นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเอ็นซัยม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ใน Trichomonas vaginalis

ธาดา สืบหลินวงศ์* สุภาภรณ์ ชีวธนานนท์**
เสาวนิต ชาญเชี่ยว*** 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 Metropolital 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 ; GPI_{1-8}.

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

นับตั้งแต่ Alfred Donné[1] ค้นพบ Trichomonas vaginalis (T. vaginalis) และ Trussell[2] ยืนยันว่าพยาธิตัวนี้เป็นสาเหตุของโรค trichomoniasis แสดงอาการในหญิงที่พบได้แก่ อาการคันบริเวณอวัยวะเพศ ช่องคลอด และตกขาวลักษณะเป็นฟอง ๆ เป็นต้น ได้มีการศึกษาด้านชีววิทยาของพยาธิกลุ่มนี้ในหลาย ๆ ด้าน การศึกษารูปร่างและแหล่งที่อยู่อาศัยทำให้จำแนก trichomonas ที่พบในคนออกเป็น 3 ชนิด คือ T. tenax, T. hominis และ T. vaginalis โดยเฉพาะ T. vaginalis เมื่อศึกษาด้านอิมมูโนวิทยาด้วยวิธีแอกกลูติเนชันและคอมพลีเมนท์ฟิกเซชัน จะแบ่ง T. vaginalis ออกเป็น 4 เซอโรไทพ์คือ TLR, TN, TRT และ TR[3] แต่การจำแนกสัตว์ออกเป็น สปีชีส สับสปีชีส สเตรน และไทพ์ที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบันได้แก่การจำแนกโดยอาศัยรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ที่พบในเซลล์ด้วยเทคนิคของเอ็นซัยม์อิเล็คโตรฟอริซิส Takayanaki และคณะ[4] ศึกษาเอ็นซัยม์อะมัยเลสใน T. vaginalis โดยเซลโลไซส์เจลอิเล็คโตรฟอรีซิสสามารถแบ่ง T. vaginalis 258 สายพันธุ์บริสุทธิ์ออกเป็น 9 ไทพ์ตามรูปแบบของอะมัยเลสไอโซซัยม์ ผู้วิจัยจึงประสงค์จะทำการศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (glucosephosphate isomerase, GPI, EC. 5.3.1.9) ซึ่งเป็นเอ็นซัยม์ที่พบมากในซัยโตซอลของ T. vaginalis และมีประสิทธิภาพในการทำงานสูง ตรวจพบได้ง่าย เพื่อใช้รูปแบบไอโซซัยม์ที่ได้ในการแยกไทพ์ของ T. vaginalis ที่แพร่กระจายในผู้ป่วยในเขตกรุงเทพมหานคร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยต่อไปเกี่ยวกับ T. vaginalis ในแง่อื่น ๆ เช่น อาการแทรกซ้อน หรือ ภาวะดื้อยาเป็นต้น

วัสดุและวิธีการ

T. vaginalis ที่ใช้ในการศึกษาเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยหญิงซึ่งมารับการตรวจรักษาด้วยปัญหาอาการตกขาว 30 รายจากผู้ป่วยนอกแผนกสูติศาสตร์–นรีเวชวิทยาของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย 20 รายจากศูนย์บริการสาธารณสุขดินแดง กรุงเทพมหานคร อีก 50 ตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยาโรงพยาบาลบางรักซึ่งเป็นเชื้อที่เก็บจากโพสิทิพคัลเจอร์ ที่ได้จากผู้ป่วยโดยตรง

1. การเก็บตัวอย่าง T. vaginalis

ตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis ซึ่งได้จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และศูนย์บริการสาธารณสุขดินแดงนั้นได้จากผู้ป่วยโดยตรงโดยแพทย์ผู้ตรวจใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วสวอบที่ช่องคลอดบริเวณ posterior fornix ในผู้ป่วยหญิงที่ตรวจพบ T. vaginalis

