บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *T. evansi* สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. การหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ITS1 และพบว่าเชื้อ isolate ที่ทำการศึกษาทั้งหมด 5 isolates สามารถแยกออกเป็น genotype ถึง 7 genotypes ทำให้สรุปได้ว่า NpI 8/2 เป็นเชื้อที่เสียคุณสมบัติของเชื้อที่ผ่านการโคลน เนื่องจากมี 3 genotypes จากการส่งตรวจหาลำดับเบส 3 พลาสมิด และ genotype f น่าจะเป็น genotype สามัญ (common genotype) ของเชื้อ *T. evansi* ที่พบได้ในประเทศไทยที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ และเชื้อถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันใน phylogenetic tree

2. การหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer 122-2 และ 122-3 พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของ DNA fingerprint ระหว่าง isolate ได้และจากการทดลองพบว่าเชื้อ isolate VPd03G และ VPd03R ซึ่งเป็นเชื้อที่มาจากสุนัขมีรูปแบบของ DNA fingerprint ที่เหมือนกัน และพบว่า isolate VPs มีรูปแบบของ DNA fingerprint ที่แตกต่างจากเชื้อ isolate อื่นๆที่ทำการศึกษา

3. ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ของลำดับเบสของ ITS1 กับ DNA fingerprint ของเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่ทำการศึกษา นอกจาก isolate VPs ที่มีทั้งลำดับเบสของ ITS1 และรูปแบบของ DNA fingerprint ที่แตกต่างจาก isolate อื่น

4. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อ *T. evansi* ในประเทศไทย ดูเหมือนว่า isolate VPs เป็นเชื้อที่มีวิวัฒนาการมานานกว่าเชื้อ isolate อื่น เนื่องจากเป็นเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่หน่วยปรสิตวิทยามาเป็นเวลานาน โดยพบว่ามี genotype ของ ITS1 ที่แตกต่างจากเชื้อ isolate อื่น (genotype h) และยังมีรูปแบบของ DNA fingerprint ที่แตกต่างจากรูปแบบของเชื้อ isolate อื่นที่ทำการศึกษาอีกด้วย

5. นอกจากนี้จากการทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธิ์ขึ้น และคัดเลือกตัวแทนจากการผ่านเชื้อทั้ง 3 ครั้ง มาทำการทดสอบหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene พบว่าเชื้อ isolate VPh03 ประกอบด้วย 4 genotype คือ f, g, j และ k โดยเชื้อที่เป็นตัวแทนจากการผ่านเชื้อทั้ง 3 ครั้ง มี genotype f เป็น genotype ร่วมกันเสมอ และจากการหาความแตกต่างของ

minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer 122-2 และ 122-3 พบว่าเชื้อ isolate VPh03 ซึ่งเป็นเชื้อตั้งต้น และเชื้อจากการผ่านเชื้อทั้ง 3 ครั้ง มี DNA fingerprint อยู่ 2 รูปแบบ

