

การตรวจทางอณูชีววิทยาของเชื้อลิซมาเนียและทริพาโนโซมในจิ้งจกจากแหล่งระบาดของโรค
ลิซมาเนียในภาคใต้ของประเทศไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR DETECTION OF *LEISHMANIA* SPP. AND *TRYPANOSOMA* SPP. IN GECKOS
(REPTILIA: GEKKONIDAE) COLLECTED FROM ENDEMIC AREA OF LEISHMANIASIS,
SOUTHERN THAILAND



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

Department of Parasitology

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจทางอณูชีววิทยาของเชื้อลิวมาเนียและทริพาโนโซมในจิ้งจกจากแหล่งระบาดของโรคลิวมาเนียในภาคใต้ของประเทศไทย
โดย	น.ส.ประพิมพ์พร ตุ่นทอง
สาขาวิชา	ปรสตีวิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์เผด็จ สิริยะเสถียร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. นายแพทย์กนก พฤฒิวัดัญญู

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงกัญญรัตน์ กรัยวิเชียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์เผด็จ สิริยะเสถียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. นายแพทย์กนก พฤฒิวัดัญญู)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ พันเอก ดร. นายแพทย์มชาติรุท มุ่งถิ่น)

ประพิมพ์พร ตุ่นทอง : การตรวจทางอณูชีววิทยาของเชื้อลิชมาเนียและทริพาโนโซมใน
จิ้งจกจากแหล่งระบาดของโรคลิชมาเนียในภาคใต้ของประเทศไทย. (MOLECULAR
DETECTION OF *LEISHMANIA* SPP. AND *TRYPANOSOMA* SPP. IN GECKOS
(REPTILIA: GEKKONIDAE) COLLECTED FROM ENDEMIC AREA OF
LEISHMANIASIS, SOUTHERN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร.นพ.เผด็จ สิริยะ
เสถียร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร. นพ.กนก พงศ์วิทย์

จิ้งจกเป็นสัตว์เลื้อยคลานขนาดเล็กที่จัดอยู่ในสกุล *Hemidactylus* สามารถพบได้ในที่อยู่อาศัยของมนุษย์ ได้มีการรายงานว่าจิ้งจกสามารถเป็นแหล่งกักเก็บโรคได้ เช่น แบคทีเรีย และโปรโตซัว สำหรับในประเทศไทยเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. มีการติดต่อสู่คนและสัตว์โดยการกัดของริ้นฝอยทรายเพชเมีย อย่างไรก็ตามข้อมูลในสัตว์ที่เป็นแหล่งกักเก็บโรคของเชื้อโปรโตซัวดังกล่าวในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อ *Leishmania* และ *Trypanosoma* DNA ในจิ้งจกที่เก็บจากบ้านของผู้ป่วย leishmaniasis ในภาคใต้ของประเทศไทย จากตัวอย่างจำนวน 57 ตัวอย่างซึ่งได้จากจิ้งจกทั้งหมด 19 ตัว ประกอบด้วยตัว ไม้ม และหัวใจ ตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมาใช้ในการตรวจหา DNA ของเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จากตำแหน่งยีน *ITS1* และ *SSU rRNA* ตามลำดับ โดยผลการทดลองพบว่า มี 15 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* spp. ประกอบไปด้วย ตัว 4 ตัวอย่าง ไม้ม 5 ตัวอย่าง และหัวใจ 6 ตัวอย่างจากตัวอย่างจิ้งจกทั้งหมด 9 ตัว แต่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *Leishmania* spp. ในการศึกษาครั้งนี้ จากผลแผนภูมิวิวัฒนาการที่ตำแหน่งยีน *ITS1* แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Trypanosoma* spp. จัดอยู่ใน An04/Frog1 ของกลุ่ม Anura clade และผลแผนภูมิวิวัฒนาการของจิ้งจกที่ตำแหน่งยีน *cytb* แสดงให้เห็นว่าจิ้งจกทั้งหมดในการศึกษานี้มีความเหมือนกับจิ้งจกสายพันธุ์ *Hemidactylus platyurus* ที่จัดอยู่ในกลุ่ม tropical asian clade โดยการศึกษานี้เป็นการศึกษาตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในจิ้งจกเป็นครั้งแรก ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าจิ้งจกอาจมีศักยภาพเป็นแหล่งกักเก็บโรคของเชื้อ *Trypanosoma* spp. นอกจากนี้การศึกษานี้ยังเป็นประโยชน์ในการป้องกันและควบคุมโรค Trypanosomiasis ในประเทศไทยได้

สาขาวิชา ประสิทธิวิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6074071430 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORD: Geckos Trypanosoma spp. Leishmania spp. Hemidactylus platyurus

Prapimporn Toontong : MOLECULAR DETECTION OF *LEISHMANIA* SPP. AND *TRYPANOSOMA* SPP. IN GECKOS (REPTILIA: GEKKONIDAE) COLLECTED FROM ENDEMIC AREA OF LEISHMANIASIS, SOUTHERN THAILAND . Advisor: Prof. PADET SIRIYASATIEN, M.D.,Ph.D. Co-advisor: Kanok Preativatanyou, M.D.,Ph.D.

Geckos are small reptile belonging to the *Hemidactylus* genus, which was found in human habitats. Some reports have been revealed that geckos can act as reservoirs hosts such as bacteria and protozoa parasite. In Thailand, *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. are transmitted to human and animal by biting of the infected female sand fly. However, data on animal reservoir of these protozoa parasites in Thailand is still limited. In the present study, we aim to detect the presence of *Leishmania* and *Trypanosoma* DNA in geckos collected from leishmaniasis patient's home in southern, Thailand. A total of 57 samples were collected from 19 geckos, which consisted of liver, spleen and heart. All samples were used for detecting *Leishmania* and *Trypanosoma* DNA by using Polymerase Chain Reaction (PCR) specific to the *ITS1* and *SSU rRNA* gene region, respectively. The results showed that 15 samples were detected for *Trypanosoma* spp. (4 livers, 5 spleens, and 6 hearts) in 9 geckos whereas *Leishmania* spp. was not detected in this study. The phylogenetic tree based of *SSU rRNA* gene sequence showed *Trypanosoma* spp. are grouped into An04/Frog1 of Anura clade. Moreover, the phylogenetic tree of geckos based on *cytb* gene sequence demonstrated that all geckos in this study were identified as *Hemidactylus platyurus* into tropical asian clade (clade1). This study is the first report of *Trypanosoma* spp. detected in geckos from Thailand. The information obtained from this study indicate that geckos might be potential animal reservoir host of *Trypanosoma* parasite. In addition, our study could be helpful to further investigate of prevention and control of the Trypanosomiasis in Thailand.

Field of Study: Medical Parasitology

Student's Signature

Academic Year: 2019

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณา ความช่วยเหลือ และความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร หัวหน้าภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร. นพ. กนก พฤตวิทย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมเป็นอย่างยิ่ง ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางในการแก้ปัญหาต่างๆในการทำวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนแล้วเสร็จ

ขอขอบพระคุณ รศ. พญ. กัญญรัตน์ กรัยวิเชียร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ศ. พ.อ. ดร. นพ. มติรุท มุ่งถิ่น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่มีความกรุณาสละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์นี้ และกรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้อย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ระดับบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ด้านวิชาการตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิต คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการจัดอุปกรณ์ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยเป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลา และคุณรุ่งฟ้า บุญเสริม ที่ยินดีช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างของจิ้งจกสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช (เลขที่ทุน RA63/029) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณสกล สุนันทราภรณ์ ที่คอยแนะนำเทคนิคและช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆรวมถึงคำปรึกษาตลอดการทำงานวิจัย และขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆร่วมห้องปฏิบัติการหน่วยกีฏวิทยา ภาควิชาปรสิต คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิจัยและเป็นกำลังใจตลอดมา

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะแล้วเสร็จไม่ได้หากไม่ได้กำลังใจ และการสนับสนุน จากบิดามารดา ญาติพี่น้อง และเพื่อนๆทุกคน คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จของงานวิจัยนี้

ประพิมพร ตุ่นทอง

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่1	1
บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.3 สมมติฐานของการวิจัย (Hypothesis)	3
1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	3
1.5 กรอบแนวความคิดงานวิจัย	4
1.6 คำสำคัญ.....	4
1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	5
1.8 ประโยชน์ที่ได้รับ	5
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	6
2.1 <i>Trypanosoma</i> spp.....	6
2.1.1 <i>Trypanosoma brucei</i> (<i>T. brucei</i>).....	7
2.1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	12

2.2 <i>Leishmania</i> spp.	17
2.3 <i>Hemidactylus</i> spp.	24
บทที่ 3.....	27
วิธีการทดลอง.....	27
3.1 รูปแบบการวิจัย.....	27
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	27
3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	28
3.4 วิธีการทดลอง.....	29
3.4.1 การเก็บตัวอย่าง.....	29
3.4.2 การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological identification).....	29
3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction).....	30
3.4.4 การวัดค่าความดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณและประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอ.....	31
3.4.5 การตรวจหาเชื้อ <i>Trypanosoma</i> และ <i>Leishmania</i> จากตัวอย่างจิ้งจกด้วยเทคนิคอนุ ชีววิทยา.....	31
3.4.5.1 การตรวจเชื้อ <i>Trypanosoma</i> spp.....	31
3.4.5.2 การตรวจเชื้อ <i>Leishmania</i> spp.....	33
3.4.6 การวิเคราะห์ PCR product โดย Agarose gel electrophoresis.....	35
3.4.7 การโคลนนิ่งยีนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	36
3.4.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Sequencing).....	38
3.4.9 การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree).....	39
บทที่4.....	40
ผลการทดลอง.....	40
4.1 จำนวนตัวอย่างและพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างจิ้งจก.....	40
4.8 ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Leishmania</i> spp. และ <i>Trypanosoma</i> spp.	47

4.9 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>Trypanosoma</i> spp. ใน DNA จากอวัยวะต่างๆ ของจิ้งจก.....	51
4.10 ผลการขึ้นทะเบียนขอหมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>SSU rRNA</i> ของเชื้อ <i>Trypanosoma</i> spp.	53
4.11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>SSU rRNA</i> ของเชื้อ <i>Trypanosoma</i> กับ ฐานข้อมูล Genbank	54
4.12 ผลการวิเคราะห์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์.....	55
4.13 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree).....	57
บทที่ 5.....	59
สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	59
บรรณานุกรม.....	2
ประวัติผู้เขียน.....	9



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ตารางการตรวจพบเชื้อหนอนพยาธิในจิ้งจก (<i>Hemidactylus frenatus</i>).....	26
ตารางที่ 2	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน <i>SSU rRNA</i>	32
ตารางที่ 3	ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>SSU rRNA</i> ..	32
ตารางที่ 4	แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>SSU rRNA</i> ..	32
ตารางที่ 5	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน <i>ITS1</i>	33
ตารางที่ 6	ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>ITS1</i>	33
ตารางที่ 7	แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>ITS1</i>	34
ตารางที่ 8	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน <i>Cytb</i>	34
ตารางที่ 9	ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>Cytb</i>	35
ตารางที่ 10	แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>Cytb</i>	35
ตารางที่ 11	แสดงส่วนประกอบและสัดส่วนของสารที่ใช้ในขั้นตอน DNA ligation	36
ตารางที่ 12	ตารางแสดงข้อมูลรหัสตัวอย่างและจำนวนจิ้งจกที่เก็บในจังหวัดสงขลา.....	40
ตารางที่ 13	แสดงผลการขึ้นทะเบียนขอหมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>Cytb</i> ของจิ้งจก.....	44
ตารางที่ 14	แสดงผลการจำแนกชนิดของจิ้งจกที่เก็บจากจังหวัดสงขลา.....	45
ตารางที่ 15	สรุปผลการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ เชื้อ <i>Leishmania spp.</i> และ <i>Trypanosoma spp.</i>	47
ตารางที่ 16	สรุปผลการตรวจเชื้อ <i>Leishmania spp.</i> และ <i>Trypanosoma spp.</i> ด้วยวิธี PCR..	49
ตารางที่ 17	ผลการตรวจเชื้อ <i>Leishmania spp.</i> และ <i>Trypanosoma spp.</i> ด้วยวิธี PCR จาก อวัยวะต่าง ๆ ในจิ้งจกแต่ละตัว	50
ตารางที่ 18	แสดงผลการขึ้นทะเบียนขอหมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>SSU rRNA</i> ของเชื้อ <i>Trypanosoma spp.</i>	53
ตารางที่ 19	ผลแสดงการเปรียบเทียบเชื้อ <i>Trypanosoma spp.</i> กับฐานข้อมูล Genebank	55
ตารางที่ 20	แสดงตัวอย่าง % Intraspecific variation ของเชื้อ <i>Trypanosoma spp.</i> จากการทำ Sequence identity matrix.....	56

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 <i>T. brucei</i> ระยะ trypomastigote ใน Blood smear ย้อมสี Giemsa.....	7
รูปที่ 2 วงจรชีวิตของ ของโรค Human African Trypanosomiasis.....	10
รูปที่ 3 <i>T. cruzi</i> ระยะ trypomastigote ใน Blood smear (รูปซ้าย) และ ใน CSF (รูปขวา) ย้อมสี Giemsa	12
รูปที่ 4 การกระจายของเชื้อ <i>T. cruzi</i> ในทวีปอเมริกาไปยังประเทศอื่น ๆ.....	13
รูปที่ 5 <i>T. cruzi</i> ระยะ trypomastigote ใน Blood smear (รูปซ้าย) และ ระยะ epimastigote ที่ได้มาจากการ Culture (รูปขวา) ย้อมสี Giemsa.....	14
รูปที่ 6 วงจรชีวิตของ ของโรค American tripanosomiasis	15
รูปที่ 7 <i>T. cruzi</i> ระยะ amastigotes ใน heart tissue ย้อมด้วยสี hematoxylin and eosin (H&E)	16
รูปที่ 8 <i>Leishmania</i> spp. ระยะ amastigote ย้อมสี Giemsa.....	19
รูปที่ 9 การพบเชื้อ <i>Leishmania</i> spp. ในประเทศไทย (Leelayoova; 2017)	20
รูปที่ 10 <i>Leishmania</i> spp. ระยะ Promastigote ที่ได้มาจากการ Culture (รูปซ้าย) และ ระยะ Amastigote ใน tissue scraping (การขูดเนื้อเยื่อ) (รูปขวา) ย้อมสี Giemsa	20
รูปที่ 11 วงจรชีวิตของ ของโรค leishmaniasis	21
รูปที่ 12 รูปร่างลักษณะของจิ้งจก	25
รูปที่ 13 แสดงการย้อมสี H&E ของชิ้นเนื้อตับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100X	41
รูปที่ 14 แสดงผลการจำแนกชนิดของจิ้งจกด้วยยีน <i>Cytb</i> ด้วยวิธี 1.5% agarose gel.....	42
รูปที่ 15 แสดงผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>Cytb</i> ของจิ้งจก..	43
รูปที่ 16 แสดง Phylogenetic tree เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของจิ้งจก จากยีน <i>Cytb</i>	46
รูปที่ 17 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ <i>Trypanosoma</i> spp. ใน DNA ของหัวใจจิ้งจกบนตำแหน่งยีน <i>SSU rRNA</i> ด้วย 1.5% agarose gel.....	48
รูปที่ 18 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ <i>Trypanosoma</i> spp. ใน DNA ของตับจิ้งจกบนตำแหน่งยีน <i>SSU rRNA</i> ด้วยด้วย 1.5% agarose gel.....	48

รูปที่ 19 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma* spp. ใน DNA ของม้ามจิ้งจกบนตำแหน่งยีน *SSU rRNA* ด้วยด้วย 1.5% agarose gel 49

รูปที่ 20 แสดงผลจาก sequencing ในรูปของกราฟ chromatogram ของยีน *SSU rRNA* *Trypanosoma* spp. 51

รูปที่ 21 แสดงผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *SSU rRNA* ของ *Trypanosoma* spp. ที่ตรวจพบในจิ้งจก 52

รูปที่ 22 แสดง Phylogenetic tree เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของ *Trypanosoma* spp. จากยีน *SSU rRNA* จากการใช้ Maximum likelihood method แบบ Kimura-2-parameter model โดย กำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ..... 58





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

จิ้งจก (Geckos) เป็นสัตว์เลื้อยคลาน ที่อยู่ในสกุล (Genus) *Hemidactylus* เป็นสัตว์เลื้อยคลานที่มนุษย์รู้จักเป็นอย่างดี สามารถพบเห็นได้ทั่วไปแม้กระทั่งในบ้านเรือน และพบได้ทั่วไปในภูมิภาคที่อบอุ่นทั่วโลก ยกเว้นขั้วโลก ซึ่งจิ้งจกเป็นที่รู้จักกันแพร่หลายว่าเป็นแหล่งสำคัญของเชื้อโรค เพราะจิ้งจกกับมนุษย์มีความสัมพันธ์กันจนกล่าวได้ว่าจิ้งจกเป็นพาหะนำเชื้อโรคมานุษย์ได้ ซึ่งทำให้เกิดโรคที่มีความสำคัญต่อสุขภาพของคนและมีการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมส่งผลให้มีการแพร่กระจายของโรคเกิดขึ้น และจิ้งจกยังสามารถถ่ายทอดเชื้อโรคจากรุ่นสู่รุ่นทำให้จิ้งจกกลายเป็นแหล่งที่สำคัญในการกักเก็บเชื้อโรค (Reservoir host) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคจากสัตว์สู่คน (Zoonosis) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า จิ้งจกอาจเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อปรสิตที่มีความสำคัญทางการแพทย์หลายชนิด เช่น ตัวไร หนองลิ้น (tongue worm) พยาธิตัวดีด พยาธิใบไม้ พยาธิตัวกลม และเชื้อ *Leishmania* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการนำโรคจากสัตว์มาสู่คนได้ (1)

Trypanosoma spp. เป็นสาเหตุของการเกิดโรคทริพาโนโซมในคน (Trypanosomiasis) เป็นหนึ่งของโรคเขตร้อนที่ถูกละเลย ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้อีก 2 โรค โดยแบ่งตามสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุและแหล่งที่พบ คือ 1. *T. cruzi* ก่อโรค American trypanosomiasis หรือ Chagas disease โดยอาศัยแมลงตัวมวนดูดเลือด (Triatomine หรือ kissing bug) เป็นพาหะ (Vector) 2. *T. brucei* ก่อโรค African sleeping sickness หรือเรียกว่า โรคเหงาหลับ ซึ่งพาหะของโรคคือ แมลง tsetse fly (ชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Glossina palpalis*) อย่างไรก็ตามทั้ง 2 โรคที่กล่าวมาไม่มีการรายงานพบในประเทศไทย เชื้อ *Trypanosoma* spp. มีแหล่งรังโรคที่สำคัญในสัตว์หลายชนิด เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก ปลา หนู แกะ วัว กระต่าย สัตว์เลื้อยคลาน กบ และงู (2-6) แต่เมื่อปี พ.ศ. 2549 ได้มีรายงานการพบเชื้อ *T. lewisi* ในผู้ป่วยเป็นครั้งแรก และต่อมาในปีพ.ศ. 2550 มีรายงานการพบเชื้อ *T. lewisi-like* (Herpetosoma) อีกครั้งในจังหวัดลำปาง

Leishmania spp. เป็นสาเหตุของการเกิดโรคลิชมาเนีย (Leishmaniasis) โดยอาศัยริ้นฝอยทราย (Sand fly) เป็นพาหะ ซึ่งโรคนี้จะแบ่งเป็นกลุ่มตามอาการทางคลินิกของโรคได้ 3 ประเภท คือ 1. ประเภทที่ก่อให้เกิดแผลที่ผิวหนัง (Cutaneous leishmaniasis) 2. ประเภทที่ก่อให้เกิดแผลที่เยื่อบุผิว (Mucocutaneous leishmaniasis) 3. ประเภทที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพอวัยวะภายใน (Visceral leishmaniasis) (7) สัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อ *Leishmania* นั้นมีการรายงานไว้ว่า

เป็นสัตว์จำพวกสุนัข แมว วัว แพะ ม้า รวมถึงหนู (8-13) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *L. orientalis* (14), *L. martiniquensis* (15) และ *L. donovani complex* (16) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค visceral และ cutaneous leishmaniasis มีจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อภายในประเทศสะสมตั้งแต่ปี 1996 จนถึงปัจจุบัน จำนวนประมาณ 20 ราย โดยมีแหล่งระบาดอยู่ที่ภาคใต้ของประเทศไทย (17)

จากข้อมูลทีกล่าวมาข้างต้นนี้เองทำให้ทุกคนมองข้ามที่จะกำจัดและควบคุมดูแลหรือเฝ้าระวังพวกสัตว์ที่เป็น reservoir host เฝ้าคอยแต่กำจัดและระมัดระวังสัตว์ที่เป็นพาหะแต่กลับหลงลืมไปว่าพวกสัตว์ที่เป็น reservoir host นั้นก็เป็นต้นเหตุของการเกิดโรคได้เช่นกัน ยกตัวอย่าง จิ้งจกเป็นสัตว์ที่พบอยู่ตามทุกครัวเรือนเป็นส่วนใหญ่ทำให้คนมีส่วนเข้าไปอยู่ในพื้นที่ที่มีสัตว์ที่เป็น reservoir host ซึ่งมีเชื้อมากมายที่พบได้ในจิ้งจกจึงปัจจัยหนึ่งที่ทำให้คนเสี่ยงต่อการติดเชื้อ

การตรวจจำแนกเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. ที่กล่าวมานั้นนิยมใช้ในปัจจุบันจะอาศัย 2 วิธีหลักคือ 1.การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological identification) โดยดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ และ 2.การจำแนกโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) โดยใช้การตรวจหาการตรวจวิเคราะห์ทางสารพันธุกรรมของเชื้อ (Genetic detection) ที่ใช้กันกันโดยทั่วไป คือ Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification อย่างไรก็ตาม การจำแนกเชื้อลิซมาเนียโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ ในการศึกษาจึงต้องใช้วิธีทางอณูชีววิทยา โดยศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบในนิวเคลียส (Nuclear DNA) และในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria DNA) (18) ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้วิธีการจำแนกโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยาเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และจำแนกสายพันธุ์ทั้งของจิ้งจกและเชื้อ *Trypanosoma* spp. , *Leishmania* spp. ที่อาศัยอยู่ในจิ้งจก ซึ่งการตรวจสายพันธุ์ของจิ้งจกจะใช้ Cytochrome b gene (*cyt B*) (1, 19) และการตรวจสายพันธุ์ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. , *Leishmania* spp. จะใช้ Internal transcribed spacer 1 (*ITS1*) และ Small subunit ribosomal RNA (*SSU rRNA*) gene อาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) (20) จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากอวัยวะของจิ้งจกที่เก็บจากบ้านของคนไข้ที่ติดเชื้อ *Leishmania* spp. ทางภาคใต้ของประเทศไทยและเคยมีการรายงานตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในหนูที่เก็บจากบ้านของคนไข้รายนี้ซึ่งหนูจัดเป็น reservoir host (21) และนอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. ในรีนฝอยทรายซึ่งเป็น Vector ของเชื้อทั้งสองชนิด (22) งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจตรวจหาเชื้อในจิ้งจกที่อาศัยอยู่ในบ้านคนไข้ เนื่องจากเคยมีการรายงานตรวจพบเชื้อทั้งสองชนิดนี้ในสัตว์เลี้ยงคลานชนิดอื่น แล้วนำมาวิเคราะห์ผลความหลากหลาย