จาก wet smear preparation แล้วจุ่มไม้พันสำลีลงในหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนตัวอย่างที่ได้จากโรงพยาบาลบางรักนั้นบรรจุอยู่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงต่อไป

2. การเพาะเลี้ยง T. vaginalis ในหลอดทดลอง

ดูดตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis ที่เก็บจากผู้ป่วยซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 มล. ใส่หลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่โดยวิธีสเตอไรล์ นำไปพักตัวในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุก 48 ชั่วโมง แต่เนื่องจากตัวอย่าง T. vaginalis ที่เก็บจากผู้ป่วยโดยตรงหรือที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากโรงพยาบาลบางรักนั้นมักจะมีแบคทีเรียและเชื้อราปนอยู่ ก่อนจะแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ต้องกำจัดแบคทีเรียและราโดยใช้เพนนิซิลิน 5,000 ยูนิต ไดฮัยโดรสเตรปโตมัยซิน 5,000 ไมโครกรัม และมัยโคสแตติน 300 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มล. ซึ่งจะใส่ยาเพียง 2–3 ครั้งก็กำจัดได้หมด จึงนำเชื้อที่ได้ไปแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้ดัดแปลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM (cystein-peptone–liver–maltose)[5] โดยไม่ใส่วุ้นและลดปริมาณซีรัมเหลือเพียง 0.5 มล. ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 8 มล. จึงเรียก CPLM–NA ซึ่งจะประกอบด้วย 2.4 กรัม cystein monohydrochloride 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 เติม 0.5% Methylene blue 0.7 มล. แบ่งใส่หลอดเลี้ยงเชื้อหลอดละ 8 มล. และนึ่งฆ่าเชื้อ ซีรัมและยาปฏิชีวนะจะเติมใส่หลอดก่อนใช้ เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อได้นาน 14 วันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์

นำ 0.5 มล. ของเชื้อ T. vaginalis ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง จนปราศจากเชื้อแบคทีเรียและราอายุ 48 ชั่วโมงมาผสมกับอาหารแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ชั้นบน (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) ซึ่งประกอบด้วย 0.8% วุ้นใน 5 มล. ของ CPLM[7] เพนนิซิลิน 5,000 ยูนิต และไดฮัยโดรสเตรปโตมัยซิน 5,000 ไมโครกรัมต่อ มล.อาหาร ซีรัมคน (อุ่นที่ 56 องศาเซลเซียส 30 นาที เพื่อทำลายคอมพลีเมนท์แล้ว) 1 มล. และอุ่นจนได้ 40 องศาเซลเซียส เทอาหารแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ชั้นบนลงในจานแก้วเลี้ยงเชื้อขนาด 20 มล. ที่มีอาหาร

แยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ชั้นล่างแข็งตัวอยู่แล้วโดยเร็ว ปิดฝา นำจานแก้วแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์วางในเดสสิเคเตอร์ จุดเทียนไข ปิดฝาเดสสิเคเตอร์ เมื่อเทียนดับปิด stopcock จะทำให้คาร์บอนไดออกไซด์ในเดสสิเคเตอร์สูงเกินร้อยละ 2[8] ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อาหารแข็งตัว อาหารแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ชั้นล่างประกอบด้วย 1.6 % วุ้นใน CPLM 10.0 มล. เพนนิซิลิน 5,000 ยูนิตและไดฮัยโดรสเตรปโซมัยซิน 5,000 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มล. นึ่งฆ่าเชื้อและเก็บในหลอดแก้วปิดจุกไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเมื่อจะใช้ต้องนำไปอุ่นที่ 40 องศาเซลเซียส เทใส่จานแก้ว ทิ้งให้แข็งตัวในเดสสิเคเตอร์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 2 เมื่ออาหารทั้งชั้นบนและชั้นล่างแข็งตัวแล้วนำเดสสิเคเตอร์ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3-5 วัน จะเห็นโคโลนีเป็นจุดขาวเล็กขนาด 0.5–1 มม. เลือกโคโลนีที่รูปร่างต่างกัน 2–4 โคโลนีใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุ CPLM–NA 2–4 หลอด ใช้สเตอไรล์ปาสเตอร์-ปิเปตบี้ให้โคโลนีแยกจากกัน เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองสำหรับใช้ศึกษาเอ็นซัยม์ต่อไป

