



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1

### งานวิจัยเรื่อง

“การวิเคราะห์จีโนมในไมโทคอนเดรียของอะแคนธามีบาเพื่อการจำแนกจีโนไทป์  
โดยวิธีใหม่ การศึกษาสายวิวัฒนาการและการวินิจฉัย”

“Insights into the mitochondrial genomes of *Acanthamoeba*: Implications  
for novel genotyping, phylogeny and diagnosis”

### หน่วยงานวิจัย

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### คณะผู้วิจัย

ศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิวาศย์

รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์

นางสาวอรัศยา พัฒนวงศ์

อ. นพ. ดร. ไพโรจน์ ธีรน้อยพงศ์

GRANT NO: GR-B\_61\_061\_30\_19

ปี พ.ศ. 2561

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินอุดหนุนการวิจัยจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2561 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวนภาพร กวมทรัพย์ นายภัทกร บุษพันธ์ นายสุรศักดิ์ ยานมณี นางสาวรัตนทิพร โกสุรินทร์และนางสาวสุนิสา สงสัยเกตุ ในการช่วยงานการวิจัย

คณะผู้วิจัย

เมษายน 2562

## บทคัดย่อ

โปรโตซัวที่ดำรงชีพเป็นอิสระในจลิน์สอะแคนธามีบาสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงและถึงแก่ชีวิตในคนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาวะกระจกตาอักเสบและภาวะสมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ในธรรมชาติอะแคนธามีบาดำรงอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย อาทิ ในดิน ฟัน ระบบทำความเย็น น้ำเสียและแหล่งน้ำในธรรมชาติ เป็นต้น การจำแนกจีโนมไทป์ของอะแคนธามีบาในปัจจุบันอาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไดแอกโนสติกแฟรกเมนต์ 3 (DF3) ในยีนไรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็กซึ่งมักมีปัญหาในการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นการค้นหาอื่นจึงมีความจำเป็นเพื่อการจำแนกจีโนมไทป์ของอะแคนธามีบา เช่น ยีนในจีโนมของไมโตคอนเดรีย ทั้งนี้จีโนมในไมโตคอนเดรียของอะแคนธามีบามีขนาดประมาณ 39.2 กิโลเบสถึง 41.6 กิโลเบส ประกอบด้วยยีนอย่างน้อย 55 ชนิดซึ่งยีนหนึ่งคือยีนสำหรับไซโตโครมบี ขอบเขตของการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษาระบาดวิทยาของอะแคนธามีบาในแหล่งน้ำในธรรมชาติของประเทศไทยและการวิเคราะห์จีโนมของไมโตคอนเดรียของอะแคนธามีบาจากจีโนมไทป์ที่ชัดเจน ในการศึกษาอุบัติการณ์ของอะแคนธามีบาได้ทำการสำรวจแหล่งน้ำจืด 40 แห่งที่อยู่ใน 10 จังหวัดใน 5 ภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี ลำพูน สกลนคร ชัยภูมิ สระบุรี สุพรรณบุรี ปราจีนบุรี ระยอง ระนอง และพัทลุง โดยใช้ตัวอย่างทั้งสิ้น 4,000 ตัวอย่าง ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้วันร้อยละ 1.5 ในจานเพาะเลี้ยงที่มีแบคทีเรียเอสเชอริเชียโคไลที่ผ่านความร้อน ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบอะแคนธามีบาจากแหล่งน้ำในทุกจังหวัดที่สำรวจ โดยมีอัตราการตรวจพบเฉลี่ยร้อยละ 14.43 ของตัวอย่างทั้งหมด อะแคนธามีบาที่พบมีทุกกลุ่มจำแนกตามลักษณะของระยะซิสต์ซึ่งซิสต์ที่อยู่ในกลุ่ม 2 พบมากที่สุดคือร้อยละ 67.42 รองลงมาคือซิสต์ที่อยู่ในกลุ่ม 3 และกลุ่ม 1 ตามลำดับ ตัวอย่างร้อยละ 22.01 มีซิสต์ที่อยู่ปะปนกันมากกว่า 1 กลุ่ม จากการวิเคราะห์ส่วน DF3 ในยีนไรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็กจาก 214 ตัวอย่างพบว่าประกอบด้วยแฮปโลไทป์ต่างกัน 74 แบบ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนไรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็กครอบคลุม 2.0 กิโลเบสถึง 2.2 กิโลเบส พบว่าตัวอย่างเหล่านี้สามารถจำแนกเป็นจีโนมไทป์ได้ 16 แบบ ได้แก่ จีโนมไทป์ T2/6b, T3, T4B, T4C, T4D, T4F, T4G, T4Neff, T5, T11, T12, T13, T17, T18, T20 และ New#1 ซึ่งเป็นจีโนมไทป์ใหม่ เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างอะแคนธามีบาทุกตัวอย่างจากผู้ป่วยกระจกตาอักเสบและตัวอย่างจากแหล่งน้ำในธรรมชาติที่มีจีโนมไทป์ T4B, T4C, T4D และ T4G มีคุณลักษณะทนความร้อน โดยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อให้ได้ผลผลิตสายยาวจำนวน 6 ส่วนที่ครอบคลุมความยาวตลอดทั้งจีโนมของไมโตคอนเดรียของอะแคนธามีบาโดยแต่ละส่วนมีความยาว 4.3 กิโลเบสถึง 9.4 กิโลเบสจาก 20 ตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ต่างกันได้เป็นผลสำเร็จเพื่อใช้ในการเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษาต่อไป สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนสำหรับไซโตโครมบีครอบคลุมความยาว 1,155 เบสจาก 65 ตัวอย่าง พบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จำนวนมากซึ่งสามารถใช้จำแนกจีโนมไทป์โดยการวิเคราะห์สายใยพันธุกรรมได้เป็นจีโนมไทป์ต่าง ๆ ที่สอดคล้องกับการจำแนกโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนไรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็ก โดยสรุปพบว่าแหล่งน้ำในธรรมชาติในประเทศไทยมีอะแคนธามีบาหลากหลายจีโนมไทป์ปะปนอยู่และพบว่ายีนในจีโนมของไมโตคอนเดรียสามารถใช้เป็นเป้าหมายทางเลือกในการจำแนกจีโนมไทป์ของอะแคนธามีบาได้

## Abstract

Free-living protozoa in the genus *Acanthamoeba* can cause severe and lethal infections in humans, especially keratitis and meningoencephalitis. In nature, acanthamoebae occupy diverse ecological niche such as soil, dust, cooling systems, sewage and natural water sources. To date, genotype assignment of *Acanthamoeba* is solely relied on sequence analysis of the diagnostic fragment 3 (DF3) of the nuclear small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene that can be compromised by unreliable sequence alignment. Therefore, searching for alternative gene target such as loci in mitochondrial genome is promising for genotyping of *Acanthamoeba*. The mitochondrial genomes of *Acanthamoeba* comprised ~39.2 kb to 41.6 kb in which at least 55 genes have been identified, one of which is the gene encoding cytochrome *b*. The scopes of this study include epidemiology of *Acanthamoeba* in natural water sources in Thailand and analysis of the mitochondrial genome of certain genotypes. To determine the prevalence and distribution of *Acanthamoeba*, 4,000 water samples from 40 natural fresh water sources located in 10 provinces (Uttaradit, Lamphun, Sakon Nakhon, Chaiyaphum, Saraburi, Suphan Buri, Prachinburi, Rayong, Ranong and Phatthalung) in 5 regions of Thailand were collected and searched for *Acanthamoeba* by cultivation with 1.5% non-nutrient agar plate lawn with heat-inactivated *Escherichia coli*. Results revealed that *Acanthamoeba* could be isolated from the water sources of all these provinces with an average recovery rate of 14.43%. All three morphological groups of *Acanthamoeba* cysts were recovered, characterized by the most common group II accounting for 67.42% of positive samples, followed by groups III and I. Mixed morphological groups were also common among isolates, representing 22.01% of samples. Based on analysis of the DF3 region in the SSU rRNA gene, 74 distinct haplotypes were found among 214 isolates. However, further sequencing of the SSU rRNA gene encompassing 2.0-2.2 kb has validated that these haplotypes could be assigned to 16 genotypes including a novel genotype, i.e. T2/6b, T3, T4B, T4C, T4D, T4F, T4G, T4Neff, T5, T11, T12, T13, T17, T18, T20 and New#1. Interestingly, all clinical isolates from keratitis patients and isolates from natural water sources bearing genotypes T4B, T4C, T4D and T4G exhibited thermotolerance phenotype with the capability of growing at 42°C in culture condition. Meanwhile, long PCR amplification of 6 overlapping fragments, measured 4.3-9.4 kb for each fragment, encompassing the complete mitochondrial genomes of 20 distinct genotypes of *Acanthamoeba* was accomplished for deploying as sequencing templates in a subsequent study. Sequencing of the complete cytochrome *b* gene, spanning 1,155 bp of 65 isolates has revealed substantial nucleotide substitutions that could be phylogenetically assigned to distinct genotypes corresponding to genotyping based on the SSU rRNA locus. In conclusion, natural water sources in Thailand contained various genotypes of *Acanthamoeba* and the mitochondrial cytochrome *b* gene is an alternative target for genotyping of *Acanthamoeba*.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	8
บทนำ	9
วัตถุประสงค์การวิจัย	13
วิธีดำเนินการวิจัย	13
ผลการวิจัย	16
วิจารณ์ผลการวิจัย	43
สรุปผลการวิจัย	45
แผนงานในปีที่ 2	46
บรรณานุกรม	47
ประวัตินักวิจัยและคณะ	51

## สารบัญตาราง

	หน้า	
ตารางที่ 1	รายละเอียดสถานที่เก็บตัวอย่างน้ำและคุณภาพของน้ำในแต่ละจังหวัด	17
ตารางที่ 2	อัตราการตรวจพบ <i>Acanthamoeba</i> จากแหล่งน้ำในจังหวัดต่าง ๆ	19
ตารางที่ 3	การกระจายของ <i>Acanthamoeba</i> จำแนกตามลักษณะของระยะ cyst ในจังหวัดต่าง ๆ	20
ตารางที่ 4	ความสามารถในการเจริญในอุณหภูมิต่าง ๆ ของ <i>Acanthamoeba</i> ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial genome	27
ตารางที่ 5	ความยาวของผลผลิต PCR จำแนกตาม fragment ต่าง ๆ ในตัวอย่าง <i>Acanthamoeba</i> ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial genome	28
ตารางที่ 6	molecular diversity indices ในยีน cytochrome <i>b</i> ของแต่ละ genotype ของ <i>Acanthamoeba</i>	42
ตารางที่ 7	ค่า nucleotide divergence ( <i>k</i> ) และค่าเฉลี่ยการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่งระหว่างประชากร (Dxy) ระหว่างกลุ่ม genotypes ในยีน cytochrome <i>b</i> ของ <i>Acanthamoeba</i>	43

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการทำ PCR และ sequencing ของยีน SSU rRNA (18S rRNA)	14
รูปที่ 2 โครงสร้างและองค์ประกอบของยีนใน mitochondrial genome ของ <i>Acanthamoeba</i>	15
รูปที่ 3 แผนที่แสดงจังหวัดที่เก็บตัวอย่างน้ำ	17
รูปที่ 4 ตัวอย่างลักษณะ cyst ใน morphological group II ของ <i>Acanthamoeba</i> จากแหล่งน้ำในจังหวัดสระบุรี	20
รูปที่ 5 จำนวน genotypes ของ <i>Acanthamoeba</i> ที่พบจากแหล่งน้ำที่สำรวจ 214 ตัวอย่าง	21
รูปที่ 6 การกระจายของ genotype ของ <i>Acanthamoeba</i> วิเคราะห์จากยีน SSU rRNA จากตัวอย่างน้ำ 214 ตัวอย่าง	22
รูปที่ 7 Phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน SSU rRNA แสดง genotype ใหม่ (Novel#1)	23
รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของ PCR primers สำหรับ 6 fragments จาก mitochondrial genome ของ <i>Acanthamoeba</i>	25
รูปที่ 9 ตัวอย่างผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณ DNA จาก 6 fragments ใน mitochondrial genome ของ <i>Acanthamoeba</i>	26
รูปที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome <i>b</i> ใน mitochondrial genome ของ <i>Acanthamoeba</i> จากตัวอย่างจากแหล่งน้ำในประเทศไทย	29
รูปที่ 11 Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน cytochrome <i>b</i> ของ mitochondrial genome ของ <i>Acanthamoeba</i>	41

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

PCR	=	polymerase chain reaction
DNA	=	deoxyribonucleic acid
RNA	=	ribonucleic acid
SSU rRNA	=	small subunit ribosomal RNA
A	=	adenine
T	=	thymine
G	=	guanine
C	=	cytosine
dNTP	=	deoxyribonucleotide triphosphate
dATP	=	deoxyadeninosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
PCR	=	polymerase chain reaction
T <sub>m</sub>	=	melting temperature
Taq	=	<i>Thermus aquaticus</i>
ddH <sub>2</sub> O	=	double distilled water
bp	=	base pair
kb	=	kilobases
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
mM	=	millimolar
ng	=	nanogram
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar
UV	=	ultraviolet
°C	=	degree celsius
MgCl <sub>2</sub>	=	Magnesium chloride
π <sub>S</sub>	=	synonymous nucleotide diversity
π <sub>N</sub>	=	nonsynonymous nucleotide diversity
π	=	nucleotide diversity
k	=	nucleotide divergence
D <sub>xy</sub>	=	average number of nucleotide substitution per site between populations
R <sub>m</sub>	=	minimum number of recombination events



## 1. บทนำ

*Acanthamoeba* ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1913 โดย Puschkarew ได้แยกเชื้อดังกล่าวได้จาก ละเอียดองุ่น (Pushkarew 1913; Page 1967) พยาธิสภาพในสมองที่เกิดจาก *Acanthamoeba* เรียกว่า granulomatous amoebic encephalitis ซึ่งจัดเป็นโรคที่เกิดจากจุลชีพฉวยโอกาส (opportunistic disease) ชนิดหนึ่งเนื่องจากส่วนใหญ่พบในผู้ที่มีภาวะบกพร่องในระบบเมตาโบลิซึม ระบบประสาทวิทยา ตลอดจนระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ผู้ที่ติดเชื้อ HIV/AIDS ผู้ป่วยโรค systemic lupus erythematosus ผู้ที่มีการเจ็บป่วยเรื้อรัง ผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ที่เจ็บป่วยด้วยโรคเรื้อรังต่าง ๆ หรือในผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ทั้งนี้ผู้ป่วยเหล่านี้ไม่จำเป็นต้องมีประวัติการสัมผัสกับแหล่งน้ำมาก่อน (Schuster and Visvesvara 2004a; Schuster and Visvesvara 2004b; Shirwadkar et al 2006) อาการของโรค granulomatous amoebic encephalitis มักดำเนินไปอย่างช้า ๆ กินเวลาหลายสัปดาห์หรือแรมเดือน โดยผู้ป่วยจะมีอาการปวดศีรษะ คอแข็ง ภาวะการรับรู้สติเปลี่ยนแปลงจากปกติ คลื่นไส้ อาเจียน ผู้ป่วยมักมีไข้ต่ำ ๆ อ่อนเพลีย การมองเห็นผิดปกติ อัมพาต ชักและหมดสติ หรืออาการทางอื่น ๆ ทางสมอง ทั้งนี้ขึ้นกับบริเวณของสมองที่ถูกทำลาย (Martinez and Visvesvara 1997) สำหรับการพยากรณ์โรคนั้นพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่มักเสียชีวิตเนื่องจากการวินิจฉัยโรคมักล่าช้าหรือวินิจฉัยได้หลังจากการผ่าตัดผู้ที่เสียชีวิต การที่ *Acanthamoeba* สามารถเปลี่ยนจากรยะ trophozoite เป็น cyst ในเนื้อเยื่อได้ดี ส่งผลทำให้ยาต้านจุลชีพหลายชนิดไม่สามารถทำลายเชื้อได้ นอกจากนี้ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องของผู้ป่วยที่มีอยู่เดิมล้วนมีผลต่อความรุนแรงของโรคเช่นกัน (Marciano-Cabral and Cabral 2003)

นอกจาก granulomatous amoebic encephalitis แล้ว *Acanthamoeba* ยังสามารถก่อโรคในอวัยวะอื่น ๆ เช่น ผิวหนัง ปอด และกระจกตา เป็นต้น โดยภาวะกระจกต้ออักเสบจาก *Acanthamoeba* (*Acanthamoeba* keratitis) นั้นพบได้บ่อยกว่า granulomatous amoebic encephalitis และการติดเชื้อ *Acanthamoeba* ในระบบอื่น ๆ ของร่างกาย *Acanthamoeba* keratitis เป็นการอักเสบของกระจกตาร่วมกับอาการปวดตาที่รุนแรง ผู้ป่วยอาจสูญเสียความสามารถในการมองเห็นหรืออาจต้องได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนกระจกตาหรือเอาลูกตาออก ซึ่งมักพบในกรณีที่วินิจฉัยไม่ได้ในระยะแรก (Jones et al 1975; Jongwutiwes et al 2000; Seal 2003) สำหรับปัจจัยที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมักพบว่าสัมพันธ์กับการเกิดแผลถลอกที่กระจกตา เช่น จากอุบัติเหตุของแข็งกระทบกระจกตา หรือการใช้ contact lens ที่มีการใช้น้ำเกลือที่มีการปนเปื้อนของ *Acanthamoeba* ในการทำความสะอาด contact lens ดังกล่าว โดยทั่วไปผู้ที่เป็ *Acanthamoeba* keratitis มักเกิดขึ้นกับตาเพียงข้างเดียวเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจาก *Acanthamoeba* keratitis เป็นการอักเสบและเกิดแผลที่กระจกตาคัลลัสกับการติดเชื้อ herpes simplex virus หรือการติดเชื้อราบางชนิด ดังนั้นการวินิจฉัยแยกโรคโดยอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่เป็น *Acanthamoeba* keratitis มักเป็นการติดเชื้อเฉพาะที่ โดยไม่มีการลุกลามหรือแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น จึงไม่พบว่า *Acanthamoeba* keratitis มีความสัมพันธ์กับการเกิด granulomatous amoebic encephalitis ในภายหลัง สำหรับการวินิจฉัย *Acanthamoeba* keratitis สามารถทำได้โดยการชุดตัวอย่างเนื้อเยื่อกระจกตาที่เป็นแผลมาทำการตรวจหา *Acanthamoeba* ระยะ trophozoite หรือ cyst โดยตรงหรือการนำตัวอย่างดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี heat-inactivated *Escherichia coli* โดยวิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบเชื้อได้เพียงร้อยละ 33 และร้อยละ 7 ตามลำดับเท่านั้น ในขณะที่วิธีการตรวจหา DNA ของ *Acanthamoeba* ให้ผลบวกที่สูงกว่า โดยพบว่าให้ความไวมากถึงร้อยละ 94 (Petry et al 2006) จากการศึกษาคุณลักษณะของเชื้อที่ก่อโรค *Acanthamoeba* keratitis พบว่าส่วนใหญ่มี genotype T4 และมักเป็นสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่าสายพันธุ์ที่ทำให้เกิด granulomatous amoebic encephalitis อย่างไรก็ตามมักพบว่าผู้ป่วย *Acanthamoeba* keratitis มักมีระดับของ secretory IgA ต่ำกว่าปกติ (Clarke and Niederkorn 2006) ภาวะดังกล่าวจึงอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงประการหนึ่งในการเกิดโรค (Visvesvara and Stehr-Green 1990) สำหรับสถานการณ์ของการติดเชื้อ *Acanthamoeba*

ในประเทศไทยพบว่า ส่วนใหญ่ทำให้เกิดภาวะกระจกตาอักเสบและเป็นแผล (Jongwutiwes et al 2000; Kosrirukvongs et al 1988) โดยมีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งที่ต้องสูญเสียสายตาก็จะได้รับการปลูกถ่ายกระจกตา ผู้ป่วยส่วนน้อยที่มีภาวะ granulomatous amoebic encephalitis ซึ่งพบในผู้ที่มีประวัติการเจ็บป่วยเรื้อรังด้วยโรคอื่นมาก่อน นอกจากนี้ภายใน *Acanthamoeba* ยังสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดและบางชนิดสามารถก่อโรคในคนได้ เช่น *Legionella pneumophila*, *Chlamydia*, *Mycobacterium* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น (Adeleke et al 1996; Amann et al 1997; Essig et al 1997; Fritsche et al 1993; Krishna et al 1978; Michel et al 1995; Rowbotham et al 1980; Winięcka-Krusnell and Linder 2001) ดังนั้นจึงเชื่อว่า *Acanthamoeba* อาจมีบทบาทในการแพร่กระจายจุลชีพเหล่านี้ได้

ในระยะแรกของการศึกษาเพื่อจัดหมวดหมู่ นั้น Pussard และ Pons ได้แบ่งโปรโตซัวใน genus *Acanthamoeba* ออกเป็น 3 กลุ่มซึ่งใช้สัญญาณของระยะ cyst เป็นเกณฑ์ โดยผนังชั้นในของ cyst (endocyst) จะหดตัวเข้าไปในรูปแบบที่ต่างกันทำให้เห็นเป็นส่วนยื่นออก (arm) มาชิดกับผนังชั้นนอก (ectocyst) โดยคำนึงถึงขนาดและจำนวนของส่วนที่ยื่นออกภายใน cyst ดังนี้ (Pussard and Pons, 1977)

กลุ่มที่ 1 เส้นผ่าศูนย์กลางของ cyst ยาวมากกว่า 18 ไมโครเมตร trophozoite มีขนาดใหญ่ ผนังของ endocyst และ ectocyst มีระยะห่างกันมาก ตัวอย่าง *Acanthamoeba* ในกลุ่มนี้ เช่น *A. astronyxis*, *A. comandoni* และ *A. echinulata* เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 เส้นผ่าศูนย์กลางของ cyst ยาวน้อยกว่า 18 ไมโครเมตร endocyst และ ectocyst อาจอยู่ชิดหรือห่างจากกัน ผนังชั้นนอกอาจหนาหรือบาง ผนังชั้นในมีทั้งรูปสามเหลี่ยม หลายเหลี่ยม หรือกลม ตัวอย่าง *Acanthamoeba* ในกลุ่มนี้ เช่น *A. mauritaniensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhyode*, *A. paradiunionensis* และ *A. hatchetti* เป็นต้น

กลุ่มที่ 3 เส้นผ่าศูนย์กลางของ cyst ยาวน้อยกว่า 18 ไมโครเมตร ผนังชั้นนอกบาง ผนังชั้นในอาจมีมุมเล็ก ๆ 3-5 มุม ตัวอย่าง *Acanthamoeba* ในกลุ่มนี้ เช่น *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* และ *A. pustulosa* เป็นต้น

อย่างไรก็ตามตราบเท่าปัจจุบันความชัดเจนในการจำแนก species ของอะมีบาในกลุ่มนี้ยังไม่สามารถยึดถือจากลักษณะทางสัญญาณของระยะ trophozoite หรือระยะ cyst ได้ นอกจากนี้ลักษณะของ cyst ยังมีความแปรเปลี่ยนได้ขึ้นกับสภาวะแวดล้อม เช่น คุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น หรือจากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยแม้จะเป็น species เดียวกัน (Jongwutiwes et al 2000) ดังนั้นในระยะต่อมาก็จะมีการประยุกต์โดยการวิเคราะห์โปรตีนของ *Acanthamoeba* ซึ่งสามารถใช้จำแนก species ได้ แต่วิธีดังกล่าวยังขาดข้อมูลมาตรฐานในการบ่งบอกถึง species ที่จำเพาะ ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้วิธีการทางอณูชีววิทยา โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของยีนสำหรับไรโบโซมยูนิตย่อยขนาดเล็ก (small subunit ribosomal RNA, SSU rRNA) พบว่าสามารถจำแนก *Acanthamoeba* ทั่วโลกได้ 20 genotypes ได้แก่ T1-T20 (Sotthard et al 1998; Horn et al 1999; Gast 2001; Hewett et al 2003; Marciano-Cabral and Cabral 2003; Khan 2006; Koshler et al 2006; Fuerst 2014) ซึ่งในอนาคตการค้นพบ *Acanthamoeba* ชนิดใหม่ ๆ โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมดังกล่าวพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นโดยลำดับ ทั้งนี้ยีน small subunit ribosomal RNA ประกอบด้วยบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อ genus *Acanthamoeba* และมีบริเวณที่มีความหลากหลายสูงแปรเปลี่ยนตามสายพันธุ์ของเชื้อ โดยความผันแปรดังกล่าวสามารถจัดกลุ่มและใช้เป็นตัวกำหนด genotype ของเชื้อได้ ยีน small subunit ribosomal RNA ของ *Acanthamoeba* มีความยาวประมาณ 2,300-2,700 คู่เบส โดยที่ *Acanthamoeba* ในกลุ่มที่ 2 และ 3 มีความยาวของยีน small subunit ribosomal RNA ประมาณ 2,300 bp

ส่วน *A. astronyxis*, *A. castellani* และ *A. tubioshi* มีความยาวของยีนประมาณ 2,600 ถึง 2,700 bp (Stothard et al 1998)

ในการจำแนก genotype ของ *Acanthamoeba* มีการศึกษาโดยใช้ยีน small subunit ribosomal RNA แบ่งเป็น 3 บริเวณได้แก่ (1) บริเวณ ASA.S1 ครอบคลุมนิวคลีโอไทด์ที่ 938-1402 (2) บริเวณ GTSA.B1 ครอบคลุมนิวคลีโอไทด์ที่ 1-1475 และ (3) บริเวณ Diagnostic Fragment 3 (DF3) ครอบคลุมประมาณ 240 นิวคลีโอไทด์ ซึ่ง DF3 เป็นบริเวณที่อยู่ภายใน ASA.S1 (Schroeder et al 2001) ทั้งนี้บริเวณ DF3 นับเป็นส่วนที่สามารถใช้จำแนก genotype ได้ดีกว่าบริเวณอื่น ๆ เมื่อใช้ไพรเมอร์ JDP1 และ JDP2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในลำดับเบสคู่ที่ 936-1402 จะได้บริเวณ ASA.S1 ซึ่งมีขนาดประมาณ 113 คู่เบส สามารถแยกได้ 12 genotypes (Booton et al 2005; Booton et al 2009) ซึ่งปัจจุบันพบถึง 20 จีโนไทป์ จากการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมในส่วน DF3 ประมาณ 240 คู่เบส สามารถแยกจีโนไทป์ที่ T13 (Horn et al 1999), T14 (Gast 2001) T15 (Hewett et al 2003) T16 (Corsaro and Venditti 2010) T17 (Nuprasert et al 2010) T18 (Qvarnstrom et al 2013) T19 (Magnet et al 2014) และ T20 (Corsaro et al 2015) ได้ตามลำดับ การศึกษา genotype ของ *Acanthamoeba* ที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมมีรายงานจากหลายภูมิภาคในโลก เช่น ประเทศอิหร่านพบ genotype T2 ที่ได้จากสิ่งแวดล้อมมากที่สุด รองลงมาคือ T4 (Maghsood et al 2005) ในขณะที่ประเทศอังกฤษพบ genotype T4 ได้มาก (Maghsood et al 2005) การศึกษา genotype ของ *Acanthamoeba* ตามแหล่งน้ำในกรุงเทพมหานครและปริมณฑลพบ genotype T4 มากที่สุดและในการสำรวจครั้งนั้นพบ genotype 17 เป็นครั้งแรกของโลก (Nuprasert et al 2010) ปัจจุบันพบว่ามี genotype ที่เป็นสาเหตุของภาวะกระจกตาอักเสบ ได้แก่ T2, T3, T4, T5, T6, T7, T10, T11 และ T15 โดยการศึกษาส่วนใหญ่พบว่า T4 เป็น genotype ที่พบมากและเป็นสาเหตุหลักของ *Acanthamoeba keratitis* ทั้งนี้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง genotype และการจัดหมวดหมู่โดยอาศัยสัณฐานของระยะ cyst ตามวิธีของ Pussard และ Pons ได้ตั้งนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย genotypes T7, T8, T9, T17 และ T18 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ genotypes T1, T3, T4 และ T11 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ genotypes T2, T5, T6, T10, T12, T14, T15, T16 และ T19 (Booton et al 2005; Fuerst 2014) ในขณะที่ genotype T20 มีลักษณะ cyst ที่ก้ำกึ่งระหว่างกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 (Corsaro et al 2015)