ทางพันธุกรรมด้วยแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการป้องกันและควบคุมโรคและยังใช้เป็นฐานข้อมูลทางอณูชีววิทยาในงานวิจัยอื่นต่อไป

1.2 คำถามงานวิจัย (Research Questions)

1.2.1 สามารถตรวจพบเชื้อ *Leishmania* spp. และเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในจิ้งจกได้หรือไม่

1.2.2 ตำแหน่งยีน *ITS1* และ *SSU* rRNA มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Leishmania* spp. และเชื้อ *Trypanosoma* spp. หรือไม่

1.2.3 ยีน *Cytb* สามารถใช้แยกชนิดของจิ้งจกได้หรือไม่

1.3 สมมติฐานของการวิจัย (Hypothesis)

1.3.1 สามารถตรวจหาและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Leishmania* spp. และเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในจิ้งจก โดยอาศัยความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง *ITS1* และ *SSU* rRNA

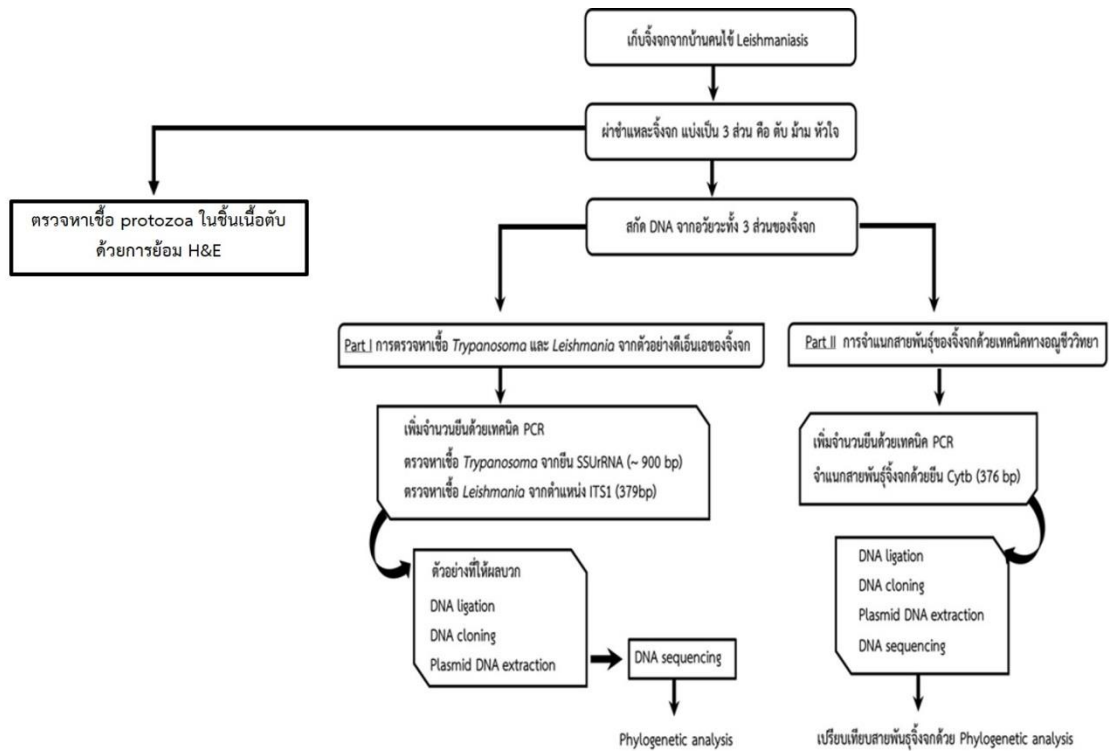
1.3.2 สามารถจำแนกชนิดของจิ้งจก โดยอาศัยความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytb*

1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.4.1. เพื่อตรวจหาและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Leishmania* spp. และเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในจิ้งจก ที่เก็บจากแหล่งระบาดของโรคพิษมาเนียในภาคใต้ของประเทศไทย

1.4.2. เพื่อจำแนกชนิดและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของจิ้งจก ที่เก็บจากแหล่งระบาดของโรคพิษมาเนียในภาคใต้ของประเทศไทย

1.5 กรอบแนวความคิดงานวิจัย



1.6 คำสำคัญ

Leishmania spp.

Trypanosoma spp.

Internal transcribed spacer (*ITS1*)

Small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA)

Cytochrome b (*Cytb*)

Phylogenetic tree

1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

1.7.1 *Leishmania* spp. คือ pathogenic flagellated protozoa ดำรงชีวิตอยู่ได้ด้วยการเป็นปรสิตของคนและสัตว์โดยที่อาศัยอยู่ในเซลล์ของโฮสต์เท่านั้น เป็นสาเหตุของการเกิดโรค leishmaniasis โดยจะมีการติดต่อผ่านการกัดของแมลงริ้นฝอยทราย (Sand fly)

1.7.2 *Trypanosoma* spp. คือ ปรสิตที่อาศัยอยู่ในเลือดของคนหรือสัตว์ซึ่งมีความสำคัญต่อการเกิดโรค Trypanosomiasis โดยโรคนี้จะแบ่งย่อยได้ 2 โรค มีจะแบ่งตามสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุและแหล่งที่พบ ทั้ง 2 โรคนี้ยังไม่พบในไทย

1.7.3 Internal transcribed spacer (*ITS1*) เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบระหว่าง 18s และ 5.8s rRNA gene นิยมใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

1.7.4 Cytochrome b (*cyt b*) เป็นยีนที่พบใน mitochondria DNA ทำหน้าที่เป็นส่วนหนึ่งในขั้นตอน electron transcription นิยมใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

1.7.5 Phylogenetic tree เป็นการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต โดยใช้ข้อมูลทางความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งความรู้เหล่านี้มีประโยชน์สำหรับการรักษาโรคทางพันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์เพื่อให้พืชหรือสัตว์มีถิ่นในแบบที่เราต้องการได้

1.8 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.8.1 สามารถอธิบายความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. เพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อที่สามารถตรวจพบในจิ้งจกได้

1.8.2 สามารถอธิบายความหลากหลายทางพันธุกรรมของจิ้งจกที่ตรวจพบเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. เพื่อการควบคุมโรคและพัฒนาการรักษาโรคต่อไป

1.8.3 สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. ที่พบในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยเพื่อใช้ประโยชน์ในการทำงานวิจัยอื่นต่อไป

บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร

2.1 *Trypanosoma* spp.

Trypanosoma spp. เป็นโปรโตซัวที่อยู่ในกระแสเลือดซึ่งจัดอยู่ใน

อาณาจักร (Kingdom) : *Protozoa*

ไฟลัม (Phylum) : *Euglenozoa*

ชั้น (Class) : *Kinetoplastea*

อันดับ (Order) : *Trypanosomatida*

วงศ์ (Family) : *Trypanosomatidae*

สกุล (Genus) : *Trypanosoma*

Trypanosomes เป็นโปรโตซัวที่อาศัยอยู่ในกระแสเลือดที่มีการอธิบายถึง species และ subspecies ของ Trypanosomes จำนวนมาก Trypanosomes ชนิดต่าง ๆ สามารถติดต่อกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง หลายชนิดรวมถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมนุษย์ส่วนใหญ่จะติดต่อโดยแมลงเป็นพาหะ ในทวีปแอฟริกา เชื้อ *Trypanosoma* spp. และ subspecies มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างมากเพราะเชื่อก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ซึ่งเป็นอุปสรรคในการดำเนินชีวิตของมนุษย์ส่งผลต่อการเลี้ยงโคและการพัฒนาการเกษตร

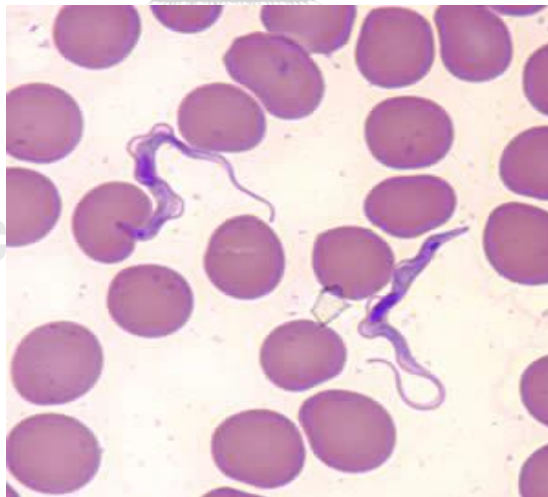
โรค Trypanosomiasis ในประเทศไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ไม่ได้อยู่ในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรค trypanosomiasis ในมนุษย์ แต่มีรายงานการเกิดโรค Trypanosomiasis ในสัตว์มาเป็นเวลานาน ซึ่งเป็นปัญหาต่อปศุสัตว์ และเศรษฐกิจของประเทศ จากงานวิจัยของ Marc Desquesnes ในปี 2013 มีการพบเชื้อ *T. evansi* ที่ส่งผลกระทบต่อปศุสัตว์ และสัตว์เลี้ยงของประเทศไทย เช่น ม้า วัว ควาย และสุนัข โดยพบว่าสัตว์เหล่านี้จะมีไข้ เกิดภาวะซีด มีน้ำหนักลด ผอมแห้ง เบื่ออาหาร และอาจทำให้ตายได้ (23) ประเทศไทยพบโรค trypanosomiasis ในมนุษย์เป็นครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2549 ในผู้ป่วยเด็กที่อาศัยอยู่ในจังหวัดลำปาง พบว่ามีการติดเชื้อ *T. lewisi* และอีกครั้งในปี พ.ศ. 2550 พบเชื้อ *T. lewisi-like* ในเด็กแรกเกิดที่อาศัยอยู่ในจังหวัดลำปางเช่นเดียวกัน โดยอาการที่ตรวจพบ จะมีไข้สูง ไอ มีภาวะซีด (anemia) และมีน้ำหนักต่ำกว่าเกณฑ์ (7)

เชื้อ trypanosome ในสัตว์เลี้ยงคลาน

Christensen H และคณะ ทำการตรวจ *T. thecadactyli* sp. ใน Blood smear ของ จิ้งจก 25 ตัวอย่างในประเทศปานามา ผลปรากฏว่าพบเชื้อใน 18 ตัวอย่าง คิดเป็น 72% ซึ่งบ่งชี้ว่า จิ้งจกอาจเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของเชื้อปรสิตชนิดนี้ และสามารถแพร่กระจายโดย *L. trinidadensis* ซึ่งมีผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการและการสังเกตทางนิเวศวิทยาเกี่ยวข้องกับ *L. trinidadensis* เป็นอาจจะเป็นเวกเตอร์ของ *T. thecadactyli* (24) ในปี 2008 Viola และคณะ ได้ ทำการศึกษาทางอนุชีววิทยาของเชื้อ trypanosomes ในงู กิ้งก่า และรินฝอยทรายจำนวน 459 ตัวอย่าง ผลปรากฏว่าพบเชื้อ *T. cascavelli* ในงู พบ *T. varani* ในกิ้งก่าและพบ *Trypanosoma* spp. ในรินฝอยทรายทั้งหมดจำนวน 39 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นงานวิจัยแรกที่มีการศึกษาและสร้างแผนภูมิ ต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis) ของ snake trypanosomes ทำให้ทราบว่าเชื้อ *T. cascavelli* ในงูมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ trypanosomes ในรินฝอยทราย (6)

2.1.1 *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*)



รูปที่ 1 *T. brucei* ระยะ trypomastigote ใน Blood smear ย้อมสี Giemsa
ที่มา *The Centers for Disease Control and Prevention website (CDC;2017)*

T. brucei มีอยู่สองชนิดที่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ ได้แก่ *T. brucei gambiense* และ *T. brucei rhodesiense* เป็นสาเหตุของโรค Trypanosomiasis เชื้อทั้งสองชนิดนี้มักถูกส่งผ่านโดยการกัดของแมลง Tsetse fly (*Glossina* spp.) โรคนี้มีผลกระทบต่อมนุษย์และปศุ

สัตว์ ในมนุษย์โรคนี้ถูกเรียกว่า Human African Trypanosomiasis (HAT) หรือเรียกว่า โรคเหงาหลับ (Sleeping sickness) ในขณะที่สัตว์เลี้ยงจะถูกเรียกว่า nagana หรือ African Animal Trypanosomiasis (AAT) โรค Trypanosomiasis อาการของผู้ป่วยมีความแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อ โดยมีความแตกต่างในด้านสาเหตุของการเกิดโรค (etiology) ด้านวิทยาการระบาด (epidemiology) การแสดงอาการทางคลินิก และรวมทั้งการรักษาด้วย รูปแบบการติดเชื้อ *T.b. gambiense* จะเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง พบใน 24 ประเทศในแอฟริกาตะวันตก และแอฟริกาตอนกลาง ส่วนรูปแบบการติดเชื้อแบบฉับพลัน เกิดจากเชื้อ *T.b. rhodostense* พบใน 13 ประเทศในแอฟริกาตะวันออก และแอฟริกาตอนใต้ ยูดานเป็นประเทศเดียวที่มีทั้ง 2 โรค อย่างไรก็ตามโรคทั้ง 2 ชนิดนี้แตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ และไม่มีการรวมกันในแต่ละโซนของโรค มักพบระบาดในประเทศต่าง ๆ ในทวีปแอฟริกาที่ตั้งอยู่ใต้ทะเลทรายซาฮารา (Sub-Sahara Africa) เพราะถือว่าเป็นที่อยู่ของแมลง tsetse fly ที่เป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรค มักจะแพร่หลายในพื้นที่ชนบท

2.1.1.1 *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b. gambiense*)

T.b. gambiense พบระบาดได้ใน 24 ประเทศบริเวณทางตะวันตก และทางตอนกลางของทวีปแอฟริกา (ซีเน็กัล ถึงซูดาน และยูกันดา) ปัจจุบันมีการรายงานพบผู้ป่วยจำนวน 97% ที่มีอาการของโรค sleeping sickness และ มีการติดเชื้อเรื้อรัง เป็นเวลาหลายเดือนหรือหลายปีโดยไม่มีอาการหรืออาการแสดงที่สำคัญของโรค เมื่อเชื้อเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) ทำให้เกิดแผลในสมอง ทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการเหงาหลับ เรียกว่า โรคเหงาหลับ ส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะเสียชีวิตในที่สุด

2.1.1.2 *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b. rhodesiense*)

T.b. rhodesiense พบระบาดได้ใน 13 ประเทศบริเวณทางตะวันออก และทางใต้ของทวีปแอฟริกา ซึ่งในปัจจุบันนี้มีการรายงานพบผู้ป่วยจำนวนน้อยกว่า 3% ที่มีการติดเชื้อ เพราะโรคนี้จะมีการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (acute infection) โรคนี้จะมีอาการและอาการบ่งชี้อย่างรวดเร็วและบุกรุกระบบประสาทส่วนกลาง โดยเฉพาะประเทศยูกันดา ที่มีการรายงานพบโรคทั้งสองรูปแบบ แต่มีการแยกโซนอย่างชัดเจน

2.1.1.3 รูปร่างลักษณะของ *Trypanosoma brucei*

เชื้อชนิดนี้อยู่ในโฮสต์คือ คน และแมลง จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ 4 ระยะ คือ

1. ระยะ Trypomastigote หรือ Trypanosome form เป็นปรสิตที่อาศัยอยู่ในเลือดของคนหรือสัตว์ซึ่งเป็นโฮสต์กักตุน มีลักษณะเรียวยาวประมาณ 20 ไมครอน มี flagella 1

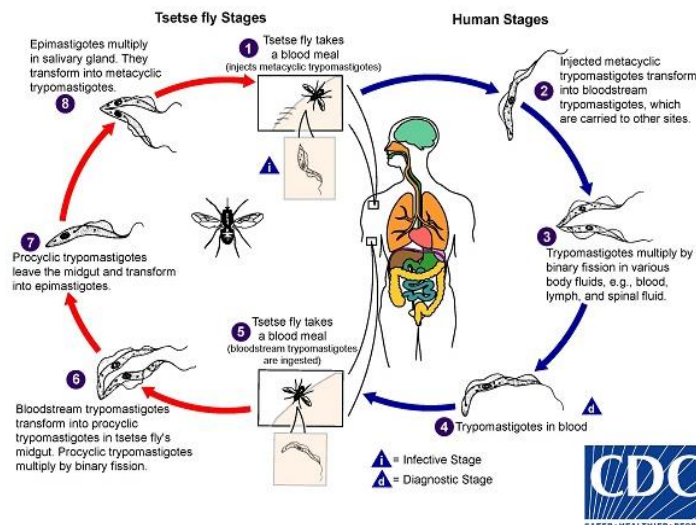
เส้น ที่ฐานมีส่วน basal body อยู่มี undulating membrane เป็นเยื่อบาง ๆ อยู่ด้านข้าง เมื่อย้อมสี จะพบก้อนติดสีเข้มอยู่ก่อนไปทางด้านท้ายเรียกว่า kinetoplast ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างของ mitochondrial DNA และพบ nucleus อยู่กลางลำตัว trypomastigote เพิ่มจำนวนด้วยการ แบ่งตัวแบบ longitudinal binary fission ที่พบในกระแสเลือดมีรูปร่างได้หลายแบบ (polymorphic) ได้แก่ รูปร่างลำตัวยาวเรียว (slender form) เป็นรูปแบบที่มีการแบ่งตัวพบได้มากที่สุด ในกระแสเลือด รูปร่างลำตัวป้อมสั้น (stumpy form) เป็นรูปแบบที่มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อ เตรียมที่จะเข้าไปเจริญต่อในแมลงพาหะ (Tsetse fly)

2. ระยะเวลา Epimastigote หรือ crithidia form เป็นระยะที่พบในต่อมน้ำลาย ของแมลงมีลักษณะป้อมสั้น มี flagellum ด้านหน้า พบ nucleus และ kinetoplast อยู่ก่อนไปทาง ท้ายลำตัว โดยมี kinetoplast อยู่หน้า nucleus และมี undulating membrane อยู่ด้านหน้า

3. ระยะเวลา Promastigote หรือ Leptomonad form เป็นระยะที่พบบริเวณ ทางเดินอาหารส่วนกลางของแมลงพาหะ รูปร่างยาวเรียว คล้ายระยะ trypomastigote พบ nucleus และ kinetoplast อยู่ก่อนชิดด้านหน้า มี flagella แต่ไม่มี undulating membrane

4. ระยะเวลา Metacyclic trypomastigote เป็นปรสิตที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนและ เปลี่ยนแปลงรูปร่างป้อมสั้นเป็นระยะติดต่อกับแมลงสู่คน

2.1.1.4 วงจรชีวิต (life cycle)



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของ ของโรค Human African Trypanosomiasis
ที่มา The Centers for Disease Control and Prevention website (CDC;2015)

1. เมื่อแมลง tsetse fly (*Glossina* spp.) กัดคนหรือสัตว์จะได้รับปรสิตระยะติดต่อ metacyclic trypomastigote ซึ่งปนออกมากับน้ำลายของแมลง
2. เชื้อระยะติดต่อ metacyclic trypomastigote จะเข้าสู่กระแสโลหิต จากนั้นจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นระยะ trypomastigote และเข้าสู่ส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย เช่น ระบบประสาท
3. trypomastigote เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในน้ำส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น กระแสเลือด น้ำไขสันหลัง และน้ำหนอง
4. ระยะ trypomastigote ที่อยู่ในกระแสโลหิตจะเปลี่ยนรูปร่างเป็น stumpy form พร้อมทั้งจะเข้าไปเจริญต่อในแมลงที่เป็นพาหะ
5. trypomastigote เข้าสู่แมลงจากการดูดเลือดจากคน แมลงที่เป็นพาหะของโรค คือ แมลงวัน tsetse fly กัดและดูดเลือดคน จะได้รับปรสิต trypomastigote ทุกรูปแบบเข้าไป แต่เฉพาะ trypomastigote ที่เป็น stumpy form เท่านั้นที่เจริญต่อในแมลงได้
6. trypomastigote ที่เป็น stumpy form เดินทางเข้ามาถึงทางเดินอาหารของแมลงวัน แล้วเปลี่ยนรูปร่างเป็น procyclic trypomastigote แล้วเริ่มแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว
7. จากนั้นประมาณ 2-3 สัปดาห์ procyclic trypomastigote จึงเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในต่อมน้ำลายของแมลงวันแล้วเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ epimastigote ซึ่งยังคงแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อีก

8. ในที่สุดปรสิตจะหยุดแบ่งตัวแล้วเปลี่ยนเป็นระยะ metacyclic trypomastigote ซึ่งเป็นระยะติดต่อที่พร้อมจะเข้าไปเจริญในโฮสต์ต่อไป โดยแมลงพาหะดูดกินเลือดจากสัตว์ หรือคนพร้อมกับปล่อยปรสิตระยะ metacyclic trypomastigote ออกมากับน้ำลาย

2.1.1.5 การติดต่อและพยาธิวิทยา

ระยะติดต่อ (infective stage) ของ African trypanosomiasis คือ ระยะ metacyclic trypomastigote ติดต่อสู่คนโดยแมลงวันกินเลือด Tsetse fly เป็นพาหะ เมื่อถูกแมลงพาหะกัดจะทำให้มีอาการเป็นตุ่มบวมแดงหรือเป็นแผลเรื้อรัง (chancre) เชื้อจะแบ่งตัวในบริเวณแผล แต่แผลจะหายไปเองได้ใน 1-2 สัปดาห์พร้อม ๆ เชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือด ผู้ป่วยจะเริ่มแสดงอาการของโรค เช่น ปวดศีรษะ มีไข้ ชิม ต่อมน้ำเหลืองโต อาการไข้จะเป็นๆหายๆ ทำให้เกิดอาการเรื้อรังพยาธิสภาพของโรคชัดเจนเมื่อเชื้อเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) เจริญแบ่งตัวแย่งอาหารจากโฮสต์ และทำให้เกิดแผลในสมอง ทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการหงาหลับ เรียกว่า โรคหงาหลับ (sleeping sickness) ส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะเสียชีวิตในที่สุด อย่างไรก็ตามอาการของผู้ป่วยอาจแบ่งออกเป็น 2 แบบตามชนิดของเชื้อ คือ

Gambian trypanomiasis ที่เกิดจากเชื้อ *T.b. gambiense* ผู้ป่วยจะมีอาการหงาหลับชัดเจน ปรสิตอยู่ในเลือดนานเป็นปีก่อนเข้าสู่ประสาทส่วนกลาง และเสียชีวิตในที่สุด

Rhodesian trypanomiasis ที่เกิดจากเชื้อ *T.b. rhodesiense* ใช้เวลาสั้นกว่าแต่รุนแรงกว่า มักไม่มีอาการหงาหลับ แต่เสียชีวิตเพราะหัวใจวายในเวลาน้อยกว่า 1 ปี (1-2 เดือน)

โรคนี้ส่วนใหญ่จะติดต่อสู่คนโดยแมลงวันกินเลือด Tsetse fly ที่ติดเชื้อ มากัด แต่มีวิธีอื่น ๆ ที่คนสามารถติดเชื้อได้ :

