บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

Trypanosoma evansi เป็นเชื้อโปรโตซัว ที่ถูกจัดลำดับทางอนุกรมวิธานไว้ดังนี้คือ

Phylum Protozoa

Subphylum Sarcomastigophora

Class Zoomastigophorea

Order Kinetoplastida

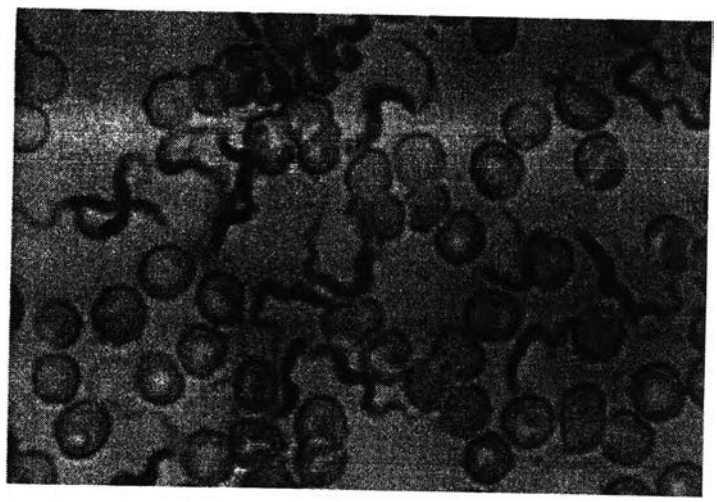
Family Trypanosomatidae

Genus *Trypanosoma*

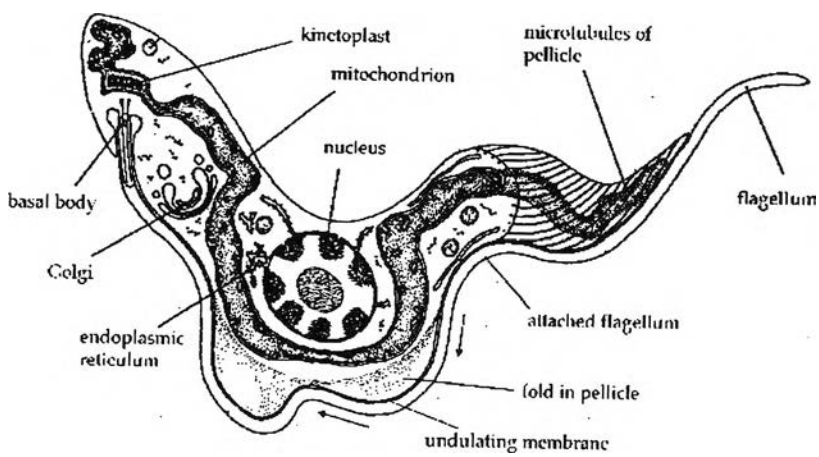
Subgenus *Trypanozoon*

T. evansi ถูกค้นพบโดย Griffith Evans ในปี ค.ศ. 1880 ในเลือดม้าและอูฐ (Hoare, 1972) ลักษณะโดยทั่วไปของ *T. evansi* คือ รูปร่างยาวเรียวคล้ายใบไม้ หรือเป็นแบบ trypomastigote form มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางตัว และ kinetoplast อยู่ทางด้านท้ายของลำตัว flagellum มี undulating membrane ยาวไปจนถึงด้านหน้าของตัว และมี free flagellum ยาว มีความยาวตลอดตัวระหว่าง 15-24 ไมครอน ดังรูปที่ 2.1 และ 2.2 โดยเชื้อ *T. evansi* อาศัยอยู่ในกระแสเลือด น้ำเหลือง และน้ำไขสันหลัง (Levine, 1985) การผ่านเชื้อของ trypanosome แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามการติดต่อของเชื้อ ดังนี้ กลุ่ม stercoraria เชื้อมีการเจริญอยู่ในแมลงพาหะและเชื้อจะออกมาพร้อมกับของเสียของแมลง เรียกการติดต่อแบบนี้ว่า contamination และเชื้อกลุ่ม salivaria มีการเจริญอยู่ในแมลงพาหะและเชื้อถูกปล่อยออกมาพร้อมกับน้ำลายของแมลง เป็นการติดต่อแบบ inoculation ซึ่ง *T. evansi* ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม salivaria เนื่องจากวงชีวิตของ *T. evansi* มีการผ่านเชื้อด้วยวิธี mechanical transmission โดยแมลงดูดเลือด ได้แก่ *Tabanus, Stomoxys, Haematopota* และ *Lyperosia* นอกจากนี้ในแถบตอนกลางและใต้ของทวีปอเมริกา พบว่าค้างคาวดูดเลือด (Vampire bat) ก็สามารถนำเชื้อ *T. evansi* ได้ โดยเชื้อ *T. evansi* ไม่มีการเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นระยะอื่นๆในพาหะนำโรค ซึ่งเชื้อ *T. evansi* ก่อให้เกิดโรคเซอรา (surra) หรือโรคทริปปาโนโซมิเอซิส (trypanosomiasis) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิดได้แก่ อูฐ ม้า ลา โค แพะ สุกร สุนัข กระบือ ช้าง และสัตว์ป่าอีกหลายชนิด (Hoare, 1972)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 ภาพถ่ายสไลด์เลือดหนูทดลองที่มีเชื้อ *T. evansi* ที่ย้อมด้วยสี 10% giemsa



รูปที่ 2.2 แสดง organelles ส่วนต่างๆของเชื้อ trypanosome

อาการทางคลินิค

อาการทางคลินิคของสัตว์ที่ได้รับเชื้อ *T. evansi* แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของสัตว์ อาการของม้าที่เป็นโรค Trypanosomiasis ได้แก่ มีไข้สูงเป็นระยะ ผอมแห้ง เบื่ออาหาร บวมน้ำบริเวณคอ สวาบ หน้าอก และขา โลหิตจาง และอาจมีเยื่อตาอักเสบ (เทพ, พีระศักดิ์ และมานพ, 2518) ส่วนอาการของสุกรที่ติดเชื้อ *T. evansi* นั้น ในสุกรแม่พันธุ์จะมีไข้ มีผื่นแดงบริเวณรอบหัวนม ราวนม ด้านข้างลำตัว ต้นขาหลัง รอบก้น และโคนใบหู และสุกรที่ตั้งท้อง 1-2 เดือนจะแท้งทุกตัว (วีระ, คัมภีร์ และพรเทพ, 2527) สุกรพ่อพันธุ์จะพบว่ามีผื่นแดงบริเวณอัณฑะ มีไข้ขึ้นๆลงๆ หอบ และบางตัวมีอาการทางประสาท (เอ็นดูและคณะ, 2527) ส่วนสุกรขุนจะแสดงอาการไม่เด่นชัด (เอ็นดูและสุรพงษ์, 2528) สำหรับอาการในโคและกระบือที่ติดเชื้อ *T. evansi* มักไม่แสดงอาการเด่นชัดหรือเป็นตัวอมโรค (Reservoirs) แต่มีบางรายงานกล่าวว่าโคและกระบืออาจแสดงอาการรุนแรงและก่อให้เกิดการแท้งลูกได้ (วรพลและคณะ, 2526; วิทยาและคณะ, 2528; อัมพวัน, สุกิจ และชาญ, 2530; อิทธิพลและคณะ, 2530) และยังมีรายงานในโคพื้นเมืองที่ติดเชื้อ *T. evansi* มีอาการทางประสาทร่วมด้วย (Tuntasuvan et al., 1997) นอกจากนั้นได้มีผู้ทำการศึกษา *T. evansi* 10 isolates จากโฮสต์ 3 ชนิด ได้แก่ ม้า สุนัข และ coati สามารถแบ่งเชื้อออกได้เป็น 2 กลุ่มตามความรุนแรง คือ กลุ่มที่มีความรุนแรงมาก (more virulence) และกลุ่มที่มีความรุนแรงน้อย (less virulence) และได้สรุปไว้ว่าความรุนแรงของเชื้อ *T. evansi* ไม่มีความสัมพันธ์กับชนิดของโฮสต์เลย (Queiroz, Cabello and Jansen, 2000)