5.2 อภิปรายผล

ผลการหาลำดับเบสของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆ ในส่วนของ small subunit rRNA gene ช่วง 18S rRNA gene ITS1 และ 5.8S rRNA gene ความยาวประมาณ 510-511 คู่เบส ซึ่งครอบคลุมในช่วง ITS1 ทั้งหมด พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ลำดับเบสต่างๆอยู่ในช่วง ITS1 ส่วนช่วงของ 18S rRNA gene และ 5.8S rRNA gene ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากการตรวจหาลำดับเบสของ 18S rRNA gene และ 5.8S rRNA gene เป็นเพียงบางช่วงเท่านั้น และเมื่อนำเอาลำดับเบสที่ได้มาทำการ alignment เปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ใน GenBank ของเชื้อ *T. brucei* จำนวน 1 ข้อมูลและ *T. evansi* จำนวน 2 ข้อมูล สามารถจำแนกออกได้เป็น 9 genotype (a-i) โดยพบว่าเชื้อสายพันธุ์ NPI 8/2 มี genotype ที่แตกต่างกันออกไปถึง 3 genotype (c, d, e) จากข้อมูลลำดับเบสจากทั้ง 3 พลาสมิด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อสายพันธุ์ NPI 8/2 เสียคุณสมบัติของเชื้อสายพันธุ์ที่ผ่านการโคลน เนื่องจากมีประชากรเชื้อมากกว่า 1 ประชากรเชื้อ ในขณะที่ isolate VPs มี genotype เดียวคือ genotype h ซึ่งจากการทดลองฉีดเชื้อ *T. brucei* ให้หนูทดลอง (*Mus musculus*) พบว่าการฉีดเชื้อผ่านหนูทดลองมาเป็นเวลานานทำให้เกิดการคัดเลือกเชื้อที่มีความรุนแรงที่สามารถเพิ่มจำนวนในหนูทดลองได้ (Turner, C. M. R., Aslam, N. and Dye, D., 1995) เนื่องจากหนูทดลอง *M. musculus* ไม่ใช่โฮสต์ตามธรรมชาติของเชื้อ *T. evansi* และเชื้อ isolate VPh03 VPd03G และ VPd03R มี genotype f ร่วมกันทั้งๆที่เชื้อมาจากต่างโฮสต์กันคือ VPh03 เป็นเชื้อที่มาจากม้า และ VPd03G และ VPd03R เป็นเชื้อที่มาจากสุนัข แสดงว่ารูปแบบของ genotype ไม่มีความจำเพาะกับชนิดของโฮสต์

ข้อมูลลำดับเบสของ ITS1 สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาประชากรเชื้อภายในชนิดและเป็นข้อมูลในการศึกษาการระบาดของเชื้อ *T. evansi* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Khuchareontaworn (2003) พบว่าลำดับเบสของ 18S rRNA gene และ 5.8S rRNA gene นั้นมีความเหมือนกันในทุกสายพันธุ์ของเชื้อ *T. evansi* ที่พบในประเทศไทย และส่วน ITS2 พบว่ามีความหลากหลายของลำดับเบสแต่ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ phylogenetic tree ได้ ในขณะที่ลำดับเบสของ ITS1 มีความหลากหลายและสามารถนำมาใช้เป็น genetic marker ในการศึกษาการระบาดของเชื้อในประเทศไทยได้ ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาลำดับเบสในส่วน ITS ของเชื้อ *T. rangeli* ซึ่งพบความหลากหลายของลำดับเบสในส่วนของ ITS2 มากกว่า ITS1 และ 5.8S rRNA gene ตามลำดับ (Botelho-Beltrame et al., 2005)

เมื่อนำลำดับเบสทั้งหมดมาสร้าง phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกออกได้ 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *T. evansi* accession number U75507 และ *T. brucei* accession number AE017168 มีความคล้ายคลึงกันมากซึ่งจัดไว้เป็น genotype a กลุ่มที่ 2 ได้แก่ VPs ทั้ง 3 พลาสมิดเป็น genotype h กลุ่มที่ 3 คือ VPd03G_1 เป็น genotype i กลุ่มที่ 4 ได้แก่ VPd03G_2, VPd03G_3, VPd03R_1, VPd03_2, VPh03_1 และ VPh03_3 ทั้งหมดเป็น genotype f และกลุ่มที่ 5 ได้แก่ NpI8/2_1, NpI8/2_2, NpI8/2_3, VPh03_2, VPd03R_3 และ *T. evansi* accession number D89527 ซึ่งเป็น genotype c, d, e, g, g และ b ตามลำดับ จากข้อมูล phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่าข้อมูลลำดับเบสของ VPs ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมด (กลุ่มที่ 2) เช่นเดียวกันกับ NpI 8/2 ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 5 ทั้งหมด และแสดงให้เห็นว่า isolate VPs น่าจะมีวิวัฒนาการมานานกว่าเชื้อ isolate ที่ทำการศึกษาทั้งหมด