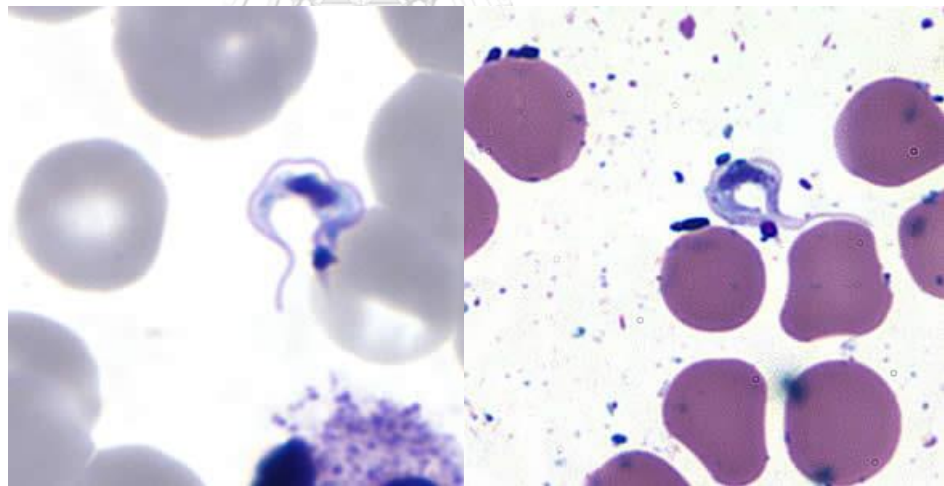
- การติดเชื้อจากแม่สู่ลูก : โดย trypanosome สามารถข้ามผ่านรกแม่และติดเชื้อทารกในครรภ์ได้
- การส่งผ่านทางแมลงดูดเลือดชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามเป็นเรื่องยากที่จะประเมินผลกระทบทางระบาดวิทยาของเชื้อชนิดนี้
- การติดเชื้อในห้องปฏิบัติการเนื่องจากมีอุบัติเหตุโดยบังเอิญ เช่น ถูกเข็มหรือของมีคมที่มีปนเปื้อนของเชื้อทิ่มตำ

- การติดต่อทางเพศสัมพันธ์ได้

2.1.1.6 Antigenic variation ของ *T. brucei*

การเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนใน *T. brucei* สามารถเปลี่ยนลักษณะของแอนติเจนบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เพื่อหลีกเลี่ยงการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ซึ่งเป็นกลไกการอยู่รอดของเชื้อที่มีความซับซ้อนสูง ซึ่งมีการเกี่ยวข้องกับการสลับตำแหน่งในระหว่างขบวนการถอดรหัสของ variant surface glycoprotein genes (VSG) ในขบวนการถอดรหัสนี้จะมีการสลับตำแหน่งที่มีการแสดงออกของ VSG genes ในตำแหน่งต่าง ๆ หรือ มีการเกิดขบวนการ gene rearrangement คือ การสลับไปมาของยีนแบบสุ่ม (random) ทำให้ VSG genes ที่ inactive ไปแทนที่ในตำแหน่งที่มีการแสดงออกของยีนก่อนหน้านี้ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพีโนไทป์นี้ไม่มีการเหนี่ยวนำของ Antigen antibody complex

2.1.2 *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)



รูปที่ 3 *T. cruzi* ระยะ trypomastigote ใน Blood smear (รูปซ้าย) และ ใน CSF (รูปขวา) ย้อมสี Giemsa

ที่มา *The Centers for Disease Control and Prevention website (CDC;2017)*

T. cruzi เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Chagas disease หรือที่เรียกว่า American trypanosomiasis โดยมีพาหะนำโรคที่เกี่ยวข้องกับการแพร่เชื้อชนิดนี้สู่มนุษย์ คือ มวนเพชฆาต/มวนดูดเลือด (triatomine bug) หรือที่เรียกว่า 'kissing bug' พบระบาดมากที่สุดใน 21 ประเทศในทวีปอเมริกา ระบาดบริเวณอเมริกาใต้และตอนกลาง (อาร์เจนตินา ชิลี โบลิเวีย บราซิล เวเนซุเอลา

และเม็กซิโก) พบผู้ป่วยประมาณ 8 ล้านคนที่ติดเชื้อ *T. cruzi* ทั่วโลกซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในทวีปอเมริกา แพร่กระจายไปยังภูมิภาคที่ไม่ติดเชื้อมากขึ้น เมื่อเทียบกับวิวัฒนาการของมันนับ แต่เมื่อกว่า 9,000 ปีที่ผ่านมา การติดเชื้อจาก *T. cruzi* เกิดขึ้นระหว่างสัตว์ป่า แต่ภายหลังแพร่กระจายไปยังต่อภายหลังแพร่กระจายไปยังสัตว์เลี้ยงและมนุษย์โดยมีการเพิ่มขึ้นของสัมพัทธ์เมื่อต้นศตวรรษที่ผ่านมา ส่วนใหญ่มาจากสาเหตุที่มีการการเดินทางของนักท่องเที่ยวและการเปลี่ยนแปลงทางเศรษฐกิจรวมทั้งการอพยพในชนบทการตัดไม้ทำลายป่าทำให้เปลี่ยนรูปแบบการระบาดวิทยาของโรคนี้ทำให้พบการติดเชื้อ *T. cruzi* ในเมือง และชานเมืองมากขึ้น ยังคงเป็นปัญหาสุขภาพที่ใหญ่ที่สุดแห่งหนึ่งซึ่งทำให้เกิดความสามารถในการติดเชื้อและเสียชีวิตมากกว่า 10,000 รายต่อปี และยังมีความเสี่ยงที่จะได้รับการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้นกว่า 25 ล้านคน ซึ่งโรค Chagas disease สามารถรักษาได้ในทางการแพทย์หากเริ่มรักษาในระยะเริ่มแรก ดังนั้นการเข้าถึงการวินิจฉัยและการดูแลจึงจำเป็นอย่างยิ่งในปัจจุบัน เพราะฉะนั้นการควบคุมแมลงที่เป็นพาหะนำโรคยังคงเป็นวิธีที่มีประโยชน์มากที่สุดในการป้องกันการติดเชื้อ

และการตรวจคัดกรองเลือดยังมีความสำคัญเพื่อที่จะหลีกเลี่ยงการติดเชื้อผ่านการถ่ายเลือดและการปลูกถ่ายอวัยวะ ส่วนการตรวจคัดกรองและการวินิจฉัยโรคในหญิงตั้งครรภ์และบุตรหลาน ยังคงเป็นมาตรการควบคุมที่จำเป็นของประเทศในทวีปอเมริกา



รูปที่ 4 การกระจายของเชื้อ *T. cruzi* ในทวีปอเมริกาไปยังประเทศอื่น ๆ

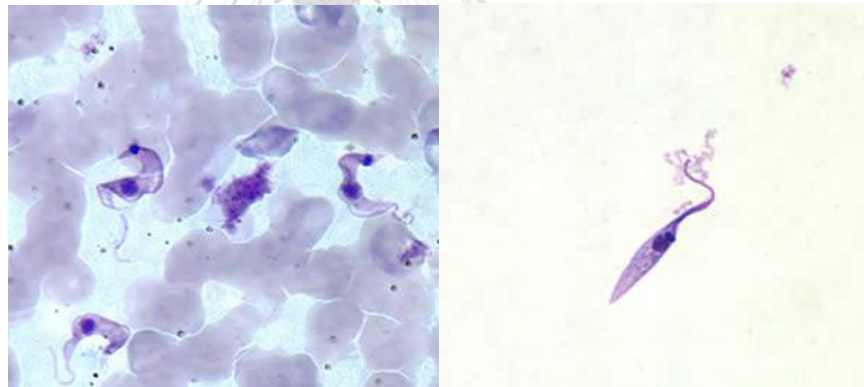
ที่มา The Centers for Disease Control and Prevention website (CDC;2017)

2.1.2.1 รูปร่างลักษณะของ *T. cruzi*

1.ระยะ trypomastigote มีขนาดยาว 15-20 ไมโครเมตร รูปร่างยาวเรียวโค้งงอ พบลักษณะเดียว (monomorphic) คล้ายตัว “C” หรือ “S” มี nucleus อยู่กลางลำตัว เคลื่อนไหวโดยใช้ flagellum ยาวอยู่ส่วนหน้าของลำตัว ส่วนที่อยู่บนตัวมีผนังบาง (undulating membrane) พบฐานของ flagellum อยู่ด้านท้ายเป็นแท่งเล็ก ๆ (basal body) และมีก้อน kinetoplast ขนาดใหญ่อยู่ท้ายสุดของลำตัว เป็นระยะที่พบในเลือด

2.ระยะ amastigote ลักษณะรูปไข่ มีขนาดยาว 3 - 6 ไมโครเมตร มีnucleus และ kinetoplast ไม่มี flagellum พบภายในเซลล์โฮสต์

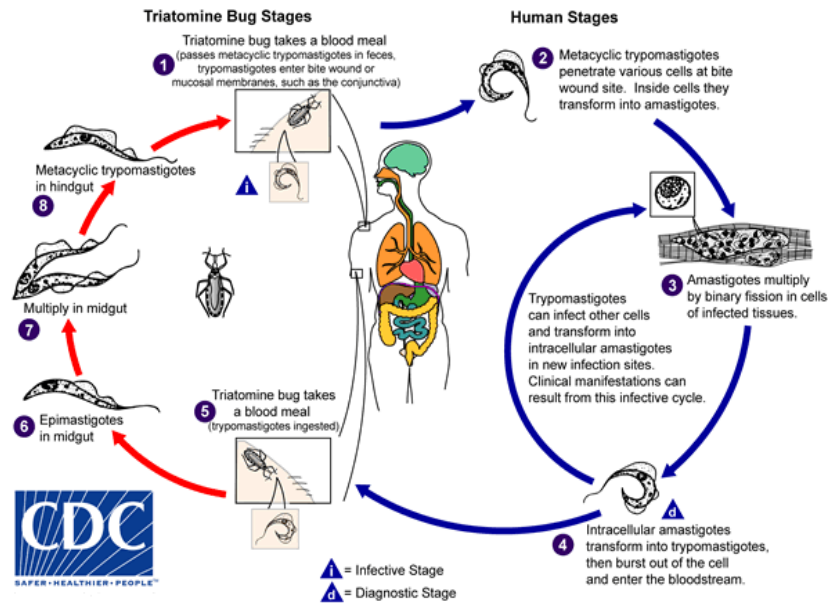
3.ระยะ epimastigote รูปร่างป้อมและสั้นกว่า trypomastigote nucleus อยู่ด้านท้ายของลำตัว kinetoplast อยู่ถัดจาก nucleus มี undulating membrane สั้น พบในทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของแมลงที่เป็นพาหะ



รูปที่ 5 *T. cruzi* ระยะ trypomastigote ใน Blood smear (รูปซ้าย) และ ระยะ epimastigote ที่ได้มาจากการ Culture (รูปขวา) ย้อมสี Giemsa

ที่มา *The Centers for Disease Control and Prevention website (CDC;2017)*

2.1.2.2 วงจรชีวิต



รูปที่ 6 วงจรชีวิตของ ของโรค American tripanosomiasis

ที่มา *The Centers for Disease Control and Prevention website (CDC;2017)*

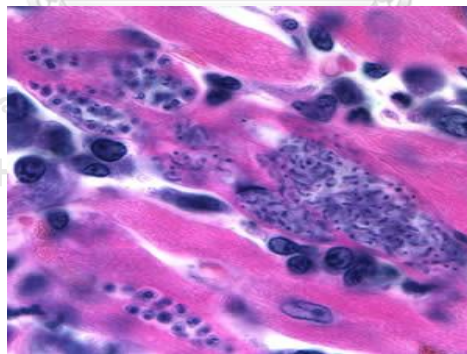
1. ปรสิตรระยะติดต่อ metacyclic trypomastigote จากแมลง triatomine bug เข้าสู่โฮสต์ทางบาดแผลที่ถูกกัด
2. ทันทีที่ metacyclic trypomastigote เข้าสู่ร่างกาย ปรสิตรจะเข้าไปในเซลล์และเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ amastigote
3. Amastigote จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในเซลล์
4. Amastigote ยังสามารถเปลี่ยนเป็นระยะ trypomastigote ซึ่งระยะนี้ไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ปรสิตรที่อยู่ในเซลล์จะทำให้เซลล์ตายแตกออก trypomastigote จะถูกปล่อยเข้าสู่กระแสโลหิตกระจายทั่วร่างกาย สามารถเข้าไปเจริญในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ทั่วร่างกายได้ โดยเฉพาะในระบบประสาทส่วนกลาง เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ
5. โฮสต์ตัวกลาง หรือพาหะที่สำคัญได้แก่ มวนดูดเลือด (Triatomine bug) จะดูดกินเลือดจากคน ก็จะได้ปรสิตรระยะ trypomastigote ที่อยู่ในกระแสเลือดเข้าไป
6. หลังจากที่แมลงพาหะได้รับเชื้อเข้าไป ปรสิตรจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนบริเวณทางเดินอาหารส่วนกลางของแมลง แล้วจึงเคลื่อนตัวไปยังทางเดินอาหารส่วนปลาย เปลี่ยนแปลงเป็นระยะ epimastigote
8. Epimastigote เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นระยะ metacyclic trypomastigote ซึ่ง

เป็นระยะติดต่อกับแมลงปัสสาวะ

2.1.2.3 การติดต่อและพยาธิวิทยา

ระยะติดต่อ (infective stage) คือ ระยะ metacyclic trypomastigote โดยอาศัยแมลงตัวมวนดูดเลือด (triatomine หรือ kissing bug) เป็นพาหะ *T. cruzi* ยังสามารถติดต่อโดยการให้เลือด การปลูกถ่ายอวัยวะ จากแม่สู่ลูกทางน้ำนม ทางเพศสัมพันธ์ และอุบัติเหตุที่อาจเกิดได้ในห้องปฏิบัติการ

T. cruzi ก่อโรค American trypanosomiasis หรือ Chagas' disease ผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อมักไม่แสดงอาการของโรค หรือมีแต่อาการไม่รุนแรง อาการที่รุนแรงมักพบในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ขวบ อาการของโรคแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะเฉียบพลัน (acute phase) และระยะเรื้อรัง (chronic phase) ระยะเฉียบพลันเกิดขึ้นหลังรับเชื้อประมาณ 2-3 สัปดาห์ จะมีการอักเสบ บวมแดง และเจ็บมากบริเวณที่ถูกกัด ร่วมกับการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงจากนั้นจะเข้าสู่ระยะเรื้อรัง ซึ่งมักเกิดหลังจากมีอาการระยะเฉียบพลันแล้วประมาณ 2-4 เดือน โดยจะแสดงอาการรุนแรงของโรคเนื่องจากที่เชื้อเข้าไปยังกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้กล้ามเนื้อหัวใจตาย อาการที่ตรวจพบได้แก่ หัวใจโต หัวใจเต้นผิดปกติ เลือดเลี้ยงหัวใจไม่พอ และหัวใจล้มเหลว ซึ่งเป็นสาเหตุตายที่สำคัญที่สุดของโรคนี้



รูปที่ 7 *T. cruzi* ระยะ amastigotes ใน heart tissue ย้อมด้วยสี hematoxylin and eosin (H&E)

ที่มา *The Centers for Disease Control and Prevention website (CDC;2017)*

2.2 *Leishmania* spp.

Leishmania spp. เป็นโพรทิสต์ที่อยู่ในกระแสเลือดซึ่งจัดอยู่ใน

อาณาจักร (Kingdom) : *Protista*

Subkingdom: *Protozoa*

ไฟลัม (Phylum) : *Sarcomastigophora*

Subphylum: *Mastigophora*

ชั้น (Class) : *Zoomastigophora*

อันดับ (Order) : *Kinetoplastida*

Suborder : *Trypanomatina*

วงศ์ (Family) : *Trypanosomatidae*

สกุล (Genus) : *Leishmania*



มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์

โรคไลชมาเนียเป็นโรคติดต่อที่นำโดยแมลง (Vector-borne disease ;p VBD) ที่องค์กรรม
 อนามัยโลกให้ความสำคัญเป็น 1 ใน 5 ของโรคติดต่อที่สำคัญของมนุษย์ โรคนี้เกิดจากเชื้อชนิด
 obligate intracellular protozoa ที่เรียกว่า *Leishmania* spp. ซึ่งเป็น pathogenic
 flagellated protozoa ดำรงชีวิตอยู่ได้ด้วยการเป็นปรสิตของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ
 โดยอาศัยอยู่ภายในเซลล์ของโฮสต์เท่านั้น โดยปกติจะติดต่อกันด้วยการกัดของแมลงพาหะ คือ รินฝอย
 ทรายเทศเมีย (sand fly) ในตระกูล *Phlebotomus* ซึ่งเป็นแมลงขนาดเล็ก 2-3 มิลลิเมตร และ
 แหล่งรังโรคที่สำคัญคือ สัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงภายในบ้าน (Domestic animals)
 ได้แก่ สุนัข แมว วัว ม้า และสัตว์กักตุน จำพวก หนู กระรอก กระแต เป็นต้น ทั้งนี้มนุษย์เป็นโฮสต์
 บังเอิญ (Accidental host) ของวงจรชีวิตของเชื้อ *Leishmania* spp. (9)

การระบาดของเชื้อ *Leishmania* spp. ในประเทศไทย จัดเป็นโรคอุบัติใหม่ในประเทศไทย นับตั้งแต่ปี พ.ศ.2503 ที่มีการพบเชื้อในผู้ป่วยที่มีการเดินทางกลับมาจากประเทศแถบตะวันออกกลาง ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคนี้ ในประเทศไทยพบผู้ป่วยลิซมาเนียเฉพาะที่มีรายงานประมาณ 20 ราย โดยส่วนใหญ่เชื้อที่พบคือเชื้อ *L. orientalis* (14), *L. martiniquensis* (15) และ *L. donovani* จำนวน 1 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัด (16)

อาการแสดงออกของโรค Leishmaniasis ในประเทศไทยมีทั้งอาการที่แสดงออกบริเวณอวัยวะภายใน อาการที่แสดงออกบริเวณผิวหนัง และอาการที่แสดงออกบริเวณอวัยวะภายใน ร่วมกับอาการที่แสดงออกบริเวณผิวหนัง ซึ่งโรคลิซมาเนียนั้นเป็นโรคที่สามารถพบได้ทั้งในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติ และผู้ป่วยที่มีความคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเอดส์

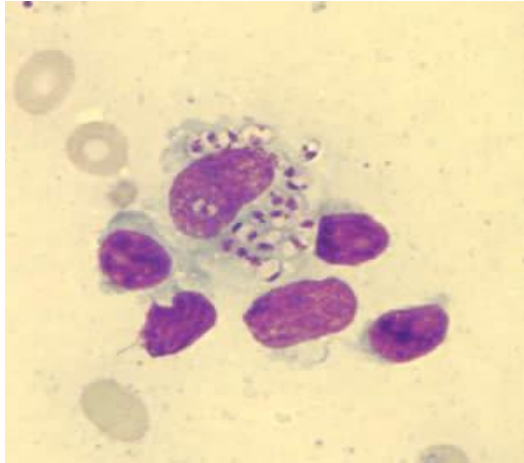
เชื้อ *Leishmania* ในสัตว์เลี้ยงคาน

ในปี 2004 B. Kazemi และคณะได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Leishmania* spp. จากกิ้งก่าจำนวน 144 ตัวที่เก็บจากประเทศอิหร่าน โดยวิธีการทำ Blood smear พบเชื้อระยะ promastigote และ amastigote จำนวน 3 และ 10 ตัวอย่างตามลำดับ และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจากหัวใจของกิ้งก่าผลปรากฏว่าพบระยะ promastigote จำนวน 2 ตัวอย่างซึ่งเป็นการรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับ *Leishmania* promastigote ในกิ้งก่า ที่ประเทศอิหร่าน (25)

ในปี 2016 Jun-Rong Zhang และคณะได้ศึกษาเชื้อ *Leishmania* spp. ในสัตว์เลี้ยงคานโดยวิธีการทางอนุชีววิทยาซึ่งได้ถูกสนใจว่าสัตว์เลี้ยงคานอาจเป็นแหล่งกักเก็บโรคของสัตว์เลี้ยงลูกด้วย จึงทำการตรวจเชื้อ *Leishmania* spp. ในจิ้งจก 6 สายพันธุ์ที่เก็บมาจากภาคตะวันตกเฉียงเหนือของจีน ผลปรากฏว่าพบเชื้อ *Leishmania* 3 สายพันธุ์คิดเป็น 64.6% (53/82) ประกอบไปด้วย *L. (Saurleishmania) sp.* (43.9%) และ *L. tropica* (28.1%) และ *L. donovani complex*. (8.5%) และจากการทำ Phylogenetic พบว่าเชื้อ *L. tropica* มีความคล้ายกับตัวอย่างที่เก็บจากคนไข้ ซึ่งสรุปได้ว่าจิ้งจกอาจเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของเชื้อปรสิตชนิดนี้(26)

ในปี 2019 Jun-Rong Zhan และคณะได้ศึกษาเชื้อ *Leishmania* spp. ในกิ้งก่าทั้ง 13 สายพันธุ์จำนวน 316 ตัวอย่างที่เก็บจากทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศจีนโดยใช้วิธีการทางอนุชีววิทยา ผลปรากฏว่าพบเชื้อ *Leishmania* 4 สายพันธุ์ (*Leishmania* sp., *L. turanica*, *L. donovani complex*, *L. tropica*) จำนวน 183 ตัวอย่างคิดเป็น 57.51% และพบการติดเชื้อร่วมกัน

อีก 37.7% ซึ่งบ่งชี้ว่าการติดเชื้อร่วมกันในกิ่งก่าอาจนำไปสู่การแพร่กระจายของเชื้อ *Leishmania* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค Leishmaniasis อาจมีความสำคัญต่อการระบาดของระบบนิเวศ(27)



รูปที่ 8 *Leishmania* spp.ระยะ amastigote ย้อมสี Giemsa

ที่มา *The Centers for Disease Control and Prevention website (CDC;2015)*

2.2.1 การระบาดของเชื้อ *Leishmania* spp.

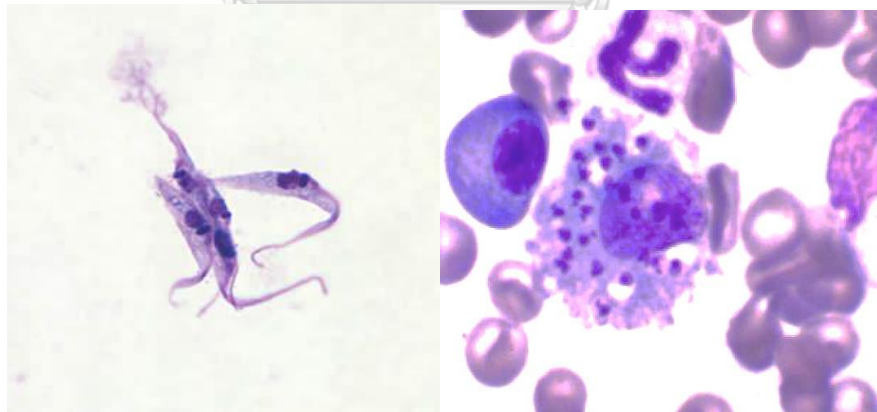
การระบาดของโรค leishmaniasis ในแอฟริกาตะวันออก (เอธิโอเปีย เคนยา ซูดานใต้ และซูดาน) จะพบโรคระบาดที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่อวัยวะภายใน (visceral leishmaniasis) โรคนี้มักมีการระบาดใหญ่ในเมืองที่มีประชากรหนาแน่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตสงครามและความขัดแย้งค่าผู้ลี้ภัย และในสถานที่ที่มีการโยกย้ายถิ่นฐานเป็นจำนวนมาก

ตั้งแต่ปี 1999 leishmaniasis ถือเป็นโรคนำเข้ามาในประเทศไทย ซึ่งได้พบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ คือ *Leishmania siamensis* ประกอบด้วยสองสายพันธุ์คือสายตระกูล TR และ PG ตั้งแต่นั้นมาได้มีการรายงานพบในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ (Immunocompetent) และผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV (human immunodeficiency virus) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วย HIV ที่มีการติดเชื้อร่วมกันของโรค leishmaniasis ร่วมด้วย (Leishmania/HIV co-infection) 2528 จึงจัดโรค leishmaniasis เป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญของผู้ติดเชื้อ HIV-1 โรคหนึ่ง โดยเฉพาะโรค visceral leishmaniasis (VL) จะทำให้ผลของการติดเชื้อ HIV รุนแรงขึ้นจนเกิดอาการของโรคเอดส์ (AIDS)



Figure 1. Locations of the reported autochthonous leishmaniasis cases in Thailand. 1. Surat Thani,³² 2. Nan,³³ 3. Phang-nga,¹⁵ 4. Chanthaburi,¹¹ 5. Songkha,^{10,24} 6. Trang,^{1,11} 7. Lopburi,¹⁶ 8. Chiang Rai,³² 9. Surin,²⁷ 10. Lamphun,^{27,28} 11. Chiang Mai.²⁸

รูปที่ 9 การพบเชื้อ *Leishmania spp.* ในประเทศไทย (Leelayoova; 2017)



รูปที่ 10 *Leishmania spp.* ระยะ Promastigote ที่ได้มาจากการ Culture (รูปซ้าย) และ ระยะ Amastigote ใน tissue scraping (การขูดเนื้อเยื่อ) (รูปขวา) ย้อมสี Giemsa
ที่มา *The Centers for Disease Control and Prevention website (CDC;2015)*

2.2.2 รูปร่างลักษณะของ *Leishmania* spp.