การตรวจวินิจฉัย

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *T. evansi* มีหลายวิธีทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยการตรวจวินิจฉัยทางตรงได้แก่ การตรวจเลือดสด (fresh smear) การทำฟิล์มเลือดบาง (thin blood film) หรือฟิล์มเลือดหนา (thick blood film) ย้อมด้วยสี 10% Giemsa และ Haematocrit centrifuge technique นอกจากจะตรวจพบเชื้อ *T. evansi* ในเลือดสัตว์แล้ว ยังสามารถพบได้ในน้ำไขสันหลังอีกด้วย (Tuntasuvan et al., 1997) ส่วนการตรวจวินิจฉัยทางอ้อมนั้นทำได้หลายวิธีได้แก่ การฉีดเลือดสัตว์ที่สงสัยว่าติดเชื้อ *T. evansi* เข้าหนูทดลอง (mouse inoculation) การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อด้วยวิธี ELISA (enzyme linked immunosorbant essay) (ดรุณี และคณะ, 2539) การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (indirect immuno-fluorescence antibody test, IFAT) (สุรีย์และสุรพงษ์, 2538) การใช้เทคนิค DNA ตรวจสอบ (DNA probe) (Viseshakul and Punyim, 1990; Zhang and Baltz, 1994) และวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง โดย Wuyts และคณะ (1994) ได้ใช้วิธี PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *T. evansi* ในเลือดเพียง 10 ไมโครลิตร ทำให้มีผู้ทำการศึกษา

เปรียบเทียบการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR และกล้องจุลทรรศน์พบว่า วิธี PCR เป็นวิธีที่มีความไวมากกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Wyuts, Chokesajjawatee and Panyim, 1994; Ijaz et al., 1998; Halland et al., 2001) นอกจากนั้น Chansiri และคณะ (2002) ได้นำเอาวิธี PCR-ELISA มาใช้ เป็นวิธีที่นำเอาวิธี Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) มาตรวจหา PCR product ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจพบเชื้อ *T. evansi* เพียง 1 parasite ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร

การรักษา

โรค Trypanosomiasis สามารถป้องกันและรักษาได้ ซึ่งมียาหลายชนิดที่ใช้ และยังไม่มีวัคซีนที่สามารถป้องกันโรคนี้ได้ โดยยาแต่ละชนิดมีขนาดที่ใช้รักษา และวิธีการรักษาที่แตกต่างกันไป ยาที่ใช้ในประเทศไทยมีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ Diminazene aceturate (Berenil®) Isometamidium chloride (Samorin® หรือ Trypamidium®) และ Napthylamine sulphonate (Naganol®) (Tuntasuvan and Luckins, 1998)

การระบาดกับเทคนิคทางอณูชีววิทยา

โรค Trypanosomiasis หรือโรคเซอรา มีการกระจายอย่างกว้างขวางในประเทศที่อยู่ในเขตร้อนและเขตอบอุ่น รวมทั้งประเทศไทย (Hoare, 1972) ซึ่งมีรายงานการระบาดของเชื้อ *T. evansi* ทั้งใน ม้า (สนั่นรักษ์สัตว์, 2492; เทพและคณะ, 2518) โค (อัมพวันและคณะ, 2530; อิทธิพลและคณะ, 2530) กระบือ (วรพลและคณะ, 2526; วิทยาและคณะ, 2528) และสุกร (วีระและคณะ, 2527; เอ็นดูและคณะ, 2527; ชิต, อำนวยพร และรื่นฤดี, 2532) ความเสี่ยงของการติดเชื้อ *T. evansi* ขึ้นอยู่กับว่าในพื้นที่นั้นมีสัตว์ที่ติดเชื้ออยู่ และมีแมลงพาหะที่สามารถผ่านเชื้อได้ (Hoare, 1972)