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่า genotype f น่าจะเป็น genotype หลักของเชื้อ *T. evansi* ที่พบในประเทศไทย นอกจากนั้นถึงแม้เชื้อ *T. evansi* ที่ทำการศึกษาจะถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ใน phylogenetic tree แต่ยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่พบในประเทศไทย และทำการศึกษายังคงถูกจัดอยู่ในกลุ่มใหญ่เดียวกันทั้งหมด ในขณะที่เชื้อ *T. evansi* accession number U75507 และ *T. brucei* accession number AE017168 ซึ่งเป็นข้อมูลลำดับเบสจาก GenBank ถูกแยกกลุ่มออกไป

ผลการหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer NV4 และ NV5 และปรับสภาวะของปฏิกิริยา PCR แล้วพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของ DNA fingerprint ของเชื้อแต่ละ isolate ได้ เนื่องจาก primer อาจเข้าเกาะกับ DNA template ไม่ดี จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ที่มีขนาดยาวได้ ดังนั้นจึงทำการออกแบบ primer 122-2 และ 122-3 ซึ่งมีขนาดสั้นลงคือ 10 และ 6 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ ทำให้ primer สามารถเข้าเกาะกับ DNA template ได้ดีขึ้น จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของ DNA fingerprint ของเชื้อแต่ละ isolate ได้ โดยพบว่า isolate VPs มี DNA fingerprint จากเชื้อ isolate อื่นมากที่สุด ในขณะที่ isolate VPd03G และ VPd03R ซึ่งเป็นเชื้อที่มากสุนัขมี DNA fingerprint ที่เหมือนกัน

วิธี minisatellite PCR นี้ มีความแตกต่างกับการหาความแตกต่างภายในชนิดด้วยวิธี AP-PCR (Watanapokasin et.al, 1998) และวิธี RAPD-PCR (Omanwar et. al, 2001) ซึ่งวิธีเหล่านี้ primer ที่ใช้ไม่ได้ออกแบบมาจากลำดับเบสที่พบบน chromosomal DNA โดยตรง ในขณะที่ primer 122-2 และ 122-3 ออกแบบมาจาก ลำดับเบสภายใน DNA ตรวจสอบ pTec.21 ที่มีขนาด 122 คู่เบส ซึ่งเป็น DNA ตรวจสอบที่ใช้ในการทำ hybridization ที่สามารถนำมาแยกความแตกต่าง

ภายในชนิดของเชื้อ *T. evansi* ได้ และพบว่า DNA ขนาด 122 คู่เบสนี้มีกระจายอยู่ใน chromosomal DNA ของเชื้อ *T. evansi* ซึ่งรายงานไว้โดย Viseshakul (1990)

วิธีการหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR นี้ เมื่อนำ DNA ของโฮสต์ชนิดต่างๆมาทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer 122-2 และ 122-3 พบว่าไม่มีแถบ DNA เกิดขึ้น ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่นำไปศึกษาการระบาดของเชื้อ *T. evansi* และสามารถนำไปใช้กับตัวอย่างเลือดของสัตว์ที่สงสัยว่าติดเชื้อ *T. evansi* ได้โดยตรง และเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว

เมื่อนำผลของการหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene และผลของการหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR มาเปรียบเทียบกัน พบว่าการใช้ลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ซึ่งครอบคลุมในส่วนของ ITS1 พบว่าสามารถจำแนก genotype ของเชื้อภายในเชื้อ 1 isolate ได้ในขณะที่วิธีการหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ไม่สามารถบอกถึง genotype ของเชื้อได้

ผลจากการทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธิ์ขึ้น พบว่าเชื้อจากการผ่านเชื้อทั้ง 3 ครั้งที่ได้ทำการคัดเลือกมาทำการทดลองการหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene และการหาความแตกต่างของ minisatellite DNA คือ H2/10 จากการผ่านเชื้อครั้งที่ 1 H2.2/3 จากการผ่านเชื้อครั้งที่ 2 และ H2.2.1/3 จากการผ่านเชื้อครั้งที่ 3 เนื่องจากเป็นเชื้อที่ดูเหมือนว่ามีความรุนแรงปานกลาง ซึ่งสังเกตได้จากการผ่านเชื้อครั้งที่ 3 ของ H2/10 พบเชื้อในหนูทดลอง 2 ใน 3 ตัว ในขณะที่ H5/10 มีความรุนแรงมากกว่าเนื่องจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 3 ของ H5/10 พบเชื้อในหนูทดลองทุกตัว และ H10/10 มีความรุนแรงน้อยทำให้การผ่านเชื้อครั้งที่ 3 ไม่พบเชื้อในหนูทดลองทั้ง 3 ตัว