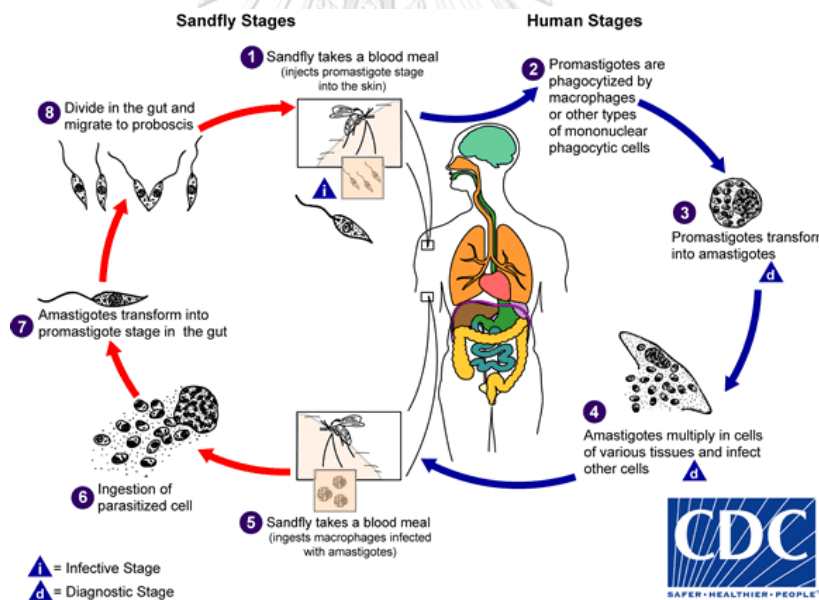
1. Amastigote form

พบในเซลล์ reticuloendothelial cell และ lymphoid tissue ของคน ลักษณะรูปไข่ มีขนาดยาว 2-5 ไมโครเมตร ไม่มีหนวด มีนิวเคลียสใหญ่ เมื่อย้อมสี Giemsa พบ Kinetoplast มีขนาดเล็ก รูป rod ติดสีม่วงเข้มกว่า nucleus ส่วน cytoplasm ติดสีน้ำเงินจางๆ และมี axoneme ยื่นถึงปลายด้านหน้า (anterior end) ระยะนี้สามารถแบ่งตัวแบบ binary fission ได้

2. Promastigote form

พบในทางเดินอาหารของแมลงริ้นฝอยทราย (sandfly) รูปร่างยาวเรียว มีขนาดยาว 15-20 ไมโครเมตร kinetoplast และ basal body อยู่ชิดด้านหน้าลำตัว หนวดยาวเกือบเท่าความยาวลำตัว มีนิวเคลียสอยู่กลางลำตัว ไม่มี undulating membrane

3.2.3 วงจรชีวิต (life cycle)



รูปที่ 11 วงจรชีวิตของ ของโรค leishmaniasis

ที่มา *The Centers for Disease Control and Prevention website (CDC;2013)*

1. *Leishmania* spp. ติดต่อโดยการกัดของริ้นฝอยทรายตัวเมีย มีระยะติดต่อคือ promastigote

2. promastigote จะผ่านเข้าสู่บาดแผลที่ถูกกัด และถูก macrophage จับกิน

3. ต่อมา promastigote มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น amastigote ใน macrophage
4. amastigotes จะแบ่งตัวในเซลล์ต่าง ๆ จนในที่สุด macrophage แรกออก amastigote จะเข้าสู่เซลล์อื่น ซึ่งทำให้เกิดพยาธิสภาพ และอาการของโรคบริเวณนั้น ๆ
5. รั้นฝอยทรายตัวเมียได้รับเชื้อเมื่อกัดดูดเลือดคน หรือสัตว์ที่มีเชื้อ โดยการดูดเลือดที่มีเชื้อระยะ amastigote ที่อยู่ใน macrophages
6. ในทางเดินอาหารของแมลงรั้นฝอยทรายจะพบ amastigote จำนวนมาก
7. amastigote จะเปลี่ยนรูปร่างเป็น promastigote ในทางเดินอาหาร ส่วนกลางของแมลง
8. promastigote ซึ่งจะมีการแบ่งตัว เพิ่มจำนวน และเคลื่อนที่ไปอยู่ที่ proboscis ของแมลง

2.2.4. การติดต่อและพยาธิวิทยา

เชื้อก่อโรค leishmaniasis พบได้หลายสายพันธุ์โดยสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม คือ

- *L. tropica* complex (*L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*)
- *L. mexicana* complex (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* และ Sub species *L. brazillensis*)
- *L. donovani* complex (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagsi*)

เชื้อที่อยู่ในกระแสเลือดและเนื้อเยื่อทำให้เกิดโรค leishmaniasis ในคน ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะอาการทางคลินิกของโรค คือ

1. ปรากฏก่อให้เกิดแผลที่ผิวหนัง (cutaneous leishmaniasis) มี 2 ชนิด คือ ชนิดแผลผื่นเปียกในชนบท (wet rural form) เกิดจากเชื้อ *L. major* และชนิดแผลผื่นแห้งในเขตเมืองใหญ่ (dry urban form) เกิดจากเชื้อ *L. tropica* เป็นโรคของคนแต่ถ่ายทอดสู่สัตว์ได้เช่นกัน
2. ปรากฏก่อให้เกิดแผลที่เยื่อบุผิว (mucocutaneous leishmaniasis) ลักษณะคล้ายกับที่เกิดขึ้นที่ผิวหนัง แต่จะเกิดแผลลุกลามในอวัยวะที่เยื่อเมือก เช่น จมูก ปาก เป็นต้น ซึ่งมีอยู่หลายแบบขึ้นอยู่กับชนิดของตัวเชื้อและความรุนแรงของโรค
3. ปรากฏก่อเกิดพยาธิสภาพอวัยวะภายใน (visceral leishmaniasis) เรียกอีกชื่อว่า kala-azar หมายถึง black fever เพราะเมื่อเป็นโรคนี้นาน ๆ จะทำให้ผิวหนังสีคล้ำขึ้น

โรคเกิดจากการติดเชื้อในอวัยวะภายในร่างกาย โดยเฉพาะที่ไขกระดูก ม้าม ต่อม้ำเหลือง และตับ เป็นต้น ถือว่าเป็นลักษณะโรคที่รุนแรงที่สุด อาการของโรคจะค่อยเป็นค่อยไปอย่างช้า ๆ ระยะพักตัวมีตั้งแต่สัปดาห์ไปจนถึงหลายเดือน (เฉลี่ยประมาณ 3 - 6 เดือน) เคยมีระยะพักตัวนานถึง 9 ปี ระยะ 2 - 8 สัปดาห์แรกผู้ป่วยจะรู้สึกมีไข้ต่ำ ๆ อ่อนเพลีย และมีอาการไม่สบายในท้อง อาจท้องเดิน ท้องผูก เบื่ออาหาร และปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ บางครั้งอาจมีไข้สูงขึ้นมาคล้ายมาลาเรีย ไข้อาจเป็นเวลาชนิด intermittent, remittent และร่วมกับมีอาการท้องเดิน ไอแห้ง ๆ อาจมีเลือดออกผิดปกติ เช่น เลือดออกทางจมูก ไรฟีน มีจุดเลือดออกตามตัวและทางเดินอาหาร เป็นต้น หลังจากนั้นผู้ป่วยจะมีอาการอ่อนเพลียมากขึ้นเรื่อย ๆ และท้องอืด ท้องโต คลื่นไส้ อาเจียน ผิวหนังแห้ง ตกสะเก็ด และจะกลายเป็นสีเทาๆ โดยเฉพาะที่บริเวณมือหน้าเส้กลางของหน้าท้อง petechia, ecchymosis และบวมได้ ม้ามจะโตมากซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโรคนี้ ม้ามนุ่มไม่เจ็บปวด และอาจโตมากจนถึงเชิงกราน ตับโต และบางรายจะมีต่อม้ำเหลืองโตด้วย เลือดซีด เม็ดเลือดขาวต่ำกว่า 4000/ลบ.มม. เกิดกับบ อัล บ ลู มิน ต่ำ และมี polyclonal hypergammaglobinemia สูงมาก ซึ่งเป็น IgG ภาวะแทรกซ้อนที่มักเกิดขึ้นร่วมด้วย คือ ปอดบวม ภาวะอาหารและลำไส้อักเสบ ถ้าไม่ได้รับการรักษาก็จะเสียชีวิต ซึ่งมักเกิดจากภาวะแทรกซ้อน ซีดมาก หรือมีเลือดออกในภาวะอาหารและลำไส้มาก ๆ ได้ บางรายผู้ป่วยมีอาการคล้ายจะหายแต่ต่อมามีอาการทางผิวน้ำเรียกว่า Post kala-azar dermal leishmaniasis เป็นตุ่มนูนและผื่นแดงเกิดขึ้น

2.3 *Hemidactylus* spp.

จิ้งจกบ้าน เป็นสัตว์เลื้อยคลาน ที่อยู่ในสกุล *Hemidactylus*

อาณาจักร (Kingdom) : *Animalia*

ไฟลัม (Phylum) : *Chordata*

ชั้น (Class) : *Reptilia*

อันดับ (Order) : *Squamata*

อันดับย่อย (Sub - Order) : *Lacertilia*

วงศ์ (Family) : *Gekkonidae*

วงศ์ย่อย (Sub-Family) : *Gekkoninae*

สกุล (Genus) : *Hemidactylus*



ประกอบด้วยประมาณ 80 ชนิดที่เป็นที่รู้จัก พบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแพร่พันธุ์ไปในหลายประเทศทั่วโลก ทั้งแอฟริกาตะวันออก, นิวกินี, เม็กซิโก, มาดากัสการ์, ออสเตรเลีย และหลายพื้นที่ทั่วโลก ยกเว้นในเขตขั้วโลก มีทั้งหากินในเวลากลางวันและกลางคืน เป็นสัตว์เลื้อยคลานที่มนุษย์รู้จักเป็นอย่างดี เพราะสามารถพบเห็นได้ทั่วไปแม้กระทั่งในบ้านเรือน

ส่วนใหญ่ชนิดของ *Hemidactylus* spp. มีการกระจายค่อนข้างมีที่ขนาดเล็กจะพบอยู่ในเอเชียใต้และแอฟริกาและมีเพียง 8 สายพันธุ์เท่านั้นที่พบอย่างแพร่หลายในพื้นที่ทางภูมิศาสตร์นี้ คือ *H. turcicus*, *H. brookii*, *H. frenatus*, *H. garnotii*, *H. persicus*, *H. flaviviridis* และ *H. bowringii* ซึ่ง *Hemidactylus* spp. เป็นการอยู่แบบพึ่งพาอาศัยกัน (commensal) กับคนเป็นอย่างมาก มักเกิดขึ้นในพื้นที่รอบ ๆ ที่อยู่อาศัยของคน

นอกจากนี้แล้วลักษณะพิเศษเฉพาะที่สำคัญอีกประการของสัตว์เลื้อยคลานวงศ์นี้คือ สามารถเกาะติดกับผนังได้เป็นอย่างดี โดยไม่หล่นลงมา ด้วยหลักของสุญญากาศที่บริเวณใต้ฝ่าเท้าทั้ง 4 ด้าน โดยเป็นแผ่นหนังที่เรียงตัวต่อกัน ซึ่งแผ่นหนังแต่ละแผ่นมีเส้นขนจำนวนมากและแต่ละเส้นนั้นยาวประมาณ 60-90 ไมครอน เรียกว่า "เซต้า" ซึ่งส่วนปลายของขนนั้นแตกแขนงและขยายออกเป็นกลุ่ม การเรียงตัวของแผ่นหนังและรายละเอียดของเส้นขนนี้ใช้ในการอนุกรมวิธานแยกประเภท แต่ในหลายสกุลก็ไม่อาจจะเกาะติดกับผนังได้ (19)

3.3.1 ลักษณะรูปร่างของจิ้งจก



รูปที่ 12 รูปร่างลักษณะของจิ้งจก

มีสีเทา มีลำตัวขนาดเล็ก ลำตัวแบน หัวสั้น และมีหาง ไม่มีม่านตา โดยเฉลี่ยลำตัวจะมีความยาว 3 นิ้ว ตัวเต็มวัยอาจถึง 5 นิ้ว มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงเข้ม ลื่นลื่นแต่ยึดออกได้ ผิวหนังค่อนข้างละเอียด ตัวมักมีสีขาหรือคล้ำ สามารถปรับตัวให้กลมกลืนกับสิ่งแวดล้อม เพ้าเหนียวช่วยให้ไต่ไปตามเพดานหรือข้างฝาได้ มักอาศัยอยู่ตามบ้านเรือน มักหากินในเวลากลางคืน มีอายุประมาณ 5 - 10 ปี การงอกใหม่ของหางจิ้งจกใช้เวลาประมาณ 2 - 6 สัปดาห์ ระยะเวลาขึ้นอยู่กับขนาดของหางที่ขาดหายไป อาหาร และสุขภาพ ขยายพันธุ์ด้วยออกลูกเป็นไข่ ซึ่งตัวเมียนั้นจะออกไข่คราวละ 2 ฟอง มีความกว้างประมาณ 0.5 - 0.9 เซนติเมตร และมีความยาว 0.6 - 1.0 เซนติเมตร ไข่จะใช้เวลาในการฟักตัวเป็นเวลา 50 - 65 วันหลังจากออกจากท้องของตัวเมีย โดยเมื่อตัวอ่อนออกจากไข่แล้วจะมีขนาดประมาณ 2 นิ้ว ไข่มีสีขา ลำตัวเป็นปล้องๆ (28)

ในการจัดจำแนก *Hemidactylus* spp. ตามหลักอนุกรมวิธานจากคุณลักษณะภายนอกเป็นเรื่องที่ยาก ซึ่งมักจะมีความแตกต่างที่ใกล้เคียงกันมาก บางชนิดมีตัวแปรทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันมากทำให้มีลักษณะที่แตกต่างกันไปและสิ่งเหล่านี้อาจทำให้สับสน ทำให้ยากที่จะระบุลักษณะประจำตัวที่ชัดเจนในการจำแนก ยกตัวอย่างเช่น *H. brookii* และ *H. angulatus* ที่อยู่ในทวีปแอฟริกาจะมีรูขุมขนลดลงอย่างมาก และ tubercles ที่มีจำนวนลดลงหรือแทบไม่มีเลย ทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความคล้ายคลึงกันมาก จึงต้องใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการแยก (1, 19)

ในปัจจุบัน ประเทศไทยยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดว่าจิ้งจกเป็นแหล่งเก็บเชื้อ *Trypanosoma* และ *Leishmania* มีรายงานเพียงแค่ตรวจพบเชื้อปรสิตทั้งสองชนิดนี้ในสัตว์เลื้อยคลานชนิดต่าง ๆ ซึ่งอยู่ในไฟลัมเดียวกับจิ้งจกจากการศึกษาของ Njagu และคณะในปี 1999 ได้ทำการตรวจเชื้อ trypanosomes ในสัตว์เลื้อยคลานจำพวกกิ้งก่า (Monitor lizard , *Varanus niloticus*) ที่อาจติดเชื้อในมนุษย์ได้ ในพื้นที่ที่มีการระบาดในประเทศเคนย่า ผลปรากฏว่าพบเชื้อ *T. brucei* จำนวน 1 ใน 19 ตัวอย่างคิดเป็น 6% (5) และ *Viola* และคณะในปี 2008 ได้ทำการศึกษาทางอนุชีววิทยาของเชื้อ trypanosomes ในงู กิ้งก่า และรินฝอยทรายจำนวน 459 ตัวอย่าง ผลปรากฏว่าพบเชื้อ *T. cascavelli* ในงู พบ *T. varani* ในกิ้งก่าและพบ *Trypanosoma* spp. ในรินฝอยทรายทั้งหมดจำนวน 39 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นงานวิจัยแรกที่มีการศึกษาและสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis) ของ snake trypanosomes(6) ต่อมาในปี 2014 Zhang และคณะ ได้ทำการศึกษาทางอนุชีววิทยาของเชื้อ *Leishmania* spp. โดยใช้ยีนส์ *ITS1* ในสัตว์เลื้อยคลาน ผลปรากฏว่าพบเชื้อ *Leishmania* sp., *Leishmania tropica* และ *Leishmania donovani* complex. รวม 64.6% ของสัตว์ทั้งหมด และ Ursula และคณะ ได้ทำการศึกษาเลือดของสัตว์เลื้อยคลานที่นำเข้ามาจากประเทศเยอรมัน (Germany) ได้มีการรายงานพบเชื้อ Trypanosome ในงู 9% และพบในสัตว์เลื้อยคลาน 25% ได้แก่ *K. fischeri*, *Acanthosaura capra*, *G. Gecko* (26)และในปี 2017 Oluwafem และคณะ ได้ทำการศึกษาการติดเชื้อหนอนพยาธิในจิ้งจก (*Hemidactylus frenatus*) และ จิ้งเหลน (*M. quinquetaeniata*) ในประเทศไนจีเรีย โดยการผ่าอวัยวะต่าง ๆ ของจิ้งจกและจิ้งเหลนมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลปรากฏว่า ความชุกของการติดเชื้อปรสิตในสัตว์ทั้ง 2 ชนิดมีความสูง 64.0% ใน *H. frenatus* และ 72.1% ใน *M. quinquetaeniata* ผลการทดลองพบ *Paraphayngodon* spp., *Pharyngodon* spp., *Spirura* spp., *Oochoristica truncate*, *Mesocoelium monas*, *Raileteilla frenatus*, และ *Cystacant* (29) ดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ 1 ตารางการตรวจพบเชื้อหนอนพยาธิในจิ้งจก (*Hemidactylus frenatus*)

Parasite group	Parasite	<i>Hemidactylus frenatus</i>				<i>Mabuya quinquetaeniata</i>			
		P (%)	Intensity	Range	Site	P (%)	Intensity	Range	Site
Nematode	<i>Paraphayngodon</i> sp	49.4	1.16 ± 0.22	0 - 11	Rectum	65.6	2.27 ± 0.43	0 - 9	Rectum
	<i>Pharyngodon</i> sp.	1.20	0.09 ± 0.06	-	Rectum	-	-	-	-
	<i>Spirura</i> sp.	1.20	-	-	Stomach	19.7	0.56 ± 0.39	0 - 16	Intestine
Cestoda	<i>Oochoristica truncate</i>	8.10	0.43 ± 0.18	0 - 9	Stomach	-	-	-	-
Trematoda	<i>Mesocoelium monas</i>	-	-	-	-	1.60	2.0 ± 2.0	0 - 2	Intestine
Pentastomid	<i>Raileteilla frenatus</i>	42.4	1.5 ± 0.36	0 - 16	Lungs	13.1	0.98 ± 0.36	0 - 9	Lungs
Acanthocephala	<i>Cystacant</i>	-	-	-	-	1.60	0.33 ± 0.33	0 - 1	Rectum

P = Prevalence

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study) โดยได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมในสัตว์ทดลอง และอนุมัติโดยคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของคณะแพทยศาสตร์ จากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Faculty of medicine, Chulalongkorn University Ethics Committee) เลขที่ใบรับรอง 004/2562

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 เครื่องเพิ่มปริมาณพันธุกรรม (PCR) รุ่น Veriti บริษัท Genplus ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 เครื่องเพิ่มปริมาณพันธุกรรม(PCR) รุ่น Cyclern PROS บริษัท eppendorf ประเทศเยอรมนี

3.2.3 ตู้เย็นอุณหภูมิตั้งที่ 4 c รุ่น LG บริษัท LG ประเทศไทย

3.2.4 ตู้เย็นอุณหภูมิตั้งที่ -20 c รุ่น Whirlpool บริษัทSanyo ประเทศไทย

3.2.5 ตู้เย็นอุณหภูมิตั้งที่ -80 c รุ่น Forma 900 series บริษัท Thermo scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.6 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ incubator shaker รุ่น Innova 43 บริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมนี

3.2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5430 R บริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมนี

3.2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5417 R บริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมนี

3.2.9 เครื่องไมโครเวฟ รุ่น LG บริษัท LG ประเทศจีน

3.2.10 เครื่องเขย่าผสมสาร Vortex รุ่นFINEVORTEX (FinePCR) ประเทศเกาหลี

3.2.11 เครื่อง dry bath incubator บริษัท Cleaver scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.12 เครื่อง gel electrophoresis รุ่น Biorade sub-cell RT บริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.13 เครื่องถ่ายภาพ gel documentation รุ่น gel doc XR บริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.14 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม spectrophotometer

3.2.15 เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น Sartorius ประเทศเยอรมนี

3.2.16 เครื่อง Autoclave (ตั้งนั่งฆ่าเชื้อ) รุ่น HIRAYAMA HA-3D ประเทศญี่ปุ่น

3.2.17 เครื่อง Autoclave (ตั้งนั่งฆ่าเชื้อ) รุ่น HVE-50 ประเทศญี่ปุ่น

3.2.18 ตู้ปรับอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย บริษัท Memmert

3.2.19 ตู้สำหรับเตรียมสาร PCR (PCR caninet) รุ่น pcr- 01 ประเทศไทย

3.2.20 ไมโครปิเปต ขนาด 0.1-10,2-20,20-200 และ 100-1,000... บริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมนี

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.3.1 หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml บริษัท extragene ,lnc

3.3.2 หลอด pcr ขนาด 0.2 ml บริษัท extragene,lnc

3.3.3 ปิเปตทิป ขนาด 0.1-10,200 และ 1,000

3.3.4 หลอด centrifuge ขนาด 15 และ 50 ml

3.3.5 ปากคีบ (forceps)

3.3.6 ถังมือยาง

3.3.7. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

3.3.8 Loop เขี่ยเชื้อ และ spreader

3.3.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.3.10 ขวดแก้วสำหรับเตรียมสารเคมี ขนาด 100,500 และ 1,000 ml