ดังนั้นจึงมีการใช้ความรู้ทางด้านอณูชีววิทยามาอธิบายการเกิดการระบาดของเชื้อ *T. evansi* โดยหาความแตกต่างของ DNA ของเชื้อ *T. evansi* ของ isolate ที่แตกต่างกัน Watanapokasin และคณะ (1998) ได้ใช้วิธี Arbitrary Primered-PCR (AP-PCR) ทำให้ได้ DNA fingerprinting profiles ของเชื้อ *T. evansi* และสามารถใช้อธิบายการเกิดการระบาดของเชื้อ *T. evansi* ในฟาร์มโคนมที่จังหวัดสิงห์บุรี ว่าเกิดจากประชากรของเชื้อ *T. evansi* หลายประชากร และวิธี random amplified polymorphic DNA-PCR โดยใช้ DNA ของเชื้อ *T. evansi* isolate ที่มาจาก กระบือ ม้า และอูฐ ที่มาจากรัฐ Uttar Pradesh, Haryana และ Pajasthan ของประเทศอินเดีย พบว่ามี DNA polymorphism จากการใช้ primer AP1/AP3 และ primer AP1/AP2

(Omanwar et al., 2001) นอกจากนั้นยังมีวิธีการหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของ transferrin receptor ซึ่งถูกถอดรหัสพันธุกรรมจาก expression-site-associated gene (ESAGs) โดยยีน ESAG6 ที่ทำการศึกษานี้จัดอยู่ใน variant surface glycoprotein expression sites โดยทำการศึกษาในเชื้อ *T. evansi* ทั้งหมด 7 isolates ต่างโฮสต์กันจากประเทศไทย พบว่ามีความแตกต่างของข้อมูลลำดับเบสของ ESAG6 ของเชื้อต่าง isolate กัน ซึ่งอาจเกิดจากการปรับตัวในการอาศัยอยู่ในโฮสต์ที่แตกต่างกัน (Witola et al., 2005) นอกจากนั้นยังมีวิธีที่ยังไม่มีการศึกษาในเชื้อ *T. evansi* คือวิธี mobile genetic elements PCR (MGE-PCR) แต่ได้มีการศึกษาในเชื้อ *T. brucei* โดยสามารถใช้ MGE-PCR เป็นเครื่องมือในการติดตามสายพันธุ์ของเชื้อได้ และพบว่ามีความแตกต่างกันของเชื้อที่ติดต่อในคน และเชื้อที่ไม่ได้ติดต่อในคน และยังพบอีกว่าวิธี MGE-PCR เป็นประโยชน์ในการติดตามการติดเชื้อ *T. brucei* ในแต่ละกรณีอีกด้วย (Tilley et al., 2003) นอกจากนั้นยังมีการทดลองพบว่าการศึกษาระยะห่างระหว่าง RIME element ซึ่งเป็น mobile genetic element ด้วยวิธี MGE-PCR โดยใช้ single primer พบว่าสามารถแสดงถึงความแตกต่างภายในชนิดของเชื้อ *T. brucei* s.l. isolate ได้ และยังกล่าวอีกว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย เร็ว และมีประโยชน์ในการศึกษาความแตกต่างภายในชนิดของเชื้อ *T. brucei* s.l. isolate อีกด้วย (Simo et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวข้างต้นไม่สามารถที่จะนำมาหา mixed population ใน isolate ของเชื้อ *T. evansi* ได้

การใช้วิธีทางด้านอณูชีววิทยาเหล่านี้สามารถนำมาใช้ช่วยในการอธิบายและการศึกษาการเกิดการระบาดของเชื้อ *T. evansi* ได้ ซึ่ง DNA marker ที่ใช้ในการหาความแตกต่างภายในชนิด (intra-specific differentiation) ของเชื้อ *T. evansi* ได้มาจากทั้ง small subunit rRNA, minisatellites, microsatellites และอื่นๆ