4. การศึกษาเอ็นซัยม์โดยสตาร์ชเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส

T. vaginalis ที่แยกสายพันธุ์บริสุทธิ์และอยู่ใน CPLM–NA ซึ่งปราศจากเชื้อแบคทีเรีย รา อายุได้ 48 ชั่วโมงครั้งละ 12 สายพันธุ์บริสุทธิ์จะถูกนำมาปั่น 2,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนน้ำ นำตะกอนปรสิตที่ได้มาล้างด้วย 0.15M NaCl 1.0 มล. ปั่น 2,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที รวม 3 ครั้ง ดูดส่วนน้ำทิ้ง ทำให้ T. vaginalis ใน 0.5 มล. น้ำเกลือแตกตัวโดยเติม 30 ไมโครลิตรของ 1 % triton X–100 ใน EDTA–Tris–HCl buffer, pH 7.4 ใช้ปาสเตอร์-ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลง 1–2 ครั้ง ดูดซับสารละลายปรสิตนี้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 7 × 5 มิลลิเมตรแผ่นละ 1 สายพันธุ์บริสุทธิ์ นำไปใส่ในหลุมที่เจาะไว้แล้วบนสตาร์ชเจลเพื่อแยกไอโซซัยม์โดยอิเล็คโตรฟอรีซิส

สตาร์ชเจลที่ใช้เตรียมจาก 9 % แป้งมัน สำหรับอิเล็คโตรฟอรีซิสใน 250 มล. ของสารละลายเจือจาง 1 : 25 ของ 0.45 M tris/0.16 M citric acid, pH 6.0[9] ต้มจนแป้งสุกใน suction flask ขนาด 1 ลิตรที่มีแขนด้านข้าง เมื่อแป้งสุกใสดีแล้ว ดูดฟองอากาศ (degas) ในเนื้อแป้งจนหมดด้วย vacuum pump เทแป้งที่ปราศจากฟองอากาศลงในแบบพิมพ์ ซึ่งประกอบด้วยกรอบพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาดภายใน 18 × 18 ซม. หนา 6 มม. ซึ่งวางทาบบนแผ่นกระจกเรียบขนาด 24 × 24 ซม. ตั้งไว้

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

อิเล็คโตรฟอรีซิสทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีระบบน้ำเย็นไหลวน(cooling system) ระบายความร้อนจากแผ่นเจลตลอดเวลาที่ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 75 มิลลิแอมแปร์คงที่นาน 4 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายเจือจาง 1 : 2 ของ 0.45 M tris/0.16 M citric acid, pH 6.0 เป็นอิเล็คโทรดบัฟเฟอร์[9] แผ่นเจลที่ผ่านกระแสไฟฟ้าแยกไอโซซัยม์แล้วจะถูกนำมาผ่าฝานครึ่งหนาแผ่นละ 3 มม. เมื่อได้ดึงกระดาษกรองที่ดูดซับตัวอย่างออกแล้ว ใช้ด้านหน้าตัดรอยฝานของเจลครึ่งใดครึ่งหนึ่งสำหรับย้อมสี วิธีย้อมสีที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นการย้อมซึ่งดูประสิทธิภาพการทำงานของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสโดยเฉพาะ แถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GPI จะปรากฏบนแผ่นเจลภายใน 20–30 นาทีเมื่อย้อมด้วยสีซึ่งประกอบด้วย disodium fructose –6–phosphate 50 มก., glucose–6–phosphate dehydrogenase (140 units/ml) 10 μl, 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] เมื่อแถบไอโซซัยม์ของ GPI ปรากฏชัดแล้ว นำแผ่นเจลไปถ่ายภาพและบันทึกผลโดยใช้แผ่นพลาสติกใสทาบบนเจล ลอกแถบไอโซซัยม์ วัดระยะทางของแต่ละแถบจากจุดเริ่มต้นและนับจำนวนแถบของแต่ละตัวอย่าง T. vaginalis สายพันธุ์บริสุทธิ์

ผลการทดลอง

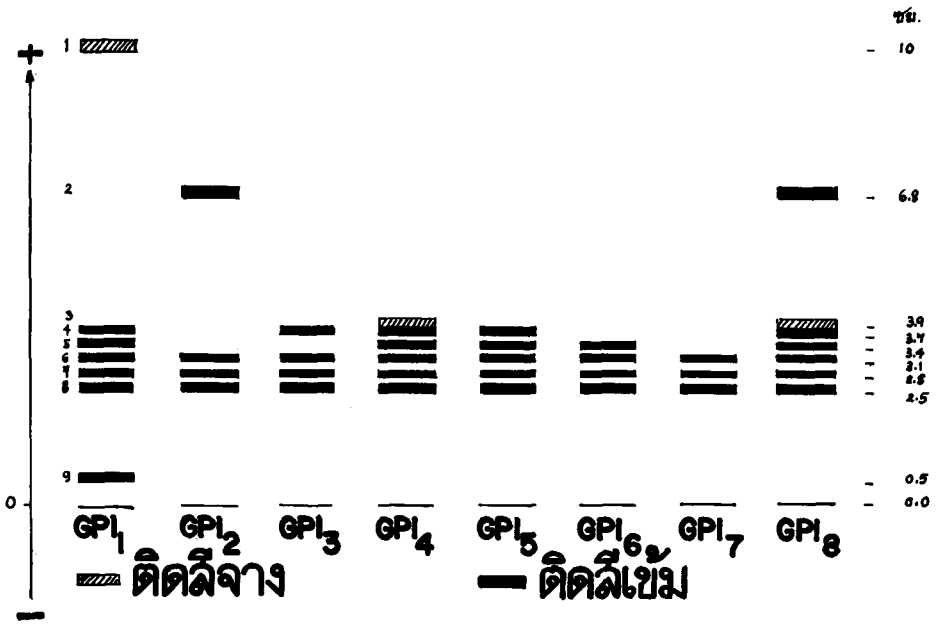
T. vaginalis 30 ตัวอย่างที่เก็บจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และ 20 ตัวอย่างจากศูนย์บริการสาธารณสุข ดินแดง รวม 50 ตัวอย่างแยกเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ไว้ 100 สายพันธุ์บริสุทธิ์ การเก็บตัวอย่างจะได้โดยเฉลี่ยสัปดาห์ละ 2–3 ตัวอย่างซึ่งจะทยอยเพาะเลี้ยงและแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์พร้อมทั้งศึกษาเอ็นซัยม์ไปพร้อมๆ กัน แต่ละตัวอย่างเชื้อที่เก็บจากผู้ป่วยจะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อแบคทีเรียและราได้ใน 8–10 วัน ใช้เวลาในการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงอีก 1 สัปดาห์จึงนำมาศึกษาเอ็นซัยม์ได้ ขณะเดียวกันจะเก็บสายพันธุ์บริสุทธิ์ไว้เปรียบเทียบรูปแบบเอ็นซัยม์หรือนำมาแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ซ้ำในกรณีที่เกิดปัญหาโดยวิธีเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (subculture) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุก 48 ชั่วโมง ดังนั้น T. vaginalis ที่นำมาศึกษาเอ็นซัยม์จะถูกเพาะเลี้ยงในภาวะปราศจากแบคทีเรียและรา (asenic condition) สายพันธุ์บริสุทธิ์อย่างน้อย 3–10 วันก่อนศึกษาเอ็นซัยม์

ผลการศึกษาไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสใน 100 สายพันธุ์บริสุทธิ์ของ T. vaginalis พบไอโซซัยม์ทั้งหมด 9 แถบ เคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกทั้งหมด เรียกชื่อเป็นไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส 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 GPI_{1-7} ดังปรากฏในแผนภาพและรูปภาพถ่ายจากเจล (รูปที่ 1 และ 2)

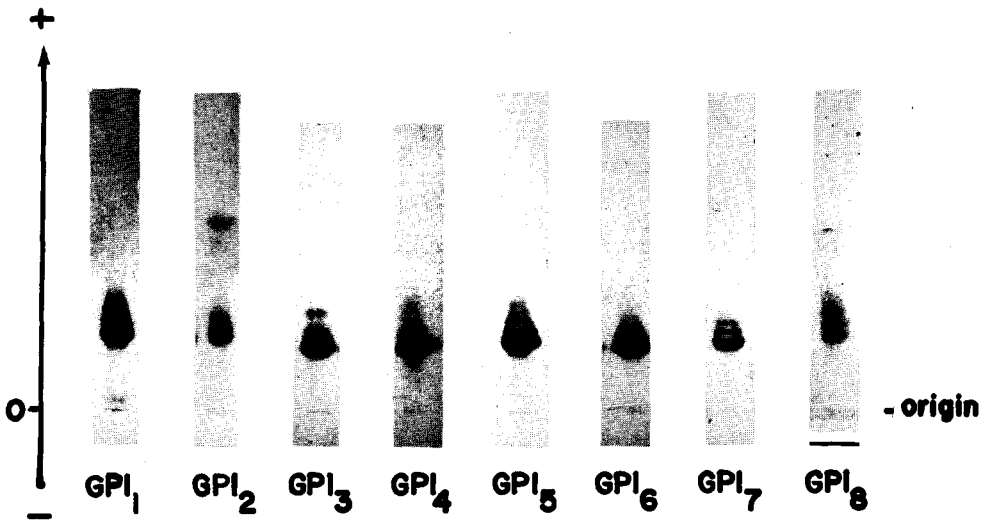
ตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis อีก 50 ตัวอย่างที่ได้จากห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา โรงพยาบาลบางรัก ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยเช่นกัน ได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย รา แล้วแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ ตัวอย่างเชื้อปรสิตจากผู้ป่วยหนึ่งรายจะเลือก 4 โคโลนีจากจานเพาะเลี้ยง T. vaginalis ตั้งแต่ได้รับตัวอย่างจนกระทั่งศึกษาเอ็นซัยม์ประมาณ 8–10 วัน จำนวนตัวอย่างที่ได้รับจากโรงพยาบาลบางรักโดยเฉลี่ยอาทิตย์ละ 2–3 ตัวอย่าง จึงทยอยเพาะเลี้ยงและศึกษาเอ็นซัยม์จนครบ 50 ตัวอย่าง หรือ 200 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ผลการแยกไอโซซัยม์ พบแถบไอโซซัยม์ลักษณะการเคลื่อนที่ตลอดจนระยะทางของแต่ละไอโซซัยม์ที่เคลื่อนห่างจุดเริ่มต้นเป็นแบบเดียวกับใน 100 สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ศึกษาก่อนหน้านี้ การจัดเรียงตัวของแถบไอโซซัยม์ พบรูปแบบที่ต่างจากเดิมเพิ่มอีก 1 รูปแบบ จึงเรียกเป็น GPI_8 (รูปที่ 1 และ 2) ดังนั้นการศึกษาไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสใน T. vaginalis 100 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บเชื้อปรสิตจากผู้ป่วย 100 ราย ในเขตกรุงเทพมหานคร จึงทำให้ถูกแบ่งออกเป็นไทพ์ได้ 8 ไทพ์ ตามรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส

วิจารณ์

แถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสทั้ง 9 แถบที่พบใน T. vaginalis มีประสิทธิภาพในการทำงานมากน้อยต่างกัน ความแตกต่างนี้เห็นได้จากการติดสีย้อม ถ้าติดสีเข้มชัดแสดงว่ามีประสิทธิภาพการทำงานสูง ติดสีจางแสดงว่าประสิทธิภาพต่ำ (รูปที่ 1) ซึ่งได้แก่แถบที่ 1 ใน GPI_1 และแถบที่ 3 ใน GPI_4 ของ T. vaginalis สำหรับ GPI_1 นั้นไม่เป็นปัญหาในการวิเคราะห์ผลเนื่องจากรูปแบบต่างจากอันอื่นอย่างเด่นชัด แต่ GPI_4 และ GPI_5 นั้น การจำแนกต้องระมัดระวังมากเนื่องจากไอโซซัยม์แถบที่ 3



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงรูปแบบไอโซซัยม์ของกลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ใน T.Vaginalis



รูปที่ 2 ภาพถ่ายจากสตาร์ชเจลแสดงรูป 8 แบบไอโซซัยม์ของกลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ใน T.Vaginalis

(รูปที่ 1) ใน GPI_4 มีประสิทธิภาพการทำงานต่ำ ทำให้อาจจำแนกผิดเป็น GPI_5 ได้ ดังนั้นการแยก T. vaginalis ออกเป็นไทพ์ GPI_4 และ GPI_5 จึงต้องทำซ้ำหลายครั้งจนได้ผลตรงกัน 3 ครั้งติดต่อกันในแต่ละสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงไว้จึงเชื่อถือได้ นอกจากนี้รูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสชนิด GPI_4 GPI_5 GPI_6 และ GPI_7 ซึ่งมีส่วนของแถบไอโซซัยม์ที่คล้ายคลึงกัน จึงทำให้เข้าใจได้ว่าสายพันธุ์ที่แยกได้อาจไม่ใช่สายพันธุ์บริสุทธิ์ ในกรณีเช่นนี้มักต้องทำการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ซ้ำอีกครั้งโดยวิธีเดิม[7] แต่จะเจือจางปรสิตยิ่งขึ้น เพื่อให้โคโลนีที่ได้กระจายห่างกันมากขึ้น ป้องกันการปะปนขณะแยกโคโลนีออกมาใส่หลอดเพาะเลี้ยง การแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยวิธีเพาะเลี้ยง T. vaginalis ในระหว่างขั้นวุ่นนี้[7] Takayanaki และคณะ[4] พบว่าเป็นวิธีแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้ผลเชื่อถือได้ โดยที่ Takayanaki และคณะ[4] ก็ใช้วิธีดังกล่าวนี้ในการศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์อะมัยเลสใน T. vaginalis ที่เก็บจากผู้ป่วย 65 รายแยกเป็น 258 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ผลการศึกษาพบแถบไอโซซัยม์ 7 แถบ แบ่งปรสิตออกเป็น 9 ไทพ์ คล้ายคลึงกับผลการศึกษาเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสครั้งนี้

GPI แบบที่ 8 หรือ GPI_8 ที่พบใน T. vaginalis เป็นอีกรูปแบบที่อาจก่อให้เกิดข้อข้องใจว่า รูปแบบที่ได้เป็น mixed infections ของ T. vaginalis ไทพ์ GPI_2 และไทพ์ GPI_4 แต่จากการทดลองทำการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์และศึกษาเอ็นซัยม์ซ้ำให้ผลยืนยันว่าไม่ใช่ mixed infections จึงเรียกเป็น GPI_8 การพบ mixed infections ในที่นี้หมายถึงผู้ป่วยหนึ่งรายที่ติดเชื้อ T. vaginalis เมื่อนำมาแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์แล้ว พบรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสต่างรูปแบบกันใน 2 สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ เช่น พบสายพันธุ์บริสุทธิ์หนึ่งเป็นไทพ์ GPI_7 อีกสายพันธุ์บริสุทธิ์เป็นไทพ์ GPI_2 เป็นต้น จากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย 100 ราย พบอุบัติการของ mixed infections เพียง 2 รายเท่านั้น แต่แสดงว่า mixed infections ของ T. vaginalis ที่ต่างไอโซซัยม์ไทพ์นั้นพบได้ในผู้ป่วย ซึ่งควรจะได้ศึกษาความสำคัญด้านคลินิค การต้านยาและภาวะแทรกซ้อนต่อไป ส่วนรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสที่พบบ่อยที่สุดได้แก่ GPI_4 พบได้ร้อยละ 53.35 รองลงมาได้แก่ GPI_5 พบร้อยละ 14.5 GPI_7 ร้อยละ 12.5 GPI_6 ร้อยละ 12 GPI_3 ร้อยละ 4 GPI_8 ร้อยละ 1.6 ส่วน GPI_1 และ GPI_2 ร้อยละ 1 ทั้งสองรูปแบบ

