอโซซัยม์ไทป์ได้แก่ GPI₁₋₈ และ *T. vaginalis* ไอโซซัยม์ไทป์ GPI₄ พบได้บ่อยที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนโครงการพัฒนามหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2522) และทุนการศึกษาพระมหิตลathiเบตร์ บรมราชชนก (พ.ศ. 2524) ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ขอขอบพระคุณแพทย์ พยาบาล และเจ้าหน้าที่แผนกนรีเวชวิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ศูนย์บริการสาธารณสุข ดินแดง และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา โรงพยาบาลบางรัก กรุงเทพมหานคร ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเชื้อ *T. vaginalis* ขอขอบพระคุณศูนย์บริการโลหิตสภากาชาดไทย ที่ให้ซึ่มใช้ตลอดการวิจัย และขอขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาชีวเคมีคณะแพทยศาสตร์ กับหัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุน

อ้างอิง

1. Donné A. Animalcules observés dans les matiérs purulents et le produit des sécrétions des organes génitaux de l'homme et de la femme, Acad Sci 1836; 3 : 385-386
2. Trussell RE. *Trichomonas vaginalis* and Trichomoniasis. Springfield, Illinois : Charles C. Thomas. 1947
3. Honigberg BM. *Trichomonas* In : Jackson GJ, Herman R, Singer L. eds. Immunity to Parasitic Animals, Vol 2. New York : Appleton, 1970 ; 469-550
4. Takayanaki T, Enriquez L, Kambara H. An electrophoresis study of the amylase of *Trichomonas vaginalis*. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1971 Jun ; 2 (2) : 308-312
5. Johnson G, Trussell RE. Experimental Basis for chemotherapy of *Trichomonas vaginalis* Infestation I. Proc Soc Exp Biol (N.Y.) 1943 ; 54 : 245-249
6. Taylor AER, Baber JR. The Cultivation of Parasites in Vitro, Oxford : Adlard and Son, 1968
7. Samuels R. Agar techniques for colonizing and cloning trichomonas. J Protozool 1962 ; 9 : 103-107
8. Jensen JB, Trager W. Plasmodium falciparum in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. J Parasit 1977 Oct; 63 (5) : 883-856
9. Carter R. Enzyme variation in Plasmodium berghei. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1970 ; 64 (3) : 401-406
10. Harris H, Hopkinson DA. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. Amsterdam : North Holland Publishing, 1976
11. Carter R, Walliker D. Biochemical markers for strain differentiation in malarial parasites. Bull WHO 1977 ; 55 : 339-345
12. Brodie HD, Ryckman RE. Molecular taxonomy of triatominae. J Med Entomol 1967 ; 4 : 497-517