Minisatellites

Minisatellites หรือ Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs) เป็น DNA ส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำๆกันเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีขนาด 1-5 Kb (กิโลเบส) ภายในมี unit ที่ซ้ำกัน 20-50 ซ้ำ แต่ละ unit มีความยาว 15-100 bp โดย minisatellites ในสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอาจมีจำนวน unit และความยาวระหว่าง unit ที่แตกต่างกันและสามารถตรวจสอบได้ ซึ่งความแตกต่างนี้ทำให้เกิด DNA fingerprint (Lodish et al., 2000) McLeod และคณะ (1999) ได้นำเอา hypervariable minisatellite markers (หรือ minisatellites DNA ที่มีความแตกต่างกันมาก) มาศึกษาโครงสร้างของประชากรของเชื้อ *T. brucei* ในแมลงพาหะ tsetse flies พบว่า 1 isolate ที่ทำการศึกษามี genotype ที่แตกต่างกันได้ถึง 7 genotypes แสดงว่า genotype ที่แตกต่างกันของ trypanosome เกิดจากการผสมกันของหลาย genotype และสามารถนำเอา minisatellite markers มาใช้ในการ

วิเคราะห์โครงสร้างของประชากรของเชื้อ *T. brucei* ได้ (population genetics) นอกจากนั้นยังสามารถที่จะแยก subspecies ระหว่างเชื้อ *T. brucei rhodensiense* ซึ่งก่อให้เกิดโรค African sleeping sickness ในคนและ *T. b. brucei* ซึ่งเป็น trypanosome ที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ได้ โดยใช้ minisatellite markers และใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรของทั้ง 2 subspecies ได้ (McLeod et al., 2000)

Ribosomal RNA gene

RNA ของสิ่งมีชีวิตมีด้วยกัน 3 ชนิด ซึ่งทำหน้าที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ ได้แก่ mRNA (messenger RNA), tRNA (transfer RNA) และ rRNA (ribosomal RNA) โดย mRNA จะนำข้อมูลทางพันธุกรรมจาก DNA ออกมาในรูปแบบของ three-base code หลังจากนั้น tRNA จะอ่าน three-base code สร้างเป็นสาย polypeptide และ rRNA จะทำหน้าที่โดยรวมตัวกับโปรตีนอื่นเพื่อสร้างเป็น ribosome ซึ่ง ribosome จะเคลื่อนไปบน mRNA และจับกับ tRNA ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ribosomes ประกอบด้วย large subunit และ small subunit โดย ribosomal subunit และ RNA มีหน่วยเป็น Svedbergs (S) ซึ่งวัดจากอัตราการตกตะกอนจากการปั่นเหวี่ยงมาตรฐาน โดยขนาดของ ribosomal subunit มีขนาดแตกต่างกันใน prokaryote cell และ eukaryote cell rRNA ของ สิ่งมีชีวิตพวก prokaryote ประกอบด้วย 23S 16S และ 5S rRNA ในขณะที่ rRNA ของสิ่งมีชีวิตพวก eukaryote ประกอบด้วย RNA 4 ชนิดได้แก่ 5S 5.8S 18S และ 28S rRNA (Lodish et al., 2001) ซึ่ง rRNA gene จะถูก transcribed ออกมาเป็น 45S pre-rRNA โดยจะผ่านกระบวนการต่อไปเพื่อให้ได้ 18S rRNA ของ 40S small ribosomal subunit และ 5.8S และ 28S rRNAs ของ 60S large ribosomal subunit ส่วน 5S rRNA จะถูก transcribed จากภายนอกนิวเคลียส และพบเป็นส่วนหนึ่งใน 60S large ribosomal subunit ในเซลล์ทุกเซลล์มี rRNA genes อยู่หลาย copies เช่น ใน genome ของคน มี gene ที่ encode 5.8S 18S และ 28S rRNAs มากถึง 200 copies และ gene ที่ encode 5S rRNA อยู่ประมาณ 2,000 copies ซึ่ง genes เหล่านี้จะมีลักษณะเป็น tandem โดยระหว่าง rRNA gene จะคั่นอยู่ด้วย nontranscribed spacer DNA rRNA gene มี ETS (external transcribed spacer) อยู่ที่ด้าน 5' และ 3' ของ gene และมี ITS (internal transcribed spacer) อยู่ระหว่าง 18S และ 5.8S rRNA gene และระหว่าง 5.8S และ 28S rRNA gene ดังรูปที่ 2.3 และ 2.4 (Cooper, 2000) และเนื่องจาก rRNA genes มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสช้าด้วยเหตุนี้จึงมักจะมีผู้ที่นำ rRNA genes มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและสร้างเป็น Phylogenetic tree ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (Campbell, Reece and Mitchell, 1999) ได้มีผู้ทำการศึกษาถึง substitution rate ของลำดับเบสของ 18S rRNA gene (SSU rRNA gene) ของสิ่งมีชีวิตใน genus *Plasmodium*