เมื่อเปรียบเทียบผลการแยก T. vaginalis ออกเป็นไทพ์ตามรูปแบบไอโซซัยม์กับการแยกไทพ์โดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา[3] จะพบว่าการแยกโดยรูปแบบไอโซซัยม์ทำได้ละเอียด และเป็นการศึกษาชีวโมเลกุลของปรสิตโดยตรง และเทคนิคนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการจำแนกไทพ์ของโปรโตซัว[4,11,12] ส่วนการศึกษาทางอิมมูโนวิทยานั้นเป็นการศึกษาที่ต้องผ่านปฏิกิริยาของโฮส์ทต่อปรสิต จึงอาจจำแนกได้ไม่ละเอียดนักถ้าโฮส์ทและปรสิตมีปฏิกิริยาตอบโต้กันน้อย รูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ใน T. vaginalis ที่เลี้ยงใน asenic condition ซึ่งเป็นภาวะผิดธรรมชาติสำหรับ T. vaginalis จากการศึกษานี้สามารถคงรูปแบบของแต่ละไทพ์ได้นานถึง 1 ปี มี T. vaginalis 42 สายพันธุ์บริสุทธิ์ซึ่งถูกเลี้ยงใน asenic condition นาน 3 ปี และเปลี่ยนรูปแบบไอโซซัยม์จาก GPI_5, GPI_6, GPI_7, เป็น GPI_4 ทั้งนี้คงเนื่องจากเกิดการผ่าเหล่า (mutation) ขึ้น ส่วนความสำคัญของไทพ์ต่าง ๆ ต่ออาการทางคลินิค การดื้อต้านยาและภาวะแทรกซ้อนอื่น ๆ เป็นสิ่งที่ควรจะได้ศึกษาต่อไป

สรุป

T. vaginalis จำนวน 300 สายพันธุ์บริสุทธิ์ซึ่งเก็บตัวอย่างปรสิตจากผู้ป่วยหญิงในเขตกรุงเทพมหานคร 100 ราย ถูกเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM–NA จนอายุ 48 ชั่วโมงในภาวะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย แล้วนำไปศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส พบแถบไอโซซัยม์ 9 แถบแบ่งเป็น 8 รูปแบบ จึงสามารถจำแนก T. vaginalis ออกเป็น 8 ไอโซซัยม์ไทพ์ได้แก่ GPI_{1-8} และ T. vaginalis ไอโซซัยม์ไทพ์ GPI_4 พบได้บ่อยที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนโครงการพัฒนามหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2522) และทุนการศึกษาพระมหิตลาธิเบศร์ บรมราชชนก (พ.ศ. 2524) ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ขอขอบพระคุณแพทย์ พยาบาล และเจ้าหน้าที่แผนกนรีเวชวิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ศูนย์บริการสาธารณสุข ดินแดง และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา โรงพยาบาลบางรัก กรุงเทพมหานคร ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis ขอบพระคุณศูนย์บริการโลหิตสภากาชาดไทย ที่ให้ซีรัมใช้ตลอดการวิจัย และขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาชีวเคมีคณะแพทยศาสตร์ 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

จุฬาลงกรณ์เวชสารได้รับต้นฉบับเมื่อวันที่ 1 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2527.