3.3.11 ก่อ้งโฟมสำหรับใส่น้ำแข็ง

3.3.12 นาฬิกาจับเวลา

3.3.13 ทิชชูสำหรับทำความสะอาด

3.3.14 หลอดหยด (dropper)

3.3.15 พาราฟิล์ม (parafilm)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเก็บตัวอย่าง

ติดต่อเจ้าของบ้านเพื่อขอความร่วมมือในการเก็บตัวจิ้งจก การเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรคลิชมาเนียในภาคใต้ของประเทศไทย และทำการผ่าชำแหละจิ้งจก โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ตับ ม้าม หัวใจ โดยแบ่งการเก็บตัวอย่างเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 จำนวนจิ้งจก 12 ตัว ซึ่งเก็บในช่วงเดือน พฤศจิกายน พ.ศ.2560 ช่วงที่ 2 จำนวนจิ้งจก 7 ตัว ซึ่งเก็บในช่วง เมษายน พ.ศ.2561

3.4.2 การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological identification)

โดยทำการย้อมสี Geimsa และ Hematoxylin and eosin (H&E) ของเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ของจิ้งจก (ตับ ม้าม หัวใจ) โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.4.2.1 การย้อมสี Hematoxylin and eosin (H&E)

1. นำสไลด์ชิ้นเนื้อ จุ่มใน Xylene เป็นขั้นตอน Deparaffinization เป็นการล้างหรือขจัดเอาขี้ผึ้ง (Paraffin) ออกจากสไลด์ หรือ Section (ส่วนของชิ้นเนื้อ) โดยการจุ่มสไลด์ ลงใน Xylene จนชิ้นเนื้อปราศจาก Paraffin โดยจะมีลักษณะใส

2. จุ่มใน 100% Ethyl alcohol Hydration เป็นการทำให้ น้ำเข้าสู่เซลล์ และเนื้อเยื่อเข้มข้นสูง โดยผ่านสารละลาย Alcohol จากความเข้มข้นสูง (100%) ลงไปหาต่ำ (95%) เพื่อเป็นการเตรียมให้เซลล์มีความพร้อมในการรับสีที่จะย้อม เพราะสารละลายสีส่วนใหญ่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

3. Tap water เป็นขั้นตอนการล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านชิ้นเนื้อตลอดเวลา

4. จุ่มใน Mayer' s Hematoxylin Primary staining เป็นการย้อมสีแรก ส่วนใหญ่ เป็น Basic dye เพื่อย้อม Nucleus และทำการ Tap water เป็นขั้นตอนการล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านชิ้นเนื้อตลอดเวลา

5. จุ่มในสี Eosin Counterstaining เป็นการย้อมสีซ้ำ เพื่อเพิ่มสีหมในชั้นเนื้อ ทำให้เกิดการเปรียบเทียบระหว่างสิ่งที่ย้อมในขั้นตอนแรก และขั้นที่สองเด่นชัดขึ้น ส่วนใหญ่เป็นสี Acid dye ย้อม Cytoplasm หรือส่วนอื่นของเซลล์และเนื้อเยื่อ

6. จุ่มใน 95% Ethyl alcohol Dehydration เป็นการขจัดน้ำออกจากเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยการผ่านสารละลาย Alcohol จากความเข้มข้นต่ำ (95%) ไปสูง (100%)

7. จุ่มใน Xylene ขั้นตอน Clearing เป็นการทำให้ชิ้นเนื้อใสขึ้น โดยใช้ Xylene ช่วยให้เห็นผ่าน Section ได้ดี เหมาะต่อการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

การสกัดดีเอ็นเอของอวัยวะต่าง ๆ ของจิ้งจก (ตับ ม้าม หัวใจ) โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปจาก Invisorb Spin Tissue Mini kit (Invitex GmbH, ประเทศเยอรมนี) โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.4.3.1 นำตัวอย่างตับ ม้าม หัวใจ ของจิ้งจก แล้วเติม Lysis Buffer G ปริมาตร 400 μ l ทำการบดโดยใช้ไม้บดจนละเอียด แล้วเติม proteinase S ปริมาตร 40 μ l นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 52°C ประมาณ 16 - 18 ชั่วโมง (overnight)

3.4.3.2 นำตัวอย่างที่มีการบ่มไว้มาปั่นตกโดยใช้ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปใส่ในหลอด microcentrifuge อันใหม่ แล้วเติม Binding Buffer A ปริมาตร 200 μ l นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นทำการย้ายไปใส่หลอด microcentrifuge ที่มี Spin filter บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

3.4.3.3 นำตัวอย่างไปปั่นตกโดยใช้ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง

3.4.3.4 เติม Wash Buffer ปริมาตร 550 μ l นำไปปั่นตกโดยใช้ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสด้านล่างทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้ง แล้วเทส่วนใสด้านล่างทิ้ง

3.4.3.5 นำตัวอย่างไปปั่นแห้งโดยใช้ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 4 นาที

3.4.3.6 ทำการย้าย Spin filter ไปใส่ Receiver tube แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 40 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที

3.4.3.7 นำไปปั่นตกโดยใช้ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ Spin filter จะได้ DNA พร้อมใช้งาน

3.4.4 การวัดค่าความดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณและประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (nanoDrop 1000 Spectrophotometer ; thermo scientific , USA) โดยเครื่องจะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และความยาวคลื่น 280 nm และเครื่องจะทำการคำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ } (\mu\text{l /ml}) = A_{260} \text{ dilution factor}$$

ค่าความดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 260 nm ที่วัดได้นำมาประเมินผล โดยเทียบกับค่าความยาวคลื่น 280 nm (A_{260} / A_{280}) เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยดูจาก

อัตราส่วน (A_{260} / A_{280}) อยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 แสดงว่า ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ หรือมีคุณภาพ ถ้าอัตราส่วนอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้อาจมีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่ในสารละลาย แต่ถ้าอัตราส่วนอยู่ในช่วงที่สูงกว่า 2.0 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้อาร์เอ็นเอปะปนอยู่ในสารละลาย

3.4.5 การตรวจหาเชื้อ Trypanosoma และ Leishmania จากตัวอย่างจึงจกด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

3.4.5.1 การตรวจเชื้อ Trypanosoma spp.

3.4.5.1.1 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน SSU rRNA โดยอาศัยหลักการทำงานร่วมกับ primer ที่จำเพาะต่อบริเวณ SSU rRNA (ตารางที่2) ใช้สารละลายในสัดส่วนที่เหมาะสม (ตารางที่2) และทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน SSU rRNA ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 4) เมื่อเสร็จเรียบร้อยทุกขั้นตอนจึงเก็บ PCR Product ไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน *SSU rRNA* (30)

Primers	Sequences (5'-3')
TRY927-F	GAAACAAGAAACACGG
TRY927-R	CTACTGGGCAGCTTGGA

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *SSU rRNA*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μ l)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	1.25
2.5 mM dNTPs	2
10 μ M TRY927-F	0.4
10 μ M TRY927-R	0.4
Taq polymerase (5U/ μ l)	0.2
DNA template	2
dH ₂ O	16.25
รวม	25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *SSU rRNA*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ (cycles)
1. Initial denaturation	95	5	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	0.45	40
- Annealing	53	1	
- Extension	72	1.30	
3. Final extension	72	7	1

3.4.5.2 การตรวจหาเชื้อ *Leishmania* spp.

3.4.5.2.1 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *ITS1*

การตรวจหาเชื้อ *Leishmania* spp. โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธีข้างต้น โดยทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณยีน *ITS1* โดยใช้ primer ที่จำเพาะ (ตารางที่ 5) ใช้สารละลายในสัดส่วนที่เหมาะสม (ตารางที่ 6) และทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *ITS1* ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 7) เมื่อเสร็จเรียบร้อยทุกขั้นตอนจึงเก็บ PCR Product ไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน *ITS1* (31)

Primers	Sequences (5'-3')
Le-F	TCCGCCCGAAAGTTCACCGATA
Le-R	CCAAGTCATCCATCGCGACACG

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *ITS1*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	1.25
2.5 mM dNTPs	2
10 µM Le-F	0.4
10 µM Le-R	0.4
<i>Taq</i> polymerase (5U/ µl)	0.2
DNA template	2
dH ₂ O	16.25
รวม	25

ตารางที่ 7 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *ITS1*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ (cycle)
1. Initial denaturation	95	5	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	0.30	40
- Annealing	53	1	
- Extension	72	1	
3. Final extension	72	7	1

3.4.5.3 การจำแนกสายพันธุ์ของจิ้งจกด้วยเทคนิคอนุชีววิทยา

3.4.4.3.1 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *Cytb*

การตรวจจำแนกชนิดของจิ้งจก โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธีข้างต้น โดยทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะยีน *Cytb* โดยใช้ primer ที่จำเพาะ (ตารางที่ 8) ใช้สารละลายในสัดส่วนที่เหมาะสม (ตารางที่9) และทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *Cytb* ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่10) เมื่อเสร็จเรียบร้อยทุกขั้นตอนจึงเก็บ PCR Product ไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน *Cytb* (32)

Primers	Sequences (5'-3')
<i>Cytb</i> -F	AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA
<i>Cytb</i> -R	AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA

ตารางที่ 9 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *Cytb*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	2.5
2.5 mM dNTPs	2
10 μM Le-F	0.4
10 μM Le-R	0.4
Taq polymerase (5U/ μl)	0.2
DNA template	2
dH ₂ O	15
รวม	25

ตารางที่ 10 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *Cytb*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ (cycles)
1. Initial denaturation	95	5	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	0.30	35
- Annealing	45	0.45	
- Extension	72	1	
3. Final extension	72	7	1

3.4.6 การวิเคราะห์ PCR product โดย Agarose gel electrophoresis

โดยการนำ PCR product มาผสม 6X loading buffer แล้วนำมาแยกบนแผ่นเจลโดยใช้วุ้น Agarose ความเข้มข้น 1.5% หลังจากนั้นใส่ DNA marker ขนาด 100 bp ลงไปในช่องที่เหลือ โดยวิธีการ gel electrophoresis จะรันด้วยไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 50 - 60 นาที หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย Ethidium bromide

ประมาณ 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า ประมาณ 3 ครั้ง แล้วนำเจลที่ได้เข้าเครื่องถ่ายภาพ เจลด้วยแสง UV (gel documentation) ปรับภาพให้เหมาะสมแล้วบันทึกภาพ โดยที่เชื้อ *Trypanosoma* ยีน SSU rRNA จะมีขนาดประมาณ 900 bp เชื้อ *Leishmania* ที่ตำแหน่ง *ITS1* มีขนาดประมาณ 379 bp และยีน *Cytb* ของจิ้งจก จะมีขนาดประมาณ 376 bp เมื่อเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 100 bp

3.4.7 การโคลนนิ่งยีนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.7.1 การเชื่อมต่อ PCR product กับ plasmid vector (DNA ligation)

เมื่อเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจได้แล้วจะนำ PCR product ที่ได้มาเชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy vector (Promega, USA) โดยส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 11 เมื่อนำสารละลายผสมด้วยกันทั้งหมดแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือที่ อุณหภูมิ 4 °C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง

ตารางที่ 11 แสดงส่วนประกอบและสัดส่วนของสารที่ใช้ในขั้นตอน DNA ligation

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
2X Rapid ligation buffer	2.5
pGEM -T easy vector	0.5
T4 DNA ligase	0.5
PCR product	1.5
รวม	5

3.4.7.2 การถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ Competent cells (transformation)

การนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์เริ่มจากการละลาย Competent cells (*Escherichia coli* ; DH5 alpha) โดยแช่ในน้ำแข็งเมื่อเซลล์ละลายจึงดูดแบ่งใส่หลอดที่มีพลาสมิดสายผสมที่เตรียมไว้หลอดละ 40 μl แล้วบ่มไว้ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิดสาย

ผสมเข้า Competent cells โดยกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 50 วินาที แล้วแช่ลงในน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที เติม SOC medium จนมีปริมาตรครบ 1000 µl แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 170 rpm อุณหภูมิ 37 °C นาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย x-gel ปริมาตร 40 µl และ IPTG ปริมาตร 40 µl มา spread ลงบน LB agar ที่ผสมยา ampicillin 100 mg/ml ให้ทั่วจนแห้งแล้วนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C รอไว้จนครบเวลาจะนำเซลล์ที่ได้มา spread บน LB agar ที่ได้เตรียมไว้จนทั่วแล้วนำไปเข้าสู่บ่มอุณหภูมิ 37 °C นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้แบคทีเรียเจริญเติบโต

3.4.7.3 การคัดเลือกโคโลนี *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม

จากคุณสมบัติของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy vector จะมียื่นต่อต้านยา ampicillin ดังนั้นเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดนี้สามารถเจริญได้บนอาหาร LB agar ที่มียา ampicillin ได้ จึงสามารถคัดเลือกเซลล์ *E. coli* ที่เจริญแล้วได้รับพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์ที่อาจปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้และคุณสมบัติของพลาสมิดนี้จะมีบริเวณ *LacZ* gene ซึ่งทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ galactosidase ที่ย่อยสลาย x-gel แล้วให้โคโลนีมีสีฟ้า โดยใช้คุณสมบัตินี้มาคัดเลือกเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ศึกษาได้ โดยเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนของยีนที่เราศึกษา สามารถแทรกเข้าไปในส่วนของยีน *LacZ* ทำให้ส่วนของยีน *LacZ* แยกออกจากกันจึงไม่สามารถทำงานและย่อย x-gal ได้ทำให้โคโลนีของเซลล์ *E. coli* เจริญในสีขาวในทางตรงกันข้ามเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่ไม่มีชิ้นส่วนของยีนที่ศึกษา ยีน *LacZ* จะยังคงทำงานและย่อย x-gal ได้ ทำให้โคโลนีเจริญเป็นสีฟ้า จึงสามารถคัดเลือกโคโลนีของเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมได้ จากนั้นเลือกโคโลนีสีขาวมาทำการยีนย่นผลโคลนด้วย PCR โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นแต่จะลดสัดส่วนของสารละลายที่ใช้เหลือปริมาณ 10 µl สุ่มเลือกโคโลนีที่มีสีขาวจำนวน 5 - 10 โคโลนี/เพลต มาตรวจสอบและทำ subculture โคโลนีดังกล่าวไว้บน LB agar สำหรับเป็นเพลตต้นแบบ (master plate) แล้วนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 - 6 ชั่วโมง จากนั้นนำ pcr product ที่ได้ในขั้นตอนนี้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส หากตรวจพบแถบ ดีเอ็นเอที่มีขนาดตามต้องการจะเขี่ยโคโลนีจากเพลตต้นแบบมาเลี้ยงในอาหาร LB broth ปริมาตร 8 ml และเติมยาแอมพิซิลลิน 100 mg/ml ปริมาตร 8 ml แล้วนำมาบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 170 rpm อุณหภูมิ 37 °C นาน 16 -18 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สำหรับนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นต่อไป

3.4.7.4 การสกัด Plasmid DNA

การสกัด Plasmid DNA โดยใช้ชุดทดสอบ Invisorb Spin Plasmid Mini two (invitek GmbH, Germany) เริ่มจากการปั่นตกเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 7000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งแล้วเติมสาร Solution A ปริมาตร 250 μ l ผสมไปเข้ากันด้วยการ Vortex เติมสาร Solution B ปริมาตร 250 μ l ผสมให้เข้ากัน ด้วยการดูดขึ้นลง 3 - 4 ครั้ง เติมสาร solution C ปริมาตร 250 μ l แล้วผสมให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 rpm นาน 5 นาที จะได้ส่วนใสแล้วเทลงในชุดตัวกรอง (spin column) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ ประมาณ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนที่ตกลงกัน หลอดทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 750 μ l เพื่อล้างตะกอนเซลล์นำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็ว 12000 rpm นาน 2 นาที เทส่วนใสทิ้งและปั่นแห้งชุดตัวกรองที่ความเร็ว 12000 rpm นาน 4 นาที จากนั้นย้ายชุดตัวกรองใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 mL. แล้วเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11000 rpm นาน 1 นาที จะได้สารละลายที่มี Plasmid DNA ออกมา จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดปริมาณและ ประเมินคุณภาพของ Plasmid DNA ที่ได้ก่อนส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Sequencing)

การนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Prima Scientific CO.,LTD เป็นบริษัทกลาง ในการจัดส่ง) ของแต่ละตัวอย่างที่แสดงค่าในรูปแบบกราฟ sequence electropherogram มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor version 7.2.6 โดยเลือกตัดเฉพาะ บริเวณที่เป็นลำดับ นิวคลีโอไทด์ของส่วนที่ศึกษาออกจากส่วน vector แล้วบันทึกในรูปแบบ fasta format สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3.4.8.1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ *ITS1*, *SSU rRNA* และ *Cytb* มาเปรียบเทียบ ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Nucleotide blast (BLASTN) เทียบกับ ฐานข้อมูล NCBI (Genbank) โดยผลการเปรียบเทียบความเหมือนจะถูกวิเคราะห์และแสดงค่า เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (percentage identities) ออกมา

3.4.8.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายพันธุ์

หลังการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดมา Align โดยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.2.6 เพื่อเปรียบเทียบและประเมินส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และบริเวณที่มีการผันแปร (variable region) ทำให้สามารถใช้บริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิงเพื่อเทียบหาความแตกต่างของบริเวณความผันแปรได้จากนั้นจะนำลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไปศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการต่อไป

3.4.9 การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

การศึกษาคือความสัมพันธ์ทางลำดับและวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต โดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม Molecular Evolution Genetic Analysis Version 7 (MEGA7) นำข้อมูลนิวคลีโอไทด์มาจัดลำดับจากระยะห่างทางพันธุกรรม (Distance method) โดยใช้ Neighbor Joining method ร่วมกับการจัดกลุ่มที่อาศัยลักษณะทางข้อมูลพันธุกรรม (Character-based method) โดยกำหนดแบบจำลองแบบ Maximum likelihood และตรวจสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติโดยใช้ Bootstrap test จำนวน 100 รอบ จากนั้นคำนวณตาม Algorithm แล้วสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการออกมา ซึ่งสามารถบอกถึงความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการและความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตได้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 จำนวนตัวอย่างและพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างจิ้งจก

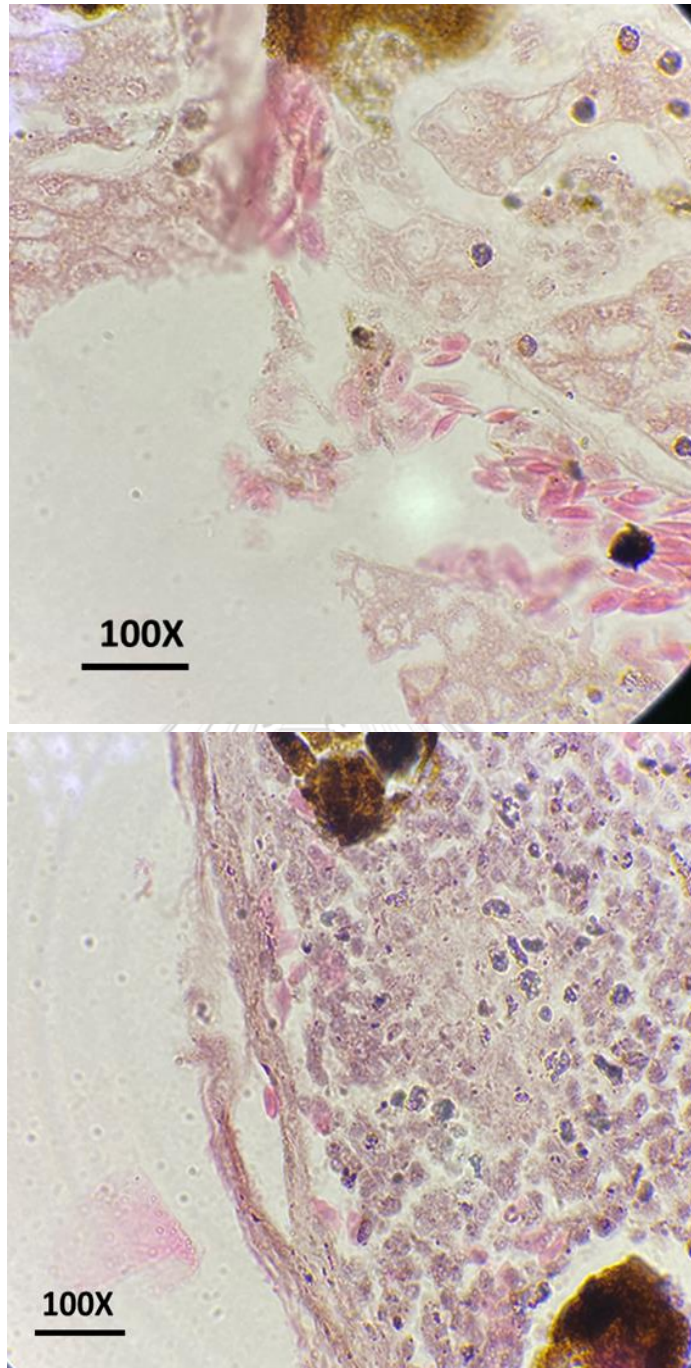
งานวิจัยนี้ทำการเก็บตัวอย่างจิ้งจกจากบ้านของผู้ป่วยโรคไลชมาเนีย จังหวัดสงขลาที่แสดงอาการทั้ง cutaneous และ visceral leishmania รวมทั้งคนในบ้านที่เป็น asymptomatic leishmania (21) อีกทั้งร้านฝอยทรายที่เก็บจากบ้านผู้ป่วยรายนี้เคยมีรายงานที่สามารถตรวจพบเชื้อไลชมาเนียและ ทริปปาโนโซมด้วย (22) จำนวนทั้งหมด 19 ตัวอย่างโดยใช้คนจับ และกำหนดรหัสตัวอย่างเป็น JJ1 – JJ19 โดยจิ้งจกแต่ละตัวได้ทำการผ่าชำแหละและนำอวัยวะทั้ง 3 ส่วน คือ ตับ ม้าม หัวใจ มาตรวจหาเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. รวมตัวอย่างทั้งหมด 57 ตัวอย่าง สำหรับในงานวิจัยนี้ได้นำเลือดของจิ้งจกมาทำ Blood smear ย้อมด้วยสี Giemsa พบว่า ไม่พบเชื้อ protozoa ในตัวอย่างจิ้งจกทั้งหมด

ตารางที่ 12 ตารางแสดงข้อมูลรหัสตัวอย่างและจำนวนจิ้งจกที่เก็บในจังหวัดสงขลา

ชนิดของตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	จำนวน (n=57)
ตับ	LJ1, LJ2, LJ3, LJ4, LJ5, LJ6, LJ7, LJ8, LJ9, LJ10, LJ11, LJ12, LJ13, LJ14, LJ15, LJ16, LJ17, LJ18, LJ19	19
ม้าม	SJ1, SJ2, SJ3, SJ4, SJ5, SJ6, SJ7, SJ8, SJ9, SJ10, SJ11, SJ12, SJ13, SJ14, SJ15, SJ16, SJ17, SJ18, SJ19	19
หัวใจ	HJ1, HJ2, HJ3, HJ4, HJ5, HJ6, HJ7, HJ8, HJ9, HJ10, HJ11, HJ12, HJ13, HJ14, HJ15, HJ16, HJ17, HJ18, HJ19	19

4.2 ผลการตรวจหาเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. ในตัวอย่างชิ้นเนื้อ โดยการย้อมสี hematoxylin & eosin

การตรวจเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp ในการศึกษานี้ ได้ใช้ตัวอย่างจากตับของจิ้งจกมาทำสไลด์สำหรับย้อมสี H&E เพียงอวัยวะเดียว เนื่องจาก ม้าม และหัวใจ มีขนาดเล็ก ไม่สามารถนำมาทำสไลด์ชิ้นเนื้อได้ โดยผลการดูชิ้นเนื้อจากตับของจิ้งจก พบว่าไม่พบเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. ที่เป็นระยะ amastigote ที่กำลังขยาย 100X

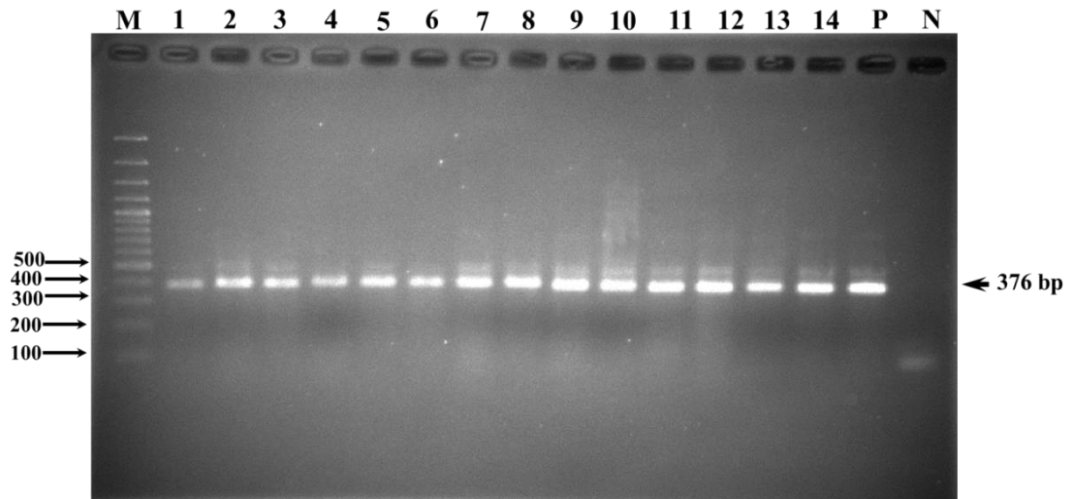


รูปที่ 13 แสดงการย้อมสี H&E ของชิ้นเนื้อตับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X

4.3 ผลการจำแนกชนิดของจีจกโดยใช้เทคนิค PCR

จากการจำแนกชนิดของจีจกด้วยด้วยเทคนิค PCR จาก DNA ที่สกัดจากจีจก โดยยีน Cytochrome b (cytb) โดยใช้ Primers คือ Cytb-F 5' -AAA-AAG-CTT-CCA-TCC-AAC-ATC-TCA-GCA-TGA-TGA-AA-3' และ Cytb -R 5' -AAA-CTG-CAG-CCC-CTC-AGA-ATG-ATA-TTT-

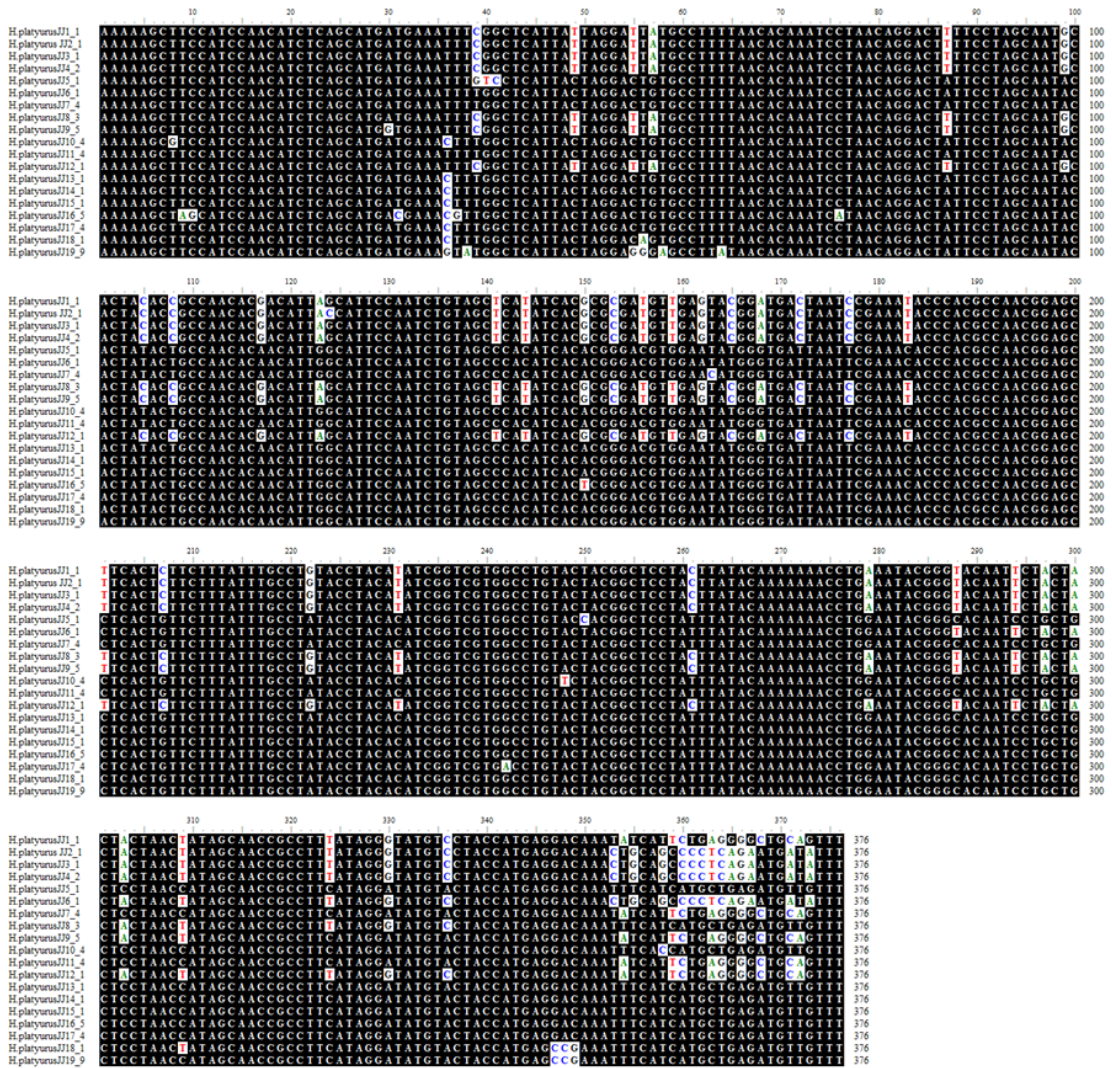
GTC-CTC-A-3' เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยใช้วิธี Gel electrophoresis จะพบ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 376 bp ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดงผลการจำแนกชนิดของจิ้งจกด้วยยีน *Cytb* ด้วยวิธี 1.5% agarose gel
 Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)
 Line P คือ positive control Lane N คือ Negative control
 Lane 1-14 PCR product ของตำแหน่งยีน *cytb* ของจิ้งจก

4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจิ้งจก

จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค Colony PCR และตรวจสอบด้วยวิธี Gel electrophoresis แล้วจากนั้นเลือกโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปและวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากนั้นทำการส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลี) โดยบริษัท เอ็มพี เคมีคอล ซัพพลาย จำกัด เป็นตัวแทนในการจัดส่ง หลังจากที่ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริษัทแล้ว จะทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการตัดส่วนของ insert gene และ vector ออกและพบว่าผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างจิ้งจกจะมีขนาดความยาว 376 bp



รูปที่ 15 แสดงผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *Cytb* ของจิ้งจก



4.5 ผลการขึ้นทะเบียนขอหมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *Cytb* ของจิ้งจก

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytb* ของจิ้งจก ได้ทำการยื่นขอหมายเลขขึ้นทะเบียน (Accession number) ของจิ้งจก ทุกตัว อย่างไรก็ตาม โดยใช้โปรแกรม BankIt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/>) เพื่อกรอกข้อมูลและเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *Cytb* ของจิ้งจก จากจังหวัดสงขลา ประเทศไทย ลงในฐานข้อมูลสากล Genbank โดยผลการขอหมายเลขขึ้นทะเบียนของตัวอย่างทั้งหมด 19 ตัวอย่าง

ตารางที่ 13 แสดงผลการขึ้นทะเบียนขอหมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *Cytb* ของจิ้งจก

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	สายพันธุ์	Accession No.
1	JJ1	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635549
2	JJ2	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635550
3	JJ3	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635551
4	JJ4	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635552
5	JJ5	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635553
6	JJ6	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635554
7	JJ7	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635555
8	JJ8	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635556
9	JJ9	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635557
10	JJ10	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635558
11	JJ11	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635559
12	JJ12	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635560
13	JJ13	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635561
14	JJ14	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635562
15	JJ15	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635563
16	JJ16	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635564
17	JJ17	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635565
18	JJ18	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635566
19	JJ19	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635567

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytb* ของจิ้งจกกับฐานข้อมูล GenBank

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการตัดส่วนของ insert gene และ vector ออกแล้วจะนำมาเปรียบเทียบดูความคล้ายคลึงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytb* ของจิ้งจกกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ซึ่งโปรแกรมจะแสดงค่าความเหมือนเป็นเปอร์เซ็นต์และความคล้ายคลึง (Percentage identity) โดยพบว่าจากตัวอย่างของจิ้งจกทั้งหมด 19 ตัวอย่าง มีค่ามีค่า % identity ระหว่าง 87.09-100% (เฉลี่ย 92.33%) โดยที่ตัวอย่างจิ้งจกทั้งหมดมีความเหมือนกับจิ้งจกสายพันธุ์ *Hemidactylus platyurus* (Accession no. EU268384)

ตารางที่ 14 แสดงผลการจำแนกชนิดของจิ้งจกที่เก็บจากจังหวัดสงขลา

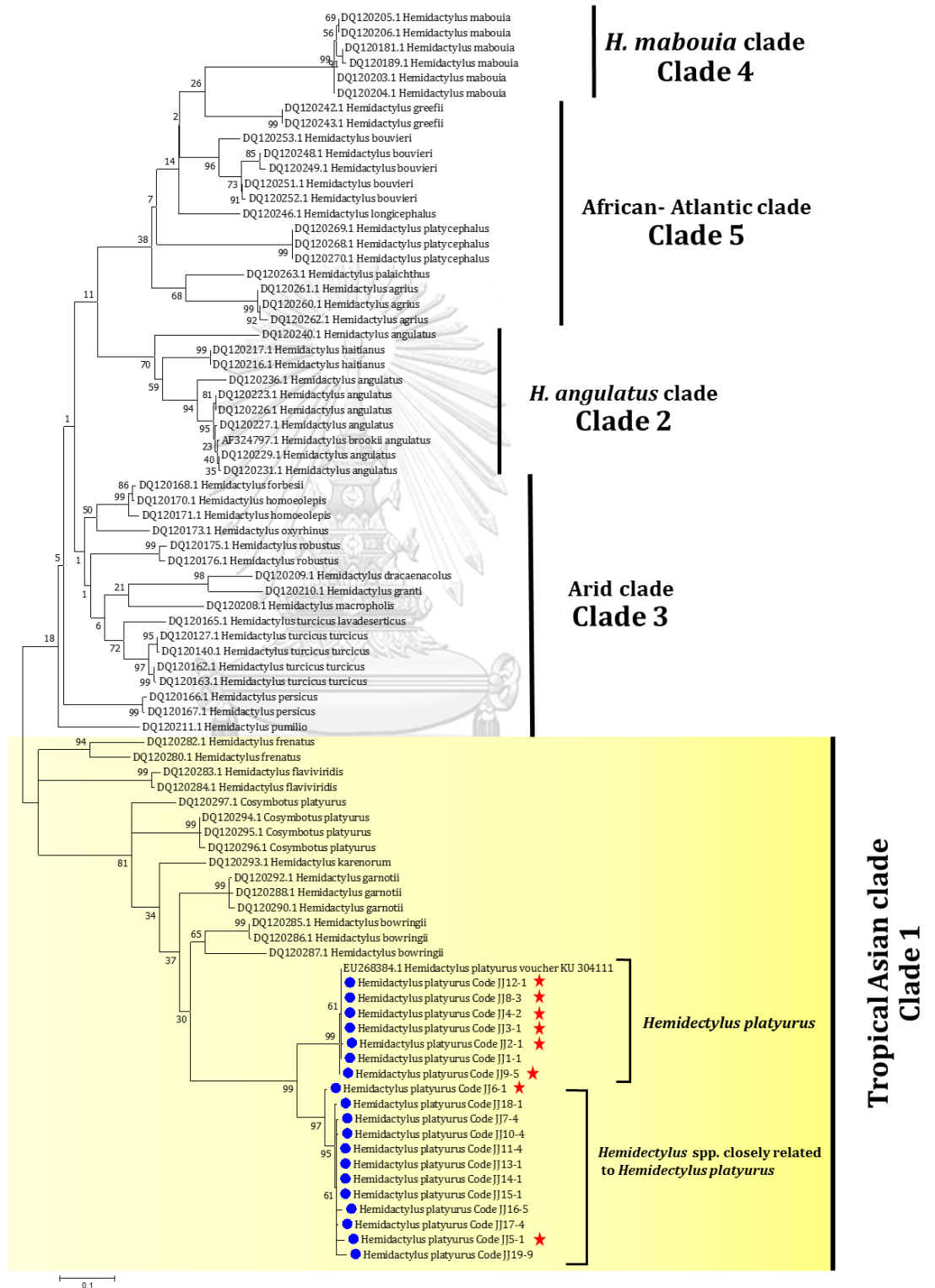
รหัส	product size	ชนิดของจิ้งจก	Accession No.	% identity	Ref. Accession No.
JJ1	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635549	100.00%	EU268384.1
JJ2	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635550	99.67%	EU268384.1
JJ3	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635551	100.00%	EU268384.1
JJ4	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635552	100.00%	EU268384.1
JJ5	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635553	87.67%	EU268384.1
JJ6	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635554	90.85%	EU268384.1
JJ7	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635555	87.58%	EU268384.1
JJ8	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635556	100.00%	EU268384.1
JJ9	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635557	99.02%	EU268384.1
JJ10	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635558	87.58%	EU268384.1
JJ11	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635559	87.91%	EU268384.1
JJ12	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635560	100.00%	EU268384.1
JJ13	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635561	87.91%	EU268384.1
JJ14	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635562	87.91%	EU268384.1
JJ15	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635563	87.91%	EU268384.1
JJ16	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635564	87.75%	EU268384.1
JJ17	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635565	87.58%	EU268384.1
JJ18	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635566	87.91%	EU268384.1
JJ19	376	<i>Hemidactylus platyurus</i>	MN635567	87.09%	EU268384.1

4.7 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของจิ้งจก

การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cytb* ของจิ้งจกทุกตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม MEGA7 โดยใช้ maximum-likelihood method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Hasegawa – Kishino – Yano (HKY) model และใช้ bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ โดยทำการเปรียบเทียบกับ reference sequence ของจิ้งจกสายพันธุ์ต่างๆ จากฐานข้อมูล GenBank

จากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของตัวอย่างจิ้งจกจากยีน *cytb* เมื่อทำการเปรียบเทียบกับจิ้งจกสายพันธุ์ต่างๆ จากฐานข้อมูล Genbank พบว่าตัวอย่างจิ้งจกมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับจิ้งจกสายพันธุ์ *Hemidactylus platyurus* (acc no. KU304111) หรือที่เรียกโดยทั่วไปว่า

จิ้งจกบ้าน หรือจิ้งจกหางแบน โดยจิ้งจกในสายพันธุ์ *Hemidactylus platyurus* ซึ่งรวมถึงตัวอย่างจิ้งจกในการศึกษานี้จัดอยู่ในกลุ่ม Tropical Asian clade (Clade1)



รูปที่ 16 แสดง Phylogenetic tree เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของจิ้งจก จากยีน *Cytb*

4.8 ผลการตรวจหาเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp.

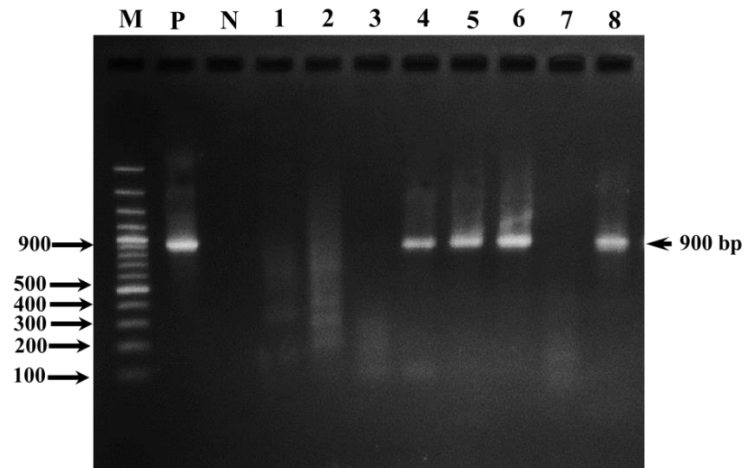
ผลการตรวจหาเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. ในจิ้งจกโดยการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในตัวอย่างทั้งหมดโดยทำการย้อมสี Geimsa และ Hematoxylin and eosin ของเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ซึ่งในงานวิจัยนี้ตรวจไม่พบเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp.

ตารางที่ 15 สรุปผลการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ เชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp.

อวัยวะของจิ้งจก	จำนวนตัวอย่าง	Hematoxylin and eosin
หัวใจ	19	ND
ตับ	19	ND
ม้าม	19	ND
Total	57	0

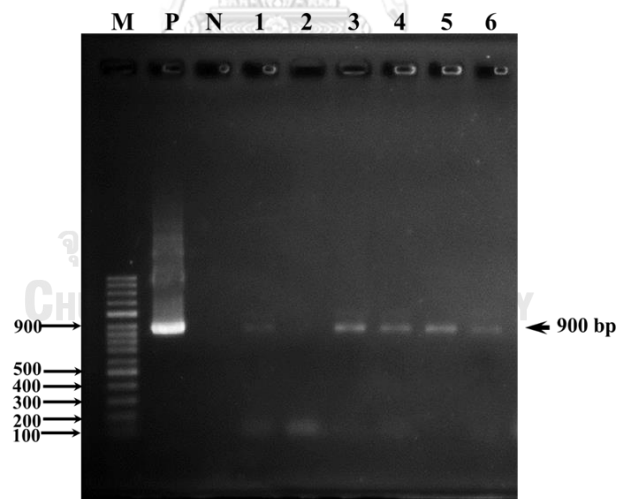
ND = not detected

ผลการตรวจหาเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. ในจิ้งจกด้วยเทคนิค PCR จาก DNA ที่สกัดจาก ตับ ม้าม และหัวใจ จำนวน 57 ตัวอย่าง โดยในงานวิจัยนี้ตรวจไม่พบเชื้อ *Leishmania* spp. ในตัวอย่างที่สกัดจากอวัยวะทั้งหมดโดยใช้ Primers คือ Le-F 5'-TCC-GCC-CGA-AAG-TTC-ACC-GAT-A-3' และ Le-R 5'-CCA-AGT-CAT-CCA-TCG-CGA-CAC-G-3' แต่สามารถตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในอวัยวะของจิ้งจกด้วย โดยใช้ Primers คือ TRY927F 5'-GAA-ACA-AGA-AAC-ACG-GGA-G-3' และ TRY927R 5'-CTA-CTG-GGC-AGC-TTG-GA-3' ที่จำเพาะกับยีน *SSU rRNA* เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยใช้วิธี Gel electrophoresis จะเห็น PCR product ที่มีขนาดประมาณ 900 bp ดังแสดงในรูปที่ 17 และ 18



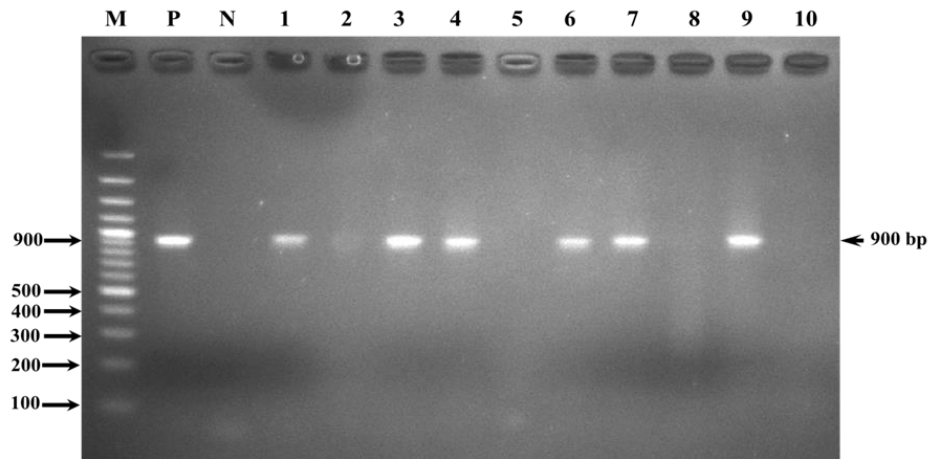
รูปที่ 17 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma* spp. ใน DNA ของหัวใจจิ้งจกบนตำแหน่งยีน *SSU rRNA* ด้วย 1.5% agarose gel

Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder) Lane P คือ positive control, Lane N คือ Negative control, Lane 1-8 คือตัวอย่างหัวใจจิ้งจก



รูปที่ 18 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma* spp. ใน DNA ของตัวจิ้งจกบนตำแหน่งยีน *SSU rRNA* ด้วยด้วย 1.5% agarose gel

Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder) Lane P คือ positive control, Lane N คือ Negative control, Lane 1-6 คือตัวอย่างตัวจิ้งจก



รูปที่ 19 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma* spp. ใน DNA ของม้ามจิ้งจกบนตำแหน่งยีน *SSU rRNA* ด้วยด้วย 1.5% agarose gel

Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder) Lane P คือ positive control, Lane N คือ Negative control, Lane 1-6 คือตัวอย่างม้ามจิ้งจก

จากผลตารางที่ 16 จากการตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในอวัยวะต่าง ๆ ของจิ้งจก โดยสามารถตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* spp. จากตัวอย่างจิ้งจกทั้งหมด 9 ตัว ซึ่งประกอบด้วย ตัวอย่างหัวใจ ให้ผล positive จำนวน 4 ตัวอย่าง ตับให้ผล positive จำนวน 5 ตัวอย่าง และม้าม ให้ผล positive จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยรวมทั้งหมด 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 26.32%

ตารางที่ 16 สรุปผลการตรวจเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. ด้วยวิธี PCR

อวัยวะของจิ้งจก	จำนวน ตัวอย่าง	ITS1-PCR (<i>Leishmania</i> detection)	SSU rRNA-PCR (<i>Trypanosoma</i> detection)
หัวใจ	19	ND	5
ตับ	19	ND	4
ม้าม	19	ND	6
Total	57	0	15

ND = not detected

ตารางที่ 17 ผลการตรวจเชื้อ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* spp. ด้วยวิธี PCR จาก
อวัยวะต่าง ๆ ในจิ้งจกแต่ละตัว