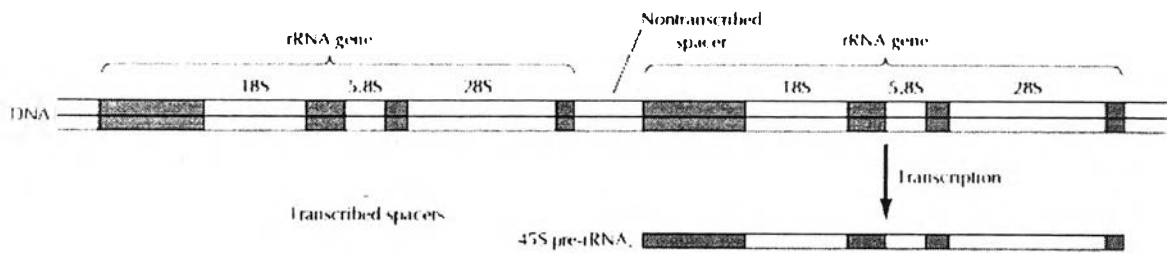
และ กลุ่ม Apicomplexa อื่นๆ ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรโตซัวเช่นเดียวกับเชื้อ trypanosome พบว่ามีค่า 0.85 % / 100 ล้านปี (MY, Million Year) (Escalante and Ayala, 1995) โดย rRNA gene ที่นำมาใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของ Trypanosome ได้แก่ SSU rRNA gene LSU rRNA gene (large subunit rRNA gene) และ ITS

การจัด phylogenetic tree โดย Maslov และคณะ (1996) ได้นำเอาลำดับเบสของ SSU rRNA gene และ ลำดับเบสบางส่วนของ large subunit rRNA gene ของ trypanosomes ในโฮสต์หลายชนิด ได้แก่ นก, สัตว์ครึ่งน้ำครึ่งบก, ปลากระดูกอ่อน (elasmobranch), ปลากระดูกแข็งที่อาศัยอยู่ในทะเล (marine teleost), ปลากระดูกแข็งที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด (freshwater teleost) และตัวแทนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมคือ *T. brucei* มาสร้าง phylogenetic tree พบว่า trypanosomes เป็น monophyletic group (สิ่งมีชีวิตทุกชนิดใน taxon เดียวกันมีวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน) และไม่มี co-evolution ระหว่าง trypanosome และโฮสต์ แต่พบว่าวิวัฒนาการของกลุ่ม Trypanosomatid เกิดจากแหล่งที่อยู่อาศัยของ host นอกจากนั้น Hagg, O'h Uigin และ Overath (1998) ได้ศึกษา phylogenetic ของ SSU rRNA gene ของ trypanosomes ชนิดต่างๆ พบว่า trypanosomes เป็น monophyletic group เช่นเดียวกับ Maslov และคณะ (1996) โดยแยกออกเป็น 2 สายคือ trypanosomes กลุ่ม salivarian และ กลุ่ม non-salivarian และประมาณเวลาการแยกจากกัน (divergence time) ของ trypanosomes ด้วยการประมาณเวลาตามเวลาในการวิวัฒนาการของ host และ Kawashita และคณะ(2001) ได้ทำการศึกษาวิวัฒนาการภายในชนิด (intraspecific evolution) ของเชื้อ *T. cruzi* ซึ่งก่อให้เกิดโรค Chaga's ในทวีปอเมริกา โดยใช้ลำดับเบสของ rRNA gene ทำให้สามารถแยกเชื้อออกได้เป็น 4 subgroups หรือ riboclades

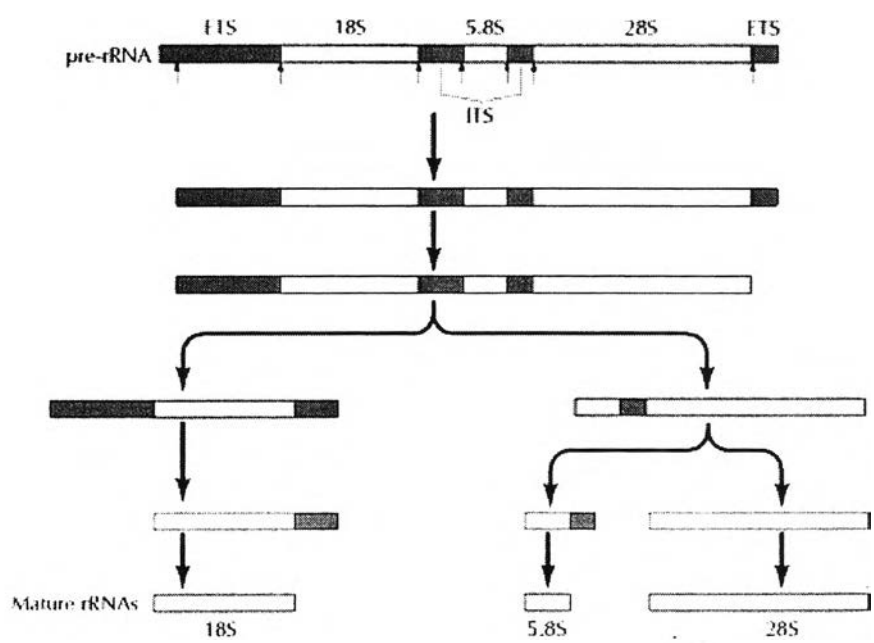
นอกจากนั้น internal transcribed spacer หรือ ITS นับเป็นส่วนหนึ่งใน small subunit rRNA gene ITS มี 2 ส่วนด้วยกัน คือ ITS-1 และ ITS-2 ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S, 5.8S และ 28S rRNA gene ตามลำดับ (Lodish et al, 2001) โดย Khuchareontaworn (2003) กล่าวว่าสามารถใช้ ITS1 เป็น genetic marker สำหรับใช้ในการศึกษาการระบาดของเชื้อ *T. evansi* ในประเทศไทยได้ นอกจากนั้น ITS ยังสามารถใช้เป็น genetic marker สำหรับศึกษาสายพันธุ์ของ *Trypanosoma rangeli* ทำการศึกษาเชื้อที่มาจากพื้นที่ต่างกัน และหาลำดับเบสทั้งในส่วนของ ITS-1, 5.8S rRNA gene และ ITS-2 พบว่าทั้ง 3 ส่วนนี้มี polymorphisms (Beltrame-Botelho, I.T. et al., 2005)

ดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่า phylogenetic relationship ที่แตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับความแตกต่างของจำนวนชนิดและจำนวนตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตที่นำมาศึกษาและยังขึ้นอยู่กับวิธีในการสร้าง phylogenetic ซึ่งมีให้เลือกใช้ได้หลายวิธี ดังนั้นการศึกษาโดยใช้ marker คือ small subunit

rRNA gene และ DNA fingerprint เพื่อประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายภายในชนิดของเชื้อ *T. evansi* ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทย การใช้ลำดับเบสของ 18S rRNA gene สามารถบอกถึงความจำเพาะของกลุ่ม Trypanosomatid และ DNA fingerprint สามารถบอกถึงความหลากหลายภายในชนิดของเชื้อ *T. evansi* ได้



รูปที่ 2.3 Ribosomal rRNA genes แต่ละ rRNA gene ประกอบด้วย 18S 5.8S และ 28S rRNA และ transcribed spacers (Cooper, 2000)



รูปที่ 2.4 กระบวนการของ pre-rRNA : โดย 45S ประกอบด้วย external transcribed spacer (ETS) อยู่บริเวณปลายทั้งสองข้าง และมี internal transcribed spacer (ITS) คั่นอยู่ระหว่าง 18S 5.8S และ 28S rRNA (Cooper, 2000)