ในการสำรวจ free-living amoebae ที่ก่อโรคได้ในคนตามที่ปรากฏในธรรมชาติ พบว่ามีความแตกต่างกัน เช่น พบ *Acanthamoeba* จากตัวอย่างน้ำประปาในบ้านผู้ป่วย *Acanthamoeba keratitis* ในประเทศอังกฤษ ร้อยละ 89 โดยส่วนใหญ่พบจากตัวอย่างน้ำประปาในห้องน้ำ (Kilvington et al 2004) นอกจากนี้มีผู้สำรวจ *Acanthamoeba* ในแหล่งน้ำบริเวณแม่น้ำไนล์ จากทั้งหมด 37 ตัวอย่าง พบเชื้อดังกล่าว 16 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 43.2 โดย *Acanthamoeba* เหล่านี้สามารถจำแนกได้ 5 genotypes (Lorenzo-Morales et al 2006) สำหรับประเทศไทย วิชาและคณะในปี พ.ศ. 2552 (Nuprasert et al 2010) ได้สำรวจหาเชื้อ *Acanthamoeba* จากการเก็บตัวอย่างน้ำในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 374 ตัวอย่าง ผลพบเชื้อ *Acanthamoeba* ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง และผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน small subunit ribosomal RNA สามารถจัดตัวอย่างเหล่านี้เป็นชนิด T4 ซึ่งเป็นชนิดที่สามารถก่อให้เกิดโรคในคนได้จำนวน 12 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบชนิด T9 และ T11 ชนิดละ 1 ตัวอย่าง และที่สำคัญยังพบชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการค้นพบมาก่อนคือ T17 จำนวน 2 ตัวอย่าง ในขณะเดียวกันคณะผู้วิจัยยังได้ตรวจพบเชื้อ *Acanthamoeba* จากผู้ป่วย keratitis ที่มารับการรักษาจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในช่วงปี พ.ศ. 2551-2553 จำนวน 7 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 42 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.6 และจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าตัวอย่างจากผู้ป่วยทั้งหมดเป็นชนิด T4 ยกเว้นมี 1 ตัวอย่างเป็นชนิด T10 ซึ่งเป็นการค้นพบครั้งแรกที่ชนิดนี้ก่อให้เกิดโรค keratitis จะเห็นได้ว่าอุบัติการณ์ของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Acanthamoeba* มีเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน และยังมีการค้นพบสายพันธุ์ใหม่จากตัวอย่างในธรรมชาติ

ผลการพบเชื้อดังกล่าวจึงเป็นการยืนยันว่าผู้ป่วยเหล่านี้มีโอกาสได้รับเชื้อ *Acanthamoeba* ตามธรรมชาติ ดังนั้น การสำรวจการแพร่กระจายของเชื้อในตัวอย่างน้ำตามภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยจึงมีความจำเป็นเพื่อการเฝ้าระวังโรคต่อไป (Nuprasert et al 2010)

แม้ว่าการจำแนก genotypes ของ *Acanthamoeba* โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน small subunit ribosomal RNA จะให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ DF3 อย่างเดียวอาจให้ข้อมูลที่คาดเคลื่อนได้ เนื่องจากบาง genotype ที่ต่างกันมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน DF3 น้อยกว่าร้อยละ 5 อันเนื่องมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันอยู่นอกบริเวณดังกล่าว นอกจากนี้การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบในการประเมินความแตกต่างระหว่าง genotype ยังมีข้อจำกัดจากการพบการแทรก (insertion) หรือการขาดหายไป (deletion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นระหว่าง genotype ซึ่งพบได้บ่อยใน small subunit ribosomal RNA gene ทำให้ข้อมูลที่ได้อย่างขาดความชัดเจนโดยเฉพาะในกรณีของ genotype ที่ต่างกันแต่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรม เนื่องจากการติดเชื้อ *Acanthamoeba* spp. ที่กระเจกตาไม่ได้มีสาเหตุจากการติดเชื้อ species หรือ genotype เดียว ในขณะที่เดียวกันหลาย species หรือ genotype ที่พบในธรรมชาติไม่ได้เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในคน ดังนั้นการพัฒนาระบบการจำแนก genotype ใหม่จึงมีความสำคัญเพื่อใช้ควบคู่กับการวิเคราะห์แบบเดิมในกรณีที่การกำหนด genotype ได้ไม่ชัดเจน เช่นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบางส่วนของ mitochondrial genome เนื่องจาก mitochondrial genome มีความสัมพันธ์กับสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตจึงมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง species ที่แตกต่างกัน ในขณะที่ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายใน species มีความแตกต่างกันน้อยมาก โดย mitochondrial genome ของสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่มีลักษณะเป็น circular DNA และมีหลายชุดในแต่ละเซลล์ (Burger et al 2003) จึงเป็นเป้าหมายที่ดีสำหรับการตรวจวินิจฉัยในเวชปฏิบัติ ดังเช่นการเลือกใช้ยีน mitochondrial cytochrome *b* ในการจำแนกและวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคคนทั้ง 5 species ออกจากกันอย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ small subunit ribosomal RNA gene (Putaporntip et al 2011) สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ *Acanthamoeba castellanii* มีขนาด 41,591 bp ซึ่งเป็นเชื้อที่จัดอยู่ใน genotype T1 และเป็นข้อมูลเดียวที่มีการศึกษาสำหรับโปรโตซัวในกลุ่มนี้ (Burger et al 1995)

Mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba castellanii* ประกอบด้วยเบส adenine และ thymine รวมกันคิดเป็นร้อยละ 70.6 โดยแต่ละชุด (copy) ของ circular mitochondrial genome ประกอบด้วยยีน small subunit ribosomal RNA และ large subunit ribosomal RNA อย่างละ 1 ชุด พบยีนที่สร้าง transfer RNA 16 ชนิดอย่างละ 1 ชุด พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอ็นไซม์ใน electron transport/oxidative phosphorylation จำนวน 16 ยีน ประกอบด้วยยีนที่สร้างเอ็นไซม์ใน respiratory chain ได้แก่ NADH dehydrogenase (*nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6*, *nad7*, *nad9* และ *nad11*) apocytochrome *b* (*cob*) และ cytochrome oxidase (*cox1/2* และ *cox3*) รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับ ATP synthase complex ประกอบด้วย F0-ATPase (*atp6* และ *atp9*) และ F1 ATPase (*atp1*) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยยีนที่สร้าง ribosomal protein 16 ชนิด ได้แก่ small subunit 10 ชนิด (*rps2*, *rps3*, *rps4*, *rps7*, *rps8*, *rps11*, *rps12*, *rps13*, *rps14* และ *rps19*) และ large subunit 6 ชนิด (*rpl2*, *rpl5*, *rpl6*, *rpl11*, *rpl14* และ *rpl16*) นอกจากนี้ยังประกอบด้วย open reading frames ที่ไม่ทราบหน้าที่อีก 8 ตำแหน่ง (Burger et al 1995) เนื่องจาก mitochondrial genome มีความคงที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายใน species ค่อนข้างสูงและมักไม่พบที่มีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมระหว่างกัน (recombination) จึงสามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ การจำแนก species และพันธุกรรมประชากร (population genetics) ของจุลชีพได้ดีดังเช่นการประยุกต์ใช้สำหรับการศึกษาเชื้อมาลาเรียเป็นต้น (Escalante et al; Putaporntip et al 2011; Jongwutiwes et al 2005)

ในปัจจุบันการประยุกต์ใช้ข้อมูลจาก mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* เพื่อการจัดหมวดหมู่ของเชื้อในกลุ่มนี้รวมทั้งการประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคจึงมีข้อจำกัด ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ *Acanthamoeba* ทุก genotype จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการประยุกต์ดังกล่าว รวมทั้งการศึกษาสายใยวิวัฒนาการ (phylogeny) ของโปรโตซัวในกลุ่มนี้ ทั้งนี้การจัดหมวดหมู่ที่ชัดเจนและการเข้าใจสายใยวิวัฒนาการจะเป็นการสร้างรากฐานที่สำคัญสำหรับการเปรียบเทียบเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคในคน ตลอดจนการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรคและพยาธิกำเนิด รวมทั้งแนวทางการรักษาและป้องกันโรคต่อไปในอนาคต

## 2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* ที่พบในประเทศไทยทุก genotypes
- 2.2 เพื่อจำแนก genotype ของ *Acanthamoeba* โดยอาศัยข้อมูลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ใน mitochondrial genome เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ small subunit ribosomal RNA gene
- 2.3 เพื่อวิเคราะห์ขอบเขตความหลากหลายของ mitochondrial genome ภายใน genotype T4 ของ *Acanthamoeba* ที่ก่อโรคในคนมากที่สุด
- 2.4 เพื่อศึกษาสายใยวิวัฒนาการ (phylogeny) ของ *Acanthamoeba* ที่พบในประเทศไทยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของเชื้อที่พบทั่วโลก
- 2.5 เพื่อพัฒนาการวินิจฉัย genotype ของ *Acanthamoeba* จากแหล่งน้ำในธรรมชาติด้วยวิธี PCR โดยใช้ mitochondrial genome เป็นยีนเป้าหมาย

## 3. วิธีดำเนินการวิจัย

### แผนการวิจัย

1. สํารวจ *Acanthamoeba* จากแหล่งน้ำในธรรมชาติ
2. การคัดเลือกและเตรียมตัวอย่าง *Acanthamoeba* สำหรับวิเคราะห์ mitochondrial genome
3. การเพิ่มปริมาณ DNA และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nuclear small subunit ribosomal RNA
4. การเพิ่มปริมาณ DNA และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial genome
5. พัฒนารววิธีตรวจสอบ genotype จาก mitochondrial genome
6. ทดสอบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างจากแหล่งน้ำในธรรมชาติ
7. วิเคราะห์ข้อมูล
8. สรุปผลและเขียนรายงาน

หมายเหตุ: แผนการดำเนินงานวิจัยในปีที่ 1 ครอบคลุมหัวข้อที่ 1 ถึงหัวข้อที่ 3 และดำเนินงานตามหัวข้อที่ 4 ในบางส่วน ส่วนการดำเนินงานตามหัวข้อที่ 4 ส่วนที่เหลือจนเสร็จสิ้นโครงการจะดำเนินการในปีที่ 2

### ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยในปีที่ 1

#### 1. สํารวจ *Acanthamoeba* จากแหล่งน้ำในธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างเชื้อจากแหล่งน้ำธรรมชาติหรือแหล่งน้ำในเขตชุมชน โดยใช้ปริมาณน้ำ 2 ลิตร พื้นที่เก็บตัวอย่างได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือประกอบด้วยจังหวัดปราจีนบุรี และระยอง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือประกอบด้วยจังหวัดชัยภูมิ และสกลนคร ภาคเหนือประกอบด้วยจังหวัดลำพูน และอุตรดิตถ์ ภาคกลางประกอบด้วยจังหวัดสุพรรณบุรี และสระบุรี ภาคใต้ประกอบด้วยจังหวัดระนอง และพัทลุง รวม 10 จังหวัด โดยสุ่มตัวอย่างจากแหล่ง

น้ำ 4 แหล่งในแต่ละจังหวัด ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ 10 ตัวอย่างต่อแหล่งน้ำ 1 แหล่ง รวมตัวอย่างน้ำทั้งหมด 400 ตัวอย่าง ซึ่งคาดว่าจะได้ตัวอย่างที่พบเชื้อ *Acanthamoeba* จากแต่ละจังหวัด ๆ ละประมาณ 10 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้นตลอดการสำรวจคาดว่าจะได้ *Acanthamoeba* ประมาณ 100 ตัวอย่างจากแหล่งน้ำที่สำรวจทั้งหมด โดยประมาณจากการสำรวจเบื้องต้นของคณะผู้วิจัย (Nuprasert et al 2010) พบอัตราการตรวจพบประมาณร้อยละ 20 จากตัวอย่างน้ำในกรุงเทพมหานครที่ใช้ทดสอบ

## 2. การเพาะตรวจหา *Acanthamoeba*

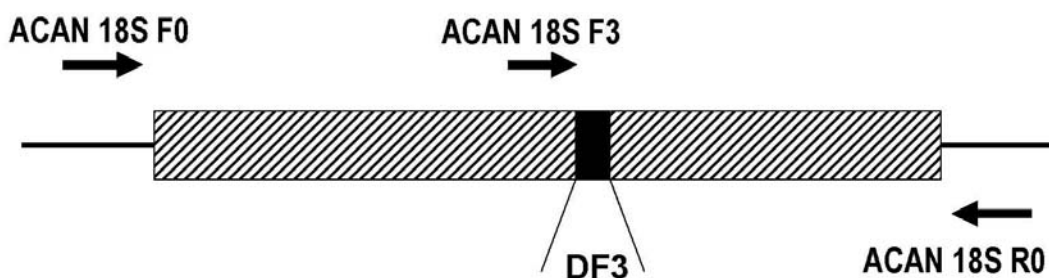
โดยนำตัวอย่างน้ำปริมาตร 2 ลิตรมาปั่นที่ความเร็ว 1,000 g เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนที่ได้ไปเพาะเลี้ยงใน 1.5% non-nutrient agar ที่มี heat-inactivated *Escherichia coli* เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ตรวจหา free-living amoebae ทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน ถ้าตัวอย่างใดให้ผลบวกจะทำการแยก *Acanthamoeba* จากสิ่งมีชีวิตอื่นที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว โดยวิธี micromanipulation ภายใต้กล้อง inverted microscope ซึ่งบางตัวอย่างอาจต้องทำต่อเนื่องเช่นนี้ซ้ำหลายครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อที่เป็นชนิดเดียวกัน

## 3. การเตรียม DNA

นำเชื้อในระยะโทรโฟซอยต์มาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) ต่อไป

## 4. ทำการตรวจสอบ genotype ของ *Acanthamoeba*

ทำโดยการเพิ่มปริมาณ DNA ของ small subunit ribosomal DNA ในส่วน DF3 ซึ่งมีความยาวประมาณ 250 bp โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาเพิ่มจำนวนเพื่อทดสอบหาเชื้อ *Acanthamoeba* โดยผ่านกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ SSU rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) โดยใช้ primer ACAN 18S F0 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'- TCCTGCCAGTAGTCATATGC -3' (ตำแหน่งเบสที่ 9-28) และ ACAN 18S R0 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'- CTTCTCCTTCCTCTAAATGGT -3' (ตำแหน่งเบสที่ 2236-2256) ดังแสดงในรูปที่ 1 มี LA Taq DNA polymerase เป็นเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยา ประกอบด้วยขั้นตอนแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอนการจับคู่ของ primer กับสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 0.2 นาที ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส 2 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจผลโดยวิธี Gel electroporesis และใช้  $\lambda$  Hind III เป็นตัวบอกขนาดดีเอ็นเอ (Marker) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ agarose gel เข้มข้น 1% ไปย้อมด้วย ethidium bromide 15 นาที และนำไปดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต และทำการหาลำดับเบสในส่วนของ DF3 โดยใช้ไพรเมอร์ ACAN 18S F3 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'- CAGAGGTGAAATTCTTGG -3' (ตำแหน่งเบสที่ 1120-1137) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ 20 genotypes ที่เคยมีรายงานมาก่อนใน GenBank Database



รูปที่ 1 ตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการทำ PCR และ sequencing ของยีน SSU rRNA (18S rRNA)

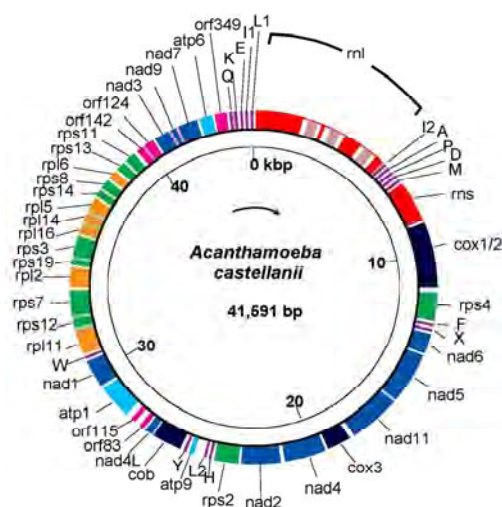
## 5. การเพิ่มปริมาณ DNA และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nuclear small subunit ribosomal

### RNA

เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์แม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DF3 สามารถใช้กำหนด genotype ได้ แต่เพื่อให้การเปรียบเทียบมีความสมบูรณ์และชัดเจนจึงต้องทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน small subunit ribosomal RNA ทั้งหมดซึ่งครอบคลุมความยาวประมาณ 2,300-2,700 bp โดยใช้วิธี long PCR และ direct sequencing จาก purified PCR template โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำเป็นต้องใช้ sequencing primers และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดำเนินการจากทั้ง 2 ทิศทาง (bi-directional sequencing)

## 6. การเพิ่มปริมาณ DNA และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial genome ในส่วนของยีน cytochrome b

เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nuclear small subunit ribosomal RNA ยังมีขีดจำกัดในการใช้แยกจีโนไทป์ในบางกลุ่มดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการหาลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ของ mitochondrial genome เพื่อให้ข้อมูลที่ได้มีความถูกต้องชัดเจนมากขึ้น โดยทำการออกแบบ PCR primers ซึ่ง PCR primers ที่ออกแบบจะได้ overlapping PCR fragment ในส่วนของยีน cytochrome b (ประมาณ 5,000-9,000 bp) ซึ่งผลผลิต PCR ที่ได้นี้สามารถนำไปใช้หาลำดับเบสในส่วนของยีนอื่น ๆ ที่อยู่ข้างเคียงยีน cytochrome b ในการออกแบบ primers โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน genome ของ mitochondria ที่มีในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมี 4 genomes ภายใต้ GenBank accession numbers NC001637 (*Acanthamoeba castellanii* Neff), KX580904 (*Acanthamoeba castellanii* TN), KT185628 (*Acanthamoeba castellanii* BCPEM3VF211) และ KP05447 (*Acanthamoeba polyphaga* LincAp1) ทำการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยโปรแกรม Clustal X และจำแนกส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกันระหว่างสายพันธุ์หรือ conserved regions และส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันหรือ variable regions เพื่อเป็นพื้นฐานในการออกแบบ primers ทั้งนี้ภายหลังจากออกแบบ primers แล้วต้องทำการทดสอบกับตัวอย่างที่มี genotype ต่างกันเพื่อให้ได้ primers ที่สามารถใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณส่วนของ DNA ใน genome ของ mitochondria ได้ทุกตัวอย่าง โดยในแผนการทำ long PCR จะเพิ่มปริมาณ DNA แบ่งเป็น 6 fragments โดยแต่ละ fragment ครอบคลุมประมาณ 5,000–9,000 bp ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ complete mitochondrial genome จำเป็นต้องใช้ sequencing primers และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดำเนินการจากทั้ง 2 ทิศทาง สำหรับโครงสร้างของ genome ของ mitochondria ของ *Acanthamoeba* และองค์ประกอบของยีนต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างและองค์ประกอบของยีนใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba*

## 7. วิเคราะห์ข้อมูล

การเรียงลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์ในการเปรียบเทียบระหว่าง genotypes โดยใช้โปรแกรม Clustal X การคำนวณค่า nucleotide diversity ( $\pi$ ), recombination parameter (Rm) และ neutrality test โดยใช้ Tajima  $D$  statistics ใช้โปรแกรม DnaSP ทำการเปรียบเทียบ nonsynonymous nucleotide diversity ( $\pi_S$ ) และ nonsynonymous nucleotide diversity ( $\pi_N$ ) ภายใน genotype การสร้าง phylogenetic tree ใช้วิธี neighbor-joining ภายใต้ Kimura 2 parameter substitution model การทดสอบระดับความเชื่อมั่นของการแยกสายวิวัฒนาการ (tree branch) โดยใช้วิธี bootstrap จาก 1,000 pseudoreplicates ในโปรแกรม MEGA6.0 ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง genotype และระหว่างกลุ่ม genotype โดยทำการวิเคราะห์ nucleotide divergence (k) ระหว่าง genotypes และค่าเฉลี่ยการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่งโดยเปรียบเทียบระหว่างประชากร (average number of nucleotide substitution per site between populations) หรือค่า Dxy

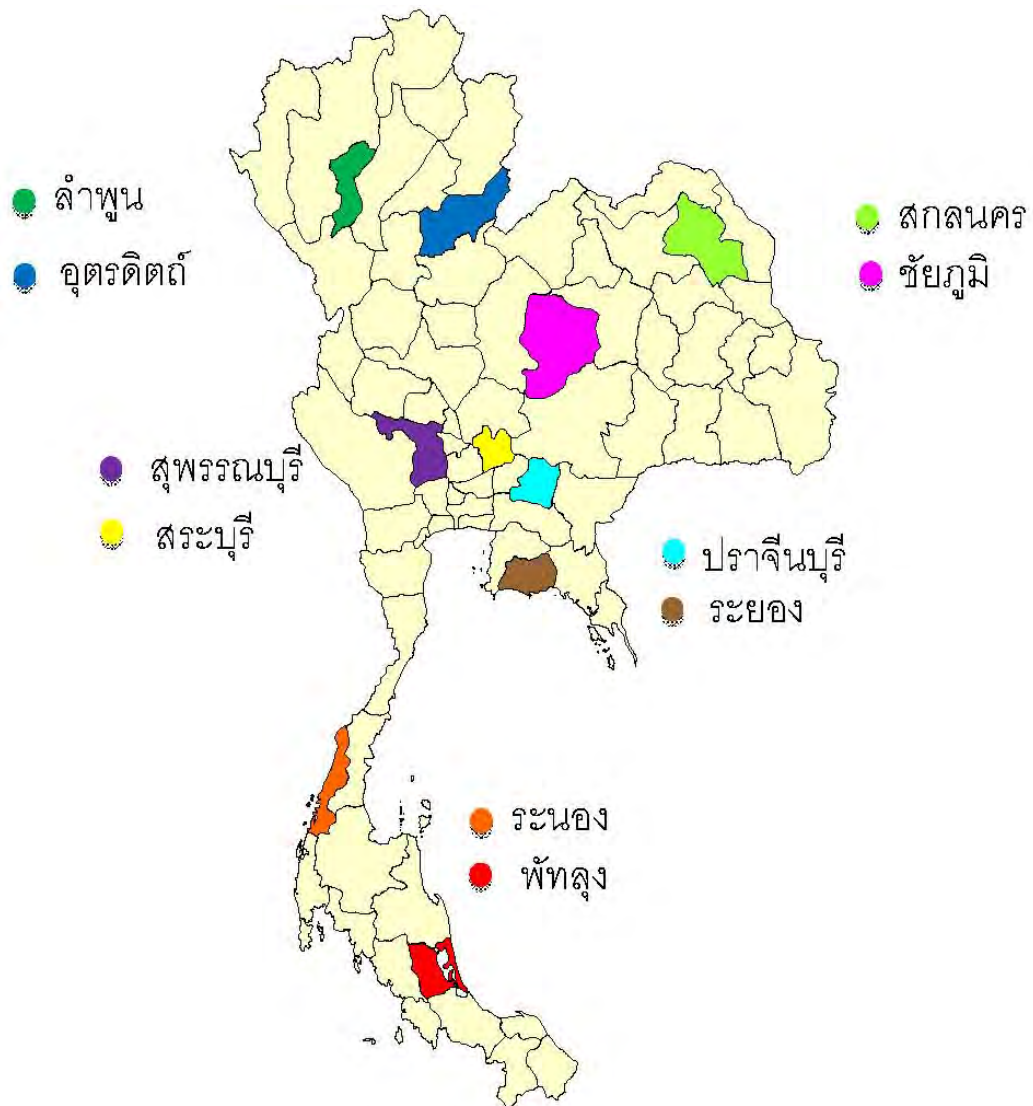
## 4. ผลการวิจัย

### 4.1 การสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำตามพื้นที่ต่าง ๆ

การสำรวจ *Acanthamoeba* จากแหล่งน้ำในธรรมชาติ โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำในจังหวัดลำพูน อุดรดิตต์ ชัยภูมิ สกลนคร สุพรรณบุรี สระบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา ระนองและพัทลุง รวม 10 จังหวัด (รูปที่ 3 และตารางที่ 1) โดยเก็บตัวอย่างจังหวัดละ 400 ตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 4,000 ตัวอย่าง นำตัวอย่างน้ำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมตะกอนให้เข้มข้นตามวิธีที่เสนอในโครงการวิจัย โดยทำการเพาะเชื้อโดยใช้ 1.5% non-nutrient agar ที่มี heat-inactivated *Escherichia coli* ในลักษณะของ suspension อยู่ด้านบน โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ผลการเพาะเลี้ยงพบว่า มี free-living organisms ปรากฏจำนวนมาก อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่มี *Acanthamoeba* สามารถสังเกตระยะ trophozoite ได้ภายใน 2-5 วันแรกที่ทำการเพาะเชื้อ ส่วนระยะ cyst ที่มีลักษณะเฉพาะสำหรับ *Acanthamoeba* สามารถสังเกตได้ตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป จากผลการเพาะเลี้ยงดังกล่าวพบว่าตัวอย่างที่ตรวจพบ *Acanthamoeba* มีจำนวน 577 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราการตรวจพบโดยรวมทั้งหมดร้อยละ 14.43 โดยแหล่งน้ำในภาคเหนือตรวจพบ 113 ตัวอย่างจาก 800 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบ 136 ตัวอย่าง ภาคกลางตรวจพบ 102 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกตรวจพบ 130 ตัวอย่าง ส่วนภาคใต้ตรวจพบ 96 ตัวอย่างจาก 800 ตัวอย่าง สำหรับอัตราการตรวจพบ *Acanthamoeba* จากตัวอย่างน้ำในแต่ละจังหวัดแสดงในตารางที่ 2 จากการสำรวจพบว่าตัวอย่างน้ำที่มีเชื้อ *Acanthamoeba* จากการตรวจโดยเพาะเชื้อมีอัตราการตรวจพบตั้งแต่ร้อยละ 11.25 ถึงร้อยละ 17.75 เฉลี่ยอัตราการตรวจพบจากแหล่งน้ำทุกแห่งที่สำรวจพบประมาณร้อยละ 14.43 ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบ *Acanthamoeba* ระหว่างจังหวัดในภาคเดียวกันพบว่าจังหวัดเดียวกันในภาคเหนือคือจังหวัดอุดรดิตต์มีอัตราการตรวจพบมากกว่าจังหวัดลำพูนอย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.019$ ) ในขณะที่จังหวัดเดียวกันในภาคอื่น ๆ มีอัตราการตรวจพบเชื้อไม่แตกต่างกัน ( $p=0.39 - p=0.57$ ) อย่างไรก็ตามอัตราการตรวจพบเมื่อพิจารณาเป็นภาคพบว่าภาคเหนือมีอัตราการตรวจพบไม่ต่างจากภาคอื่น ๆ ( $p=0.11 - p=0.42$ ) สำหรับภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอัตราการตรวจพบมากกว่าภาคกลางและมากกว่าภาคใต้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.017$  และ  $p=0.0045$  ตามลำดับ) ส่วนภาคกลางมีอัตราการตรวจพบน้อยกว่าภาคตะวันออกเฉียงเหนืออย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.047$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าภาคตะวันออกตรวจพบมากกว่าภาคใต้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.047$ ) ดังนั้นจะเห็นว่าอัตราการตรวจพบ *Acanthamoeba* ในแหล่งน้ำต่าง ๆ มีอัตราใกล้เคียงกันแต่ในบาง



พื้นที่อาจมีอัตราการตรวจแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ ทางกายภาพ ลักษณะของแหล่งน้ำ ตลอดจนความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป



รูปที่ 3 แผนที่แสดงจังหวัดที่เก็บตัวอย่างน้ำ

ตารางที่ 1 รายละเอียดสถานที่เก็บตัวอย่างน้ำและคุณภาพของน้ำในแต่ละจังหวัด

จังหวัด	แหล่งน้ำ	pH	อุณหภูมิ (°C)	จำนวนตัวอย่าง
ปราจีนบุรี	อ่างเก็บน้ำค่ายจักรพงษ์	7.0	31.0	100
	หนองบัว	7.5	32.5	100
	แม่น้ำปราจีนบุรี	7.5	29.0	100
	สวนสาธารณะปราจีนวนารมย์	7.0	33.0	100
ระยอง	สวนสาธารณะศรีเมือง	7.0	29.0	100
	บึงจำรุง	6.5	28.5	100
	อ่างเก็บน้ำดอกกราย	7.0	29.0	100
	สวนรุกขชาติหนองสนม	7.0	29.0	100

จังหวัด	แหล่งน้ำ	pH	อุณหภูมิ (°C)	จำนวนตัวอย่าง
ชัยภูมิ	แม่น้ำชี	7.5	30.0	100
	บึงละหาน	7.5	30.0	100
	สวนสาธารณะหนองปลาเฒ่า	7.5	30.0	100
	ห้วยลำปะทาว	8.0	33.5	100
สกลนคร	สวนสมเด็จพระศรีนครินทร์ สกลนคร	7.5	34.5	100
	อ่างสกลนคร	7.5	33.0	100
	สวนสาธารณะริมน้ำพุง	7.0	34.0	100
	หนองหาน	7.5	30.0	100
ลำพูน	แม่น้ำลี้	8.0	29.0	100
	สวนสาธารณะเทศบาลเมืองลำพูน	7.5	31.0	100
	สวนสาธารณะกู่ช้าง	8.0	29.0	100
	สวนสาธารณะ เจ้าหญิงแขกแก้ว	8.0	28.0	100
อุดรดิตถ์	สวนสาธารณะริมน้ำน่าน	7.0	30.0	100
	สวนสาธารณะหนองพระแล	7.5	35.0	100
	สวนสาธารณะเฉลิมพระเกียรติฯ	7.0	31.0	100
	สวนสาธารณะบึงทับกระดาน	7.0	31.0	100
สุพรรณบุรี	สวนเฉลิมภัทรราชินี	7.0	33.0	100
	สวนสาธารณะจังหวัดสุพรรณบุรี	6.5	32.0	100
	บึงฉวากเฉลิมพระเกียรติ	7.0	31.0	100
	บึงระหาร	7.5	32.0	100
สระบุรี	แม่น้ำป่าสัก	7.0	29.0	100
	สวนมิ่งมงคล	7.5	30.0	100
	สวนพฤกษศาสตร์ภาคกลาง (พุแค)	7.0	29.0	100
	คลองบึงไม้	7.0	29.0	100
ระนอง	แม่น้ำกระบุรี	7.5	28.0	100
	สวนสาธารณะเฉลิมพระเกียรติ ร. 9	7.0	29.0	100
	สวนสาธารณะ เทศบาลตำบลกะเปอร์	6.5	28.5	100
	สวนรุกขชาติรักษะวาริน	6.0	27.0	100
พัทลุง	ทะเลน้อย	8.5	30.0	100
	สวนสาธารณะคูหาสวรรค์	7.5	31.0	100
	สวนสาธารณะสวนกาญจนาภิเษก	6.5	31.0	100
	สวนสาธารณะ"สาครินทร์"บ้านพี	7.5	32.5	100

ตารางที่ 2 อัตราการตรวจพบ *Acanthamoeba* จากแหล่งน้ำในจังหวัดต่าง ๆ

ภาค	จังหวัด	จำนวนตัวอย่างที่ ตรวจสอบ	จำนวนตัวอย่างที่ ตรวจพบ <i>Acanthamoeba</i>	% positive
เหนือ	ลำพูน	400	45	11.25
	อุตรดิตถ์	400	68	17.00
	รวม	800	113	14.13
ตะวันออกเฉียงเหนือ	ชัยภูมิ	400	71	17.75
	สกลนคร	400	65	16.25
	รวม	800	136	17.00
กลาง	สุพรรณบุรี	400	55	13.75
	สระบุรี	400	47	11.75
	รวม	800	102	12.75
ตะวันออก	ปราจีนบุรี	400	69	17.25
	ระยอง	400	61	15.25
	รวม	800	130	16.25
ใต้	ระนอง	400	45	11.25
	พัทลุง	400	51	12.75
	รวม	800	96	12.00
รวมทั้งสิ้น		4,000	577	14.43

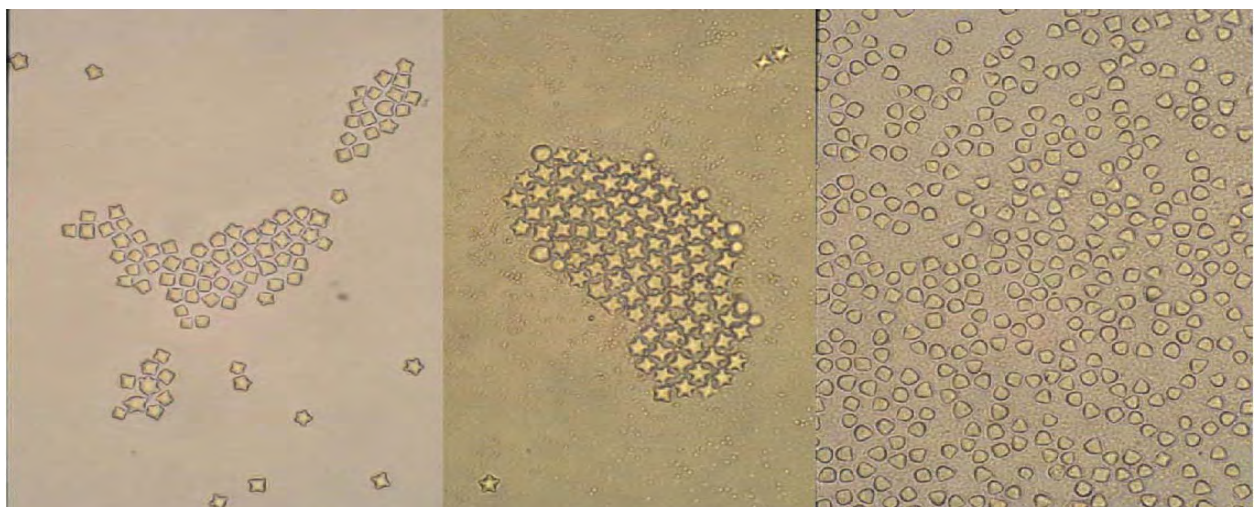
#### 4.2 Morphological group ของ *Acanthamoeba*

เมื่อพิจารณาลักษณะของ *Acanthamoeba* โดยจำแนกตามลักษณะของ cyst โดยอาศัยข้อกำหนดที่เสนอโดย Pussard and Pons ในปี ค.ศ. 1977 พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่พบ cyst มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 18 ไมโครเมตร ส่วนของ ectocyst และ endocyst มีส่วนที่อยู่ชิดและห่างกันทำให้ผนัง cyst มีลักษณะหนาบางไม่เท่ากัน รวมทั้งบางตัวอย่างพบ cyst มีลักษณะกลม สามเหลี่ยมหรืออาจมีลักษณะหลายเหลี่ยมซึ่งลักษณะดังกล่าวเข้าได้กับ cyst ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งพบในตัวอย่างทั้งหมด 389 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 67.42 ของตัวอย่างทั้งหมด สำหรับตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่างหรือร้อยละ 3.47 ของตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ พบว่า cyst มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 18 ไมโครเมตร ผนัง ectocyst และ endocyst มีขนาดต่างกันมากและมักพบ trophozoite ขนาดใหญ่ซึ่งเป็นลักษณะของ cyst ในกลุ่มที่ 1 ส่วน cyst ในกลุ่มที่ 3 ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า 18 ไมโครเมตร ผนังขี้ยอกบางและผนังชั้นในมีมุมเล็ก ๆ ประมาณ 3-5 มุม พบในตัวอย่างทั้งหมด 41 ตัวอย่างหรือร้อยละ 7.11 ของตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ อย่างไรก็ตามพบว่ามีตัวอย่าง 127 ตัวอย่างหรือร้อยละ 22.01 มี cyst หลายขนาดและลักษณะของ cyst สามารถจำแนกได้มากกว่า 2 กลุ่มแสดงว่ามีเชื้อ *Acanthamoeba* มากกว่า 1 morphological group ปะปนกันอยู่ (ตารางที่ 3) สำหรับตัวอย่างลักษณะ cyst ใน morphological group II ของ *Acanthamoeba* ซึ่งพบมากที่สุดจากตัวอย่างในแหล่งน้ำที่ศึกษาแสดงในรูปที่ 4

ตารางที่ 3 การกระจายของ *Acanthamoeba* จำแนกตามลักษณะของระยะ cyst ในจังหวัดต่าง ๆ\*

จังหวัด	No. isolates	Group I (%)	Group II (%)	Group III (%)	Mixed group (%)
ลำพูน	45	0 (0)	34 (75.56)	5 (11.11)	6 (13.33)
อุดรดิตถ์	68	4 (5.88)	43 (63.24)	2 (2.94)	19 (27.94)
รวม	113	4 (3.54)	77 (68.14)	7 (6.19)	25 (22.12)
ชัยภูมิ	71	3 (4.23)	45 (63.38)	4 (5.63)	19 (26.76)
สกลนคร	65	4 (6.15)	39 (60.00)	3 (4.62)	19 (29.23)
รวม	136	7 (5.15)	84 (61.76)	7 (5.15)	38 (27.94)
สุพรรณบุรี	55	2 (3.64)	37 (67.27)	2 (3.64)	14 (25.45)
สระบุรี	47	3 (6.38)	33 (70.21)	6 (12.77)	5 (10.64)
รวม	102	5 (4.90)	70 (68.63)	8 (7.84)	19 (18.63)
ปราจีนบุรี	69	2 (2.90)	46 (66.67)	5 (7.25)	16 (23.19)
ระยอง	61	0 (0)	41 (67.21)	6 (9.84)	14 (22.95)
รวม	130	2 (1.54)	87 (66.92)	11 (8.46)	30 (23.08)
ระนอง	45	1 (2.22)	33 (73.33)	0 (0)	14 (31.11)
พัทลุง	51	1 (1.96)	38 (74.51)	8 (15.69)	4 (7.84)
รวม	96	2 (2.08)	71 (73.96)	8 (8.33)	15 (15.63)
รวมทั้งสิ้น	577	20 (3.47)	389 (67.42)	41 (7.11)	127 (22.01)

\* Pussard and Pons' morphological group criteria (Pussard and Pond 1977)

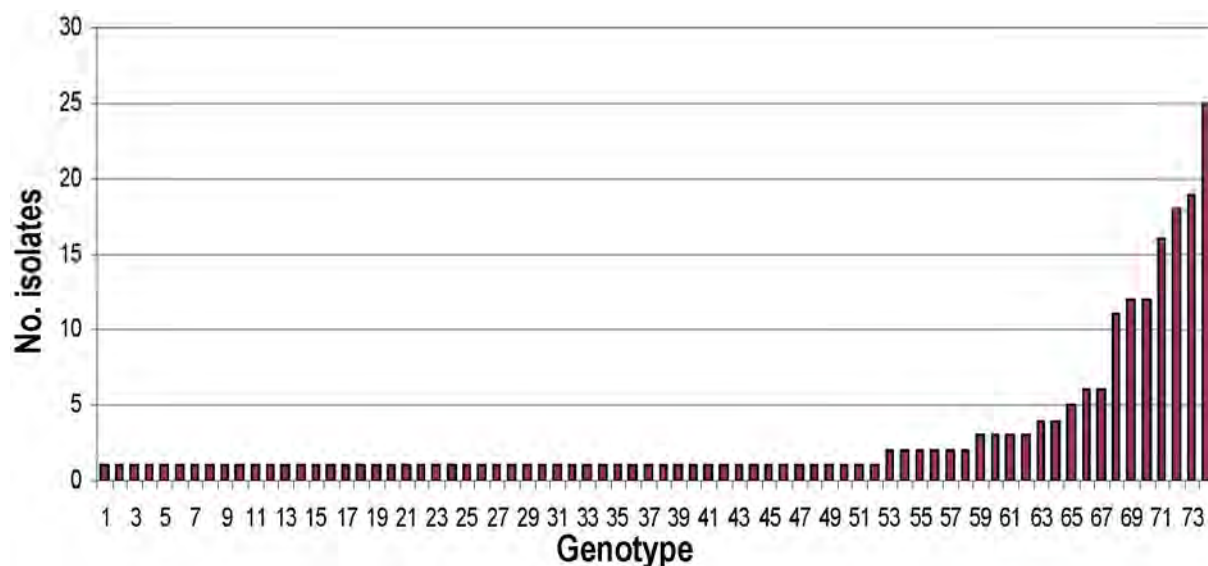


รูปที่ 4 ตัวอย่างลักษณะ cyst ใน morphological group II ของ *Acanthamoeba* จากแหล่งน้ำในจังหวัดสระบุรี

### 4.3 การวิเคราะห์ genotype ของ *Acanthamoeba*

เนื่องจากตัวอย่างที่ให้ตรวจพบ *Acanthamoeba* มีจำนวนมาก ดังนั้นตัวอย่างที่มีลักษณะของ morphological group ต่างกันมากกว่า 1 กลุ่มจึงไม่ใช้ในการศึกษาต่อ อย่างไรก็ตามจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ DNA จึงคัดเลือกจาก 450 ตัวอย่างที่มี morphological group เดียวในแต่ละตัวอย่าง ทั้งนี้ตัวอย่างที่มี morphological group เดียวกันอาจมีหลาย genotype ปะปนกัน ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ DNA ของตัวอย่างที่มี morphological group เดียวโดยใช้ PCR primers ที่เพิ่มปริมาณ DNA ใน diagnostic fragment 3 (DF3 region) ซึ่งเป็นส่วนที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์รวมทั้งจำนวนนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นตัวอย่างที่มีผลผลิต PCR มากกว่า 1 แถบซึ่งแสดงถึงการปะปนของ *Acanthamoeba* ที่มี genotype ต่างกัน โดยพบว่ามีตัวอย่างจำนวน 201 ตัวอย่างหรือร้อยละ 44.67 ให้ผลผลิต PCR มากกว่า 1 แถบแสดงว่าตัวอย่างเหล่านี้มี genotype ที่แตกต่างกันปะปนกันอยู่ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน DF3 ของ 249 ตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR เพียงแถบเดียวพบว่ามี 35 ตัวอย่างที่มีลักษณะ electropherogram ที่มี signal บางตำแหน่งทับซ้อนกัน แสดงว่าตัวอย่างเหล่านี้ยังคงมี genotype มากกว่า 1 รูปแบบปะปนในตัวอย่างเดียวกัน

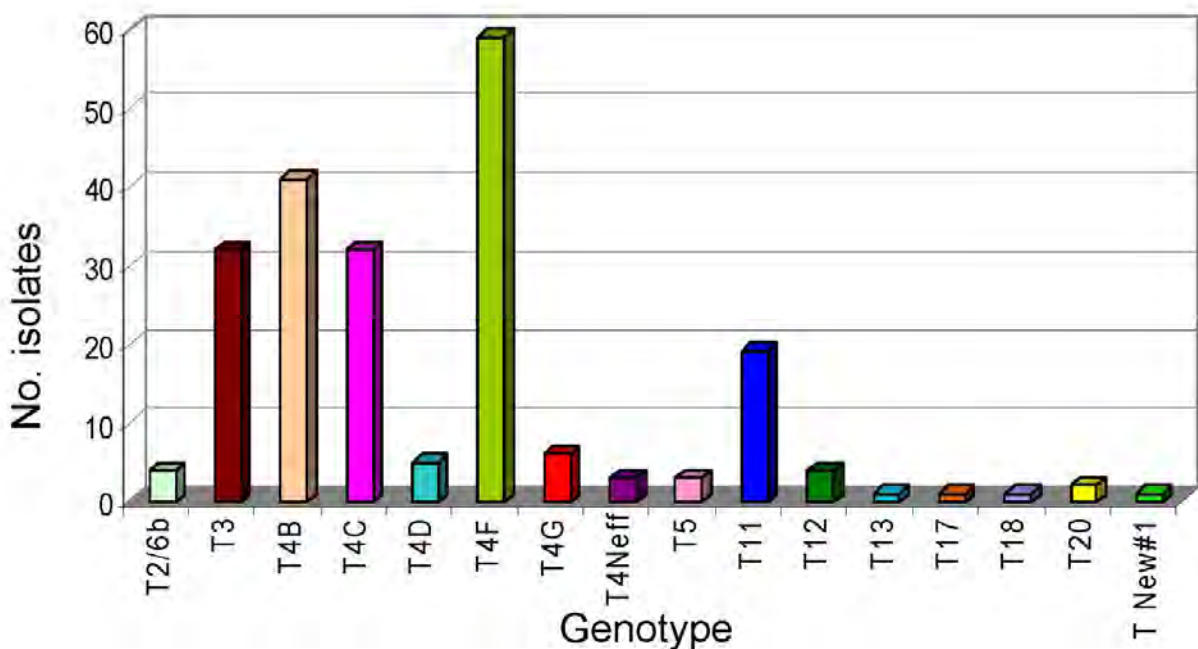
ตัวอย่างจำนวน 214 ตัวอย่างที่มี genotype เดียวจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน DF3 เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้ genotype มาตรฐานที่มีในฐานข้อมูล GenBank database ในการเปรียบเทียบพบว่าตัวอย่างเหล่านี้ประกอบด้วย 74 haplotypes ในเบื้องต้นก่อนที่จะจำแนก genotypes ชื่อ haplotype จะเรียกตามลำดับตัวเลขโรมัน โดย haplotype #I ถึง haplotype #LII พบเพียงตัวอย่างเดียว haplotype #LIII ถึง haplotype #LVIII พบอย่างละ 2 ตัวอย่าง ส่วน haplotype #LIX ถึง haplotype #LXII พบอย่างละ 3 ตัวอย่าง haplotype #LXIII และ haplotype #LXIV พบอย่างละ 4 ตัวอย่าง สำหรับ haplotype #LXV พบ 5 ตัวอย่าง haplotype #LXVI และ haplotype #LXVII พบอย่างละ 6 ตัวอย่าง haplotype #LXVIII พบ 11 ตัวอย่าง haplotype #LXIX และ haplotype #LXX พบอย่างละ 12 ตัวอย่าง ส่วน haplotype #LXXI, haplotype #LXXII, haplotype #LXXIII และ haplotype #LXXIV พบจากตัวอย่างที่วิเคราะห์ 16, 18, 19 และ 25 ตัวอย่างตามลำดับ (รูปที่ 5)



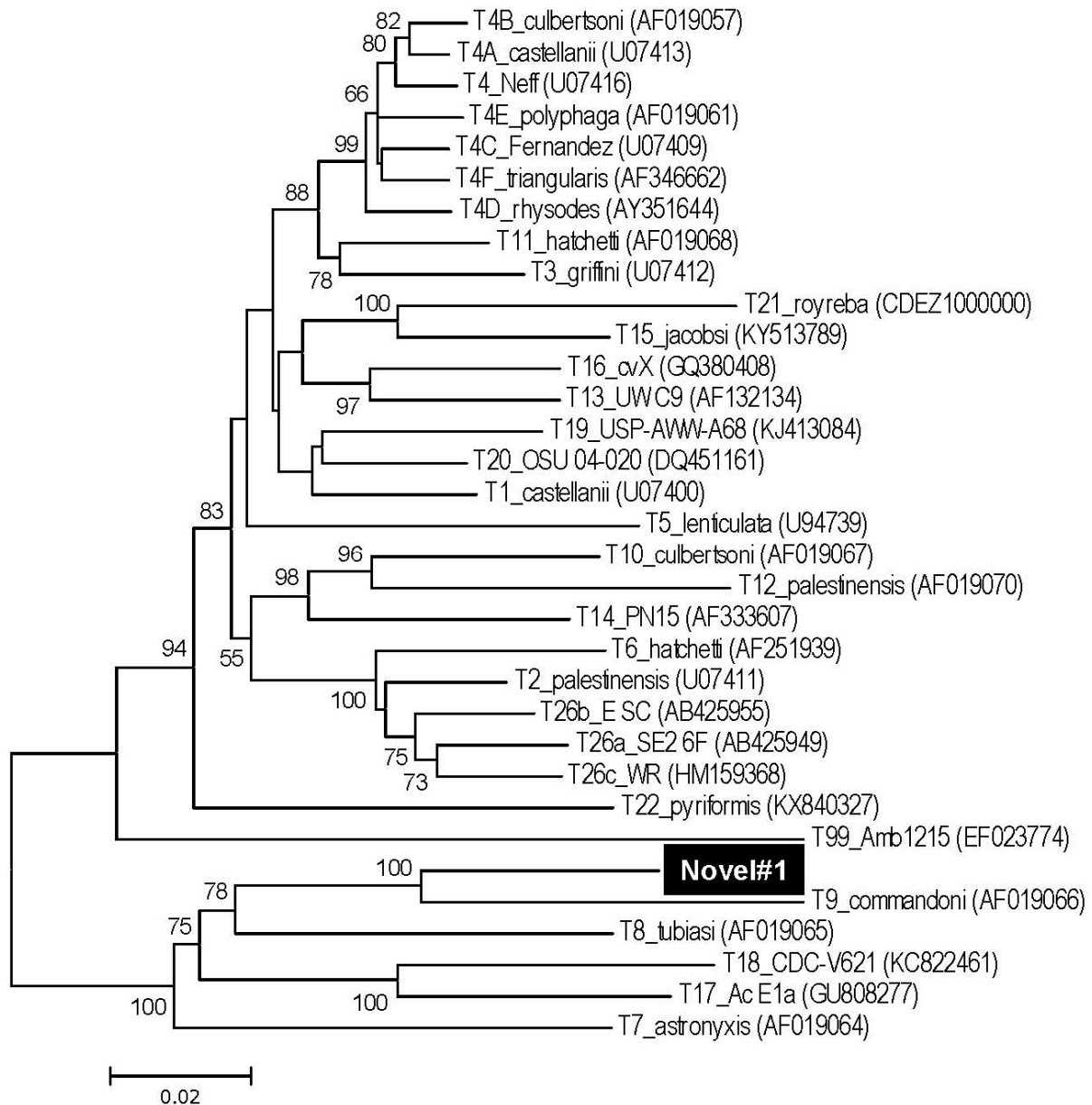
รูปที่ 5 จำนวน genotypes ของ *Acanthamoeba* ที่พบจากแหล่งน้ำที่สำรวจ 214 ตัวอย่าง

ในการจำแนก genotype โดยวิธีการสร้าง phylogenetic tree ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nuclear small subunit ribosomal RNA ครอบคลุมความยาวประมาณ 2 kb ถึง 2.2 kb ซึ่งมีความผันแปรระหว่างตัวอย่างเพื่อให้การเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานหรือสายพันธุ์ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ที่มีในฐานข้อมูลสากลมีความถูกต้องมากขึ้น เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน DF3 อาจมีข้อจำกัดในการจำแนกสำหรับบาง genotype ตัวอย่างแสดงการวิเคราะห์ genotype โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว

ทั้งนี้จากการวิเคราะห์โดยใช้วิธี neighbor-joining และใช้ Kimura 2 parameter model พบว่าตัวอย่าง ทั้ง 74 haplotypes สามารถจำแนกเป็น genotype ที่ต่างกัน 16 genotypes ได้แก่ genotype T2/6b จำนวน 4 ตัวอย่าง genotype T3 จำนวน 32 ตัวอย่าง genotype T4B จำนวน 41 ตัวอย่าง genotype T4C จำนวน 32 ตัวอย่าง genotype T4D จำนวน 5 ตัวอย่าง genotype T4F จำนวน 59 ตัวอย่าง genotype T4G จำนวน 6 ตัวอย่าง genotype T4Neff จำนวน 3 ตัวอย่าง genotype T5 จำนวน 3 ตัวอย่าง genotype T11 จำนวน 19 ตัวอย่าง genotype T12 จำนวน 4 ตัวอย่าง genotypes T13, T17 และ T18 อย่างละ 1 ตัวอย่าง genotype T20 พบ 2 ตัวอย่างและพบว่ามี 1 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจัดในกลุ่ม genotype ใด ๆ ที่ทราบมาก่อน ดังนั้น genotype นี้จึงเป็น genotype ใหม่ในที่นี่เรียกว่า genotype T Novel#1 (รูปที่ 6 และรูปที่ 7)



รูปที่ 6 การกระจายของ genotype ของ *Acanthamoeba* วิเคราะห์จากยีน SSU rRNA จากตัวอย่างน้ำ 214 ตัวอย่าง



รูปที่ 7 Phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน SSU rRNA แสดง genotype ใหม่ (Novel#1)

#### 4.4 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ mitochondrial DNA โดยวิธี cloning

เนื่องจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ใน mitochondrial genome ต้องใช้ตัวอย่างที่มาเซลล์เพียงเซลล์เดียว เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาของการปะปนของ genome จาก *Acanthamoeba* ต่างสายพันธุ์กัน ดังนั้นจึงได้ทำการ clone ตัวอย่าง *Acanthamoeba* ที่มี genotype ตามที่คัดเลือกไว้ โดยใช้ pipette ขนาด 10 ไมโครเมตรแยก cyst ของ *Acanthamoeba* เพียง cyst เดียวที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus IX71 กำลังขยายวัตถุ 200 เท่า แล้วนำไปเพาะเลี้ยงใหม่จนเชื้อเพิ่มปริมาณชัดเจน แล้วทำการแยก cyst เดียวโดยวิธีการเดียวกันทำซ้ำ 3 ครั้งสำหรับแต่ละตัวอย่าง ซึ่งในปีแรกได้ทำการ clone จากตัวอย่าง *Acanthamoeba* ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ได้แก่ genotypes T2/6b, T3, T4B, T4C, T4D, T4F, T4G, T5, T11, T12, T13, T17, T18, T20, และ T New#1 ซึ่งเป็นตัวอย่างจากแหล่งน้ำในธรรมชาติที่เก็บรวบรวมจากการศึกษานี้และ genotype T4 จำนวน

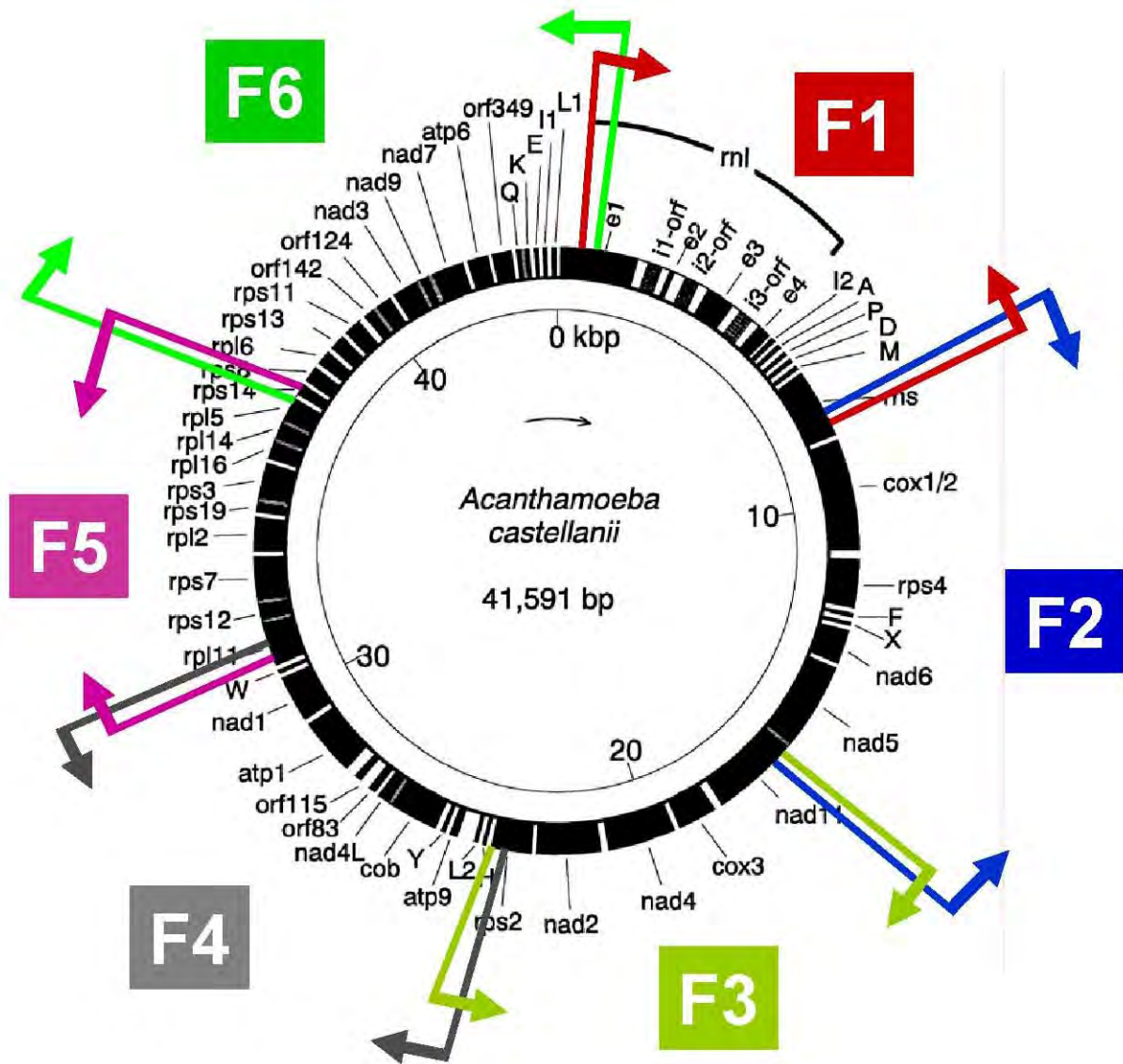
5 ตัวอย่างจากผู้ป่วยกระจกตาอักเสบที่เก็บรวบรวมมาก่อน ทั้งนี้ได้ทำการเตรียม DNA ของตัวอย่างที่ได้จากการ clone ทุกตัวอย่างเพื่อใช้เป็น DNA template สำหรับ long PCR ในขั้นต่อไป

#### 4.4 การเพิ่มปริมาณ mitochondrial DNA

เนื่องจาก genome ของไมโทคอนเดรียของ *Acanthamoeba* มีขนาดใหญ่มาก โดยในปัจจุบันข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน genome ดังกล่าวมีการวิเคราะห์จาก 4 สายพันธุ์ได้แก่ (1) *Acanthamoeba castellanii* สายพันธุ์ Neff (GenBank accession no. NC001637) ประกอบด้วย 41,591 bp (Burger et al. 1995) (2) *Acanthamoeba castellanii* สายพันธุ์ TN (GenBank accession no. KX580904) ประกอบด้วย 41,588 bp (Greninger, Jerome and Dixon 4-OCT-2016) (3) *Acanthamoeba castellanii* สายพันธุ์ BCPEM3VF211 (GenBank accession no. KT185628) ประกอบด้วย 39,205 bp. (Fucikova and Lahr, 2016) และ *Acanthamoeba polyphaga* สายพันธุ์ LincAp1 (GenBank accession no. KP05447) ประกอบด้วย 39,215 bp. (Karlyshev 02-OCT-2015) ดังนั้นในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ครอบคลุมทั้งหมดใน genome ของไมโทคอนเดรียจำเป็นต้องทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี long PCR amplification โดยมีส่วนของ overlapping fragment เพื่อให้สามารถเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างต่อเนื่องอย่างถูกต้อง

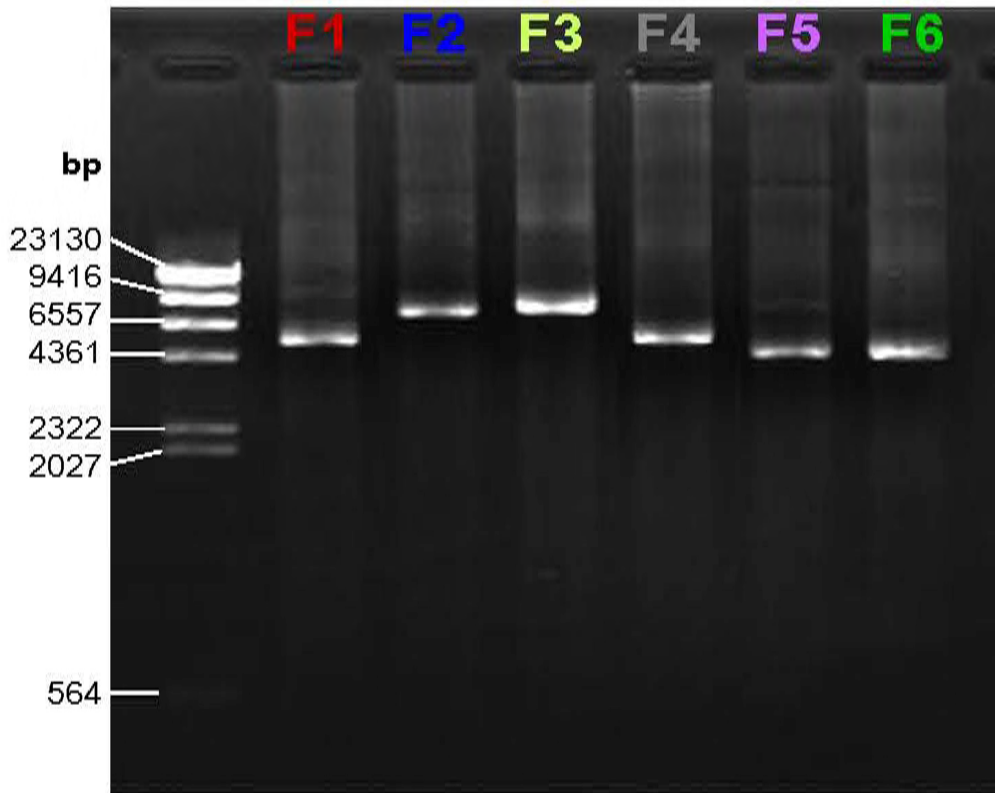
สำหรับการศึกษานี้ได้เพิ่มปริมาณ DNA โดย long PCR amplification โดยแบ่งส่วนของ genome ของไมโทคอนเดรียของ *Acanthamoeba* เป็น 6 ส่วน โดย fragment แรก (F1 fragment) ครอบคลุมตั้งแต่ยีน rnl หรือ large subunit ribosomal RNA (23S-like rRNA) จนถึงส่วนของยีน rns หรือ small subunit ribosomal RNA (16S-like rRNA) gene โดยใช้ primer F1 (5'-GTAAATCCAGCAGAGAAATCTCTAA-3') และ primer R1 (5'-CTATACCACTTCTAATCAAACCAATTC-3') อยู่ในส่วนของยีน rns ซึ่งครอบคลุมประมาณ 7.1-7.2 kb สำหรับ fragment ที่ 2 (F2 fragment) ครอบคลุมตั้งแต่ยีน small subunit ribosomal RNA จนถึงส่วนของยีน NAD11 หรือ NADH dehydrogenase subunit 11 gene โดยใช้ primer F2 (5'-AAGTCGAGAGTATGAAGTAGGAATCG-3') และ primer R2 (5'-CACATACGACAATTACCTGCAATAG-3') ซึ่งครอบคลุมประมาณ 7.3 kb ส่วน fragment ที่ 3 (F3 fragment) ครอบคลุมตั้งแต่ยีน NAD5 หรือ NADH dehydrogenase subunit 5 gene จนถึงส่วนของยีน trnL2 หรือ transfer RNA-Leucine gene โดยใช้ primer F3 (5'-ATGAACAAGATATGCGTAAAATGGGTG-3') และ primer R3 (5'-GGTTTTAAGCCCATCGCGTCTAC-3') อยู่ในส่วนของยีน rpl11 หรือ ribosomal protein L11 gene ซึ่งครอบคลุมประมาณ 7 kb ส่วน fragment ที่ 4 (F4 fragment) ครอบคลุมตั้งแต่ยีน trnW หรือ transfer RNA Tryptophan จนถึงส่วนของยีน rpl11 หรือ ribosomal protein L11 gene โดยใช้ primer F4 (5'-AGGTAAAGTGACAATTTGTGAAG-3') และ primer R4 (5'-AACCATATTGTATGGTATTTAGG-3') อยู่ในส่วนของยีน rpl11 หรือ ribosomal protein L11 gene ซึ่งครอบคลุมประมาณ 7 kb ส่วน fragment ที่ 5 (F5 fragment) ครอบคลุมตั้งแต่ยีน trnW หรือ transfer RNA Tryptophan จนถึงส่วนของยีน rnl โดยใช้ primer F5 (5'-GTTATCCTCCAAAGTTAAAGATAAAGG-3') และ primer R5 (5'-ATCTTATACAACTAACAAATACTG-3') อยู่ในส่วนของยีน rpl11 หรือ ribosomal protein L11 gene ซึ่งครอบคลุมประมาณ 7 kb ส่วน fragment ที่ 6 (F6 fragment) ครอบคลุมตั้งแต่ยีน trnW หรือ transfer RNA Tryptophan จนถึงส่วนของยีน rnl โดยใช้ primer F6 (5'-GAGGTAAAGGCAGTCCAGCAG-3') และ primer R6 (5'-TGTTTTCACTCACCATTACTAAC-3') อยู่ในส่วนของยีน rnl ซึ่งครอบคลุมประมาณ 7 kb สำหรับตัวอย่างผลผลิต PCR สำหรับแต่ละ fragment ทั้งหมด แสดงในรูปที่ 8





รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของ PCR primers สำหรับ 6 fragments จาก mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba*

เป็นที่น่าสังเกตว่าในแต่ละ fragment พบความผันแปรในความยาวขึ้นกับตัวอย่างที่ต่างกัน เช่น F1 fragment มีความยาวแตกต่างกันอย่างน้อย 5 แบบซึ่งมีความยาวตั้งแต่ 5 kb ถึง 9 kb ส่วน F3 fragment มีความยาวตั้งแต่ 5 kb ถึง 7.5 kb และ F4 fragment มีความยาวตั้งแต่ 5.5 kb ถึง 7 kb ดังแสดงในรูปที่ 7 ทั้งนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณ DNA จากตัวอย่าง ที่ทำการคัดเลือก genotype ละ 1 ตัวอย่าง ได้แก่ genotypes T2/6b, T3, T4B, T4C, T4D, T4F, T4G, T5, T11, T12, T13, T17, T18, T20 และ T New#1 รวม 15 ตัวอย่างที่มาจากแหล่งน้ำในธรรมชาติและ genotype T4 จากผู้ป่วยที่เพาะเลี้ยงในห้องทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง ดังนั้นจำนวนตัวอย่างที่จะใช้วิเคราะห์ complete mitochondrial genome มีทั้งสิ้นประมาณ 20 ตัวอย่าง



รูปที่ 9 ตัวอย่างผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณ DNA จาก 6 fragments ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba*

ตัวอย่างเหล่านี้ได้ทำการตรวจสอบคุณลักษณะของ thermotolerance ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการก่อโรคระดับหนึ่ง การทดสอบดังกล่าวทำโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในลักษณะเดียวกัน แต่ในภาวะอุณหภูมิต่างกัน คือ ที่อุณหภูมิห้อง (25-30°C) 37°C และ 42°C สำหรับข้อมูลขนาด PCR fragment ทั้ง 6 fragments และข้อมูล thermotolerance ของแต่ละตัวอย่างแสดงในตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ โดยพบว่าตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคกระจกตาอักเสบทั้ง 5 รายและตัวอย่างจากแหล่งน้ำที่ genotypes T4B, T4C, T4D และ T4G สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C และ 42°C ในขณะที่ genotypes T2/6b, T3, T5, T11, T12, T13, T17, T18, T20 และ T New#1 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C และ 42°C อย่างไรก็ตามแม้ว่า genotype T4F สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C แต่การเจริญเกิดได้ช้ามากและไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 42°C เลย

ตารางที่ 4 ความสามารถในการเจริญในอุณหภูมิต่าง ๆ ของ *Acanthamoeba* ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial genome

Genotype	25-30°C	37°C	42°C
T2/6b	+++	0	0
T3	+++	0	0
T4B	+++	+++	++
T4C	+++	+++	++
T4D	+++	+++	+
T4F	+++	+	0
T4G	+++	++	+
T5	+++	0	0
T11	+++	0	0
T12	+++	0	0
T13	+++	0	0
T17	+++	0	0
T18	+++	0	0
T20	+++	0	0
T New#1	+++	0	0
T4 (clinical isolate #1)	+++	+++	++
T4 (clinical isolate #2)	+++	+++	+++
T4 (clinical isolate #3)	+++	+++	+++
T4 (clinical isolate #4)	+++	+++	++
T4 (clinical isolate #5)	+++	+++	+++

หมายเหตุ +++ หมายถึงเจริญได้ดีพบเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง

++ หมายถึงเจริญได้ดีพบเชื้อภายใน 48 ชั่วโมง

+ หมายถึงเจริญได้แต่พบเชื้อได้น้อยหลังจาก 48 ชั่วโมง

0 หมายถึงไม่พบเชื้อภายหลังการสังเกตติดต่อกัน 5 วัน

ตารางที่ 5 ความยาวของผลผลิต PCR จำแนกตาม fragment ต่าง ๆ ในตัวอย่าง *Acanthamoeba* ที่ใช้วิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial genome

Genotype	PCR Fragments (kb)					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
T2/6b	4.3	8.0	9.4	7.0	4.5	4.5
T3	4.5	8.0	9.4	6.9	4.5	4.4
T4B	6.4	8.5	9.1	6.4	4.4	4.4
T4C	6.2	8.2	9.4	6.5	4.4	4.4
T4D	9.4	8.1	9.4	6.5	4.4	4.4
T4F	6.2	8.3	9.3	6.3	4.4	4.4
T4G	4.3	8.1	9.3	6.5	4.5	4.4
T5	6.1	8.3	9.2	6.8	4.6	4.6
T11	5.8	8.4	6	7.1	4.6	4.7
T12	4.7	8.3	9.0	7.2	4.5	4.4
T13	5.9	8.0	9.2	6.9	4.5	4.4
T17	7	8.1	9.3	7.0	4.5	4.8
T18	7.5	8.2	9.2	7.2	4.5	4.3
T20	5.8	8.3	9.1	6.7	4.7	4.6
T New#1	7.9	8.2	9.0	6.9	4.5	4.5
T4#1	6.5	8.4	9.3	6.6	4.4	4.4
T4#2	6.3	8.1	9.3	6.5	4.4	4.5
T4#3	6.4	8.3	9.4	6.5	4.4	4.4
T4#4	6.4	8.2	9.4	6.4	4.4	4.4
T4#5	6.4	8.0	9.3	6.6	4.4	4.4

หมายเหตุ: T4#1 ถึง T4#5 คือตัวอย่าง genotype T4 จากผู้ป่วยกระจกตาอักเสบรายที่ 1 ถึงรายที่ 5 ตามลำดับ

#### 4.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน cytochrome *b*

ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุม F4 fragment ซึ่งครอบคลุมความยาว 6.3-7.4 kb ทั้งหมด 20 ตัวอย่างดังกล่าวข้างต้น ซึ่งใน fragment ดังกล่าวมียีน cytochrome *b* เป็นองค์ประกอบภายใน เนื่องจากยีนดังกล่าวอาจมีศักยภาพในการจำแนก genotype ของ *Acanthamoeba* ดังนั้นเพื่อเป็นการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ดังกล่าวจึงทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเพิ่มอีก 45 ตัวอย่างเฉพาะในส่วนยีน cytochrome *b* สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน cytochrome *b* ดังกล่าวครอบคลุมความยาว 1155 bp ดังแสดงในรูปที่ 10

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome *b* ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* (1-100)

#T4B_ACG30C56_AcF082	ATGGCTTTTA TAAAAAATA TCCCTTATTA AATATATGAA ATAGTTTTTT AATAGATTAAT CCGGCTCCTC CAAATATAGG TTAATTAATGA AACTTTGGGG	[ 100]
#T4B_ACGNK32_AcF052	.....C.....C.....	[ 100]
#T4B_ACGBU48_AcF144	.....C.....C.....	[ 100]
#T4B_ACGBU50_AcF158	.....C.....C.....	[ 100]
#T4B_ACGBU52_AcF092	.....C.....C.....	[ 100]
#T4B_ACGUB2_AcF102	.....C.....C.....	[ 100]
#T4F_ACG30C61_AcF084	C.....C.....T.....A..G.....CC.T.....T.....	[ 100]
#T4F_ACGCM42_AcF035	C.....C.....T.....A..G.....CC.T.....T.....	[ 100]
#T4F_ACGCM44_AcF036	C.....C.....T.....A..G.....CC.T.....T.....	[ 100]
#T4F_ACGRA26_AcF181	C.....C..C.....T.....A..G.....CC.T.....T.....	[ 100]
#T4G_ACG30C128_AcF066	.....G..C.....A..C.....T.....A.....	[ 100]
#T4G_ACG30C136_AcF087	.....G..C.....A..C.....T.....A.....	[ 100]
#T4G_ACG30C143_AcF096	.....G..C.....A..C.....T.....A.....	[ 100]
#T11_ACG30C152_AcF089	C..G.....T.....GA..C.....T.....T.....T.....	[ 100]
#T4F_ACG30C240_AcF168	C.....C.....T.....A..G.....CC.T.....T.....	[ 100]
#T26B_ACG30M20_AcF044	C..A..C.G.....T..T.....A..A..C.....T..C.....	[ 100]
#T26B_ACG30M4_AcF045	C..A..C.G.....T..T.....A..A..C.....T..C.....	[ 100]
#T4E_ACGMK17_AcF172	.....G..C.....A..C.....T.....T.....T.....	[ 100]
#T4C_ACGNK24_AcF080	C.....C.....T.....G.....T.....T.....	[ 100]
#T4C_ACGNK31_AcF051	C.....C.....T.....G.....T.....T.....	[ 100]
#KT185620_1150 bp	.....G..C.....A..C..C.....T.....A.....	[ 100]
#T4C_ACGUB19_AcF103	C.....C.....T.....G.....T.....T.....	[ 100]
#T3_ACGNS24_AcF189	C..C.T.....T.....T.....T.....T.....C.....	[ 100]
#T3_ACS38_AcF027	C..C.T.....T.....T.....T.....T.....C.....	[ 100]
#T3_ACS313_AcF028	C..C.T.....T.....T.....T.....T.....C.....	[ 100]
#T3_ACS316_AcF030	C..C.T.....T.....T.....T.....T.....C.....	[ 100]
#T3_ACS321_AcF016	C..C.T.....T.....T.....T.....T.....C.....	[ 100]
#T3_ACS335_AcF042	C..C.T.....T.....T.....T.....T.....C.....	[ 100]
#T4B_ACGBU30_AcF138	.....C.....C.....	[ 100]
#T4B_ACGBU36_AcF141	.....C.....C.....	[ 100]
#T4B_ACGKAR12_AcF160	.....C.....C.....	[ 100]
#T4B_ACGKAR23_AcF077	.....C.....C.....	[ 100]
#T4B_ACGBU65_AcF185	.....C.....C.....	[ 100]
#T4C_ACGSI46_AcF134	C.....C.....T.....G.....G.....T.....T.....	[ 100]
#T4F_ACGRA11_AcF121	C.....C.....T.....A..G.....CC.T.....T.....	[ 100]
#T4F_ACGMK28_AcF173	C.....C.....T.....A..G.....CC.T.....T.....	[ 100]
#T4F_ACGYA948_AcF174	C.....C.....T.....A..G.....CC.T.....T.....	[ 100]
#T4E_ACGRA12_AcF071	.....G..C.....A..A..C..T.....T.....T.....	[ 100]
#T4D_ACGSIG9_AcF126	C.....C.....C.....A..C.....T.....T.....	[ 100]
#T11_ACGSIG33_AcF128	C..G.....T.....GA..C.....T.....T.....T.....	[ 100]
#T4F_ACGSIG36_AcF129	C.....C.....C.....T.....A..G.....CC.T.....T.....	[ 100]
#T4B_ACGSIG38_AcF130	.....C.....C.....	[ 100]
#T4B_ACGYA355_AcF165	.....C.....C.....	[ 100]
#T11_ACGSUR24_AcF079	C..G.....T.....GA..C.....T.....T.....T.....	[ 100]
#T11_ACGTK30_AcF113	C..G.....T.....GA..C.....T.....T.....T.....	[ 100]
#T11_ACGTK33_AcF128	C..G.....T.....GA..C.....T.....T.....T.....	[ 100]
#T4C_ACGNK25_AcF088	.....C.....T.....G.....G.....T.....T.....	[ 100]
#T26B_ACGYA316_AcF164	C..A..C.G.....T..T.....A..A..C.....T..C.....	[ 100]
#T4C_ACSG18_AcF017	C.....C.....T.....G.....T.....T.....	[ 100]
#ACGAT19_AcF201	C..G.....T.....GA..C.....T.....T.....T.....	[ 100]
#ACGAT34_AcF162	.....C.....T.....A..G.....CC.T.....T.....	[ 100]
#ACG30C162_AcF059	C.....C.....T.....A..G.....G.....T.....T.....	[ 100]
#ACGNK33_AcF081	C.....C.....T.....G.....G.....T.....T.....	[ 100]
#ACGNK34_AcF053	C.....C.....T.....G.....G.....T.....T.....	[ 100]
#ACGNK37_AcF055	C.....C.....T.....G.....G.....T.....T.....	[ 100]
#ACGNK41_AcF056	C.....C.....T.....G.....G.....T.....T.....	[ 100]
#ACGBU49_AcF145	.....C.....C.....	[ 100]
#ACGBU54_AcF148	.....C.....C.....	[ 100]
#ACGBU64_AcF150	.....C.....C.....	[ 100]
#ACGSUR22_AcF078	C.....C.....T.....G.....G.....T.....T.....	[ 100]
#ACGTD4_AcF048	C..G.....T.....GA..C.....T.....T.....T.....	[ 100]
#ACGTK49_AcF117	C..G.....T.....GA..C.....T.....T.....T.....	[ 100]
#ACGUB5_AcF166	C.....C.....T.....A..G.....CC.T.....T.....	[ 100]
#ACSG46_AcF057	C..C.T.....T.....T.....T.....T.....C.....	[ 100]
#G7_AcF020	C..C.T.....T.....T.....T.....T.....C.....	[ 100]
#G31_AcF021	C..C.T.....T.....T.....T.....T.....C.....	[ 100]
#KFO54475	.....A.....C..CC.....A.....	[ 100]
#NC_001637	.....C.....A.....A.....A.....	[ 100]
#K3580904	.....C.....A.....A.....A.....	[ 100]
#U12386	.....C.....A.....A.....A.....	[ 100]
#KT185628	.....G..C.....A..C..C.....T.....A.....	[ 100]

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome *b* ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* (101-200)

#T4B_ACGCC56_AcF082	CTCTAGCCGC TTTCGTGCTT GGTATTCAAA TTGTTACAGG TATATTTTTA GCGATGTTT ATGTCCCTAG TATAGAAAGT GCTTTTTCTA GTGTTCAGTA	[ 200]
#T4B_ACGNK32_AcF052	.....	[ 200]
#T4B_ACGPU48_AcF144	.....	[ 200]
#T4B_ACGPU50_AcF158	.....	[ 200]
#T4B_ACGPU52_AcF092	.....	[ 200]
#T4B_ACGUB2_AcF102	.....	[ 200]
#T4F_ACGCC61_AcF084	.GT...T. .T. ....	[ 200]
#T4F_ACGCM42_AcF035	.GT...T. .T. ....	[ 200]
#T4F_ACGCM442_AcF036	.GT...T. .T. ....	[ 200]
#T4F_ACGRA26_AcF181	.GT...T. .T. ....	[ 200]
#T4G_ACGCC128_AcF066	.T...T. .T. ....G. ....G. ....A. ....T. ....T. ....A. ....C. ....C. ....A. ....	[ 200]
#T4G_ACGCC136_AcF087	.T...T. .T. ....G. ....G. ....A. ....T. ....T. ....C. ....C. ....A. ....	[ 200]
#T4G_ACGCC143_AcF096	.T...T. .T. ....G. ....G. ....A. ....T. ....T. ....C. ....C. ....A. ....	[ 200]
#T11_ACGCC152_AcF089	.AT...T. A. ....A. ....T. ....C. ....T. ....T. ....A. ....G. ....T. ....G. ....C. ....C. ....A. ....	[ 200]
#T4F_ACGCC240_AcF168	.GT...T. .T. ....	[ 200]
#T26B_ACGCM20_AcF044	.GT...T. .T. .T.A. ....A. ....A. ....T. ....T. ....T. ....T. ....A. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#T26B_ACGCM4_AcF045	.GT...T. .T. .T.A. ....A. ....A. ....T. ....T. ....T. ....T. ....A. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#T4E_ACGMK17_AcF172	.T...T. .T. ....	[ 200]
#T4C_ACGNK24_AcF080	.T...T. .T. ....G. ....	[ 200]
#T4C_ACGNK31_AcF051	.T...T. .T. ....G. ....	[ 200]
#KT185628_1158 bp	.T...T. .T. ....G. ....C. ....T. ....T. ....A. ....T. ....C. ....A. ....	[ 200]
#T4C_ACGUB19_AcF103	.T...T. C. T. ....G. ....	[ 200]
#T3_ACGNS24_AcF189	.T...T. .T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....T. ....G. ....	[ 200]
#T3_ACS38_AcF027	.T...T. .T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....G. ....	[ 200]
#T3_ACS313_AcF028	.T...T. .T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....G. ....	[ 200]
#T3_ACS316_AcF030	.T...T. .T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....G. ....	[ 200]
#T3_ACS321_AcF016	.T...T. .T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....G. ....	[ 200]
#T3_ACS335_AcF042	.T...T. .T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....G. ....	[ 200]
#T4B_ACGPU30_AcF138	.....	[ 200]
#T4B_ACGPU36_AcF141	.....	[ 200]
#T4B_ACGKAR12_AcF160	.....	[ 200]
#T4B_ACGKAP23_AcF077	.....	[ 200]
#T4B_ACGPU65_AcF185	.....	[ 200]
#T4C_ACGSIG46_AcF134	.T...T. C. T. ....G. ....T. ....A. ....T. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#T4F_ACGRA11_AcF121	.GT...T. .T. ....T. ....T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....A. ....A. ....	[ 200]
#T4F_ACGMK28_AcF173	.GT...T. .T. ....T. ....T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....A. ....A. ....	[ 200]
#T4F_ACGYAS48_AcF174	.GT...T. .T. ....T. ....T. ....T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....A. ....A. ....	[ 200]
#T4E_ACGRA12_AcF071	.T...T. .T. ....A. ....C. ....C. ....T. ....A. ....C. ....A. ....G. ....	[ 200]
#T4D_ACGSIG9_AcF126	.GT...T. .T. ....C. ....C. ....A. ....C. ....A. ....A. ....T. ....C. ....A. ....G. ....	[ 200]
#T11_ACGSIG33_AcF128	.AT...T. A. ....A. ....T. ....C. ....T. ....T. ....T. ....A. ....G. ....T. ....G. ....C. ....C. ....A. ....	[ 200]
#T4F_ACGSIG36_AcF129	.GT...T. .T. ....T. ....T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....A. ....A. ....	[ 200]
#T4B_ACGSIG38_AcF130	.....	[ 200]
#T4B_ACGYAS55_AcF165	.....	[ 200]
#T11_ACGSUR24_AcF079	.AT...T. A. ....A. ....T. ....C. ....T. ....T. ....T. ....A. ....G. ....T. ....G. ....C. ....C. ....A. ....	[ 200]
#T11_ACGTK30_AcF113	.AT...T. A. ....A. ....T. ....C. ....T. ....T. ....T. ....A. ....G. ....T. ....G. ....C. ....C. ....A. ....	[ 200]
#T11_ACGTK33_AcF128	.AT...T. A. ....A. ....T. ....C. ....T. ....T. ....T. ....A. ....G. ....T. ....G. ....C. ....C. ....A. ....	[ 200]
#T4C_ACGNK25_AcF068	.T...T. .T. ....G. ....T. ....A. ....T. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#T26B_ACGYAS16_AcF164	.GT...T. .T. .T.A. ....A. ....A. ....T. ....T. ....T. ....T. ....A. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#T4C_ACS318_AcF017	.T...T. .T. ....G. ....T. ....A. ....T. ....T. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#ACGAT19_AcF201	.AT...T. A. ....A. ....T. ....C. ....T. ....T. ....T. ....A. ....G. ....T. ....G. ....C. ....C. ....A. ....	[ 200]
#ACGAT34_AcF162	.GT...T. .T. ....T. ....T. ....G. ....A. ....T. ....T. ....A. ....A. ....	[ 200]
#ACGCC162_AcF059	.T...T. .T. ....A. ....G. ....A. ....T. ....A. ....T. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#ACGNK33_AcF081	.T...T. C. T. ....G. ....T. ....A. ....T. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#ACGNK34_AcF053	.T...T. C. T. ....G. ....T. ....A. ....T. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#ACGNK37_AcF055	.T...T. C. T. ....G. ....T. ....A. ....T. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#ACGNK41_AcF056	.T...T. C. T. ....G. ....T. ....A. ....T. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#ACGPU49_AcF145	.....	[ 200]
#ACGPU54_AcF148	.....	[ 200]
#ACGPU64_AcF150	.....	[ 200]
#ACGSUR22_AcF078	.T...T. .T. ....G. ....T. ....A. ....T. ....C. ....A. ....A. ....	[ 200]
#ACGTD4_AcF048	.AT...T. A. ....A. ....T. ....C. ....T. ....T. ....T. ....A. ....G. ....T. ....G. ....C. ....C. ....A. ....	[ 200]
#ACGTK49_AcF117	.AT...T. A. ....A. ....T. ....C. ....T. ....T. ....T. ....A. ....G. ....T. ....G. ....C. ....C. ....A. ....	[ 200]
#ACGUB5_AcF166	.GT...T. .T. ....T. ....T. ....G. ....A. ....T. ....G. ....A. ....A. ....	[ 200]
#ACSG46_AcF057	.T...T. .T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....G. ....	[ 200]
#G7_AcF020	.T...T. .T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....G. ....	[ 200]
#G31_AcF021	.T...T. .T. ....G. ....A. ....T. ....A. ....G. ....	[ 200]
#KE054475	.T...T. .T. ....C. ....A. ....T. ....A. ....A. ....	[ 200]
#NC_001637	.GT...T. .T. ....C. ....A. ....T. ....G. ....T. ....C. ....A. ....	[ 200]
#KX580904	.GT...T. .T. ....C. ....A. ....T. ....G. ....T. ....C. ....A. ....	[ 200]
#U12386	.GT...T. .T. ....C. ....A. ....T. ....G. ....T. ....C. ....A. ....	[ 200]
#KT185628	.T...T. .T. ....G. ....C. ....T. ....T. ....C. ....A. ....	[ 200]

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome *b* ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* (201-300)

#T4B_ACG30C56_AcF082	CAATCATGAGA GATGTTAATT ATGGTGTGATT AATATAGATAC ATCCATGCTA ATGGGCGTTC ATTTTTTTTT ATATGIGTIT ATATACACGT TTTTATGGGA	[ 300]
#T4B_ACGNK32_AcF052	.....	[ 300]
#T4B_ACGBU48_AcF144	.....	[ 300]
#T4B_ACGBU50_AcF158	.....	[ 300]
#T4B_ACGBU52_AcF092	.....	[ 300]
#T4B_ACGUB2_AcF102	.....	[ 300]
#T4F_ACG30C61_AcF084	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....A..T	[ 300]
#T4F_ACGCM42_AcF035	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....AA..T	[ 300]
#T4F_ACGCM442_AcF036	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....A..T	[ 300]
#T4F_ACGRA26_AcF181	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....A..T	[ 300]
#T4G_ACG30C128_AcF066	T.A....G.....C.C..G.....T.T.C..A....T.....T.....C....T..T.....T	[ 300]
#T4G_ACG30C136_AcF087	T.A....G.....C.C..G.....T.T.C..A....T.....T.....C....T..T.....T	[ 300]
#T4G_ACG30C143_AcF096	T.A....G.....C.C..G.....T.T.C..A....T.....T.....T.....C....T..T.....T	[ 300]
#T11_ACG30C152_AcF089	T.T...C.T....G....C.....T...T.A.....T.A..T.....T.C.....TA....C.T..T	[ 300]
#T4F_ACG30C240_AcF168	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....T.....A..T	[ 300]
#T26B_ACG30M20_AcF044	T.T...G....A.C.....G..TC.T.T..T.....T.....T.....T.....T..T..C....A..C	[ 300]
#T26B_ACG30M4_AcF045	T.T...G....A.C.....G..TC.T.T..T.....T.....T.....T.....T..T..C....A..C	[ 300]
#T4E_ACGMK17_AcF172	T.A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#T4C_ACGNK24_AcF080	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#T4C_ACGNK31_AcF051	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#KT185628_1150_bsp	T.A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#T4C_ACGBU19_AcF103	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#T3_ACGNS24_AcF189	T.A....G....A.C.....G.....T...T.A.....T.....T.....T.....T..TA....T.....T	[ 300]
#T3_ACS38_AcF027	T.A....G....A.C.....G.....T...T.A.....T.....T.....T.....T..TA....T.....T	[ 300]
#T3_ACS313_AcF028	T.A....G....A.C.....G.....T...T.A.....T.....T.....T.....T..TA....T.....T	[ 300]
#T3_ACS316_AcF030	T.A....G....A.C.....G.....T...T.A.....T.....T.....T.....T..TA....T.....T	[ 300]
#T3_ACS321_AcF016	T.A....G....A.C.....G.....T...T.A.....T.....T.....T.....T..TA....T.....T	[ 300]
#T3_ACS335_AcF042	T.A....G....A.C.....G.....T...T.A.....T.....T.....T.....T..TA....T.....T	[ 300]
#T4B_ACGBU30_AcF138	.....	[ 300]
#T4B_ACGBU36_AcF141	.....	[ 300]
#T4B_ACGKAR12_AcF160	.....	[ 300]
#T4B_ACGKAR23_AcF077	.....	[ 300]
#T4B_ACGBU65_AcF185	.....	[ 300]
#T4C_ACGSI46_AcF134	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#T4F_ACGRA11_AcF121	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....T.....T..A..T	[ 300]
#T4F_ACGMK28_AcF173	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....T.....T..A..T	[ 300]
#T4F_ACGY48_AcF174	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....T.....T..A..T	[ 300]
#T4E_ACGRA12_AcF071	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....T.....T..A..T	[ 300]
#T4D_ACGSIG9_AcF126	T.A....G....C.C.....T.T.C....T.C....C.....C.....C.....A..T	[ 300]
#T11_ACGSIG33_AcF128	T.T...C.T....G....C.....T...T.A.....T.A..T.....T.C.....TA....C.T..T	[ 300]
#T4F_ACGSIG36_AcF129	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....T.....A..T	[ 300]
#T4B_ACGSIG38_AcF130	.....	[ 300]
#T4B_ACGY455_AcF165	.....	[ 300]
#T11_ACGSU24_AcF079	T.T...C.T....G....C.....T...T.A.....T.A..T.....T.C.....TA....C.T..T	[ 300]
#T11_ACGTK30_AcF113	T.T...C.T....G....C.....T...T.A.....T.A..T.....T.C.....TA....C.T..T	[ 300]
#T11_ACGTK33_AcF128	T.T...C.T....G....C.....T...T.A.....T.A..T.....T.C.....TA....C.T..T	[ 300]
#T4C_ACGNK25_AcF088	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#T26B_ACGY4516_AcF164	T.T...G....A.C.....G..TC.T.T..T.....T.....T.....T.....T..T..C....A..C	[ 300]
#T4C_ACSG18_AcF017	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#ACGAT19_AcF201	T.T...C.T....G....C.....T...T.A.....T.A..T.....T.C.....TA....C.T..T	[ 300]
#ACGAT34_AcF162	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....T.....T..A..T	[ 300]
#ACG30C162_AcF059	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....C	[ 300]
#ACGK33_AcF081	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#ACGK34_AcF053	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#ACGK37_AcF055	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#ACGK41_AcF056	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#ACGBU49_AcF145	.....	[ 300]
#ACGBU54_AcF148	.....	[ 300]
#ACGBU64_AcF150	.....	[ 300]
#ACGSUR22_AcF078	..A....C.A.....G.....G.T..T.C....T....C.G....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#ACGTD4_AcF048	T.T...C.T....G....C.....T...T.A.....T.A..T.....T.C.....TA....C.T..T	[ 300]
#ACGTK49_AcF117	T.T...C.T....G....C.....T...T.A.....T.A..T.....T.C.....TA....C.T..T	[ 300]
#ACGUB5_AcF166	T.A....G....A.C.....C.G.....T.T.C....T....T.....T.....T.....T..A..T	[ 300]
#ACSG46_AcF057	T.A....G....A.C.....G.....T...T.A.....T.....T.....T.....T..TA....T.....T	[ 300]
#G7_AcF020	T.A....G....A.C.....G.....T...T.A.....T.....T.....T.....T..TA....T.....T	[ 300]
#G31_AcF021	T.A....G....A.C.....G.....T...T.A.....T.....T.....T.....T..TA....T.....T	[ 300]
#KFO54475	T.A....G.....T...T..T...C....T.A....C.....C....C.....T.....G	[ 300]
#NC_001637	T.A....G.....T...T..T...C....T.A....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#K3580904	T.A....G.....T...T..T...C....T.A....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#UI2386	T.A....G.....T...T..T...C....T.A....C.....C....C.....T.....T	[ 300]
#KT185628	T.A....C.A.....C.....G..G.....T..T.C..A....T.....T.....C.....T..T.....T	[ 300]

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome b ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* (301-400)

#T4B_ACGCC56_AcF082	TTAATATATA	ATTCTTATAT	TACCCCCCGC	GAACTTCTTT	GAAATCTTGG	TGTAACTATT	TTAATAGTAA	TGAACTTAC	AGCTTTTTTA	GGTTATGTC	[ 400]
#T4B_ACGNK32_AcF052	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4B_ACGUJ48_AcF144	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4B_ACGUJ50_AcF158	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4B_ACGUJ52_AcF092	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4B_ACGUB2_AcF102	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4F_ACGCC61_AcF084	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4F_ACGCM42_AcF035	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4F_ACGCM442_AcF036	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4F_ACGRA26_AcF181	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4G_ACGCC128_AcF066	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4G_ACGCC136_AcF087	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4G_ACGCC143_AcF096	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T11_ACGCC152_AcF089	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4F_ACGCC240_AcF168	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T26B_ACGCM20_AcF044	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T26B_ACGCM4_AcF045	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4E_ACGMK17_AcF172	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4C_ACGNK24_AcF080	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4C_ACGNK31_AcF051	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#K1185628_1158_1p	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4C_ACGUB19_AcF103	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T3_ACGS24_AcF189	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T3_ACSG8_AcF027	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T3_ACSG13_AcF028	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T3_ACSG16_AcF030	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T3_ACSG21_AcF016	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T3_ACSG35_AcF042	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4B_ACGUJ30_AcF138	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4B_ACGUJ36_AcF141	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4B_ACGKAR12_AcF160	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4B_ACGKAR23_AcF077	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4B_ACGUJ65_AcF185	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4C_ACGSIG46_AcF134	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4F_ACGRA11_AcF121	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4F_ACGMK28_AcF173	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4F_ACGYAS48_AcF174	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4E_ACGRA12_AcF071	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4D_ACGSIG9_AcF126	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T11_ACGSIG33_AcF128	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4F_ACGSIG36_AcF129	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4B_ACGSIG38_AcF130	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4B_ACGYAS55_AcF165	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T11_ACGSUR24_AcF079	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T11_ACGTK30_AcF113	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T11_ACGTK33_AcF128	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4C_ACGNK25_AcF088	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T26B_ACGYAS16_AcF164	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#T4C_ACSG18_AcF017	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGAT19_AcF201	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGAT34_AcF162	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGCC162_AcF059	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGNK33_AcF081	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGNK34_AcF053	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGNK37_AcF055	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGNK41_AcF056	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGJU49_AcF145	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGJU54_AcF148	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGJU64_AcF150	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGSUR22_AcF078	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGTD4_AcF048	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGTK49_AcF117	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACGUB5_AcF166	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#ACSG46_AcF057	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#G7_AcF020	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#G31_AcF021	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#KE054475	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#NC_001637	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#IQ580904	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#U12386	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]
#K1185628	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 400]



ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome *b* ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* (401-500)

#T4B_ACGCC56_AcF082	TACCTTGAGG	CCAGATGAGT	TTTTGAGCAG	CTACTGTTAT	AACAAAGCCT	TTTTCTGCGA	TTCCTGTGCT	TG3GGAAATAT	ATAGTTATAT	GATTATGGGG	[ 500]
#T4B_ACGNK32_AcF052	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T4B_ACGEU48_AcF144	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T4B_ACGEU50_AcF158	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T4B_ACGEU52_AcF092	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T4B_ACGUB2_AcF102	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T4F_ACGCC61_AcF084	.....G.	.....G.	.....C.	.....T.	.....A.	.....T.	A..C..G.	.....	.....C.T.	.....	[ 500]
#T4F_ACGM42_AcF035	.....G.	.....A.	.....G.	.....C.	.....T.	.....A.	.....T.	A..C..G.	.....	.....C.T.	[ 500]
#T4F_ACGM442_AcF036	.....G.	.....	.....G.	.....C.	.....T.	.....A.	.....T.	A..C..G.	.....	.....C.T.	[ 500]
#T4F_ACGRA26_AcF181	.....G.	.....	.....G.	.....C.	.....T.	.....A.	.....T.	A..C..G.	.....	.....C.T.	[ 500]
#T4G_ACGCC128_AcF066	.....A.	.....	.....G.	.....G.	.....	.....A.T.	C..C....	C..A..G.	.....	.....G.	[ 500]
#T4G_ACGCC136_AcF087	.....A.	.....	.....G.	.....G.	.....	.....A.T.	C..C....	C..A..G.	.....	.....G.	[ 500]
#T4G_ACGCC143_AcF096	.....A.	.....	.....G.	.....G.	.....	.....A.T.	C..C....	C..A..G.	.....	.....G.	[ 500]
#T11_ACGCC152_AcF089	.....G.	T.....C	.....T.	.....	T..T..T..G	.....G.T.	.....A..AA	.....T..G.	.....T.	.....	[ 500]
#T4F_ACGCC240_AcF168	.....G.	.....A.	.....G.	.....C.	.....T.	.....A.	.....T.	A..C..G.	.....	.....C.T.	[ 500]
#T26B_ACGCM20_AcF044	.T.....	G..A.....	.C.....	.A.....	T..G..TT.G	.....T.	A.....TA	.....T.....	T.....T.	.....	[ 500]
#T26B_ACGCM4_AcF045	.T.....	G..A.....	.C.....	.A.....	T..G..TT.G	.....T.	A.....TA	.....T.....	T.....T.	.....	[ 500]
#T4E_ACGMK17_AcF172	.....T.	.....	.....A.	.....	.....T.	.....A.	.....G..TA	.....T.....C	.....C..G.	.....	[ 500]
#T4C_ACGNK24_AcF080	.....A.	.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....G..A.	A..T.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#T4C_ACGNK31_AcF051	.....A.	.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....G..A.	A..T.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#KTI185628_1158_bp	.....G.	.....A.	.....G.	.....	.....	.....A.C.	C..A....	C..A..G.	.....	.....G.	[ 500]
#T4C_ACGUB19_AcF103	.....A.	.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....GA.A.	A..C.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#T3_ACGNS24_AcF189	.....G.	A..A.....	.....T..A	.....	T.....	.....G.C.	A.....G..A	.....C..A.	.....G..G.	.....	[ 500]
#T3_ACS38_AcF027	.....G.	A..A.....	.....T..A	.....	T.....	.....G.C.	A.....A..A	.....C..A.	.....GC.G.	.....	[ 500]
#T3_ACS313_AcF028	.....G.	A..A.....	.....T..A	.....	T.....	.....G.C.	A.....A..A	.....C..A.	.....GC.G.	.....	[ 500]
#T3_ACS316_AcF030	.....G.	A..A.....	.....T..A	.....	T.....	.....G.C.	A.....A..A	.....C..A.	.....GC.G.	.....	[ 500]
#T3_ACS321_AcF016	.....G.	A..A.....	.....T..A	.....	T.....	.....G.C.	A.....A..A	.....C..A.	.....GC.G.	.....	[ 500]
#T3_ACS335_AcF042	.....G.	A..A.....	.....T..A	.....	T.....	.....G.C.	A.....A..A	.....C..A.	.....GC.G.	.....	[ 500]
#T4B_ACGEU30_AcF138	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T4B_ACGEU36_AcF141	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T4B_ACGKAR12_AcF160	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T4B_ACGKAR23_AcF077	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T4B_ACGEU65_AcF185	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T4C_ACGSIG46_AcF134	.....A.	A.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....GA.A.	A..C.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#T4F_ACGRA11_AcF121	.....G.	.....	.....G.C.	.....	.....T.	.....A.	.....T.	A..C..G.	.....	.....C.T.	[ 500]
#T4F_ACGMK28_AcF173	.....G.	.....	.....G.C.	.....	.....T.	.....A.	.....T.	A..C..G.	.....	.....C.T.	[ 500]
#T4F_ACGYA948_AcF174	.....G.	.....	.....G.C.	.....	.....T.	.....A.	.....T.	A..CA.G.	.....	.....C.T.	[ 500]
#T4E_ACGRA12_AcF071	.....T.	.....	.....A.	.....	.....T.	.....A.	.....G..TA	.....T.....C	.....C..G.	.....	[ 500]
#T4D_ACGSI69_AcF126	.....A.	.....	.....G.C.	.....C..C.	.....	.....A.A.	.....G..G.	.....T.....C	.....	.....	[ 500]
#T11_ACGSIG33_AcF128	.....G.	T.....C	.....T.	.....	T..T..T..G	.....G.T.	.....A..AA	.....T..G.	.....T.	.....	[ 500]
#T4F_ACGSIG36_AcF129	.....G.	.....	.....G.C.	.....	.....T.	.....A.	.....T.	A..C..G.	.....	.....C.T.	[ 500]
#T4B_ACGSIG38_AcF130	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T4B_ACGYA555_AcF165	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#T11_ACGSUB24_AcF079	.....G.	T.....C	.....T.	.....	T..T..T..G	.....G.T.	.....A..AA	.....T..G.	.....T.	.....	[ 500]
#T11_ACGTK30_AcF113	.....G.	T.....C	.....T.	.....	T..T..T..G	.....G.T.	.....A..AA	.....T..G.	.....T.	.....	[ 500]
#T11_ACGTK33_AcF128	.....G.	T.....C	.....T.	.....	T..T..T..G	.....G.T.	.....A..AA	.....T..G.	.....T.	.....	[ 500]
#T4C_ACGNK25_AcF088	.....A.	.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....G..A.	A..T.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#T26B_ACGYAS16_AcF164	.T.....	G..A.....	.C.....	.A.....	T.....TT.G	.....T.	A.....TA	.....T.....	T.....T.	.....	[ 500]
#T4C_ACS318_AcF017	.....A.	.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....G..A.	A..T.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#ACGAT19_AcF201	.....G.	T.....C	.....T.	.....	T..T..T..G	.....G.T.	.....A..AA	.....T..G.	.....T.	.....ATG.	[ 500]
#ACGAT34_AcF162	.....G.	.....	.....G.C.	.....	.....T.	.....A.	.....T.	A..C..G.	.....	.....C.T.	[ 500]
#ACGCC162_AcF059	.....A.	.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....G..A.	A..C.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#ACGNK33_AcF081	.....A.	A.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....GA.A.	A..C.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#ACGNK34_AcF053	.....A.	A.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....GA.A.	A..C.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#ACGNK37_AcF055	.....A.	A.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....GA.A.	A..C.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#ACGNK41_AcF056	.....A.	A.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....GA.A.	A..C.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#ACGEU49_AcF145	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#ACGEU54_AcF148	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#ACGEU64_AcF150	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 500]
#ACGSUR22_AcF078	.....A.	.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....A.A.	.....G..A.	A..T.....	.....GC.T.	.....	[ 500]
#ACGTD4_AcF048	.....G.	T.....C	.....T.	.....	T..T..T..G	.....G.T.	.....A..AA	.....T..G.	.....T.	.....	[ 500]
#ACGTK49_AcF117	.....G.	T.....C	.....T.	.....	T..T..T..G	.....G.T.	.....A..AA	.....T..G.	.....T.	.....	[ 500]
#ACGUB5_AcF166	.....G.	.....	.....G.C.	.....	.....T.	.....A.	.....T.	A..C..G.	.....	.....C.T.	[ 500]
#ACSG46_AcF057	.....G.	A..A.....	.....T..A	.....	T.....	.....G.C.	A.....A..A	.....C..A.	.....GC.G.	.....	[ 500]
#G7_AcF020	.....G.	A..A.....	.....T..A	.....	T.....	.....G.C.	A.....A..A	.....C..A.	.....GC.G.	.....	[ 500]
#G3I_AcF021	.....G.	A..A.....	.....T..A	.....	T.....	.....G.C.	A.....A..A	.....C..A.	.....GC.G.	.....	[ 500]
#KE054475	.....G.	G..A.....	.....C.....	.....	.....	.....G.	.....A.....C	.....	.....G..G.	.....	[ 500]
#NC_001637	.....T.	A.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....C..A.	.....T.	.....T.....C	.....GC.	.....	[ 500]
#K3580904	.....T.	A.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....C..A.	.....T.	.....T.....C	.....GC.	.....	[ 500]
#U12386	.....T.	A.....	.....G.T.	.....	.....T.	.....C..A.	.....T.	.....T.....C	.....GC.	.....	[ 500]
#KTI185628	.....G.	.....A.	.....G.	.....	.....	.....A.C.	C..A....	C..A..G.	.....	.....G.	[ 500]



ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome *b* ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* (601-700)

#T4B_ACG30C56_AcF082	TTACATGAAA	GCGGCTCTAG	TAATCCAPTA	AATATAGGGT	TATCGGTTGC	TAATAAAGTC	CCATTCACCC	CTTATTTTAT	CTTTAAGAT	TTACTAGGGA	[ 700 ]
#T4B_ACGNK32_AcF052	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4B_ACGPU48_AcF144	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4B_ACGPU50_AcF158	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4B_ACGPU52_AcF092	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4B_ACGUB2_AcF102	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4F_ACGCC61_AcF084	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4F_ACGCM42_AcF035	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4F_ACGCM442_AcF036	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4F_ACGRA26_AcF181	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4G_ACGCC128_AcF066	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4G_ACGCC136_AcF087	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4G_ACGCC143_AcF096	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T11_ACGCC152_AcF089	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4F_ACGCC240_AcF168	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T26B_ACGCM20_AcF044	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T26B_ACGCM4_AcF045	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4E_ACGMK17_AcF172	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4C_ACGNK24_AcF080	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4C_ACGNK31_AcF051	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#KIT185628_1158_bp	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4C_ACGUB19_AcF103	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T3_ACGNS24_AcF189	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T3_ACS38_AcF027	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T3_ACS313_AcF028	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T3_ACS316_AcF030	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T3_ACS321_AcF016	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T3_ACS335_AcF042	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4B_ACGPU30_AcF138	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4B_ACGPU36_AcF141	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4B_ACGKAR12_AcF160	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4B_ACGKAR23_AcF077	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4B_ACGPU65_AcF185	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4C_ACGSIG946_AcF134	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4F_ACGRA11_AcF121	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4F_ACGMK28_AcF173	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4F_ACGYAS48_AcF174	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4E_ACGRA12_AcF071	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4D_ACGSIG9_AcF126	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T11_ACGSIG33_AcF128	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4F_ACGSIG36_AcF129	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4B_ACGSIG38_AcF130	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4B_ACGYAS55_AcF165	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T11_ACGSUR24_AcF079	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T11_ACGTK30_AcF113	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T11_ACGTK33_AcF128	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4C_ACGNK25_AcF088	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T26B_ACGYAS16_AcF164	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#T4C_ACS318_AcF017	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGAT19_AcF201	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGAT34_AcF162	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACG30C162_AcF059	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGNK33_AcF081	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGNK34_AcF053	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGNK37_AcF055	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGNK41_AcF056	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGPU49_AcF145	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGPU54_AcF148	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGPU64_AcF150	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGSUR22_AcF078	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGTD4_AcF048	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGTK49_AcF117	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACGUB5_AcF166	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#ACSG46_AcF057	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#G7_AcF020	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#G31_AcF021	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#KE054475	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#NC_001637	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#IQ580904	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#U12386	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]
#KIT185628	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 700 ]

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome *b* ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* (701-800)

#T4B_ACGCC56_AcF082	TTAATCTTCTT	TTTAATAGTGT	TTTGTGTAAAG	CTGTCTTTTCTT	CAAACCCAGAC	AGTATATATATG	ATCCAAATCAA	TAAATGTTTCGG	GCTAAATCCCTC	TAGTTACACC	[ 800]
#T4B_ACGNK32_AcF052	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4B_ACGEJ48_AcF144	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4B_ACGEJ50_AcF158	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4B_ACGEJ52_AcF092	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4B_ACGUB2_AcF102	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4F_ACGCC61_AcF084	.A...T...	.....C.T.	.C.....	.....T	.C.A.A.	.....T.T.	.....T	.....T	.....T	.....T	[ 800]
#T4F_ACGM42_AcF035	.A...T...	.....C.T.	.C.....	.....T	.C.A.A.	.....T.T.	.....T	.....T	.....T	.....T	[ 800]
#T4F_ACGM442_AcF036	.A...T...	.....C.T.	.C.....	.....T	.C.A.A.	.....T.T.	.....T	.....T	.....T	.....T	[ 800]
#T4F_ACGRA26_AcF181	.A...T...	.....C.T.	.C.....	.....T	.C.A.A.	.....T.T.	.....T	.....T	.....T	.....T	[ 800]
#T4G_ACGCC128_AcF066	...T.....	.....C..C.	..G..G..T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4G_ACGCC136_AcF087	...T.....	.....C..C.	..G..G..T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4G_ACGCC143_AcF096	...T.....	.....C..C.	..G..G..T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T11_ACGCC152_AcF089	.A.A.T.	C...AA.	.C...T.	A...C.	T...C.	...A...	...T.T.	...C.G.T	.....T	...A...	[ 800]
#T4F_ACGCC240_AcF168	.A...T...	.....C.T.	.C.....	.....T	.C.A.A.	.....T.T.	.....T	.....T	.....T	.....T	[ 800]
#T26B_ACGC20_AcF044	...T.T.	.C.T.A.	..C.....	.....T	.....C.	...T.T.	.....T	.A.....	.....T	.....	[ 800]
#T26B_ACGC14_AcF045	...T.T.	.C.T.A.	..C.....	.....T	.....C.	...T.T.	.....T	.A.....	.....T	.....	[ 800]
#T4E_ACGMK17_AcF172	.A.T.T.	.C.T..A.C	.....T.	.G.....	..G..A.T	.C.A...	.....T.	.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#T4C_ACGNK24_AcF080	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#T4C_ACGNK31_AcF051	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#KTI185628_1158_bp	...T.....	.....A.....	.....C.T.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4C_ACGUB19_AcF103	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#T3_ACGN524_AcF189	...T.T.	.C.T..A.C	.....T.	.A.....	T...T...	.....C.	...T.A.	.....A.	.....T	...A...	[ 800]
#T3_ACS98_AcF027	...T.T.	.C.T..A.C	.....T.	.A.....	T...T...	.....C.	...T.A.	.....A.	.....T	...A...	[ 800]
#T3_ACSG13_AcF028	...T.T.	.C.T..A.C	.....T.	.A.....	T...T...	.....C.	...T.A.	.....A.	.....T	...A...	[ 800]
#T3_ACSG16_AcF030	...T.T.	.C.T..A.C	.....T.	.A.....	T...T...	.....C.	...T.A.	.....A.	.....T	...A...	[ 800]
#T3_ACSG21_AcF016	...T.T.	.C.T..A.C	.....T.	.A.....	T...T...	.....C.	...T.A.	.....A.	.....T	...A...	[ 800]
#T3_ACSG35_AcF042	...T.T.	.C.T..A.C	.....T.	.A.....	T...T...	.....C.	...T.A.	.....A.	.....T	...A...	[ 800]
#T4B_ACGEJ30_AcF138	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4B_ACGEJ36_AcF141	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4B_ACGKAR12_AcF160	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4B_ACGKAR23_AcF077	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4B_ACGEJ65_AcF185	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4C_ACGSIG46_AcF134	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#T4F_ACGRA11_AcF121	.A...T...	.....C.T.	.C.....	.....T	.C.A.A.	.....T.T.	.....T	.....T	.....T	.....T	[ 800]
#T4F_ACGMK28_AcF173	.A...T...	.....C.T.	.C.....	.....T	.C.A.A.	.....T.T.	.....T	.....T	.....T	.....T	[ 800]
#T4F_ACGYAS48_AcF174	.A...T...	.....C.T.	.C.....	.....T	.C.A.A.	.....T.T.	.....T	.....T	.....T	.....T	[ 800]
#T4E_ACGRA12_AcF071	.A.T.T.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4D_ACGSIG9_AcF126	...T.T.	.C.....	.C...T.	A...C.	T...T.T	...A.C.	...G...	.....T	...C.A.	...A.G.	[ 800]
#T11_ACGSIG33_AcF128	.A.A.T.	C...AA.	.C...T.	A...C.	T...C.	...A...	...T.T.	...C.G.T	.....T	...A...	[ 800]
#T4F_ACGSIG36_AcF129	.A...T...	.....C.T.	.C.....	.....T	.C.A.A.	.....T.T.	.....T	.....T	.....T	.....T	[ 800]
#T4B_ACGSIG38_AcF130	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T4B_ACGYAS55_AcF165	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#T11_ACGSUR24_AcF079	.A.A.T.	C...AA.	.C...T.	A...C.	T...C.	...A...	...T.T.	...C.G.T	.....T	...A...	[ 800]
#T11_ACGTK30_AcF113	.A.A.T.	C...AA.	.C...T.	A...C.	T...C.	...A...	...T.T.	...C.G.T	.....T	...A...	[ 800]
#T11_ACGTK33_AcF128	.A.A.T.	C...AA.	.C...T.	A...C.	T...C.	...A...	...T.T.	...C.G.T	.....T	...A...	[ 800]
#T4C_ACGNK25_AcF088	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#T26B_ACGYAS16_AcF164	...T.T.	.C.T..A.C	.....T.	.A.....	T...T...	.....C.	...T.T.	.....T	...A...	.....	[ 800]
#T4C_ACS318_AcF017	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#ACGAT19_AcF201	.A.A.T.	C...AA.	.C...T.	A...C.	T...C.	...A...	...T.T.	...C.G.T	.....T	...A...	[ 800]
#ACGAT34_AcF162	.A...T...	.....C.T.	.C.....	.....T	.C.A.A.	.....T.T.	.....T	.....T	.....T	.....T	[ 800]
#ACGCC162_AcF059	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#ACGNK33_AcF081	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#ACGNK34_AcF053	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#ACGNK37_AcF055	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#ACGNK41_AcF056	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#ACGEU49_AcF145	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#ACGEU54_AcF148	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#ACGEU64_AcF150	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#ACGSUR22_AcF078	.A.T.....	.C.G.....	.....T.	.C.....	T...G..T	...A.A.	.C.T.T.	C.....T	.....T	.....C.	[ 800]
#ACGTD4_AcF048	.A.A.T.	C...AA.	.C...T.	A...C.	T...C.	...A...	...T.T.	...C.G.T	.....T	...A...	[ 800]
#ACGTR49_AcF117	.A.A.T.	C...AA.	.C...T.	A...C.	T...C.	...A...	...T.T.	...C.G.T	.....T	...A...	[ 800]
#ACGUB5_AcF166	.A...T...	.....C.T.	.C.....	.....T	.C.A.A.	.....T.T.	.....T	.....T	.....T	.....T	[ 800]
#ACSG46_AcF057	...T.T.	.C.T..A.C	.....T.	.A.....	T...T...	.....C.	...T.A.	.....A.	.....T	...A...	[ 800]
#G7_AcF020	...T.T.	.C.T..A.C	.....T.	.A.....	T...T...	.....C.	...T.A.	.....A.	.....T	...A...	[ 800]
#G31_AcF021	...T.T.	.C.T..A.C	.....T.	.A.....	T...T...	.....C.	...T.A.	.....A.	.....T	...A...	[ 800]
#KE054475	...T.....	.C.....	.C...T.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#NC_001637	...T.T.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#IQ580904	...T.T.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#U12386	...T.T.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]
#KTI185628	...T.....	.....A.....	.....C.T.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 800]

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome b ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* (801-900)

#T4B_ACGCC56_AcF082	TACTCAATAAT GTACCGGAAT GATATTTTTT AOCGTTTTAT GCTAATAATAA GGTCAAATCC TAATAAAGCTT GGAGGAGTAA TTACTTTTAGG TTTAGCTTTAA	[ 900]
#T4B_ACGNK32_AcF052		[ 900]
#T4B_ACGEU48_AcF144		[ 900]
#T4B_ACGEU50_AcF158		[ 900]
#T4B_ACGEU52_AcF092		[ 900]
#T4B_ACGUE2_AcF102		[ 900]
#T4F_ACGCC61_AcF084	. . A . C . . . . . A . G . . . . C . . A . . . C . . . . C . . . . G . . . . C . . T . A . . C . . . . . C . . . . . G . G . . A . .	[ 900]
#T4F_ACGCM42_AcF035	. . A . C . . . . . A . . G . . . . C . . A . . . C . . . . C . . . . G . . . . C . T . A . . C . . . . C . . . . . G . G . . A . .	[ 900]
#T4F_ACGCM44_AcF036	. . A . C . . . . . A . . G . . . . C . . A . . . C . . . . C . . . . G . . . . C . T . A . . C . . . . C . . . . . G . G . . A . .	[ 900]
#T4F_ACGRA26_AcF181	. . A . C . . . . . A . . G . . . . C . . A . . . C . . . . C . . . . G . . . . C . T . A . . C . . . . C . . . . . G . G . . A . .	[ 900]
#T4G_ACGCC128_AcF066	. . . . . G . T . . . . G . . . . . C . . . . C . G . A . . . C . . . . . G . . . . . C . . . . . C . . . . . A . . . . .	[ 900]
#T4G_ACGCC136_AcF087	. . . . . G . T . . . . G . . . . . C . . . . C . G . A . . . C . . . . . G . . . . . C . . . . . A . . . . .	[ 900]
#T4G_ACGCC143_AcF096	. . . . . G . T . . . . G . . . . . C . . . . C . G . A . . . C . . . . . G . . . . . C . . . . . A . . . . .	[ 900]
#T11_ACGCC152_AcF089	A . . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . . T . . G . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . C . . . . .	[ 900]
#T4F_ACGCC240_AcF168	. . A . C . . . . . A . . G . . . . C . . A . . . C . . . . C . . . . G . . . . C . T . A . . C . . . . C . . . . . G . G . . A . .	[ 900]
#T26B_ACGCM20_AcF044	. . C . . . . C . . T . . G . G . . . . . . . . . . T . . . . A . T . A . . . . T . A . . G . . . . A . . . . . G . . . . .	[ 900]
#T26B_ACGCM4_AcF045	. . C . . . . C . . T . . G . G . . . . . . . . . . T . . . . A . T . A . . . . T . A . . G . . . . A . . . . . G . . . . .	[ 900]
#T4E_ACGMK17_AcF172	. . . . . C . . T . T . G . . . . C . . A . . . . A . . . . . T . G . . . . . A . . . . C . . G . . . .	[ 900]
#T4C_ACGNK24_AcF080	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#T4C_ACGNK31_AcF051	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#KTI185628_1158_bp	. . . . . G . T . . . . G . . . . . A . . . . . G . . . . . G . . . . . A . . . . . C . . . . . A . . . . . A . . . . . C . .	[ 900]
#T4C_ACGUB19_AcF103	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#T3_ACGNS24_AcF189	. . C . . . . T . T . . . . . A . . . . A . . . C . T . G . . . A . . . T . A . . . . C . . . . C . T . . C . . . . AC.T	[ 900]
#T3_ACSG8_AcF027	. . . . . T . T . . . . . A . . . . A . . . C . T . G . . . A . . . T . A . . . . C . T . . C . . . . AC.T	[ 900]
#T3_ACSG13_AcF028	. . . . . T . T . . . . . A . . . . A . . . C . T . G . . . A . . . T . A . . . . C . T . . C . . . . AC.T	[ 900]
#T3_ACSG16_AcF030	. . . . . T . T . . . . . A . . . . A . . . C . T . G . . . A . . . T . A . . . . C . T . . C . . . . AC.T	[ 900]
#T3_ACSG21_AcF016	. . . . . T . T . . . . . A . . . . A . . . C . T . G . . . A . . . T . A . . . . C . T . . C . . . . AC.T	[ 900]
#T3_ACSG35_AcF042	. . . . . T . T . . . . . A . . . . A . . . C . T . G . . . A . . . T . A . . . . C . . . . C . T . . C . . . . AC.T	[ 900]
#T4B_ACGEU30_AcF138		[ 900]
#T4B_ACGEU36_AcF141		[ 900]
#T4B_ACGKAR12_AcF160		[ 900]
#T4B_ACGKAR23_AcF077		[ 900]
#T4B_ACGEU65_AcF185		[ 900]
#T4C_ACGSIG946_AcF134	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#T4F_ACGRA11_AcF121	. . A . C . . . . . A . . G . . . . C . . A . . . C . . . . C . . . . G . . . . C . T . A . . C . . . . C . . . . . G . G . . A . .	[ 900]
#T4F_ACGMK28_AcF173	. . A . C . . . . . A . . G . . . . C . . A . . . C . . . . C . . . . G . . . . C . T . A . . C . . . . C . . . . . G . G . . A . .	[ 900]
#T4F_ACGYA948_AcF174	. . A . C . . . . . A . . G . . . . C . . A . . . C . . . . C . . . . G . . . . C . T . A . . C . . . . C . . . . . G . G . . A . .	[ 900]
#T4E_ACGRA12_AcF071	. . . . . C . . T . T . G . . . . C . . A . . . . A . . . . . T . G . . . . . C . . . . A . . . . C . . . . . G . . . . .	[ 900]
#T4D_ACGSIG9_AcF126	. . A . . . C . T . T . . . G . . . . . C . . . . C . T . A . T . . . . A . . . G . . . . C . . . . . A . . . . .	[ 900]
#T11_ACGSIG33_AcF128	A . . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . T . G . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . C . . . . .	[ 900]
#T4F_ACGSIG36_AcF129	. . A . C . . . . . A . . G . . . . C . . A . . . C . . . . C . . . . G . . . . C . T . A . . C . . . . C . . . . . G . G . . A . .	[ 900]
#T4B_ACGSIG38_AcF130		[ 900]
#T4B_ACGYA555_AcF165		[ 900]
#T11_ACGSUR24_AcF079	A . . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . T . G . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . C . . . . .	[ 900]
#T11_ACGTK30_AcF113	A . . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . T . G . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . C . . . . .	[ 900]
#T11_ACGTK33_AcF128	A . . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . T . G . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . C . . . . .	[ 900]
#T4C_ACGNK25_AcF088	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#T26B_ACGYA516_AcF164	. . C . . . C . . T . . G . G . . . . . . . . . . T . . . . T . A . . . . T . A . . G . . . . A . . . . . G . . . . .	[ 900]
#T4C_ACSG18_AcF017	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#ACGAT19_AcF201	A . . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . T . G . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . C . . . . .	[ 900]
#ACGAT34_AcF162	. . A . C . . . . . A . . G . . . . C . . A . . . C . . . . C . . . . G . . . . C . T . A . . C . . . . C . . . . . G . G . . A . .	[ 900]
#ACGCC162_AcF059	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#ACGNK33_AcF081	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#ACGNK34_AcF053	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#ACGNK37_AcF055	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#ACGNK41_AcF056	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#ACGEU49_AcF145		[ 900]
#ACGEU54_AcF148		[ 900]
#ACGEU64_AcF150		[ 900]
#ACGSUR22_AcF078	. . . . . G . T . G . . . C . C . T . A . C . . . . . A . . . C . C . C . G . T . A . . . G . . . . A . . . G . . . A . . .	[ 900]
#ACGTD4_AcF048	A . . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . T . G . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . C . . . . .	[ 900]
#ACGTK49_AcF117	A . . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . T . G . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . C . . . . .	[ 900]
#ACGUB5_AcF166	. . A . C . . . . . A . . G . . . . C . . A . . . C . . . . C . . . . G . . . . C . T . A . . C . . . . C . . . . . G . G . . A . .	[ 900]
#ACSG46_AcF057	. . . . . T . T . . . . . A . . . . A . . . C . T . G . . . A . . . T . A . . . . C . T . . C . . . . AC.T	[ 900]
#G7_AcF020	. . . . . T . T . . . . . A . . . . A . . . C . T . G . . . A . . . T . A . . . . C . T . . C . . . . AC.T	[ 900]
#G31_AcF021	. . . . . T . T . . . . . A . . . . A . . . C . T . G . . . A . . . T . A . . . . C . T . . C . . . . AC.T	[ 900]
#KE054475	. . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . G . . . . . C . . . . . G . . . . . C . . . . . C . . . . .	[ 900]
#NC_001637	. . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . G . . . . . G . . . . . A . . . . A . AC . . . . G . . . . .	[ 900]
#IQ580904	. . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . G . . . . . A . . . . A . AC . . . . G . . . . .	[ 900]
#U12386	. . . . . T . . . . . . . . . . A . . . . G . . . . . A . . . . A . AC . . . . G . . . . .	[ 900]
#KTI185628	. . . . . G . T . . . . G . . . . . A . . . . . G . . . . . G . . . . . G . . . . . A . . . . C . . . . . A . . . . C . .	[ 900]

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome *b* ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* (901-1000)

#T4B_A030C56_AcF082	ATAGTCTTGT TTCTATPACC TTMTATAACT AATAATGTTT TTAGG3GTC ATTTTTGAA AMPCTAAAA CAGTATATTT CTGATCATTC CTTTCTGTTT	[1000]
#T4B_A030K32_AcF052	.....	[1000]
#T4B_A030J48_AcF144	.....	[1000]
#T4B_A030J50_AcF158	.....	[1000]
#T4B_A030J52_AcF092	.....	[1000]
#T4B_A030B2_AcF102	.....	[1000]
#T4F_A030C61_AcF084	G.T.A.A. .CT.....A.....C.....A.C. T...T.....G. .A.C. T.G...T.....A...	[1000]
#T4F_A030M42_AcF035	G.T.A.A. .CT.....A.....C.....A.C. T...T.....G. .A.C. T.G...T.....A...	[1000]
#T4F_A030M442_AcF036	G.T.A.A. .CT.....A.....C.....A.C. T...T.....G. .A.C. T.G...T.....A...	[1000]
#T4F_A030RA26_AcF181	G.T.A.A. .CT.....A.....C.....A.C. T...T.....G. .A.C. T.G...T.....A...	[1000]
#T4G_A030C128_AcF066	.....T.....T.C.G. C.....A.....T.....A.....G. T.G...T.....T.C.....	[1000]
#T4G_A030C136_AcF087	.....T.....T.C.G. C.....A.....T.....A.....G. T.G...T.....T.C.....	[1000]
#T4G_A030C143_AcF096	.....T.....T.C.G. C.....A.....T.....A.....G. T.G...T.....T.C.....	[1000]
#T11_A030C152_AcF089	G.T.T.A. .CT.....A.....C.....A.G. .C.T. .A.....T.TC.....G...T.....G...	[1000]
#T4F_A030C240_AcF168	G.T.A.A. .CT.....A.....C.....A.C. T...T.....G. .A.C. T.G...T.....A...	[1000]
#T26B_A030M20_AcF044	..T.A.A. .CT.G.....A.....G. T...T.....A...T...C.T. ....T.T.T.A.....	[1000]
#T26B_A030M4_AcF045	..T.A.A. .CT.G.....A.....G. T...T.....A...C...C.T. ....T.T.T.A.....	[1000]
#T4E_A030MK17_AcF172	.....T.A. .T.G. A.....C.....T.C.T..G.....G. .A.....T.GC.T..T.....C...	[1000]
#T4C_A030K24_AcF080	..T.G.A. .T.....A.....T.....C.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....A...	[1000]
#T4C_A030K31_AcF051	..T.G.A. .T.....A.....T.....C.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....A...	[1000]
#KTI185628_1158_bp	.....T.....T.C. C.....A.....C.....T.....T.....G. .A.....T.G...T.....C.C...	[1000]
#T4C_A030B19_AcF103	..T.G.A. .T.....A.....T.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....A...	[1000]
#T3_A030S24_AcF189	.....T.A. .T.....T.....T.....A.C. T...T.....A.....G TTA.T. T.....T.A....A...	[1000]
#T3_A030S8_AcF027	.....T.A. .T.....T.....T.....A.C. T...T.....A.....G TTA.T. T.....T.A....A...	[1000]
#T3_A030S13_AcF028	.....T.A. .T.....T.....T.....A.C. T...T.....A.....G TTA.T. T.....T.A....A...	[1000]
#T3_A030S16_AcF030	.....T.A. .T.....T.....T.....A.C. T...T.....A.....G TTA.T. T.....T.A....A...	[1000]
#T3_A030S21_AcF016	.....T.A. .T.....T.....T.....A.C. T...T.....A.....G TTA.T. T.....T.A....A...	[1000]
#T3_A030S35_AcF042	.....T.A. .T.....T.....T.....A.C. T...T.....A.....G TTA.T. T.....T.A....A...	[1000]
#T4B_A030J30_AcF138	.....	[1000]
#T4B_A030J36_AcF141	.....	[1000]
#T4B_A030KAR12_AcF160	.....	[1000]
#T4B_A030KAR23_AcF077	.....	[1000]
#T4B_A030J65_AcF185	.....	[1000]
#T4C_A030SIG46_AcF134	..T.G.A. .T.....A.....T.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....A...	[1000]
#T4F_A030RA11_AcF121	G.T.A.A. .CT.....A.....C.....A.C. T...T.....G. .A.C. T.G...T.....A...	[1000]
#T4F_A030MK28_AcF173	G.T.A.A. .CT.....A.....C.....A.C. T...T.....G. .A.C. T.G...T.....A...	[1000]
#T4F_A030YAS48_AcF174	G.T.A.A. .CT.....A.....C.....A.C. T...T.....G. .A.C. T.G...T.....A...	[1000]
#T4E_A030RA12_AcF071	.....T.A. .T.G. A.....C.....T.C.T..G.....G. .A.....T.G. T..T.....C...	[1000]
#T4D_A030SIG9_AcF126	.....TC.A. .T.C. A.....A.....T.....TA.....G...T.....T.....A...	[1000]
#T11_A030SIG53_AcF128	G.T.T.A. .CT.....A.....C.....A.G. .C.T. .A.....T.TC.....G...T.....G...	[1000]
#T4F_A030SIG36_AcF129	G.T.A.A. .CT.....A.....C.....A.C. T...T.....G. .A.C. T.G...T.....A...	[1000]
#T4B_A030SIG38_AcF130	.....	[1000]
#T4B_A030YAS55_AcF165	.....	[1000]
#T11_A030SUR24_AcF079	G.T.T.A. .CT.....A.....C.....A.G. .C.T. .A.....T.TC.....G...T.....G...	[1000]
#T11_A030TK30_AcF113	G.T.T.A. .CT.....A.....C.....A.G. .C.T. .A.....T.TC.....G...T.....G...	[1000]
#T11_A030TK33_AcF128	G.T.T.A. .CT.....A.....C.....A.G. .C.T. .A.....T.TC.....G...T.....G...	[1000]
#T4C_A030K25_AcF068	..T.G.A. .T.....A.....T.....C.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....A...	[1000]
#T26B_A030YAS16_AcF164	..T.A.A. .CT.G.....A.....G. T...T.....A...C...C.T. ....T.T.T.A.....	[1000]
#T4C_A030S18_AcF017	..T.G.A. .T.....A.....T.....C.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....A...	[1000]
#A030AT19_AcF201	G.T.T.A. .CT.....A.....C.....A.G. .C.T. .AA.....T.TC.....G...T.....G...	[1000]
#A030AT34_AcF162	G.T.A.A. .CT.....A.....C.....A.C. T...T.....G. .A.C. T.G...T.....A...	[1000]
#A030C162_AcF059	..T.GG.A. .T.....A.....T.....C.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....A...	[1000]
#A030K33_AcF081	..T.G.A. .T.....A.....T.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....AAG...	[1000]
#A030K34_AcF053	..T.G.A. .T.....A.....T.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....A...	[1000]
#A030K37_AcF055	..T.G.A. .T.....A.....T.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....A...	[1000]
#A030K41_AcF056	..T.G.A. .T.....A.....T.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....A...	[1000]
#A030J49_AcF145	.....	[1000]
#A030J54_AcF148	.....	[1000]
#A030J64_AcF150	.....	[1000]
#A030SUR22_AcF078	..T.G.A. .T.....A.....T.....A.....T.....T.....G. .A.....T.T.....A...	[1000]
#A030TD4_AcF048	G.T.T.A. .CT.....A.....C.....A.G. .C.T. .A.....T.TC.....G...T.....G...	[1000]
#A030TR49_AcF117	G.T.T.A. .CT.....A.....C.....A.G. .C.T. .A.....T.TC.....G...T.....G...	[1000]
#A030UB5_AcF166	G.T.A.A. .CT.....A.....C.....A.C. T...T.....G. .A.C. T.G...T.....A...	[1000]
#A030G46_AcF057	.....T.A. .T.....T.....T.....A.C. T...T.....A.....G TTA.T. T.....T.A....A...	[1000]
#G7_AcF020	.....T.A. .T.....T.....T.....A.C. T...T.....A.....G TTA.T. T.....T.A....A...	[1000]
#G31_AcF021	.....T.A. .T.....T.....T.....A.C. T...T.....A.....G TTA.T. T.....T.A....A...	[1000]
#KE054475	.....A.....T.....A.....T.....T.....A.....T.....T.....C...	[1000]
#NC_001637	..T.G.A. .T.....C.....C.....T.....TA.....G. T.....T.....C...	[1000]
#KX580904	..T.G.A. .T.....C.....C.....T.....TA.....G. T.....T.....C...	[1000]
#U12386	..T.G.A. .T.....C.....C.....T.....TA.....G. T.....T.....C...	[1000]
#KTI185628	.....T.....T.C. C.....A.....C.....T.....T.....G...T.....C.C...	[1000]



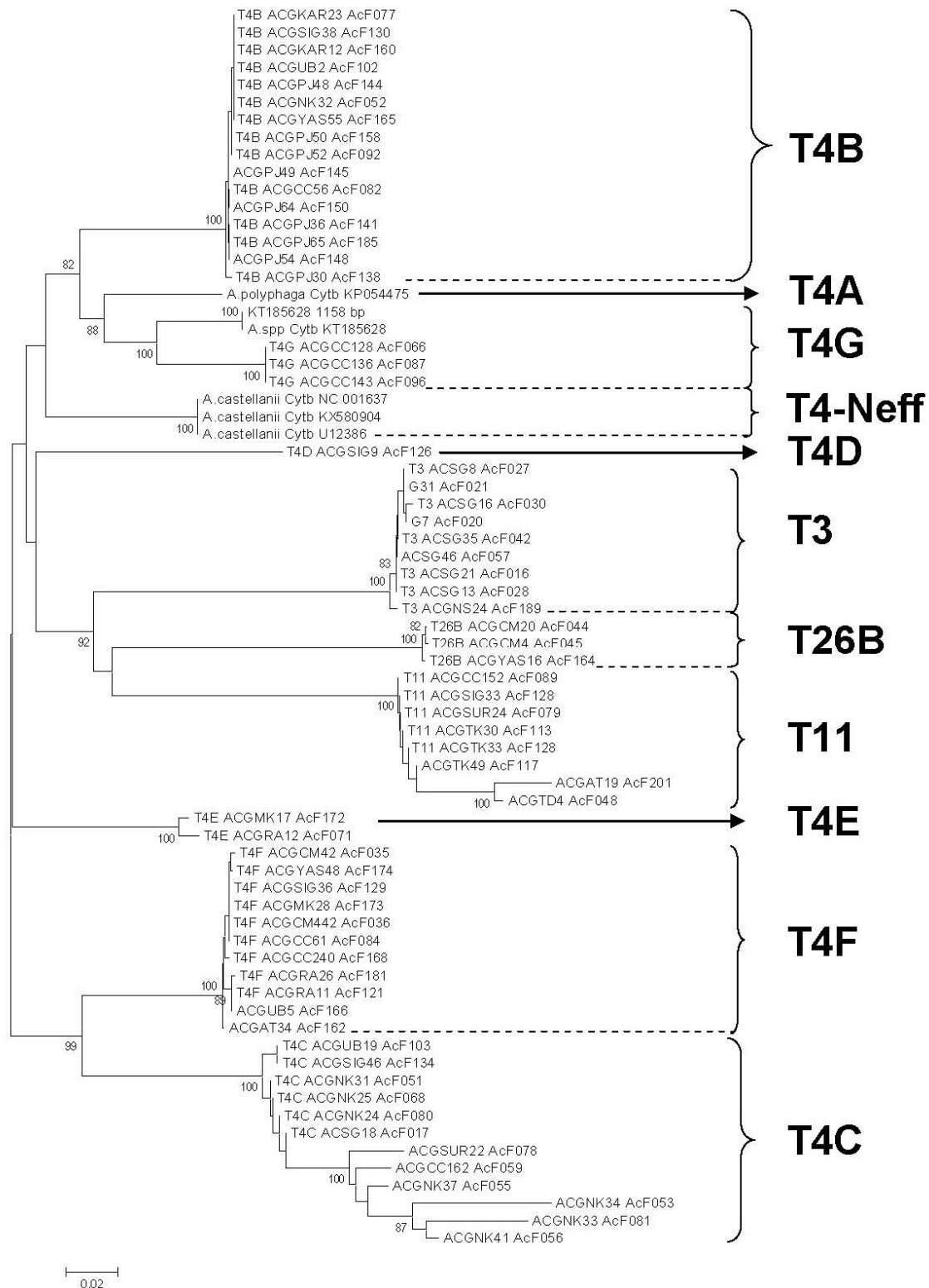
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome *b* ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* (1101-1155)

#T4B_ACGCC56_AcF082	AGCTGTTATA GTTCCAGCCT TACAGGCTTA TACTTTTCAA AATGTAATTG AAAAA	[1155]
#T4B_ACGNK32_AcF052	.....	[1155]
#T4B_ACGRU48_AcF144	.....	[1155]
#T4B_ACGRU50_AcF158	.....	[1155]
#T4B_ACGRU52_AcF092	.....	[1155]
#T4B_ACGUB2_AcF102	.....	[1155]
#T4F_ACGCC61_AcF084	..A.A. ....T. ....C. C. ....T. ..C. ....	[1155]
#T4F_ACGCM42_AcF035	..A.A. ....T. ....C. C. ....T. ..C. ....	[1155]
#T4F_ACGCM442_AcF036	..A.A. ....T. ....C. C. ....T. ..C. ....	[1155]
#T4F_ACGRA26_AcF181	..G.A. ....T. ....C. C. ....T. ..C. ....	[1155]
#T4G_ACGCC128_AcF066	G. ....T. T. T. ....A. ....T. ....A C. ....	[1155]
#T4G_ACGCC136_AcF087	G. ....T. T. T. ....A. ....T. ....A C. ....	[1155]
#T4G_ACGCC143_AcF096	G. ....T. T. T. ....A. ....T. ....A C. ....	[1155]
#T11_ACGCC152_AcF089	.....C. T. T. ....C. G. ....T. ..C. ....T C. ....	[1155]
#T4F_ACGCC240_AcF168	..A.A. ....T. ....C. C. ....T. ..C. ....	[1155]
#T26B_ACGCM20_AcF044	G. ....T. ....TT. T. ....A. .G. .T. ....T. T CT. ....	[1155]
#T26B_ACGCM4_AcF045	G. ....T. ....TT. T. ....A. .G. .T. ....T. T CT. ....	[1155]
#T4E_ACGMK17_AcF172	..C. ....T. ....A. TC. ....T. ....T. ....C. ....	[1155]
#T4C_ACGNK24_AcF080	..G.A. ....T. ....A. C. ....T. ....G. ....	[1155]
#T4C_ACGNK31_AcF051	..G.A. ....T. ....A. C. ....T. ....G. ....	[1155]
#K1185628_1158_1bp	G. ....C. C. T. ....C. T. ....G. C. C. ....	[1155]
#T4C_ACGUB19_AcF103	..G.A. ....T. ....A. C. ....T. ....G. ....	[1155]
#T3_ACGNS24_AcF189	G. CA. ....A. GA. C. T. A. ....GC. T. GG. ....T. T T. CT. ....	[1155]
#T3_ACSG8_AcF027	G. CA. ....A. GA. C. T. A. ....GC. T. GG. ....T. T T. CT. ....	[1155]
#T3_ACSG13_AcF028	G. CA. ....A. GA. C. T. A. ....GC. T. GG. ....T. T T. CT. ....	[1155]
#T3_ACSG16_AcF030	G. CA. ....A. GA. C. T. A. ....GC. T. GG. ....T. T T. CT. ....	[1155]
#T3_ACSG21_AcF016	G. CA. ....A. GA. C. T. A. ....GC. T. GG. ....T. T T. CT. ....	[1155]
#T3_ACSG35_AcF042	G. CA. ....A. GA. C. T. A. ....GC. T. GG. ....T. T T. CT. ....	[1155]
#T4B_ACGRU30_AcF138	.....	[1155]
#T4B_ACGRU36_AcF141	.....	[1155]
#T4B_ACGKAR12_AcF160	.....	[1155]
#T4B_ACGKAR23_AcF077	.....	[1155]
#T4B_ACGRU65_AcF185	.....	[1155]
#T4C_ACGSIG46_AcF134	..G.A. ....T. ....A. C. ....T. ....G. ....	[1155]
#T4F_ACGRA11_AcF121	..G.A. ....T. ....C. C. ....T. ..C. ....	[1155]
#T4F_ACGMK28_AcF173	..A.A. ....T. ....C. C. ....T. ..C. ....	[1155]
#T4F_ACGYAS48_AcF174	..A.A. ....T. ....C. C. ....T. ..C. ....	[1155]
#T4E_ACGRA12_AcF071	..C. ....T. ....A. TC. ....T. ....T. ....C. ....	[1155]
#T4D_ACGSIG9_AcF126	..C. ....T. ....TA. AC. ....C. C. T. ....C. ....C. ....	[1155]
#T11_ACGSIG33_AcF128	.....C. T. T. ....C. G. ....T. ..C. ....T C. ....	[1155]
#T4F_ACGSIG36_AcF129	..A.A. ....T. ....C. C. ....T. ..C. ....	[1155]
#T4B_ACGSIG38_AcF130	.....	[1155]
#T4B_ACGYAS55_AcF165	.....	[1155]
#T11_ACGSUR24_AcF079	.....C. T. T. ....C. G. ....T. ..C. ....T C. ....	[1155]
#T11_ACGTK30_AcF113	.....C. T. T. ....C. G. ....T. ..C. ....T C. ....	[1155]
#T11_ACGTK33_AcF128	.....C. T. T. ....C. G. ....T. ..C. ....T C. ....	[1155]
#T4C_ACGNK25_AcF068	..G.A. ....T. ....A. C. ....T. ....G. ....	[1155]
#T26B_ACGYAS16_AcF164	G. ....T. ....TT. T. ....A. .G. .T. ....T. T CT. ....	[1155]
#T4C_ACSG18_AcF017	..G.A. ....T. ....A. C. ....T. ....G. ....	[1155]
#ACGAT19_AcF201	.C. ....A. AAC. C. T. CA. ....ACG. TT. ....C. G. ....T CC. ....	[1155]
#ACGAT34_AcF162	..A.A. ....T. ....C. C. ....T. ..C. ....	[1155]
#ACGCC162_AcF059	.A. G. GA. A. ....C. ....A. A. C. A. ....TT. .A. GT. ....	[1155]
#ACGNK33_AcF081	.A. G. GA. A. ....T. ....AC. CAT ACT. ....A. .GGT. T. GA. ....G. ....	[1155]
#ACGNK34_AcF053	CCGG. AA. A. T. C. TGC. T. A. A. CC. AA. CTT. ....A. .G. T. T. AA. ....T. ....	[1155]
#ACGNK37_AcF055	.A. G. GA. A. ....TC. G. TA. A. GCCT A. ....TT. .A. GT. ....	[1155]
#ACGNK41_AcF056	.CGG. GA. A. ....TC. ....AC. CA. ACT. ....A. .GGT. T. GAA. ....G. ....	[1155]
#ACGRU49_AcF145	.....	[1155]
#ACGRU54_AcF148	.....	[1155]
#ACGRU64_AcF150	.....	[1155]
#ACGSUR22_AcF078	.CGG. AA. A. T. C. .G. T. A. A. AC. AA. C. AC. .TTT. .AAGG. .T G. ....	[1155]
#ACGTD4_AcF048	.C. G. G. .A. .CC. C. GT. ....G. C. G. ....T. ..C. GT. ....T C. ....	[1155]
#ACGTK49_AcF117	.....C. T. T. ....C. G. ....T. ..C. ....T C. ....	[1155]
#ACGUB5_AcF166	..G.A. ....T. ....C. C. ....T. ..C. ....	[1155]
#ACSG46_AcF057	G. CA. ....A. GA. C. T. A. ....GC. T. GG. ....T. T T. CT. ....	[1155]
#G7_AcF020	G. CA. ....A. GA. C. T. A. ....GC. T. GG. ....T. T T. CT. ....	[1155]
#G31_AcF021	G. CA. ....A. GA. C. T. A. ....GC. T. GG. ....T. T T. CT. ....	[1155]
#KE054475	.....T. T. ....A. ....T. ....A. ....	[1155]
#NC_001637	.....A. TA. T. ....C. C. C. T. ....C. ....	[1155]
#K3580904	.....A. TA. T. ....C. C. C. T. ....C. ....	[1155]
#U12386	.....A. TA. T. ....C. C. C. T. ....C. ....	[1155]
#K1185628	G. ....C. T. ....C. T. ....G. C. C. ....	[1155]

รูปที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome *b* ใน mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* จากตัวอย่างจากแหล่งน้ำในประเทศไทย (จุดหมายถึงนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับสายพันธุ์ T4B-ACGCC56-AcF082)



สำหรับการวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยวิธี neighbor-joining ใช้ Kimura 2 parameter จากยีน cytochrome *b* พบว่าการจัดกลุ่ม genotype มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน nuclear small subunit ribosomal RNA ที่ได้วิเคราะห์ในตอนต้น โดยการแยกกลุ่มดังกล่าวมีค่า bootstrap ที่มีค่าสูง ตัวอย่างของ phylogenetic tree ดังกล่าวแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน cytochrome *b* ของ mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* (ตัวเลขกำกับแขนงของ tree คือค่าร้อยละของ bootstrap)

ในการเปรียบเทียบขอบเขตความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน cytochrome *b* ของแต่ละ genotype พบว่า genotype T4G มีค่า nucleotide diversity มากที่สุด รองลงมาคือ genotype T4C ส่วน genotype T4Neff และ genotype T11 ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ แม้ว่า genotype T11 มีจำนวนตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์มากกว่า genotype T4G ทั้งนี้ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่เกิดจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง ดังนั้นค่า synonymous nucleotide diversity มีค่ามากกว่า nonsynonymous nucleotide diversity มากอย่างชัดเจน เช่น ใน genotype T4B และ genotype T4F ค่า synonymous nucleotide diversity มีค่ามากกว่า nonsynonymous nucleotide diversity 8.9 และ 34 เท่าตามลำดับ ยกเว้นตัวอย่างใน genotype T4C ซึ่งค่าดังกล่าวมีความแตกต่างกันไม่มาก (ตารางที่ 6) นอกจากนี้ในการตรวจสอบร่องรอยของกระบวนการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมภายใน genotype พบว่า genotypes T3, T4C และ T4F มีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น แต่ไม่พบใน genotypes T4B, T4G และ T2/6B เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้ Tajima's *D* statistics พบว่า genotypes T3, T4B, T4C และ T4F ไม่มีความแตกต่างจากค่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ genotype T4G มีค่าเป็นบวกอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า Tajima's *D* ที่มีนัยสำคัญพบเฉพาะในตำแหน่งที่มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 6) เมื่อทำการวิเคราะห์ nucleotide divergence (*k*) ระหว่าง genotypes และค่าเฉลี่ยการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่งโดยเปรียบเทียบระหว่างประชากร (average number of nucleotide substitution per site between populations) หรือค่า *D*<sub>xy</sub> พบว่าค่า nucleotide divergence มีค่าตั้งแต่ 0.1177 ถึง 0.2359 ส่วนค่า *D*<sub>xy</sub> มีค่าตั้งแต่ 0.1089 ถึง 0.2024 ทั้งนี้ค่าแตกต่างดังกล่าวมีค่ามากกว่าค่า nucleotide diversity ภายในแต่ละ genotype อย่างชัดเจน แสดงว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในยีน cytochrome *b* ของ mitochondrial genome สามารถใช้จำแนก genotype ของ *Acanthamoeba* ได้ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 molecular diversity indices ในยีน cytochrome *b* ของแต่ละ genotype ของ *Acanthamoeba*

genotype	$\pi$	$\pi_s$	$\pi_N$	Rm	Tajima's <i>D</i>
T4B	0.00168	0.00525	0.00059	0	-0.294
T4C	0.03997	0.04689	0.03797	3	-0.839
T4F	0.00357	0.01403	0.00041	2	0.013
T4G	0.04246	0.19205	0.00545	0	1.896*
T4Neff	0.00000	0.00000	0.00000	0	NA
T3	0.00275	0.00650	0.00163	1	-0.649
T11	0.00000	0.00000	0.00000	0	NA
T2/6B	0.00231	0.01007	0.00000	0	NA

$\pi$ , nucleotide diversity;  $\pi_s$ , synonymous nucleotide diversity;  $\pi_N$ , nonsynonymous nucleotide diversity; Rm, minimum number of recombination events; \*  $p < 0.05$

ตารางที่ 7 ค่า nucleotide divergence (k) และค่าเฉลี่ยการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่งระหว่างประชากร (Dxy) ระหว่างกลุ่ม genotypes ในยีน cytochrome b ของ *Acanthamoeba*

Genotype	T4B	T4F	T4C	T4G	T4Neff	T3	T11	T2/6B
T4B		0.1354	0.1636	0.1090	0.1089	0.1643	0.1642	0.1682
T4F	0.1493		0.1275	0.1393	0.1306	0.1687	0.1626	0.1629
T4C	0.1846	0.1397		0.1611	0.1542	0.1802	0.1917	0.2024
T4G	0.1178	0.1541	0.1814		0.1176	0.1646	0.1713	0.1730
T4Neff	0.1177	0.1435	0.1726	0.1279		0.1518	0.1584	0.1616
T3	0.1855	0.1910	0.2060	0.1858	0.1696		0.1615	0.1798
T11	0.1854	0.1833	0.2214	0.1944	0.1780	0.1819		0.1660
T2/6B	0.1904	0.1837	0.2359	0.1967	0.1820	0.2056	0.1876	

หมายเหตุ: ค่า k อยู่ซ้ายล่างและค่า Dxy อยู่ขวาบน

## 5. วิจารณ์ผลการทดลอง

การกระจายของ genotype ของ *Acanthamoeba* มีความแตกต่างในแต่ละภูมิภาคของโลก รวมทั้งมีความแตกต่างตามสภาวะแวดล้อมเนื่องจากโปรโตซัวใน genus นี้มีการเจริญเป็นอิสระและต้องการอาหารจากการกินแบคทีเรียที่มีในธรรมชาติ (Visvesvara and Stehr-Green 1990) ในปัจจุบันการจำแนก genotype ของ *Acanthamoeba* ยังมีความจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน nuclear small subunit ribosomal RNA ซึ่งมีการศึกษาพบว่าในส่วน diagnostic fragment 3 หรือ DF3 ซึ่งครอบคลุมประมาณ 200 bp สามารถใช้จำแนก genotype ได้ (Booton et al 2005) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวอาจไม่สามารถจำแนกบาง genotype ออกจากกันได้เนื่องจากบริเวณ DF3 มีความคล้ายคลึงระหว่างบาง genotype ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างส่วนใหญ่เกิดขึ้นในส่วนอื่นของยีน (Nuprasert et al 2010) นอกจากนี้ยีน nuclear small subunit ribosomal RNA ส่วนที่ใช้จำแนก genotype รวมทั้งบริเวณ DF3 ยังมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์แม้จะอยู่ใน genotype เดียวกัน ดังนั้นจึงเป็นอุปสรรคในการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ก่อนการสร้าง phylogenetic tree ในการจำแนก genotype

จากการสำรวจแหล่งน้ำใน 10 จังหวัดของประเทศไทยที่อยู่ในภูมิภาคต่างกันพบว่าแหล่งน้ำในทุกจังหวัดที่สำรวจสามารถตรวจพบ *Acanthamoeba* ได้ซึ่งสอดคล้องกับการสำรวจแหล่งน้ำในกรุงเทพมหานครก่อนหน้านี้ (Nuprasert et al., 2010) จากการสังเกตลักษณะ cyst ของ *Acanthamoeba* ที่เพาะเลี้ยงได้จากแหล่งน้ำ 577 ตัวอย่าง พบว่า *Acanthamoeba* ทั้ง 3 morphological groups ตามการจำแนกของ Pussard และ Pons (Pussard and Pons 1977) พบได้ทั่วไปในประเทศไทย โดยส่วนใหญ่ราวร้อยละ 67.42 จัดอยู่ใน morphological group II รองลงมาคือ morphological group III พบราวร้อยละ 7.11 ส่วน morphological group I พบน้อยที่สุดคือร้อยละ 3.47 อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่มีการตรวจพบ *Acanthamoeba* ที่มี cyst ลักษณะที่เข้าได้กับ morphological group ที่ต่างกันปะปนในตัวอย่างเดียวกันพบได้มากถึงร้อยละ 22.01 แสดงว่า *Acanthamoeba* ต่าง morphological group สามารถเจริญได้ร่วมกันในบางแหล่งน้ำที่มีคุณสมบัติเหมาะสม

ทั้งนี้ *Acanthamoeba* ใน morphological group II อาจมีการปรับตัวกับแหล่งน้ำในธรรมชาติโดยทั่วไปได้ดีกว่า *Acanthamoeba* ใน morphological group อื่น จึงสามารถตรวจพบได้ในอัตราที่มากกว่า

ในการวิเคราะห์ haplotype โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ DF3 ในยีน nuclear small subunit ribosomal RNA จากตัวอย่าง 214 ตัวอย่างที่มี morphological group เดียวและมีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบเดียวในแต่ละตัวอย่างพบว่าสามารถจำแนกเป็น 74 haplotypes โดย haplotype ส่วนใหญ่พบในตัวอย่างเดียวมากถึง 52 haplotypes ในขณะที่ haplotype ที่มีตัวอย่างมากกว่า 1 ตัวอย่างพบจำนวน 22 haplotypes ซึ่ง haplotype #LXXIV มีอัตราการพบสูงสุดโดยพบใน 25 ตัวอย่าง การพบ haplotype จำนวนมากแสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Acanthamoeba* ในธรรมชาติ การพบบาง haplotype มีจำนวนตัวอย่างมากแตกต่างกันอาจแสดงถึงความสามารถในการเจริญหรือแพร่กระจายในธรรมชาติของแต่ละ haplotype มีความแตกต่างกัน

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน nuclear small subunit ribosomal RNA ครอบคลุมเกือบตลอดทั้งยีนซึ่งมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 2 kb ถึง 2.2 kb และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบ genotype จากฐานข้อมูล Genbank database พบว่าสามารถจัดเป็น 15 genotypes ได้แก่ T2/6b, T3, T4B, T4C, T4D, T4F, T4G, T4Neff, T5, T11, T12, T13, T17, T18 และ T20 และพบว่ามี 1 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจัดอยู่ใน genotype ที่ทราบมาก่อน ดังนั้นตัวอย่างดังกล่าวจึงเป็น genotype ใหม่เรียกว่า genotype T New#1 เป็นที่น่าสังเกตว่า genotype T4F พบมากที่สุดรองลงมาคือ genotype T4B แสดงว่า genotype เหล่านี้มีการเติบโตในธรรมชาติหรือมีการแพร่กระจายตามแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยได้ดีกว่า genotype อื่น ๆ ทั้งนี้การวิเคราะห์คุณสมบัติในการเจริญในธรรมชาติจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามในการคัดเลือกบางตัวอย่างจากแต่ละ genotype เพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญในอุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่า genotype T4 ที่ได้จากผู้ป่วยทั้ง 5 รายสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 42°C ในขณะที่ genotype T2/6b, T3, T4F, T5, T11, T12, T13, T17, T18, T20 และ T New#1 ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่า genotype ที่ก่อโรคได้มักมีความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิ 37°C (Nuprasert et al 2010) ดังนั้นตัวอย่างจากแหล่งน้ำในธรรมชาติที่ทดสอบในการศึกษานี้ได้แก่ genotypes T4B, T4C, T4D และ T4G สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42°C อาจเป็นคุณลักษณะหนึ่งที่น่าจะบ่งบอกถึงศักยภาพในการก่อโรคของตัวอย่างเหล่านี้ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

ในการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนต่าง ๆ ของยีนเพื่อให้ครอบคลุมตลอด mitochondrial genome ทั้งหมดของ *Acanthamoeba* ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญและจำเป็นในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครบถ้วนทั้ง genome ของ mitochondria ในปัดไป ดังนั้นการเพาะเลี้ยง *Acanthamoeba* จาก cyst เดียวในแต่ละตัวอย่างที่จะใช้เป็นตัวแทนสำหรับแต่ละ genotype จึงมีความสำคัญ จากการออกแบบและคัดเลือก primers สำหรับการทำให้ long PCR โดยอาศัยตำแหน่งที่มีความคงที่ของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง genotype มากที่สุดทำให้ได้ผลผลิต PCR ตามต้องการซึ่งในปีแรกได้ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ดังกล่าวแบ่งเป็น 7 ส่วนได้แก่ fragments F1-F6 ซึ่งครอบคลุมตลอด genome ของ mitochondria ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ขนาดของ fragment เดียวกันในตัวอย่าง genotype ที่แตกต่างกันพบว่าความยาวของผลผลิต PCR มีความแตกต่างกันในบางตัวอย่าง แสดงว่าใน genome ดังกล่าวมีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปเป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก เช่น fragment F3 ของ genotypes T2/6b, T3, T4C และ T4D มีความยาวประมาณ 9.4 kb ในขณะที่ fragment เดียวกันของ genotype T11 มีความยาวเพียง 6 kb แสดงว่าการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปเป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเกิดขึ้นในส่วน of genome อย่างมาก ทั้งนี้การหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดทั้ง genome ดังกล่าวในปีถัดไปจะให้ข้อมูลที่สำคัญเกี่ยวกับความแตกต่างในโครงสร้างและวิวัฒนาการของ genome ดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลไก

การเกิด lateral gene transfer ซึ่งอาจมีความสำคัญในการเข้าใจคุณสมบัติในการก่อโรคของ *Acanthamoeba* ต่อไป

การศึกษานี้ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน cytochrome *b* ใน fragment F4 จากตัวอย่างทั้งหมด 65 ตัวอย่างครอบคลุมความยาว 1155 bp ซึ่งจากการสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับข้อมูลการจำแนก genotype จากยีน nuclear small subunit ribosomal RNA พบว่ามีความสอดคล้องกัน ทั้งนี้ค่า nucleotide diversity ในตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์มีค่าตั้งแต่ศูนย์ถึง 0.04246 ขึ้นกับ genotype อย่างไรก็ตามการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในตำแหน่งที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง โดยพบว่า synonymous nucleotide diversity มีค่ามากกว่า nonsynonymous nucleotide diversity ในทุก genotype ซึ่งสอดคล้องกับการที่ cytochrome *b* ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนใน mitochondria ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนอาจเป็นผลเสียต่อบทบาทหน้าที่ของ cytochrome *b* อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์นี้ แม้ว่า genotype ส่วนใหญ่ไม่พบการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมใน mitochondrial genome ซึ่งคล้ายกับ genome เดียวกันในสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไป แต่ในการศึกษานี้พบว่า genotypes T3, T4C และ T4F ตรวจพบร่องรอยของกระบวนการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่ในระหว่างการกินอาหารของ *Acanthamoeba* อาจได้รับส่วนของ mitochondrial genome จาก *Acanthamoeba* อื่นซึ่งเกิดขึ้นในบาง genotype ดังนั้น mitochondrial genome ที่ต่างกันในเซลล์เดียวกันจึงอาจเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมได้ในขณะเดียวกัน mitochondrial genome จากจุลชีพอื่น ๆ ที่ *Acanthamoeba* ใช้เป็นอาหารอาจเกิดการแลกเปลี่ยนหรือการส่งผ่านยีนในลักษณะของ lateral gene transfer เกิดขึ้น ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้ขนาดของ mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* มีความแตกต่างกันมาก

จากการวิเคราะห์โดยใช้ Tajima's *D* statistics พบว่า genotype T4B, T4C, T4F, T4Neff, T3, T11 และ T2/6B ล้วนมีค่า *D* ไม่แตกต่างจากค่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่ายีน cytochrome *b* มีวิวัฒนาการที่เป็นกลาง (selective neutrality) สอดคล้องกับยีนใน mitochondrial genome ของสิ่งมีชีวิตอื่นโดยทั่วไป อย่างไรก็ตามพบว่า genotype T4G มีค่า *D* มากกว่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในทิศทางบวกแสดงว่า genotype ดังกล่าวอาจอยู่ภายใต้กระบวนการคัดเลือกในเชิงบวก (positive selection) แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงและไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงว่า synonymous nucleotide diversity ใน genotype T4G มีค่ามากกว่า nonsynonymous nucleotide diversity ถึง 35.24 เท่าและความแตกต่างดังกล่าวมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ , z-test) ซึ่งสอดคล้องกับกระบวนการคัดเลือกในเชิงลบ (negative selection) ดังนั้นค่า Tajima's *D* ที่เป็นบวกและมีนัยสำคัญจึงอาจเป็นผลจาก population process ซึ่งอาจเกิดจาก genotype T4G ได้ผ่านภาวะคอขวดทางพันธุกรรม (population genetic bottleneck) และไม่ใช่ผลจากกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติ

## 6. สรุปผลการวิจัยจากผลงานโดยรวมตลอดโครงการ

1. ได้ทำการสำรวจแหล่งน้ำตามธรรมชาติ 40 แหล่งใน 10 จังหวัดของประเทศไทยในทุกภาค ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดลำพูนและอุดรดิตถ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิและสกลนคร ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรีและสระบุรี ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดปราจีนบุรีและระยอง ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดระนองและพัทลุง โดยเก็บตัวอย่างน้ำจำนวน 4,000 ตัวอย่าง
2. สามารถตรวจพบ *Acanthamoeba* จากแหล่งน้ำในทุกจังหวัดที่สำรวจโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีอัตราการตรวจพบคิดจากร้อยละของตัวอย่างที่สำรวจตามจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้ จังหวัดลำพูนและอุดรดิตถ์พบร้อยละ 11.25 และร้อยละ 17 ตามลำดับ จังหวัดชัยภูมิและสกลนครพบร้อยละ 17.75 และร้อยละ 16.25 ตามลำดับ จังหวัดสุพรรณบุรีและสระบุรีพบร้อยละ 13.75 และร้อยละ 11.75 ตามลำดับ จังหวัดปราจีนบุรีและระยองพบร้อยละ

- 17.25 และร้อยละ 15.25 ตามลำดับ จังหวัดระนองและพัทลุงพบร้อยละ 11.25 และร้อยละ 12.75 ตามลำดับ เฉลี่ยทุกจังหวัดที่สำรวจพบร้อยละ 14.43
3. การจำแนกลักษณะ cyst ของ *Acanthamoeba* ที่ตรวจพบจากแหล่งน้ำในธรรมชาติ พบว่าในประเทศไทยมีทุก morphological groups โดยพบ morphological group II มากที่สุดคือร้อยละ 67.42 รองลงมาคือ morphological groups III และ I ซึ่งพบร้อยละ 7.11 และ 3.47 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าร้อยละ 22.01 ของตัวอย่างที่ตรวจพบ *Acanthamoeba* ประกอบด้วย morphological groups ที่แตกต่างกันปะปนในตัวอย่างเดียวกัน
4. เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างที่มี genotype เดียวโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน diagnostic fragment 3 (DF3) ของยีน nuclear small subunit ribosomal RNA พบว่ามีความแตกต่างกันจำแนกได้เป็น 74 haplotypes โดย haplotype ส่วนใหญ่หรือร้อยละ 70.27 พบในตัวอย่างเดี่ยว แต่บาง haplotypes พบในตัวอย่างจำนวนมาก
5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน nuclear small subunit ribosomal RNA ครอบคลุมเกือบตลอดทั้งยีนความยาวประมาณ 2-2.2 kb และเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานสำหรับแต่ละ genotype พบว่าตัวอย่างจากแหล่งน้ำที่สำรวจประกอบด้วย 16 genotypes ได้แก่ genotypes T2/6b, T3, T4B, T4C, T4D, T4F, T4G, T4Neff, T5, T11, T12, T13, T17, T18, T20 และพบตัวอย่างที่เป็น genotype ใหม่คือ genotype New#1
6. ได้ผลิต PCR ที่ครอบคลุม mitochondrial genome ทั้งหมดโดยแบ่งเป็น 6 overlapping fragments ที่มีความยาว fragment ละ 4.3-9.4 kb เพื่อเตรียมเป็น DNA template สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ใน genome ทั้งหมดในการศึกษาต่อไป จากตัวอย่างทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ได้จากแหล่งน้ำที่มี genotypes T2/6b, T3, T4B, T4C, T4D, T4F, T4G, T5, T11, T12, T13, T17, T18, T20 และ genotype New#1 และตัวอย่างที่มี genotype T4 จากผู้ป่วยกระจกตาอักเสบจากการติดเชื้อ *Acanthamoeba* จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างจากผู้ป่วยทุกตัวอย่างและตัวอย่างจากแหล่งน้ำที่มี genotypes T4B, T4C, T4D และ T4G สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42°C
7. ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน cytochrome *b* ของ mitochondrial genome จาก 65 ตัวอย่างที่ทราบ genotype จากการวิเคราะห์ nuclear small subunit ribosomal RNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน cytochrome *b* สามารถจำแนก genotype ของ *Acanthamoeba* ได้สอดคล้องกับการวิเคราะห์ nuclear small subunit ribosomal RNA
8. ความหลากหลายทางพันธุกรรมในยีน cytochrome *b* ของ mitochondrial genome ของ *Acanthamoeba* ใน genotype เดียวกันมีค่าต่ำกว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง genotype มาก ดังนั้นยีน cytochrome *b* จึงมีศักยภาพในการใช้จำแนก genotype ของ *Acanthamoeba* ได้ดีทัดเทียมหรือมากกว่าการวิเคราะห์ nuclear small subunit ribosomal RNA

## 7. แผนการดำเนินงานต่อไป

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ใน mitochondrial genome ทั้งหมดจากผลผลิต long PCR ทั้ง 6 fragments จำนวน 20 สายพันธุ์และวิเคราะห์ข้อมูลในเชิง genotype assignment, lateral gene transfer และประยุกต์ข้อมูลจาก mitochondrial cytochrome *b* เพื่อการจำแนก genotype โดยวิธี PCR ที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากแต่ละตัวอย่างทำให้สามารถหาความเชื่อมโยงกับการก่อโรคและทำให้ทราบ virulence ของแต่ละ genotype ต่อไป

## บรรณานุกรม

1. Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M., and Fields, B. 1996. *Legionella*-like amebal pathogens: phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis.* 2:225-230.
2. Amann, R., Springer, N., Schonhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E. N., Mülle, K. D., and Michel, R. 1997. Obligate intracellular bacterial parasites of *Acanthamoebae* related to *Chlamydia* spp. *Appl Environ Microbiol.* 63:115-121.
3. Booton, G. C., Joslin, C. E., Shoff, M., Tu, E. Y., Kelly, D. J., and Fuerst, P. A. 2009. Genotypic identification of *Acanthamoeba* sp. isolates associated with an outbreak of acanthamoeba keratitis. *Cornea.* 28:673-676.
4. Booton, G. C., Visvesvara, G. S., Byers, T. J., Kelly, D. J., and Fuerst, P. A. 2005. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol.* 43:1689-16893
5. Burger, G., Gray, M. W., and Lang, B. F. 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.* 19:709-716.
6. Burger, G., Plante, I., Lonergan, K. M., and Gray, M. W. 1995. The mitochondrial DNA of the amoeboid protozoon, *Acanthamoeba castellanii*: complete sequence, gene content and genome organization. *J Mol Biol.* 245:522-537.
7. Clarke, D. W. and Niederkorn, J. Y., 2006. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends Parasitol.* 22:175-180.
8. Corsaro, D., and Venditti, D. 2010. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res.* 107:233-238.
9. Corsaro, D., Walochnik, J., Köhler, M., and Rott, M. B. 2015. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res.* 114:2481-2490.
10. Escalante, A. A., Freeland, D. E., Collins, W. E., and Lal, A. A. 1998. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8124-8129.
11. Essig, A., Heinemann, M., Simnacher, U., and Marre, R. 1997. Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* 63:1396-1399.
12. Fritsche, T. R., Gautom, R. K., Seyedirashti, S., Bergeron, D. L., and Lindquist, T. D. 1993. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol.* 31:1122-1126.
13. Fuerst, P. A. 2014 Insights from the DNA databases: approaches to the phylogenetic structure of *Acanthamoeba*. *Exp Parasitol.* 145: S39-S45.
14. Gast, R. J. 2001. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J Eukaryot Microbiol.* 48:609-615.
15. Hewett, M. K., Robinson, B. S., Monis, P. T., and Saint, C. P. 2003. 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* 42:325–329.
16. Horn, M., Fritsche, T. R., Gautom, R. K., Schleifer, K. H., and Wagner, M. 1999. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ Microbiol.* 1:357–367.
  17. Jones, D. B., Visvesvara, G. S., and Robinson, N. M. 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 95:221–232.
  18. Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Iwasaki, T., Ferreira, M.U., Kanbara, H., and Hughes, A. L. 2005. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol.* 22:1733-1739.
  19. Jongwutiwes, S., Pariyakanok, L., Charoenkorn, M., Yagita, K., and Endo, T. 2000. Heterogeneity in cyst morphology within isolates of *Acanthamoeba* from keratitis patients in Thailand. *Trop Med Int Health.* 5:335-40.
  20. Khan, N. A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev.* 30:564–595.
  21. Kilvington, S., Gray, T., Dart, J., Morlet, N., Beeching, J. R., Frazer, D.G., and Matheson, M. 2004. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:165–169.
  22. Köshler, M., Leitner, B., Blaschitz, M., Michel, R., Aspöck, H., and Walochnik, J. 2006. ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequence types in the genus *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebozoa). *Parasitol Res.* 98:86–93.
  23. Kosrirukvongs, P., Wanachiwanawin, D., Visvesvara, G. S. 1999. Treatment of acanthamoeba keratitis with chlorhexidine. *Ophthalmology.* 106:798-802.
  24. Krishna Prasad, B. N., and Gupta, S. K. 1978. Preliminary report on the engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of exenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas, 1930. *Curr Sci.* 47:245-247.
  25. 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. 2006. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. *Acta Trop.* 100:63-9.
  26. Magnet, A., Henriques-Gil, N., Galván-Díaz, A. L., Izquiedo, F., Fenoy, S., and del Aguila, C. 2014. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol Res.* 113:2845-2850.
  27. Maghsood, A. H., Sissons, J., Rezaian, M., Nolder, D., Warhurst, D., and Khan, N. A. 2005.



- Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. J Med Microbiol. 54:755-759.
28. Marciano-Cabral, F., and Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev. 16:273–307.
29. Martinez, A. J., and Visvesvara, G. S. 1997. Free-living amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathol. 7:583–598.
30. Michel, R., Burghardt, H., and Bergmann, H. 1995. *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. Zentbl Hyg Umweltmed. 196:532-544.
31. Nuprasert, W., Putaporntip, C., Pariyakanok, L., and Jongwutiwes, S. 2010. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. J Clin Microbiol. 48:4636-4640.
32. Page, F. C. 1967. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. J Protozool. 14:709–724.
33. Petry, F., Torzewski, M., Bohl, J., and et al. 2006. Early diagnosis of *Acanthamoeba* infection during routine cytological examination of cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 44:1903–1904.
34. Pushkarew, B. M. 1913. Über die Verbreitung der Süßwasser-Protozoen durch die Luft. Arch Protistent. 23:323–362.
35. Pussard, M., and Pons, R. 1977. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). Protistologica. 13:557-610.
36. Putaporntip, C., Buppan, P., and Jongwutiwes, S. 2011. Improved performance with saliva and urine as alternative DNA sources for malaria diagnosis by mitochondrial DNA-based PCR assays. Clin Microbiol Infect. 17:1484-1491.
37. Qvarnstrom, Y., Nerad, T. A., and Visvesvara, G. S. 2013. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. J Eukaryot Microbiol. 60:626-633.
38. Rowbotham, T. J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J Clin Pathol. 33:1179-1183.
39. Schroeder, J. M., Booton, G. C., Hay, J., Niszl, I. A., Seal, D. V., Markus, M. B., Fuerst, P. A., and Byers, T. J. 2001. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. J Clin Microbiol. 39:1903-1911.
40. Schuster, F. L., and Visvesvara, G. S. 2004a. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol. 34:1001–1027.
41. Schuster, F. L., and Visvesvara, G. S. 2004b. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. Drug Resistance Updates. 7:41–51.
42. Seal, D. V. 2003. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. Eye. 17:893–905.

43. Shirwadkar, C. G., Samant, R., Sankhe, M., Deshpande, R., Yagi, S., Schuster, F. L. , Sriram, R., and Visvesvara, G. S. 2006. *Acanthamoeba* encephalitis in patient with systemic lupus, India. *Emerg Infect Dis.* 12:984–986.
44. Stothard, D. R., Schroeder-Diedrich, J. M., Awwad, M. H., Gast, R. J., Ledee, D. R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C. L., Fuerst, P. A., and Byers, T. J. 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol.* 45:45–54.
45. Visvesvara, G. S., and Stehr-Green, J. K. 1990. Epidemiology of free-living ameba infection. *J Protozool.* 37:255–335.
46. Winiiecka-Krusnell, J., and Linder, E. 2001. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res Microbiol.* 152:613–619.

## ประวัติคณะผู้วิจัย

### ผู้วิจัยหลัก

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์  
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Somchai Jongwutiwes
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3100503095200
- ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์ ระดับ 11
- หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้  
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ  
โทรศัพท์ 02-2564761 โทรสาร 02-2525944  
e-mail: [jongwutiwes@gmail.com](mailto:jongwutiwes@gmail.com)

### 5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยม)	วิทยาศาสตร์การแพทย์	2525
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	แพทยศาสตรบัณฑิต	แพทยศาสตร์	2527
Nagasaki University	Doctor of Philosophy	Molecular Protozoology	2536

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ Medical Parasitology, Molecular Parasitology, Molecular Population Genetics

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ (5 ปีย้อนหลัง)

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: ชื่อแผนงานวิจัย “ระบาดวิทยาเชิงบูรณาการเพื่อเป็นแนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทย”

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

- ระบาดวิทยาาระดับโมเลกุลของปอดอักเสบจากเชื้อนิวโมซิสติส จีโรเว็คซี ในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสภูมิคุ้มกันบกพร่องในประเทศไทย

- การวิเคราะห์จีโนมในไมโตคอนเดรียของอะแคนธามีบาเพื่อการจำแนกจีโนไทป์ โดยวิธีใหม่ การศึกษาสายวิวัฒนาการและการวินิจฉัย

- Resurgence of malaria in Ubon Ratchathani Province after forest encroachment: a molecular population genetic analysis of malaria parasites

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

### ผลงานตีพิมพ์ (ผลงาน 5 ปีย้อนหลัง)

- Feng M, Yanagi T, Putaporntip C, Pattanawong U, Cheng X, **Jongwutiwes S**, Tachibana H. Correlation between genotypes and geographic distribution of *Entamoeba nuttalli* isolates from wild long-tailed macaques in Central Thailand. Infect Genet Evol. 2019;70:114-122.
- Buppan P, Seethamchai S, Kuamsab N, Harnyuttanakorn P, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Multiple Novel Mutations in *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter Gene

- during Implementation of Artemisinin Combination Therapy in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99:987-994.
3. Seethamchai S, Buppan P, Kuamsab N, Teeranaipong P, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Variation in intronic microsatellites and exon 2 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene during modification of artemisinin combination therapy in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2018;65:35-42.
  4. Buppan P, Seethamchai S, Kuamsab N, **Jongwutiwes S**, Putaporntip C. Episodic positive selection in the cam734 haplotype and low prevalence of the A144F mutation in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene among Thai isolates. *Trop Bio.* 2018;35:861-871.
  5. Kosuwin R, Feng M, Makiuchi T, Putaporntip C, Tachibana H, **Jongwutiwes S**. Naturally acquired IgG antibodies to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium vivax* (PvTRAP) in Thailand predominantly elicit immunological cross-reactivity. *Trop Med Int Health.* 2018;23:923-933.
  6. Feng M, Pandey K, Yanagi T, Wang T, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Cheng X, Sherchand JB, Pandey BD, Tachibana H. Prevalence and genotypic diversity of *Entamoeba* species in inhabitants in Kathmandu, Nepal. *Parasitol Res.* 2018;117:2467-2472.
  7. Cheng CW, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Polymorphism in merozoite surface protein-7E of *Plasmodium vivax* in Thailand: Natural selection related to protein secondary structure. *PLoS One.* 2018;13:e0196765.
  8. Pariyakanok L, Satitpitakul V, Laksanaphuk P, Ratanawongphaibul K, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Stromal Keratitis with Endophthalmitis Caused by *Vittaforma corneae* in an Immunocompetent Patient: A Case Report. *Ocul Immunol Inflamm.* 2018:1-3.
  9. Chitsanoor S, Somsri S, Panburana P, Mungthin M, Ubalee R, Emyeam M, **Jongwutiwes S**, Sattabongkot J, Udomsangpetch R. A novel in vitro model reveals distinctive modulatory roles of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* on naïve cell-mediated immunity. *Malar J.* 2017;16:131
  10. Shearer FM, Huang Z, Weiss DJ, Wiebe A, Gibson HS, Battle KE, Pigott DM, Brady OJ, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Lau YL, Manske M, Amato R, Elyazar IR, Vythilingam I, Bhatt S, Gething PW, Singh B, Golding N, Hay SI, Moyes CL. Estimating Geographical Variation in the Risk of Zoonotic *Plasmodium knowlesi* Infection in Countries Eliminating Malaria. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2016;10:e0004915.
  11. Putaporntip C, Kuamsab N, **Jongwutiwes S**. Sequence diversity and positive selection at the Duffy-binding protein genes of *Plasmodium knowlesi* and *P. cynomolgi*: Analysis of the complete coding sequences of Thai isolates. *Infection Genetics and Evolution.* 2016;44:367-75.
  12. Al-Qahtani AA, Abdel-Muhsin AM, Bin Dajem SM, ALSheikh AA, Bohol MF, Al-Ahdal MN, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Comparative sequence analysis of domain I of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 from Saudi Arabia and worldwide isolates. *Infection Genetics and Evolution.* 2016;39:381-8.

13. Putaporntip C, Kuamsab N, Kosuwin R, Tantiwattanasub W, Vejakama P, Sueblinvong T, Seethamchai S, **Jongwutiwes S**, Hughes AL. Natural selection of K13 mutants of *Plasmodium falciparum* in response to artemisinin combination therapies in Thailand. *Clinical Microbiology Infection*. 2016;22:285.e1-8.
14. Pariyakanok L, Satitpitakul V, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Femtosecond laser-assisted anterior lamellar keratoplasty in stromal keratitis caused by an *Endoreticulatus*-like microsporidia. *Cornea*. 2015;34:588-91.
15. Nakaviroj S, Kobasa T, Teeranaipong P, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. An autochthonous case of severe *Plasmodium knowlesi* malaria in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2015;92:569-72.
16. Putaporntip C, Miao J, Kuamsab N, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, **Jongwutiwes S**, Cui L. The *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 3 $\beta$  sequence reveals contrasting parasite populations in southern and northwestern Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8:e3336.
17. Kosuwin R, Putaporntip C, Tachibana H, **Jongwutiwes S**. Spatial variation in genetic diversity and natural selection on the thrombospondin-related adhesive protein locus of *Plasmodium vivax* (PvTRAP). *PLoS One*. 2014;9:e110463.

#### ผู้วิจัยร่วม 1

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)      ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์  
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)      Dr. Chaturong Putaporntip
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน      3240100025105
3. ตำแหน่งปัจจุบัน      รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330  
โทรศัพท์ 02-2564761 โทรสาร 02-2525944  
e-mail: [p.chaturong@gmail.com](mailto:p.chaturong@gmail.com)

#### 5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีพุทธศักราชที่จบ
มหาวิทยาลัยบูรพา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	วิทยาศาสตร์	2534
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สัตววิทยา	2538
Nagasaki University	Doctor of Philosophy	Molecular Parasitology	2546

#### 6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

Medical Parasitology, Molecular Biology, Population Genetics

#### 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

### 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

- Detection and genetic characterization of malaria in wild and domesticated nonhuman primate populations in Narathivas Province
- A study of anopheline potential vectors to human and primate malaria in western and southern Thailand
- Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax*: analysis of the genes encoding merozoite surface proteins 4 and 5 (PvMsp-4/5)
- Development of highly sensitive and specific diagnostic methods for human and primate malaria from blood samples stored in various conditions
- Population structure of *Plasmodium vivax* in Thailand based on the merozoite surface protein 1 gene
- Population genetics of anopheline primary vectors of human malaria in Thailand
- Detection of malaria among primate populations in natural habitats and some tourist attraction sites in Thailand

### 7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

#### ผลงานตีพิมพ์ (ผลงาน 5 ปีย้อนหลัง)

1. Feng M, Yanagi T, **Putaporntip C**, Pattanawong U, Cheng X, Jongwutiwes S, Tachibana H. Correlation between genotypes and geographic distribution of *Entamoeba nuttalli* isolates from wild long-tailed macaques in Central Thailand. *Infect Genet Evol.* 2019;70:114-122.
2. Buppan P, Seethamchai S, Kuamsab N, Harnyuttanakorn P, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Multiple Novel Mutations in *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter Gene during Implementation of Artemisinin Combination Therapy in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99:987-994.
3. Seethamchai S, Buppan P, Kuamsab N, Teeranaipong P, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Variation in intronic microsatellites and exon 2 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene during modification of artemisinin combination therapy in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2018;65:35-42.
4. Buppan P, Seethamchai S, Kuamsab N, Jongwutiwes S, **Putaporntip C**. Episodic positive selection in the cam734 haplotype and low prevalence of the A144F mutation in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene among Thai isolates. *Trop Bio.* 2018;35:861-871.
5. Kosuwin R, Feng M, Makiuchi T, **Putaporntip C**, Tachibana H, Jongwutiwes S. Naturally acquired IgG antibodies to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium vivax* (PvTRAP) in Thailand predominantly elicit immunological cross-reactivity. *Trop Med Int Health.* 2018;23:923-933.

6. Feng M, Pandey K, Yanagi T, Wang T, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Cheng X, Sherchand JB, Pandey BD, Tachibana H. Prevalence and genotypic diversity of *Entamoeba* species in inhabitants in Kathmandu, Nepal. *Parasitol Res.* 2018;117:2467-2472.
7. Cheng CW, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Polymorphism in merozoite surface protein-7E of *Plasmodium vivax* in Thailand: Natural selection related to protein secondary structure. *PLoS One.* 2018;13:e0196765.
8. Pariyakanok L, Satitpitakul V, Laksanaphuk P, Ratanawongphaibul K, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Stromal Keratitis with Endophthalmitis Caused by *Vittaforma corneae* in an Immunocompetent Patient: A Case Report. *Ocul Immunol Inflamm.* 2018:1-3.
9. Tangchaikereee T, Sawaisorn P, Somsri S, Polpanich D, **Putaporntip C**, Tangboriboonrat P, Udomsangpetch R, Jangpatarapongsa K. Enhanced Sensitivity for Detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes by magnetic nanoparticles combined with enzyme substrate system. *Talanta.* 2017;164:645-650.
10. Shearer FM, Huang Z, Weiss DJ, Wiebe A, Gibson HS, Battle KE, Pigott DM, Brady OJ, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Lau YL, Manske M, Amato R, Elyazar IR, Vythilingam I, Bhatt S, Gething PW, Singh B, Golding N, Hay SI, Moyes CL. Estimating Geographical Variation in the Risk of Zoonotic *Plasmodium knowlesi* Infection in Countries Eliminating Malaria. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2016;10:e0004915.
11. **Putaporntip C**, Kuamsab N, Jongwutiwes S. Sequence diversity and positive selection at the Duffy-binding protein genes of *Plasmodium knowlesi* and *P. cynomolgi*: Analysis of the complete coding sequences of Thai isolates. *Infection Genetics and Evolution.* 2016;44:367-75.
12. Al-Qahtani AA, Abdel-Muhsin AM, Bin Dajem SM, ALSheikh AA, Bohol MF, Al-Ahdal MN, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Comparative sequence analysis of domain I of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 from Saudi Arabia and worldwide isolates. *Infection Genetics and Evolution.* 2016;39:381-8.
13. **Putaporntip C**, Kuamsab N, Kosuwin R, Tantiwattanasub W, Vejakama P, Sueblinvong T, Seethamchai S, Jongwutiwes S, Hughes AL. Natural selection of K13 mutants of *Plasmodium falciparum* in response to artemisinin combination therapies in Thailand. *Clinical Microbiology Infection.* 2016;22:285.e1-8.
14. Pariyakanok L, Satitpitakul V, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Femtosecond laser-assisted anterior lamellar keratoplasty in stromal keratitis caused by an *Endoreticulatus*-like microsporidia. *Cornea.* 2015;34:588-91.
15. Nakaviroj S, Kobasa T, Teeranaipong P, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. An autochthonous case of severe *Plasmodium knowlesi* malaria in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2015;92:569-72.
16. **Putaporntip C**, Miao J, Kuamsab N, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Jongwutiwes S, Cui L. The *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 3 $\beta$  sequence reveals contrasting parasite populations in southern and northwestern Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2014;8:e3336.

17. Kosuwin R, **Putaporntip C**, Tachibana H, Jongwutiwes S. Spatial variation in genetic diversity and natural selection on the thrombospondin-related adhesive protein locus of *Plasmodium vivax* (PvTRAP). PLoS One. 2014;9:e110463.

### ผู้วิจัยร่วม 2

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายแพทย์ ดร. ไพโรจน์ ธีรนัยพงศ์  
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Phairote Teeranaipong
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3189900151716
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ A5
4. หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330  
โทรศัพท์ 02-2564761 โทรสาร 02-2525944  
e-mail: [phairote1@gmail.com](mailto:phairote1@gmail.com)

### 5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับสอง)	แพทยศาสตร์	2546
University of Tokyo	Master of Science	Human Genetics	2551
University of Tokyo	Doctor of Philosophy	Infectious Diseases	2554
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	Thai Board of Internal Medicine	อายุรศาสตร์	2557

### 6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

Molecular Biology, Population Genetics, Internal Medicine

### 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

#### 7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

1. Seethamchai S, Buppan P, Kuamsab N, **Teeranaipong P**, Putaporntip C, Jongwutiwes S. Variation in intronic microsatellites and exon 2 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene during modification of artemisinin combination therapy in Thailand. Infect Genet Evol. 2018;65:35-42.
2. **Teeranaipong P**, Sirivichayakul S, Mekprasan S, Ohata PJ, Avihingsanon A, Ruxrungtham K, Putharoen O. Role of Rilpivirine and Etravirine in Efavirenz and Nevirapine-Based Regimens Failure in a Resource-Limited Country: A Cross- Sectional Study. PLoS One. 2016;11:e0154221.
3. Nakaviroj S, Kobasa T, **Teeranaipong P**, Putaporntip C, Jongwutiwes S. An autochthonous case of severe *Plasmodium knowlesi* malaria in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2015;92:569-72.
4. **Teeranaipong P**, Sirivichayakul S, Mekprasan S, Ruxrungtham K, Putharoen O. Rilpivirine versus etravirine validity in NNRTI-based treatment failure in Thailand. J Int AIDS Soc. 2014;17:19740.



### ผู้วิจัยร่วม 3

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวอุรัสยา พัฒนวงศ์  
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Urassaya Pattanawong
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3709900367624
- ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ
- หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330  
โทรศัพท์ 02-2564761 โทรสาร 02-2525944  
e-mail: purassaya@hotmail.com

### 5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่จบ
สถาบันราชภัฏสวนสุนันทา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	คอมพิวเตอร์	2540
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ปรสิตวิทยาทางการแพทย์	2545

### 6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

Medical Parasitology , Molecular Biology, Immunoparasitology

### 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

#### 7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

- Feng M, Yanagi T, Putaporntip C, **Pattanawong U**, Cheng X, Jongwutiwes S, Tachibana H. Correlation between genotypes and geographic distribution of *Entamoeba nuttalli* isolates from wild long-tailed macaques in Central Thailand. *Infect Genet Evol.* 2019;70:114-122.
- Ungcharoensuk C, Putaporntip C, **Pattanawong U**, Jongwutiwes S. Sequence conservation in the *Ancylostoma* secreted protein-2 of *Necator americanus* (Na-ASP-2) from hookworm infected individuals in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2012;12:1926-32.
- Kuamsab N, Putaporntip C, **Pattanawong U**, Jongwutiwes S. Simultaneous detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocytes in clinical isolates by multiplex-nested RT-PCR. *Malar J.* 2012;11:190.