เมื่อนำเชื้อจากการผ่านเชื้อทั้ง 3 ครั้ง ได้แก่ H2/10 H2.2/3 และ H2.2.1/3 มาหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene นำเอาลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อตั้งต้น คือ isolate VPh03 โดย isolate VPh03 มี genotype f และ g พบว่าเชื้อจาการผ่านเชื้อทั้ง 3 ครั้งมี genotype f ร่วมกันและเป็น genotype หลักของเชื้อ isolate VPh03 นอกจากนั้นยังพบว่า H2.2/3 (เชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่2) มี genotype j และ k เพิ่มขึ้นมา ซึ่งไม่พบ genotype นี้ในเชื้อที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อซ้ำ ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณเชื้อที่ฉีดเข้าสู่หนูทดลองในการผ่านเชื้ออาจมีมากกว่า 1 trypanosome เนื่องจากการทำ limiting dilution ในการฉีดเชื้อที่ไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้อที่ฉีดเข้าสู่หนูทดลองมีปริมาณเชื้อ 1 trypanosome จริงหรือไม่

และจากการนำเชื้อจากการผ่านเชื้อทั้ง 3 ครั้ง และเชื้อ isolate VPh03 ดังกล่าวข้างต้น มาหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer 122-2 และ122-3 พบว่ามี DNA fingerprint 2 รูปแบบ คือ รูปแบบของ DNA fingerprint ของ VPh03 เหมือนกับ H2.2/3 (เชื้อ

จากการผ่านเชื้อครั้งที่ 2) และ H2/10 (เชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 1) มี DNA fingerprint เหมือนกับ H2.2.1/3 (เชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 3) เมื่อนำเอาผลการหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene มาวิเคราะห์ผลร่วมกันพบว่ารูปแบบของ DNA fingerprint ของ VPh03 กับ H2.2/3 มีจำนวนของแถบ DNA มากกว่า รูปแบบของ DNA fingerprint ของ H2/10 และ H2.2.1/3 อาจเกิดจาก H2.2/3 มีประชากรเชื้อมากกว่าคือมี genotype j และ k แต่ H2/10 และ H2.2.1/3 อาจมีประชากรเชื้อที่มี genotype j และ k แต่มีน้อยมากจนไม่สามารถแสดงออกใน DNA fingerprint ได้

5.3 **ข้อเสนอแนะ**

เพื่อเป็นการศึกษาประชากรของเชื้อให้ละเอียดมากขึ้น ควรคัดเลือกพลาสมิดไปทำการตรวจหาลำดับเบสในส่วนของ ITS1 มากกว่า 3 พลาสมิด

ควรเพิ่มจำนวนของเชื้อที่มาจากโฮสต์ชนิดเดียวกัน เพื่อให้ทราบว่ารูปแบบของ DNA fingerprint สามารถบอกได้หรือไม่ว่าแถบ DNA มีความจำเพาะกับชนิดของโฮสต์หรือไม่ และควรทำการทดสอบความไวของ primer 122-2 และ 122-3 ว่าสามารถตรวจ DNA fingerprint ได้เมื่อมีเชื้อจำนวนเท่าไหร่ในกระแสเลือดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับงานในภาคสนาม

นอกจากนั้นในการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นควรหาวิธีที่สามารถแยกเอาเชื้อเพียง 1 trypanosome มาเพิ่มจำนวนในหนูทดลองเพื่อให้สามารถใช้เป็นเชื้อที่ผ่านการโคลนและสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลของเชื้อเพียง 1 ประชากรได้