จิ้งจก	อวัยวะ	<i>Leishmania</i>	<i>Trypanosoma</i>	จิ้งจก	อวัยวะ	<i>Leishmania</i>	<i>Trypanosoma</i>
JJ1	SJ1	-	-	JJ10	HJ10	-	-
	LJ1	-	-		SJ11	-	-
	HJ1	-	-	JJ11	LJ11	-	-
JJ2	SJ2	-	+		HJ11	-	-
	LJ2	-	-	JJ12	SJ12	-	+
	HJ2	-	-		LJ12	-	+
JJ3	SJ3	-	+	JJ13	HJ12	-	-
	LJ3	-	+		SJ13	-	-
	HJ3	-	-	LJ13	-	-	
JJ4	SJ4	-	+	JJ14	HJ13	-	-
	LJ4	-	+		SJ14	-	-
	HJ4	-	+	LJ14	-	-	
JJ5	SJ5	-	+	JJ15	HJ14	-	-
	LJ5	-	-		SJ15	-	-
	HJ5	-	+	LJ15	-	-	
JJ6	SJ6	-	+	JJ16	HJ15	-	-
	LJ6	-	-		SJ16	-	-
	HJ6	-	-	LJ16	-	-	
JJ7	SJ7	-	-	JJ17	HJ16	-	-
	LJ7	-	+		SJ17	-	-
	HJ7	-	-	LJ17	-	-	
JJ8	SJ8	-	-	JJ18	HJ17	-	-
	LJ8	-	+		SJ18	-	-
	HJ8	-	+	LJ18	-	-	
JJ9	SJ9	-	-	JJ19	HJ18	-	-
	LJ9	-	-		SJ19	-	-
	HJ9	-	+	LJ19	-	-	
JJ10	SJ10	-	-	HJ19	-	-	
	LJ10	-	-				

SJ → ม้าม LJ → ตับ HJ → หัวใจ

จากผลการตรวจพบ *Trypanosoma* spp. ในตารางที่ 17 โดยแยกตามอวัยวะที่ให้ผล positive พบว่าตัวอย่างรหัส JJ4 ให้ผล PCR positive ทั้ง 3 อวัยวะ (ม้าม ตับ และหัวใจ) โดยตัวอย่างรหัส JJ3 และ JJ12 ให้ผล PCR positive ที่เหมือนกันที่อวัยวะม้ามและตับ ตัวอย่างรหัส JJ5 ให้ผล PCR positive ที่อวัยวะ ม้าม และหัวใจ ตัวอย่างรหัส JJ8 ให้ผล PCR positive ที่อวัยวะ ตับ และหัวใจ และรหัสตัวอย่าง JJ2 (ม้าม) JJ6 (ม้าม) JJ7 (ตับ) และ JJ9 (หัวใจ) ให้ผล PCR positive เพียงตัวอย่างละ 1 อวัยวะ

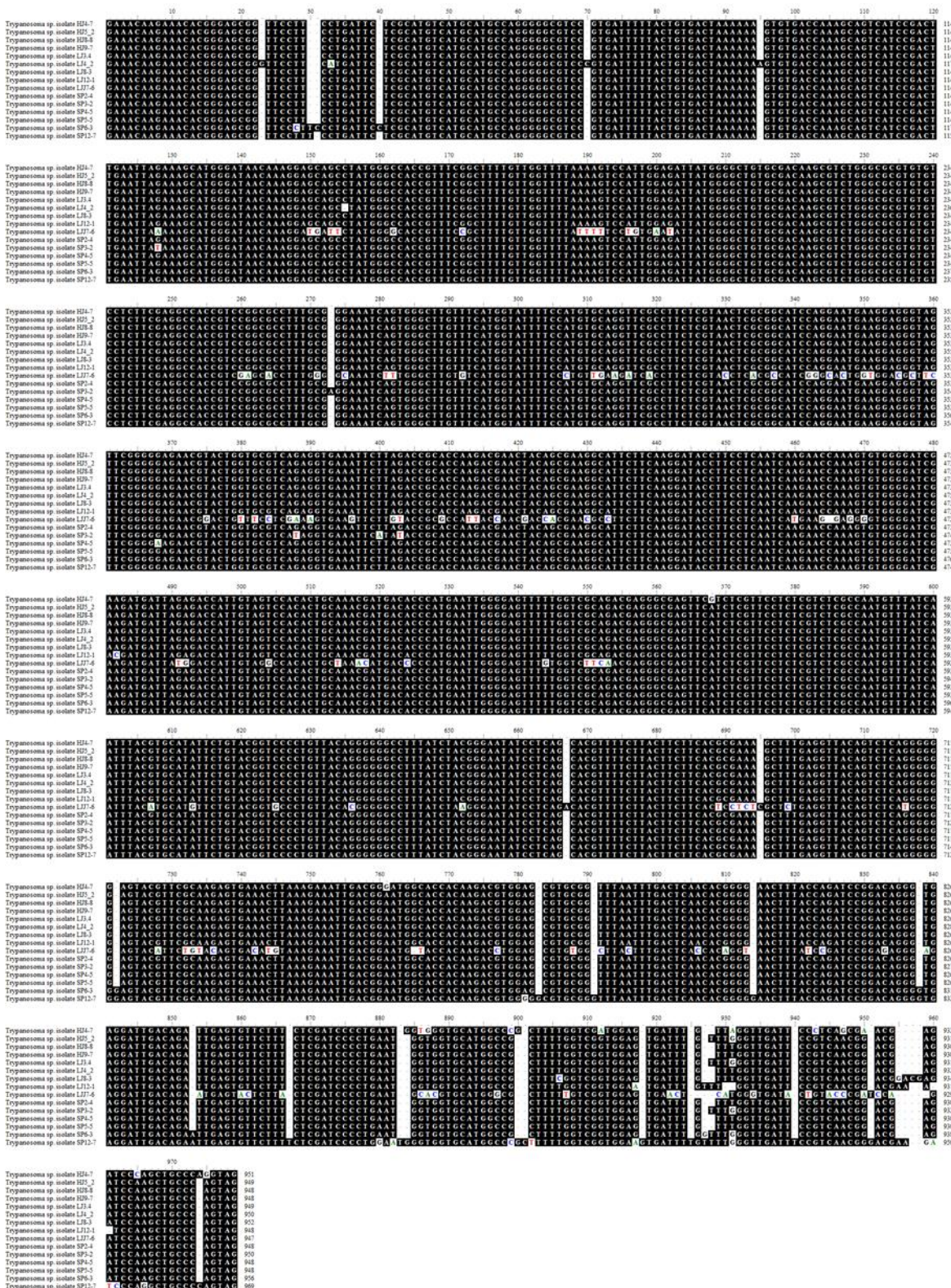
4.9 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. ใน DNA จากอวัยวะต่างๆ ของจิ้งจก

จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค Colony PCR และตรวจสอบด้วยวิธี Gel electrophoresis แล้วจากนั้นเลือกโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปและวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากนั้นทำการส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลี) โดยบริษัท เอ็มพี เคมีคอล ซัพพลาย จำกัด เป็นตัวแทนในการจัดส่ง หลังจากที่ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริษัทแล้ว จะทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการตัดส่วนของ insert gene และ vector ออกและพบว่าผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อ *Trypanosoma* spp. จะมีขนาดความยาวประมาณ 900 bp



รูปที่ 20 แสดงผลจาก sequencing ในรูปของกราฟ chromatogram ของยีน *SSU rDNA*

Trypanosoma spp.



รูปที่ 21 แสดงผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน SSU rRNA ของ *Trypanosoma* spp. ที่ตรวจพบในจิ้งก

4.10 ผลการขึ้นทะเบียนขอหมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *SSU rRNA* ของเชื้อ

Trypanosoma spp.

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SSU rRNA* ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. ได้ทำการยื่นขอหมายเลขขึ้นทะเบียน (Accession no.) ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. ทุกตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม BankIt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/>) เพื่อเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *SSU rRNA* ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. ที่สกัด DNA มาจากอวัยวะของจิ้งจกที่เก็บมาจากจังหวัดสงขลา ประเทศไทย ลงในฐานข้อมูลสากล GenBank โดยผลการขอหมายเลขขึ้นทะเบียนของตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงผลการขึ้นทะเบียนขอหมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *SSU rRNA* ของเชื้อ *Trypanosoma* spp.

รหัสตัวอย่าง	สายพันธุ์	Accession No.
HJ4-7	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629898
HJ5-2	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629899
HJ8-8	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629900
HJ9-7	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629901
LJ3-4	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629902
LJ4-2	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629903
LJ8-3	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629904
LJ12-1	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629905
LJ7-6	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629906
SJ2-4	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629907
SJ3-2	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629908
SJ4-5	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629909
SJ5-5	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629910
SJ6-3	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629911
SJ12-7	<i>Trypanosoma</i> spp.	MN629912

4.11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SSU rRNA* ของเชื้อ *Trypanosoma* กับฐานข้อมูล Genbank

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการตัดส่วนของ insert gene และ vector ออกแล้วจะนำมาเปรียบเทียบดูความคล้ายคลึงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SSU rRNA* ของ *Trypanosoma* spp. กับฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ซึ่งโปรแกรมจะแสดงค่าความเหมือนและความคล้ายคลึง (% identity)

จากผลการทำ BLASTN พบว่าจากตัวอย่างของเชื้อ *Trypanosoma* spp. ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง มีค่า % identity อยู่ระหว่าง 85.94-100% (เฉลี่ย 98.66%) โดยที่ตัวอย่างส่วนใหญ่มีความเหมือนกับเชื้อ *Trypanosoma* spp. (Accession No. MK603820) ที่ตรวจในแมลงรึ้นฝอยทรายสายพันธุ์ *Sergentomyia indica* และพบว่ามีบางตัวอย่างคือตัวอย่างรหัส SP6 (ตัวอย่างมาจากจังหวัดจันทบุรี JJ6) และตัวอย่างรหัส SP12 (ตัวอย่างมาจากจังหวัดจันทบุรี JJ12) เชื้อ *Trypanosoma* spp. ที่พบมีความเหมือนกับ *Trypanosoma* spp. (Accession No. MK603822) ที่ตรวจในแมลงรึ้นฝอยทรายสายพันธุ์ *Se. Khawi* ด้วย % identity 99.27% และ 98.25% ตามลำดับ และตัวอย่างรหัส HJ4 (ตัวอย่างตัดจากจังหวัดจันทบุรี JJ4) มีความเหมือนกับ *Trypanosoma* spp. (Accession No. MK603823) ที่ตรวจในแมลงรึ้นฝอยทรายสายพันธุ์ *Se. Khawi* ด้วย % identity 98.85% ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ผลแสดงการเปรียบเทียบเชื้อ *Trypanosoma* spp. กับฐานข้อมูล Genebank

code	Sample product size	Description	Accession no.	% Identity	Ref Accession no.	Suspected vectors
HJ4-7	951	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate BSKT4-3	MN629898	98.85	MK603823.1	<i>Se. khawi</i>
HJ5-2	949	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629899	99.89	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
HJ8-8	948	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629900	100.00	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
HJ9-7	948	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629901	100.00	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
LJ3-4	949	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629902	99.89	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
LJ4-2	950	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629903	99.47	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
LJ8-3	952	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629904	99.47	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
LJ12-1	948	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629905	99.68	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
LJJ7-6	947	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629906	85.94	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
SP2-4	948	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629907	100.00	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
SP3-2	950	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629908	99.37	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
SP4-5	948	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629909	99.89	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
SP5-5	948	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate CPLT1-2B	MN629910	100.00	MK603820.1	<i>Se. indica</i>
SP6-3	956	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate ASKT3-2	MN629911	99.27	MK603822.1	<i>Se. khawi</i>
SP12-7	969	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate ASKT3-2	MN629912	98.25	MK603822.1	<i>Se. khawi</i>

4.12 ผลการวิเคราะห์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์

การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ (Intraspecific variation) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบ (alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal W ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.0.5.3 จากนั้นทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ (Intraspecific variation) โดยเลือกโหมด Sequence identity matrix โดยผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ (Intraspecific variation) ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. พบว่าเปอร์เซ็นต์ Intraspecific variation เท่ากับ 0-15.7% ตารางที่ 20

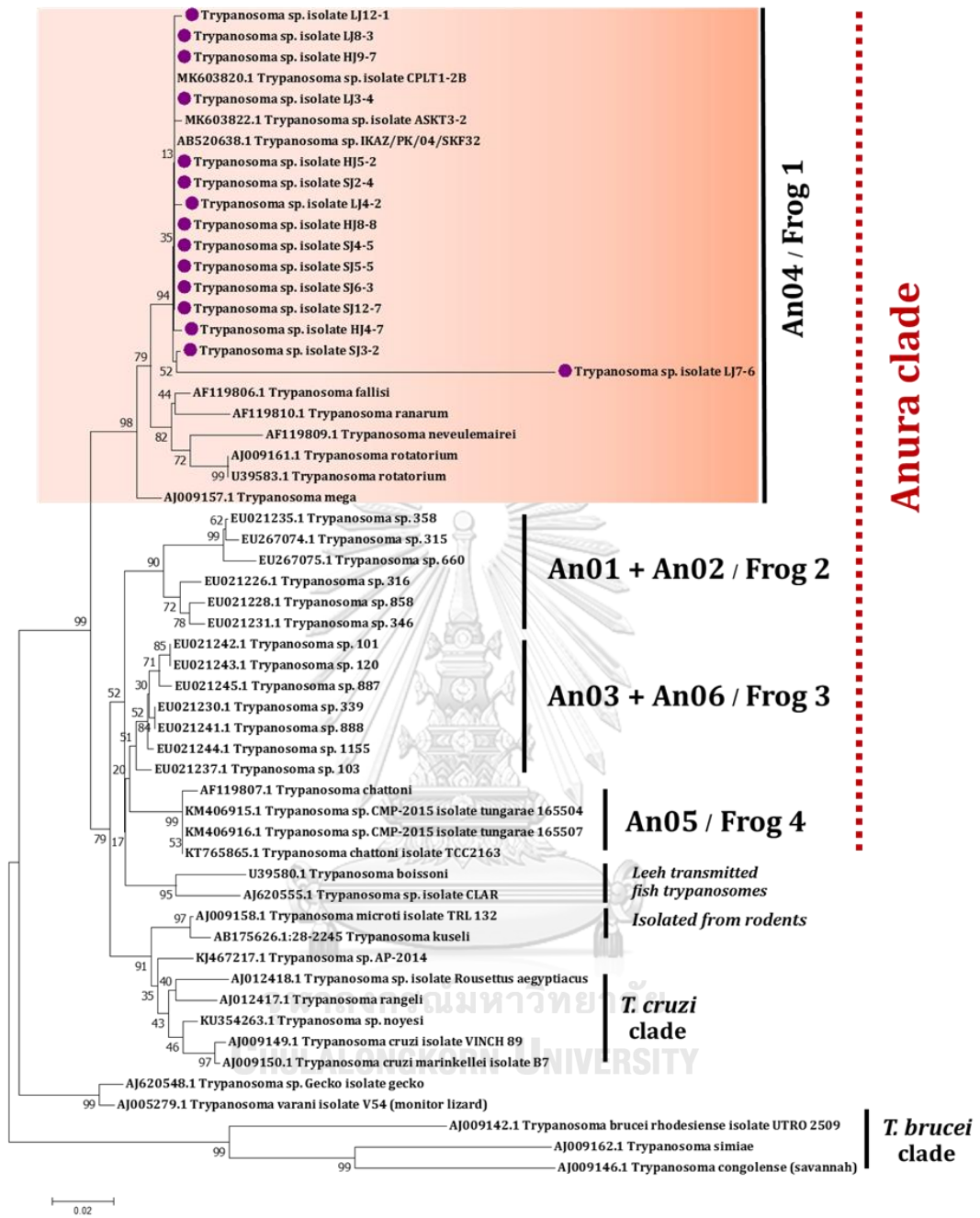
Seq->	HJ4-7	HJ5_2	HJ8-8	HJ9-7	LJ3.4	LJ4_2	LJ8-3	LJ12-1	LJ7-6	SP2-4	SP3-2	SP4-5	SP5-5	SP6-3	SP12-7
HJ4-7															
HJ5_2	1.7														
HJ8-8	1.6	0.3													
HJ9-7	1.6	0.3	0												
LJ3.4	1.7	0	0.3	0.3											
LJ4_2	2.1	0.8	0.6	0.6	0.8										
LJ8-3	2.1	0.8	0.6	0.6	0.8	1.1									
LJ12-1	2.6	1	1.1	1.1	1	1.6	1.3								
LJ7-6	15.7	14.9	14.7	14.7	14.9	15.1	15.1	15.5							
SP2-4	1.6	0.3	0	0	0.3	0.6	0.6	1.1	14.7						
SP3-2	2.3	0.6	0.8	0.8	0.6	1.3	1.3	1.5	15	0.8					
SP4-5	1.7	0.4	0.2	0.2	0.4	0.7	0.7	1.2	14.8	0.2	0.9				
SP5-5	1.6	0.3	0	0	0.3	0.6	0.6	1.1	14.7	0	0.8	0.2			
SP6-3	2.6	0.9	1.1	1.1	0.9	1.6	1.6	1.7	15.6	1.1	1.4	1.2	1.1		
SP12-7	4.2	3.2	3.5	3.5	3.2	4	3.7	3.1	7.6	3.5	3.8	3.6	3.5	3.1	

ตารางที่ 20 แสดงตัวอย่าง % Intraspecific variation ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. จากการทำ Sequence identity matrix

4.13 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

การสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. ทุกตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม MEGA7 โดยใช้ maximum-likelihood method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Kimura-2-Parameter model (K2P) และใช้ bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ โดยทำการเปรียบเทียบกับ reference sequence ของ *Trypanosome* สายพันธุ์ต่างๆ จาก Genbank

จากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของตัวอย่าง *Trypanosome* spp. เมื่อทำการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล GenBank พบว่าตัวอย่างรหัส LJ3-4, LJ4-2, LJ8-3, LJ7-6, LJ12-1, HJ4-7, HJ5-2, HJ8-8, HJ9-7, SJ2-4, SJ3-2, SJ4-5, SJ5-5, SP6-3, SP12-7 อยู่ในกลุ่ม *Trypanosoma* spp. เดียวกันที่มีความความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Trypanosoma* spp. ที่ตรวจพบในแมลงรื้อนฝอยทราย สายพันธุ์ *Se. indica* (Accession No. MK603820) และ *Se. khawi* (Accession No. MK603822) ที่พบในประเทศไทย และยังมีมีความความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Trypanosoma* spp. ที่ตรวจพบในแมลงรื้อนฝอยทราย สายพันธุ์ *Phlebotomus kazeruni* (Accession No. AB520638) ที่พบในประเทศปากีสถาน โดยเชื้อ *Trypanosoma* spp. ทุกตัวอย่างที่ตรวจพบในจิ้งจกจัดอยู่ในกลุ่ม An04/Frog1 ของ Anura clade ซึ่งเป็นกลุ่มของ *Trypanosoma* ที่สามารถพบได้ในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำโดยเฉพาะในกบ(รูปที่22)



รูปที่ 22 แสดง Phylogenetic tree เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของ *Trypanosoma* spp. จากยีน *SSU rRNA* จากการใช้ Maximum likelihood method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma* และ *Leishmania* ในตัวอย่างจิ้งจกในพื้นที่แหล่งระบาดของโรค leishmaniasis ในประเทศไทยด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา (PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและจำเพาะสูง นิยมใช้ในการตรวจหาและระบุชนิดของเชื้อปรสิต แม้จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน (18) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า จิ้งจกอาจเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อปรสิตที่มีความสำคัญทางการแพทย์หลายชนิด เช่น ตัวไร หนอนลิ้น (tongue worm) พยาธิตัวดีด พยาธิใบไม้ พยาธิตัวกลม และเชื้อ *Leishmania* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการนำโรคจากสัตว์มาสู่คนได้ (33, 34) โรค leishmaniasis เป็นโรคติดต่อที่พบในประเทศเขตร้อน เกิดจากเชื้อปรสิต *Leishmania*(7) โดยปกติจะติดต่อโดยการกัดของแมลงพาหะ คือ รันฝอยทราย เป็นโรคที่พบได้ทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและคน สามารถติดต่อจากคนถึงคน และจากสัตว์ถึงคนได้(13) ซึ่งในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *L. orientalis* (14), *L. martiniquensis* (15) และ *L. donovani complex* (16) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค visceral และ cutaneous leishmaniasis มีจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาในประเทศไทยสะสมตั้งแต่ปี 1996 จนถึงปัจจุบัน จำนวนประมาณ 24 ราย โดยมีแหล่งระบาดอยู่ที่ภาคใต้ของประเทศไทย (17) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ารันฝอยทรายยังเป็นพาหะที่สำคัญของเชื้อ *Trypanosoma* (21, 22) โดยเชื้อปรสิตชนิดนี้ก่อให้เกิดโรค trypanosomiasis ในสัตว์เลี้ยง สัตว์ฟันแทะ วัว ควาย สัตว์ป่า ช้าง และเสือ (35) อย่างไรก็ตามมีรายงานในประเทศไทยแล้วถึงการติดเชื้อมา *T. lewisi* และ *T. lewisi-like* ในมนุษย์ (36, 37) ซึ่งถือว่ามีความสำคัญในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อปรสิตชนิดนี้ในมนุษย์และสัตว์ต่อไป

ในปัจจุบัน ประเทศไทยยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดว่าจิ้งจกเป็นแหล่งเก็บเชื้อ *Trypanosoma* และ *Leishmania* มีรายงานเพียงแค่ตรวจพบเชื้อปรสิตทั้งสองชนิดนี้ในแมลงรันฝอยทรายซึ่งเป็นพาหะที่สำคัญต่อการนำโรค leishmaniasis โดยในประเทศไทย มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* และ *Leishmania* ในรันฝอยทรายสายพันธุ์ต่างๆ เช่น จากการศึกษาของ Kanjanopas และคณะ ได้มีการตรวจพบ *L. orientalis* (เดิมชื่อ *L. siamensis*) ในรันฝอยทรายสายพันธุ์ *Sergentomyia (Neophlebotomus) gemmea* นอกจากนี้ Phumee และคณะได้รายงาน

การตรวจพบ *unkown Trypanosoma* DNA ครั้งแรกในแมลงรืนฝอยทรายสายพันธุ์ *Phlebotomus stantoni* (21) อีกทั้งยังมีการศึกษาล่าสุดของ Srisuton และคณะ กล่าวไว้ว่ามีการตรวจพบทั้งเชื้อ *Trypanosoma* และ *Leishmania* ในแมลงรืนฝอยทรายสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ ตรวจพบ *L. martiniquensis* ในแมลงรืนฝอยทรายสายพันธุ์ *Se. khawi* อีกทั้งตรวจพบ *T. noyesi* ในแมลงรืนฝอยทรายสายพันธุ์ *Se. anodontis* และสายพันธุ์ *Ph. Asperulus* อีกทั้งยังตรวจพบ 14 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* spp. ที่ยังไม่ได้ระบุสายพันธุ์ในแมลงรืนฝอยทรายสายพันธุ์ *Se. khawi, Se. indica, Se. anodontis, Ph. Asperulus* และ *Ph. betisi* (22) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *Trypanosoma* สามารถมีแหล่งรังโรคที่สำคัญในสัตว์หลายชนิด เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก ปลา หนู แกะ วัว กระต่าย สัตว์เลื้อยคลาน กบ และงู (2-6) ส่วนสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อ *Leishmania* นั้นมีการรายงานไว้ว่าเป็นสัตว์จำพวกสุนัข แมว วัว แพะ ม้า รวมถึงหนู (8-12, 26, 38, 39)จากรายงานที่ผ่านมากล่าวไว้ว่า สามารถตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* และ *Leishmania* จากอวัยวะต่างๆของสัตว์ที่ติดเชื้อปรสิตทั้งสองชนิดนี้โดยเฉพาะ ตับ ม้าม และหัวใจ และมีการศึกษาของ Chusri และคณะ กล่าวไว้ว่ามีการตรวจพบเชื้อ *L. martiniquensis* ในตับ เลือด และม้ามของหนูดำ (*Rattus rattus*) ซึ่งสรุปได้ว่าหนูดำอาจเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของเชื้อปรสิตชนิดนี้ และการตรวจพบเชื้อในอวัยวะเหล่านี้มีความสำคัญในการศึกษาและตรวจหาเชื้อในอวัยวะของสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคต่อไป (9)

ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บจิ้งจกทั้งหมด 19 ตัวอย่างจากบ้านของผู้ป่วยโรคลิชมาเนียที่จังหวัดสงขลา ซึ่งเคยมีรายงานผู้ป่วยที่แสดงอาการทั้ง cutaneous และ visceral leishmaniasis รวมทั้งผู้อาศัยที่พักในบ้านที่เป็น asymptomatic leishmaniasis (21) และมีรายงานวิจัยในพื้นที่เดียวกันนี้ที่สามารถตรวจพบ *L. martiniquensis* และ *Trypanosoma* spp. ในรืนฝอยทรายที่สงสัยว่าเป็น potential vector ของเชื้อดังกล่าวด้วย (22)

สำหรับการศึกษา histology ของการติดเชื้อ *Leishmania* และ *Trypanosome* ในชิ้นเนื้ออวัยวะของจิ้งจกด้วยการย้อมสี H&E พบว่า ไม่สามารถเห็นการติดเชื้อของเชื้อ protozoa ใดๆก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาการติดเชื้อในชิ้นเนื้อเพียงในตับเท่านั้น เนื่องจากหัวใจและม้ามมีขนาดเล็กไม่สามารถนำมาทำ slide ชิ้นเนื้อได้ สำหรับตรวจสอบการติดเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X โดยกำลังขยายดังกล่าวอาจไม่เพียงพอสำหรับการเห็นตัวเชื้อที่มีการ evasive อยู่

ในเซลล์ของอวัยวะนั้นๆหรือ เทคนิคที่ใช้ย้อมอาจมี sensitivity ไม่เพียงพอ จากงานวิจัยของ Frickmann H et al (2012) (40) ได้ใช้ เทคนิค fluorescence in situ hybridization (FISH) เพื่อตรวจหาเชื้อ *Leishmania* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อจาก cutaneous leishmaniasis และ ชิ้นเนื้อจาก visceral leishmaniasis ซึ่งว่าเป็นเทคนิคที่ทำให้เห็นตัวเชื้อได้ชัดเจน หรืออาจใช้เทคนิค Immunohistochemistry (41)

จากตัวอย่างทั้งหมด 57 ตัวอย่างซึ่งประกอบไปด้วย ตับ ม้าม และหัวใจ โดยนำมาทำการตรวจจำแนกสายพันธุ์ของจิ้งจกด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยา เนื่องจากการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจิ้งจกทำได้ยาก ซึ่งวิธีการทางอนุชีววิทยาจะเป็นวิธีที่สามารถใช้ในการยืนยันความถูกต้องสำหรับการจำแนกชนิดของจิ้งจก โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ยีน *Cytb* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย โดยเป็นยีนที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็น genetic marker สำหรับจำแนกชนิดของจิ้งจก เนื่องจากยีนดังกล่าวมีความความผันแปรระหว่างสายพันธุ์สูงแต่มีความผันแปรในสายพันธุ์เดียวกันต่ำ และยีนในไมโทคอนเดรียมีความนิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ในสัตว์จำพวกมีกระดูกสันหลัง และมีประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการจากแผนภูมิต้นไม้ทางพันธุกรรมและงานด้านนิติวิทยาศาสตร์อีกด้วย (42) (43) (44) จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytb* ของจิ้งจกในการศึกษานี้ แสดงการแบ่งกลุ่มของจิ้งจกได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความคล้ายคลึงกับจิ้งจกสายพันธุ์ *H. platyurus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิงที่พบในประเทศฟิลิปปินส์ (accession no. KU304111) และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับจิ้งจกสายพันธุ์ *H. Platyurus* ซึ่งอาจเป็นกลุ่มใหม่ที่แยกมาจาก *H. platyurus* สายพันธุ์เดิม อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถเปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytb* กับข้อมูลจิ้งจกในประเทศไทยได้ เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytb* ของจิ้งจกที่รายงานในประเทศไทย โดยงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกจิ้งจกด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยา โดยข้อมูลยีน *Cytb* ในงานวิจัยครั้งนี้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิงทางอนุชีววิทยาของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะสำหรับประเทศไทยต่อไป

จากผลการระบุชนิดของตัวอย่างจิ้งจกในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าจิ้งจกทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ *H. platyurus* หรือเรียกทั่วไปว่า จิ้งจกบ้านทางแบน โดยยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดว่าจิ้งจกสายพันธุ์นี้เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อ *Trypanosoma* spp. และ *Leishmania* spp. มาก่อน ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *Leishmania* spp. ในตัวอย่างทั้งหมด อาจมีสาเหตุมาจากจำนวน

ตัวอย่างจิ้งจกมีจำนวนไม่มากพอ ซึ่งจากการเก็บตัวอย่างจิ้งจกนั้นเก็บได้ทั้งหมด 19 ตัวอย่างและเก็บที่บ้านของผู้ป่วย leishmaniasis เพียงพื้นที่เดียว และจากงานวิจัยของ Srisuton et al (2019) (22) ตรวจพบเชื้อ *Leishmania* ในรีนฝอยทรายซึ่งเป็นพาหะนำเชื้อมากกว่าเพียง 2 ตัวอย่าง ดังนั้นสำหรับการศึกษาในครั้งต่อไป ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น และ อาจตรวจหาเชื้อ *Leishmania* ในสัตว์ชนิดอื่นที่คาดว่าจะเป็นสัตว์รังโรค เช่น สุนัข แมว ในพื้นที่เดียวกัน อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้พบว่า 15 ตัวอย่างตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma* spp. แบ่งออกเป็นหัวใจ 4 ตัวอย่าง ตับ 5 ตัวอย่าง และม้าม 6 ตัวอย่างคิดเป็น 26.32% ของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งพบว่ามีเพียงตัวอย่างเดียวคือจิ้งจกหัทส JJ4 ที่ให้ผล positive ทั้ง 3 อวัยวะ และยังพบว่าจากตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma* sp. ม้ามเป็นอวัยวะที่ให้ผล PCR positive มากกว่าอวัยวะอื่นๆ โดยจากงานวิจัยของ Silva Pereira et al, (2019) (45) ได้กล่าวไว้ว่าเชื้อ *Trypanosoma* sp. หลายสายพันธุ์ เช่น *T. brucei*, *T. cruzi*, *T. vivax*, *T. congolense* สามารถพบเชื้อได้ในระบบไหลเวียนเลือด (intravascular system) และนอกระบบเลือด (extravascular system) เช่น ระบบประสาทส่วนกลาง (CNS), หัวใจ ปอด ตับ ไต และม้าม โดยการพบเชื้อในอวัยวะนอกระบบเลือดช่วยให้เชื้อสามารถซ่อนตัวและทำให้สัตว์ที่ได้รับเชื้อเข้าไปสามารถเป็นรังโรคของเชื้อ โดยสามารถเพิ่มโอกาสในติดต่อเชื้อไปสู่สัตว์หรือคนได้ (46) (47, 48) (49, 50) โดยการตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* sp. ในสัตว์เลี้ยงคลานจำพวกจิ้งจก มีบางงานวิจัยกล่าวว่าจิ้งจกอาจมีความสามารถเป็นรังโรค โดนจากงานวิจัยของ Christensen HA et al (24) ได้ตรวจพบ *T. platydictyli* ในจิ้งจกบ้านสายพันธุ์ *H. frenatus* จากประเทศปานามา และจากการศึกษาของ Telford, S.R. (1995) (51) ได้พบว่า จิ้งจกสายพันธุ์ *Gekko gecko* เป็นโฮสต์ของ *T. gekkonis* ที่พบในประเทศไทย และจากงานวิจัยของ Viola et al (2008) (6) ได้ตรวจเชื้อ *Trypanosomes* ในงู กิ้งก่า และรีนฝอยทราย โดยพบเชื้อ *T. cascavelli* ในงู และพบ *T. varani* ในกิ้งก่าและพบ *Trypanosoma* spp. ในรีนฝอยทราย

จากการศึกษาโดย Phylogenetic tree จากยีน *SSU rRNA* ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. โดยตัวอย่างที่ให้ผล Positive ทั้งหมด 15 ตัวอย่างสามารถจัดกลุ่มอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *Trypanosoma* spp. ที่ตรวจพบในรีนฝอยทรายสายพันธุ์ *Ph. kazeruni* (accession no. AB520638) จากประเทศปากีสถาน และเชื้อ *Trypanosoma* spp. ที่ตรวจพบในรีนฝอยทรายสายพันธุ์ *Se. khawi* (accession no. MK603822) และ *Se. indica* (accession no. MK603820) จาก

พื้นที่ที่ทำการศึกษาดียวกัน ในภาคใต้ของประเทศไทย (22) โดยเชื้อ *Trypanosoma* spp. นี้ ได้จำแนกอยู่กลุ่ม Frog1 หรือ An04 ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. ที่พบในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ โดยเฉพาะในกบ (anuran or amphibian trypanosomes) อย่างไรก็ตามจากการศึกษา Phylogenetic tree จากยีน *SSUrRNA* โดยจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แบ่ง *Trypanosoma* spp. ที่เป็นกลุ่มของ anura clade ออกเป็น 6 กลุ่ม คือ An01 ถึง An06 (52) และจากงานวิจัยของ Bernal XE et al, (2016) (49) ได้ทำการจัดกลุ่มของ anura clade ใหม่เป็น 4 กลุ่ม โดยเรียกเป็น Frog 1 ถึง Frog 4 โดยพบว่า *trypanosoma* ในกลุ่ม Frog 1 (An04) และ Frog 3 (An03/An06) สามารถตรวจพบได้ในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เต่า ปลา และตุ่นปากเป็ด. โดยเชื้อในกลุ่มนี้จะติดต่อบลิ่งและริ้นฝอยทราย (52) (50)

จากการศึกษาครั้งพบว่า การตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในจิ้งจก มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อในริ้นฝอยทรายซึ่งสงสัยว่าอาจจะเป็นแมลงพาหะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในริ้นฝอยทรายสายพันธุ์ *Sergentomyia* อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจ blood meal หรือชนิดของเลือดที่แมลงพาหะดูดกินเข้าไป ซึ่งแมลงพาหะอาจจะดูดกินเลือดจากโฮสต์แล้วนำไปติดต่อสู่สัตว์หรือคนได้ โดยจากงานวิจัยของ Siripattanapipong S et al (2018) (53) ได้ทำการตรวจชนิดของเลือดจากริ้นฝอยทรายจากบริเวณบ้านของผู้ป่วย leishmaniasis พบว่าชนิดของเลือดที่พบคือเลือดคน และเลือดของจิ้งเหลนบ้าน จากริ้นฝอยทรายสายพันธุ์ *S. iyengari* โดยจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า *Sergentomyia* จะดูดกินสัตว์เลือดเย็นเป็นหลักโดยเฉพาะสัตว์เลื้อยคลานขนาดเล็ก เช่น จิ้งจก และจากการศึกษาที่ผ่านมา รายงานว่าริ้นฝอยทรายสายพันธุ์ *Se. (Neophlebotomus) gemmea* มีความสัมพันธ์กับสัตว์หลายชนิด ทั้งสัตว์เลื้อยคลาน เช่น กิ้งก่า จิ้งจก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น วัว แมว และสุนัข (54) เพราะฉะนั้นในการศึกษาเพิ่มเติมควรทำการตรวจชนิดของเลือดในริ้นฝอยทรายเพราะจะได้ทราบถึง host-vector interaction ต่อไป

อย่างไรก็ตามการพบเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในอวัยวะที่แตกต่างกันของการศึกษานี้ยังตอบไม่ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อ *Trypanosoma* spp. ที่อยู่ในกลุ่ม anura clade มาก่อน เพราะฉะนั้นการศึกษาเพิ่มเติมคือการแยกเชื้อจากตัวอย่างชิ้นเนื้อหรือเลือดของจิ้งจกเพื่อนำมาเพราะเลี้ยงจะช่วยให้ทราบและสนับสนุนการศึกษาวงจรชีวิตของการติดเชื้อ *Trypanosoma* spp. และการศึกษาทำให้ทราบถึงความสามารถจิ้งจกที่อาจเป็นรังโรคของเชื้อ

ปรสิตชนิดนี้ ในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรค leishmaniasis ในทางภาคใต้ของประเทศไทย และทำให้ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของจิ้งจก ซึ่งยังมีรายงานที่ไม่มากนักในประเทศไทย อีกทั้งยังสามารถนำความรู้ในการศึกษาครั้งนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อปรสิตในจิ้งจกต่อไป





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Bauer A, Good D. Phylogenetic systematics of the day geckos, genus, *Rhoptropus* (Reptilia: Gekkonidae), of south-western Africa. *Journal of Zoology*. 1996;238(4):635-63.
2. Cooper C, Clode P, Peacock C, Thompson R. Host-parasite relationships and life histories of trypanosomes in Australia. *Advances in parasitology*. 97: Elsevier; 2017. p. 47-109.
3. Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, et al. A Phylogenetic Lineage of Closely Related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) Sharing the Same Ecotopes in Brazilian Amazonia 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2008;55(5):427-35.
4. Lemos M, Morais DH, Carvalho VT, D'Agosto M. First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Parasitology*. 2008;94(1):148-51.
5. Njagu Z, Mihok S, Kokwaro E, Verloo D. Isolation of *Trypanosoma brucei* from the monitor lizard (*Varanus niloticus*) in an endemic focus of Rhodesian sleeping sickness in Kenya. *Acta tropica*. 1999;72(2):137-48.
6. Viola LB, Campaner M, Takata CS, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas R, et al. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. *Parasitology*. 2008;135(5):595-605.
7. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(3).
8. Bhattarai NR, Van der Auwera G, Rijal S, Picado A, Speybroeck N, Khanal B, et al. Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis, Nepal. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(2):231.
9. Chusri S, Thammapalo S, Silpapojakul K, Siriyasatien P. Animal reservoirs and potential vectors of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. *Southeast Asian Journal*

of Tropical Medicine and Public Health. 2014;45(1):13.

10. Mo'awia MH, Osman OF, El-Raba'a FM, Schallig HD, Elnaiem D-EA. Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. *Parasites & vectors*. 2009;2(1):26.
11. Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary parasitology*. 2005;129(3-4):219-27.
12. Savani ESMM, de Oliveira Camargo MCG, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Áuria SRN, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary parasitology*. 2004;120(3):229-33.
13. Singh N, Mishra J, Singh R, Singh S. Animal reservoirs of visceral leishmaniasis in India. *Journal of Parasitology*. 2013;99(1):64-7.
14. Jariyapan N, Daroontum T, Jaiwong K, Chanmol W, Intakhan N, Sor-Suwan S, et al. *Leishmania (Mundinia) orientalis* n. sp.(Trypanosomatidae), a parasite from Thailand responsible for localised cutaneous leishmaniasis. *Parasites & vectors*. 2018;11(1):351.
15. Chiewchanvit S, Tovanabuttra N, Jariyapan N, Bates M, Mahanupab P, Chuamanochan M, et al. Chronic generalized fibrotic skin lesions from disseminated leishmaniasis caused by *Leishmania martiniquensis* in two patients from northern Thailand infected with HIV. *British Journal of Dermatology*. 2015;173(3):663-70.
16. Thisyakorn U, Jongwutiwes, S., Vanichsetakul, P. . Visceral leishmaniasis: the first indigenous case report in Thailand. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;93(1):23-4.
17. Leelayoova S, Siripattanapibong S, Manomat J, Piyaraj P, Tan-Ariya P, Bualert L, et al. Leishmaniasis in Thailand: a review of causative agents and situations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2017;96(3):534-42.
18. Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995;8(1):113-30.
19. Carranza S, Arnold E. Systematics, biogeography, and evolution of *Hemidactylus* geckos (Reptilia: Gekkonidae) elucidated using mitochondrial DNA sequences. *Molecular*

phylogenetics and evolution. 2006;38(2):531-45.

20. Rebêlo JMM, Rodrigues BL, Bandeira MdCA, Moraes JLP, Fonteles RS, Pereira SRF. Detection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in the Brazilian Amazonia. *Journal of Vector Ecology*. 2016;41(2):303-8.

21. Phumee A, Tawatsin A, Thavara U, Pengsakul T, Thammapalo S, Depaquit J, et al. Detection of an unknown *Trypanosoma* DNA in a *Phlebotomus stantoni* (Diptera: Psychodidae) collected from southern Thailand and records of new sand flies with reinstatement of *Sergentomyia hivernus* Raynal & Gaschen, 1935 (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*. 2017;54(2):429-34.

22. Srisuton P, Phumee A, Sunantaraporn S, Boonserm R, Sor-Suwan S, Brownell N, et al. Detection of *Leishmania* and *Trypanosoma* DNA in Field-Caught Sand Flies from Endemic and Non-Endemic Areas of Leishmaniasis in Southern Thailand. *Insects*. 2019 Aug 2;10(8). PubMed PMID: 31382501. Pubmed Central PMCID: 6722825.

23. Desquesnes M, Holzmüller P, Lai D-H, Dargantes A, Lun Z-R, Jittaplapong S. *Trypanosoma evansi* and *surra*: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *BioMed research international*. 2013;2013.

24. CHRISTENSEN HA, TELFORD JR SR. *Trypanosoma thecadactyli* sp. n. from forest geckoes in Panama, and its development in the sandfly *Lutzomyia trinidadensis* (Newstead)(Diptera, Psychodidae). *The Journal of protozoology*. 1972;19(3):403-6.

25. Kazemi B. Isolation a lizard *Leishmania* promastigote from its natural host in Iran. *Journal of Biological Sciences (Pakistan)*. 2004.

26. Zhang J-R, Guo X-G, Liu J-L, Zhou T-H, Gong X, Chen D-L, et al. Molecular detection, identification and phylogenetic inference of *Leishmania* spp. in some desert lizards from Northwest China by using internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. *Acta tropica*. 2016;162:83-94.

27. Zhang J-R, Guo X-G, Chen H, Liu J-L, Gong X, Chen D-L, et al. Pathogenic *Leishmania* spp. detected in lizards from Northwest China using molecular methods. *BMC veterinary research*. 2019;15(1):446.

28. Luu VQ, Calame T, Nguyen TQ, Le MD, Ziegler T. Morphological and molecular

review of the Gekko diversity of Laos with descriptions of three new species. *Zootaxa*. 2015;3986(3):279-306.

29. Oluwafemi TA, Sowemimo OA, Bamidele AO. Parasitic infections of two species of lizard (*Hemidactylus frenatus* and *Mabuya quinquetaeniata*) from two cities in Southwest Nigeria. *Annual Research & Review in Biology*. 2017:1-13.

30. Noyes H, Stevens J, Teixeira M, Phelan J, Holz P. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia¹. *International Journal for Parasitology*. 1999;29(2):331-9.

31. Spanakos G, Piperaki E-T, Menounos PG, Tegos N, Flemetakis A, Vakalis NC. Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102(1):46-53.

32. Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86(16):6196-200.

33. Belova E. Reptiles and their importance in the epidemiology of leishmaniasis. *Bulletin of the World Health Organization*. 1971;44(4):553.

34. Hazreen AJ. Community structure and infection characteristics of metazoan parasites in house Geckos in Peninsular Malaysia/Hazreen Abdul Jabar: University of Malaya; 2017.

35. Milocco C, Kamyngkird K, Desquesnes M, Jittapalapong S, Herbreteau V, Chaval Y, et al. Molecular demonstration of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma lewisi* DNA in wild rodents from Cambodia, Lao PDR and Thailand. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2013;60(1):17-26.

36. Sarataphan N, Vongpakorn M, Nuansrichay B, Autarkool N, Keowkarnkah T, Rodtian P, et al. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (*Herpetosoma*) infection in a sick infant from Thailand. *Journal of medical microbiology*. 2007;56(Pt 8):1118.

37. Sim ST, Wiwanitkit V. Emerging human trypanosomiasis in Southeast Asia: A coming new threat. *J Nat Sci*. 2015;1:e29.

38. Handman E. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in parasitology*. 44: Elsevier;

1999. p. 1-39.

39. Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary parasitology*. 2002;106(3):181-91.

40. Frickmann H, Alnamar Y, Essig A, Clos J, Racz P, Barth TF, et al. Rapid identification of *Leishmania* spp. in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples by fluorescence in situ hybridization. *Tropical Medicine & International Health*. 2012;17(9):1117-26.

41. Eyzaguirre E, Haque AK. Application of immunohistochemistry to infections. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2008;132(3):424-31.

42. Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M, Steinlechner M. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International journal of legal medicine*. 2000;114(1-2):23-8.

43. Harrison RG. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*. 1989;4(1):6-11.

44. Galtier N, Nabholz B, Glémin S, Hurst G. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*. 2009;18(22):4541-50.

45. Silva Pereira S, Trindade S, De Niz M, Figueiredo LM. Tissue tropism in parasitic diseases. *Open biology*. 2019;9(5):190036.

46. Suankratay C, Suwanpimolkul G, Wilde H, Siriyasatien P. Autochthonous visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus (HIV)-infected patient: the first in Thailand and review of the literature. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010;82(1):4-8.

47. Derakhshanfar A, Mozaffari A, Zadeh A. An outbreak of trypanosomiasis (Surra) in camels in the Southern Fars province of Iran: clinical, hematological and pathological findings. *Research Journal of Parasitology*. 2010;5(1):23-6.

48. Kato H, Uezato H, Sato H, Bhutto AM, Soomro FR, Baloch JH, et al. Natural infection of the sand fly *Phlebotomus kazeruni* by *Trypanosoma* species in Pakistan. *Parasites & vectors*. 2010;3(1):10.

49. Bernal XE, Pinto CM. Sexual differences in prevalence of a new species of

trypanosome infecting túngara frogs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2016;5(1):40-7.

50. Stevens J, Noyes H, Schofield C, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. 2001.

51. Telford SR. A review of trypanosomes of gekkonid lizards, including the description of five new species. *Systematic parasitology*. 1995;31(1):37-52.

52. Ferreira JIdS, da Costa AP, Ramirez D, Roldan JA, Saraiva D, Founier GFdS, et al. Anuran trypanosomes: phylogenetic evidence for new clades in Brazil. *Systematic Parasitology*. 2015;91(1):63-70.

53. Siripattanapipong S, Leelayoova S, Ninsaeng U, Mungthin M. Detection of DNA of *Leishmania siamensis* in *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *iyengari* (Diptera: Psychodidae) and molecular identification of blood meals of sand flies in an affected area, Southern Thailand. *Journal of medical entomology*. 2018;55(5):1277-83.

54. Suankratay C. Autochthonous Leishmaniasis: an emerging zoonosis in Thailand. *J Infect Dis Antimicrob Agents*. 2014;31(1):1-8.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	น.ส. ประพิมพร ตุ่นทอง
วัน เดือน ปี เกิด	12 พฤษภาคม 2538
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลสำโรงการแพทย์ จังหวัดสมุทรปราการ
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยรังสิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	249/278 ม.11 ต.คูคต อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี 12130



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY