

Sequence variation in the 18S ribosomal RNA gene of *Demodex folliculorum* and
Demodex brevis isolated from the facial skin

Miss Pawanrat Threekhan



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน 18S ribosomal RNA ใน
Demodex folliculorum และ *Demodex brevis* จากตัวอย่างผิวหนังที่เก็บจากใบหน้า



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน 18S ribosomal RNA ใน <i>Demodex folliculorum</i> และ <i>Demodex brevis</i> จากตัวอย่างผิวหนังที่เก็บจากใบหน้า
โดย	นางสาวปวันรัตน์ ตรีชัน
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง กัญญรัตน์ กรัยวิเชียร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง กัญญรัตน์ กรัยวิเชียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. วิวรพรรณ สรรประเสริฐ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง จิตติมา ฐิตวัฒน์)

ปวันรัตน์ ตรีชัน : การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน 18S ribosomal RNA ใน *Demodex folliculorum* และ *Demodex brevis* จากตัวอย่างผิวหนังที่เก็บจากใบหน้า (Sequence variation in the 18S ribosomal RNA gene of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* isolated from the facial skin) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. พญ. กัญญรัตน์ กรัยวิเชียร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร, 98 หน้า.

ไรติโมเด็กซ์จัดเป็นปรสิตภายนอก อาศัยในรูขุมขน มีขนาดเล็ก ซึ่งมีสองสายพันธุ์ที่พบในมนุษย์ คือ *Demodex folliculorum* และ *D. brevis* ไรทั้งสองชนิดสามารถแยกกันโดยดูลักษณะภายนอกในระยะตัวเต็มวัย แต่ในระยะอื่นโดยเฉพาะ ไข่ ตัวอ่อน ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ งานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจหา และจำแนกสายพันธุ์ของไรติโมเด็กซ์ที่พบในมนุษย์ ซึ่งได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 18SrRNA อีกทั้งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรและความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีนในนิวเคลียส 18SrRNA ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Skin scraping จากอาสาสมัครจำนวน 62 ราย เป็นเพศชาย 9 คน เพศหญิง 53 คน ทำการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาของไรติโมเด็กซ์ และตรวจหาสารพันธุกรรมของไรติโมเด็กซ์ด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากผิวหนังและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งให้ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แตกต่างกันคือ *D. folliculorum* จะให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ 382 pb ส่วน *D. brevis* จะให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ 317 pb จากการทดลองพบว่าให้ผลบวกต่อ *D. folliculorum* 25 ตัวอย่าง คิดเป็น 40.3% ให้ผลบวกต่อ *D. brevis* 11 ตัวอย่าง คิดเป็น 17.7% และพบว่าไร *D. folliculorum* มีค่า Percentage Identities เฉลี่ย 99.04 % และ *D. brevis* มีค่า Percentage Identities 100 % เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลสากล ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific variation ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง *D. folliculorum* เท่ากับ 0-2.1% แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง *D. brevis* นั้นไม่มีความแตกต่างกันภายในสายพันธุ์ และผลจากการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจากยีน 18srRNA ของไรติโมเด็กซ์ พบว่าสามารถแยกกลุ่มของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ออกจากกันได้ โดยรายงานการวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในประเทศไทย ที่มีการนำวิธีทางอณูชีววิทยาใช้ในการศึกษาไรติโมเด็กซ์ที่พบในมนุษย์ เพื่อประโยชน์พื้นฐานในการพัฒนาศึกษาจำแนกสายพันธุ์ของไรติโมเด็กซ์ได้ถูกต้องแม่นยำและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรติโมเด็กซ์และเพื่อการศึกษาทางระบาดวิทยาต่อไปในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5574222030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: D.FOLLICULORUM / D.BREVIS / SEMI-NESTED PCR / 18SRRNA GENE

PAWANRAT THREEKHAN: Sequence variation in the 18S ribosomal RNA gene of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* isolated from the facial skin. ADVISOR: ASSOC. PROF. KANYARAT KRAIVICHIAN, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PADET SIRIYASATIEN, M.D., Ph.D., 98 pp.

Demodex are tiny ectoparasitic mites, live in sebaceous glands. There are only two species, *D. folliculorum* and *D. brevis* found in human. Identification between both species could be done based on the morphological appearance of the adult stage. However, for other stages especially egg and nymph, they are indistinguishable. This study proposed the using of molecular technique for detecting and differentiation between these two human *Demodex* species, in addition to determine the genetic variation of human *Demodex*. Primers were designed based on 18SrRNA gene of *D. folliculorum* and *D. brevis*. Samples were collected from 62 volunteers male: female 9: 53 by using Skin scraping technique for microscopic examination and molecular detection. Total DNA was extracted from skin samples and was used to amplify the human *Demodex* mite by using Semi-Nested PCR. The PCR was able to amplify the 18SrRNA gene from both human *Demodex* mite species with approximately 382 bp and 317 bp for *D. folliculorum* and *D. brevis*, respectively. The results showed 25 samples positive for *D. folliculorum* (40.3%) and 11 samples positive for *D. brevis* (17.7%). Moreover, the nucleotide sequences compared with GenBank database revealed that the percentage identities of *D. folliculorum* and *D. brevis* is approximately 99.04% and 100%, respectively. *D. folliculorum* nucleotide sequences showed intraspecific variation 0-2.1%, but nucleotide sequencing of *D. brevis* cannot be found the intraspecific variation. The Phylogenetic tree base on 18SrRNA gene investigated that *D. folliculorum* were clearly classified from *D. brevis*. This report is the first study using molecular techniques to investigate human *Demodex* in Thailand. The data obtained from the study provides fundamental data for accurate identification of the human *Demodex* species and determine the genetic variation of human *Demodex* and therefore for further epidemiological study in the future.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก รศ.พญ.กัญญรัตน์ กรัยวิเชียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ รศ.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการศึกษาวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องเล่มวิทยานิพนธ์ เพื่อให้งานวิจัยครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.พญ.วิไล ชินธเนศ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อ.ดร.วิวรพรรณ สรรประเสริฐ และผศ.พญ.จิตติมา ฐิตวัฒน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาสละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ รวมทั้งกรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ รวมทั้งคอยอบรมสั่งสอน ให้คำแนะนำที่ตลอดการศึกษา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่แผนกโรคผิวหนังหน่วยตรวจโรค ชั้น 2 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือคำแนะนำในการตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และคอยอำนวยความสะดวก ความช่วยเหลือแก่ผู้ทำวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.อัจฉรา ภูมิ เป็นอย่างยิ่งที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำในการทำวิจัยในการแก้ปัญหาต่างๆ งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และพี่น้องๆร่วมห้อง กิฏวิทยา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยให้กำลังใจช่วยเหลือเกื้อกูลตลอดมา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนคำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ในงานวิจัยอย่างดียิ่งและขอขอบคุณฝ่ายบัณฑิตศึกษา คุณอภิญา บุตรลี รวมทั้งเจ้าหน้าที่ฝ่ายบัณฑิตศึกษาทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวก ประสานงานด้านเอกสารตลอดระยะเวลาการศึกษาเป็นอย่างดี

และสุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้ให้กำเนิด ที่ให้การอบรมสั่งสอน คุณธรรม จริยธรรมและให้กำลังใจในการทำวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งเพื่อนๆทุกคนที่ให้การสนับสนุนและคำปรึกษาอย่างดียิ่งตลอดระยะเวลาการศึกษา คุณค่าทั้งหลายที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้ที่มีพระคุณทุกท่านเพื่อนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	15
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	15
1.2 คำถามของการวิจัย.....	16
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	16
1.4 สมมติฐานของการวิจัย.....	16
1.5 กรอบแนวความคิดงานวิจัย.....	17
1.6 การออกแบบการทดลอง.....	18
1.7 คำสำคัญ.....	19
1.8 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	19
1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	20
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	21
2.1 ลักษณะทั่วไปของ <i>Demodex spp.</i>	21
2.1.1 วงจรชีวิตของ <i>Demodex sp.</i>	23
2.2 ความสำคัญทางการแพทย์ของไร <i>Demodex sp.</i>	25
2.2.1 โรคที่มีความเกี่ยวข้องกับไร <i>Demodex spp.</i>	29
2.3 การรักษา.....	31
2.4 วิธีการตรวจหาไร <i>Demodex sp.</i> ทางห้องปฏิบัติการ.....	32
2.5 การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับไร <i>Demodex sp.</i>	33

2.6 รายงานการศึกษาความชุกของไร <i>Demodex</i>	34
2.6.1 การศึกษาความชุกของไร <i>Demodex</i> ในประเทศไทย.....	36
2.7 การศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์.....	36
2.7.1 การเพิ่มปริมาณยีน 18S ribosomal RNA (18S rRNA) ด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR	36
2.7.2 การศึกษาลำดับของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing).....	38
2.7.3 การศึกษาชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatic)	39
2.8 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลดีเอ็นเอ	42
2.8.1 ยีนบนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA gene).....	42
2.8.2 ยีนบนดีเอ็นเอนิวเคลียส (Nuclear DNA gene).....	43
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	45
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design).....	45
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)	45
3.2.1 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population)	45
3.2.2 การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection).....	45
3.2.3 ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample size).....	46
3.3 เครื่องมือ.....	46
3.4 อุปกรณ์.....	47
3.5 สารเคมี.....	48
3.6 โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล	48
3.7 การดำเนินการวิจัย.....	49
3.7.1 การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological species identification) ...	49
3.7.2 การสกัด DNA.....	50

3.7.2.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณและประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer	51
3.7.3 การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR.....	51
3.7.4 Agarose gel electrophoresis.....	54
3.7.5 การโคลนนิ่งยีน 18S เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์	54
3.7.5.1 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (DNA ligation)	54
3.7.5.2 ขั้นตอนการ Transformation ในการถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้า competent cell โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน.....	55
3.7.5.3 การคัดเลือกโคโลนี E. coli ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม (Blue/white Screen).....	55
3.7.5.4 การทำ Colony PCR เพื่อตรวจสอบผลการโคลน	56
3.7.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ	56
3.7.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing).....	57
3.7.7.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S	57
3.7.7.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S กับฐานข้อมูล NCBI	57
3.7.7.3 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างภายในสายพันธุ์เดียวกัน	57
3.7.8 การสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis).....	58
3.7.9 การขอขึ้นทะเบียนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์.....	58
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	59
4.1 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	59
4.2 ผลของการศึกษาทางลักษณะสัณฐานวิทยา.....	59
4.3 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 18Sr RNA โดยเทคนิค Semi-nested PCR.....	60
4.4 ผลการตรวจสอบการโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน 18SrRNA โดยใช้เทคนิค colony PCR.....	62
4.5 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์	64

4.6 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18SrRNA ของไร Demodex กับ ฐานข้อมูลสากล	65
4.7 ผลการขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์.....	67
4.8 ผลการวิเคราะห์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์.....	67
4.9 ผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม.....	77
.....	79
.....	79
.....	79
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	80
ภาคผนวก.....	84
รายการอ้างอิง	91
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	98



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ตารางแสดงขนาดความยาวของลำดับในระยต่างๆ ของ <i>D. folliculorum</i> และ <i>D. brevis</i> (มิลลิเมตร)	25
ตารางที่ 2	แสดงรายการยาที่ใช้รักษา ไร <i>Demodex sp.</i>	31
ตารางที่ 3	แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์	52
ตารางที่ 4	แสดงส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา Semi-Nested PCR.....	53
ตารางที่ 5	แสดงขั้นตอนของการทำ Semi-Nested PCR โดยใช้เครื่อง Thermal cycle condition	54
ตารางที่ 6	แสดงส่วนประกอบและสัดส่วนที่ใช้ในขั้นตอนเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิทเวคเตอร์.....	55
ตารางที่ 7	ผลการตรวจ โดยใช้ Microscopic examination และ Semi-nested PCR.....	60
ตารางที่ 8	สรุปผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไรโตเด็กที่ตำแหน่งยีน 18srRNA ด้วยวิธี Semi-nested PCR.....	61
ตารางที่ 9	แสดงผลการเปรียบเทียบไร <i>Demodex</i> กับฐานข้อมูลสากล GenBank	65
ตารางที่ 10	แสดงเลขทะเบียนของลำดับนิวคลีโอไทด์	68
ตารางที่ 11	71
ตารางที่ 12	แสดงเปอร์เซ็นต์(%) intraspecific variation ของ <i>D. brevis</i> จากการทำ sequence identity matrix	72
ตารางที่ 13	74
ตารางที่ 14	76

สารบัญรูปภาพ

รูป 1	แสดงส่วนลักษณะส่วนประกอบของไร <i>Demodex spp.</i>	22
รูป 2	แสดงตำแหน่งที่อยู่อาศัยของไร <i>Demodex sp.</i> ทั้งสองสายพันธุ์.....	22
รูป 3	ภาพแสดงวงจรชีวิตของไร <i>Demodex sp.</i> ทั้งสองสายพันธุ์	23
รูป 4	แสดงลักษณะรูปร่างของไร <i>Demodex sp.</i> จากระยะไข่ จนถึง ระยะตัวเต็มวัย.....	24
รูป 5	แสดงลักษณะรูปร่างไข่ ของ <i>D. folliculorum</i> และ <i>D. brevis</i>	24
รูป 6	การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและพยาธิกำเนิดของไร <i>Demodex</i>	26
รูป 7	คนไข้ Pityriasis folliculorum	27
รูป 8	ภาพแสดงรูขุมขนที่ประกอบด้วย ไร <i>Demodex</i> และเศษเคราติน (keratin debris).....	27
รูป 9	คนไข้ Rosacea- like demodecosis.....	28
รูป 10	A.คนไข้ granulomatous rosacea-like และ B.ภาพของการอักเสบบริเวณรูขุมขน โดยมีลูกศรแสดงให้เห็นถึงการพบตัวไร <i>Demodex</i>	28
รูป 11	การเก็บตัวอย่างโดยใช้วิธี Standard Skin Surface Biopsy(SSSB).....	32
รูป 12	การเก็บตัวอย่างโดยใช้วิธี skin scraping.....	33
รูป 13	แสดงกระบวนการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction)	40
รูป 14	แสดงขั้นตอนการทำ DNA sequencing	41
รูป 15	แสดง chromatograph จากการใช้เครื่อง Automated.....	41
รูป 16	แสดงตัวอย่างภาพแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)	42
รูป 17	mitochondrial DNA gene	43
รูป 18	nuclear DNA gene	44
รูป 19	แสดงลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของ <i>D. folliculorum</i> และ <i>D. brevis</i>	59
รูป 20	แสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของ PCR บริเวณชิ้นส่วนของยีน 18S จากตัวอย่าง ไร <i>D. folliculorum</i>	61
รูป 21	แสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของ PCR บริเวณชิ้นส่วนของยีน 18S จากตัวอย่างไร <i>D. brevis</i>	62

รูป 22 แสดง โคลนีสีฟ้าและโคลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar ที่มีส่วนผสมของยา Ampicillin.....	63
รูป 23 แสดงผลการตรวจสอบการโคลนพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน 18S จากตัวอย่างไร <i>D. brevis</i>	63
รูป 24 แสดงตัวอย่างกราฟ chromatogram ที่ได้จากการนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	64
รูป 25 ผลการเปรียบเทียบ multiple sequence alignment แสดงตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ <i>D. folliculorum</i>	70
รูป 26 ผลการเปรียบเทียบ multiple sequence alignment แสดงตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ.....	72
รูป 27 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>D. folliculorum</i> (382 bp) และ <i>D. brevis</i> (317 bp).....	73
รูป 28 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>D. folliculorum</i> และ <i>D. brevis</i> โดยตัดความยาวของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ให้เท่ากัน	75
รูป 29 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18srRNA ของไร	78
รูป 30 แสดงการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน Semi-nested PCR.....	79

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°C	=	degree Celsius
%	=	percent
pb	=	base pair
cm	=	centrimetre
g	=	grams
ng	=	nanogram
µg	=	microgram
mg	=	milligram
M	=	molar
µM	=	micromolar
mM	=	millimolar
L	=	liter
µl	=	microliter
ml	=	milliliter
nm	=	nanometre
ddH ₂ O	=	deionized distilled water
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxynucleotide triphosphates(dATP,dTTP,dGTP,dCTP)
OD	=	optical density
PCR	=	polymerase chain reaction
pH	=	pondus hydrogenii
RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	revolutions per minute
<i>Taq</i>	=	<i>Thermophilus aquaticus</i>
UV	=	ultraviolet

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Demodex spp. จัดเป็นไรชนิดหนึ่งที่เป็นปรสิต ซึ่งไร *Demodex* จัดอยู่ใน Class: Arachnida, Order: Acarina, Family: Demodicidae ในปัจจุบันพบว่าไรชนิดนี้มีมากกว่า 65 สายพันธุ์ โดยเป็นปรสิตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้หลายชนิด เช่น แมว สุนัข หมู แพะ กวาง เป็นต้น ไร *Demodex* ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และพบในมนุษย์ มี 2 ชนิด คือ *Demodex folliculorum* และ *Demodex brevis* ซึ่งไร *Demodex* ทั้ง 2 ชนิดนี้ มีแหล่งที่อยู่อาศัยแตกต่างกัน โดย *D. folliculorum* จะอาศัยอยู่บริเวณรูขุมขน ถ้าตัวจะมีลักษณะยาว ขนาดประมาณ 0.3 - 0.4 มิลลิเมตร ดูดกินสารอาหารบริเวณรากขนเป็นอาหาร ในขณะที่ *D. brevis* มีลักษณะรูปร่างเป็นกระสวย ลักษณะอ้วนสั้น ความยาวประมาณ 0.2- 0.3 มิลลิเมตร [1] อาศัยอยู่ในบริเวณต่อมไขมัน (Sebaceous glands) ที่เชื่อมต่อกับรูขุมขน

D. folliculorum และ *D. brevis* ก่อให้เกิดการระคายเคืองและอักเสบบริเวณที่ปรสิตเคลื่อนที่เรียกว่า โรค Demodicosis โดยอาการของโรคนี้นับว่ามีได้หลายแบบ เช่น อาการ ผื่นผิวหนังอักเสบร่วมกับรอยแดง (Eczema), ใบหน้าแดง (Erythema), ตุ่มแดงรอบรูขุมขน (Peri-follicular papules) ร่วมกับการมีขุยบริเวณใบหน้า ตำแหน่งที่พบบ่อยจะอยู่ที่บริเวณที่มีต่อมไขมันมาก เช่น ใบหน้า คาง แก้ม หน้าผาก บริเวณรอบๆจมูกเปลือกตา ใบหู และรูหูชั้นนอก [2] แต่ยังไม่ทราบกลไกที่ทำให้เกิดโรค เนื่องจากตัวไรนี้สามารถพบได้ทั้งในสภาวะปกติหรือพบในคนที่ เป็นโรคผิวหนังบางชนิดร่วมด้วย เมื่อมีอายุเพิ่มมากขึ้นจะพบตัวไรเพิ่มขึ้น [3, 4] และพบว่าในคนที่มีความภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง อาจพบตัวไรเพิ่มมากขึ้นได้ [5] ไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์นี้จะก่อโรคแตกต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์ของไร *Demodex* ซึ่งการแยกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ระหว่าง *D. folliculorum* และ *D. brevis* นั้นค่อนข้างยากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะไข่และตัวอ่อน เนื่องจากมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากจึงจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการแยกไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกัน

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอนุชีววิทยาเพื่อใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และแยกสายพันธุ์ของไร *Demodex* โดยศึกษาทั้งยีนในนิวเคลียสและในไมโทคอนเดรีย ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาทางอนุชีววิทยา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาไร *Demodex* ที่ก่อโรคในผิวหนังในมนุษย์เท่านั้นจากตัวอย่างผื่นผิวหนังที่เก็บจากคนไข้ที่มีอาการและไม่มีอาการซึ่งจะเก็บ

ตัวอย่างด้วยวิธี Standardized skin surface biopsies[6-9] แล้วนำมาทำการศึกษาเปรียบเทียบ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อแยกสายพันธุ์ของไรและใช้เทคนิค Semi- Nested Polymerase Chain Reaction (Semi Nested PCR) เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของไร *Demodex* ที่ ตำแหน่งยีน 18S ribosomal RNA [10] รวมทั้งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree) ซึ่งการศึกษา นี้สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกสายพันธุ์ของไร *Demodex* ที่พบในมนุษย์ ในกรณีที่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน อีกทั้งมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาทางอนุชีววิทยาต่อไป

1.2 คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก

สามารถใช้ยีน 18S ribosomal RNA จำแนกสายพันธุ์ของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ด้วย เทคนิค Semi- nested PCR ได้หรือไม่

คำถามรอง

D. folliculorum และ *D. brevis* ที่เก็บจากผิวหนังบริเวณใบหน้า สามารถพบความหลากหลายทาง พันธุกรรมที่ตำแหน่งยีน 18S ribosomal RNA ได้หรือไม่

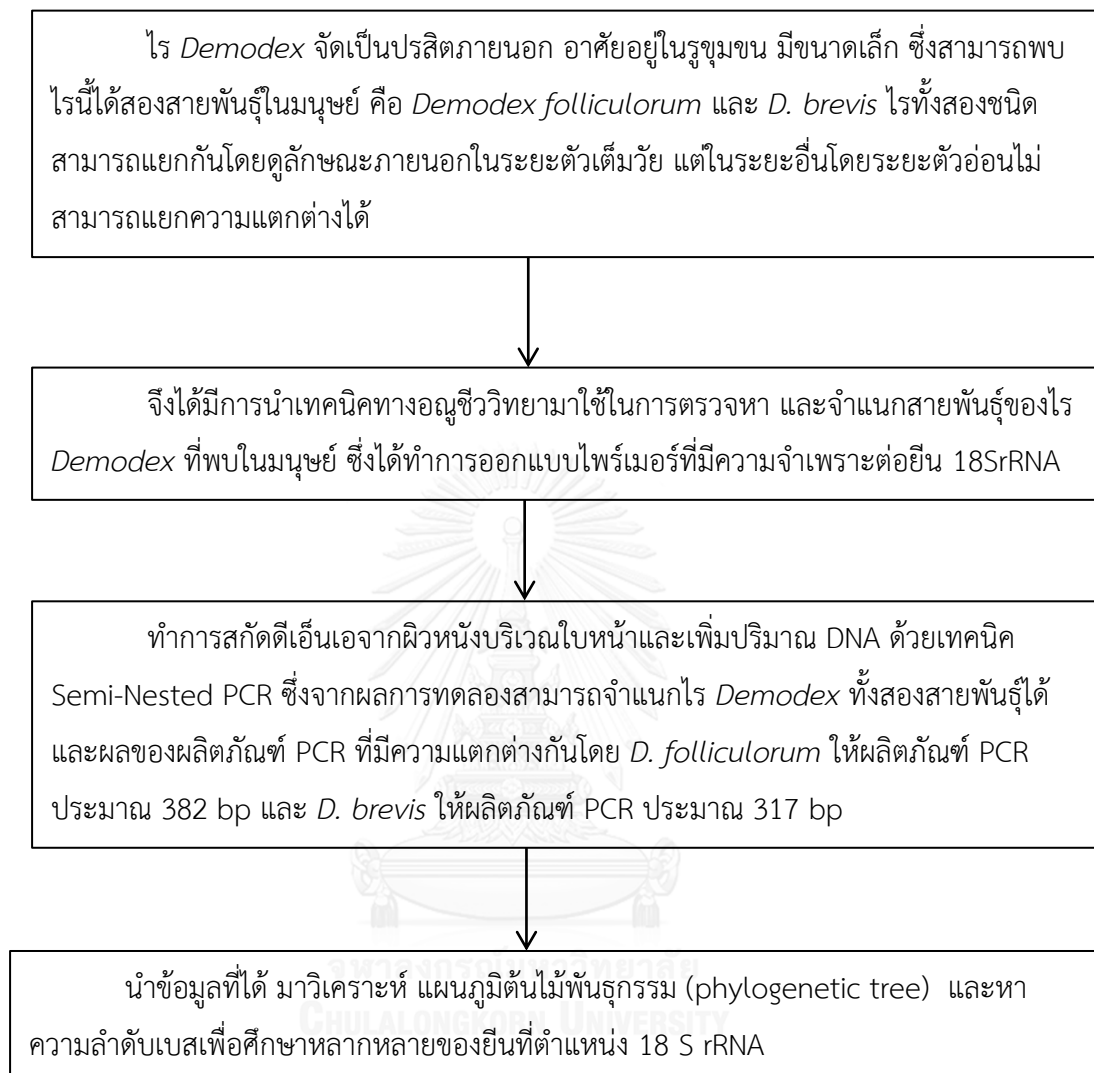
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ที่ตำแหน่งยีน 18S ribosomal RNA ด้วยเทคนิคSemi-Nested PCR
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งยีน 18S ribosomal RNA ของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ที่เก็บจากผิวหนังบริเวณใบหน้า

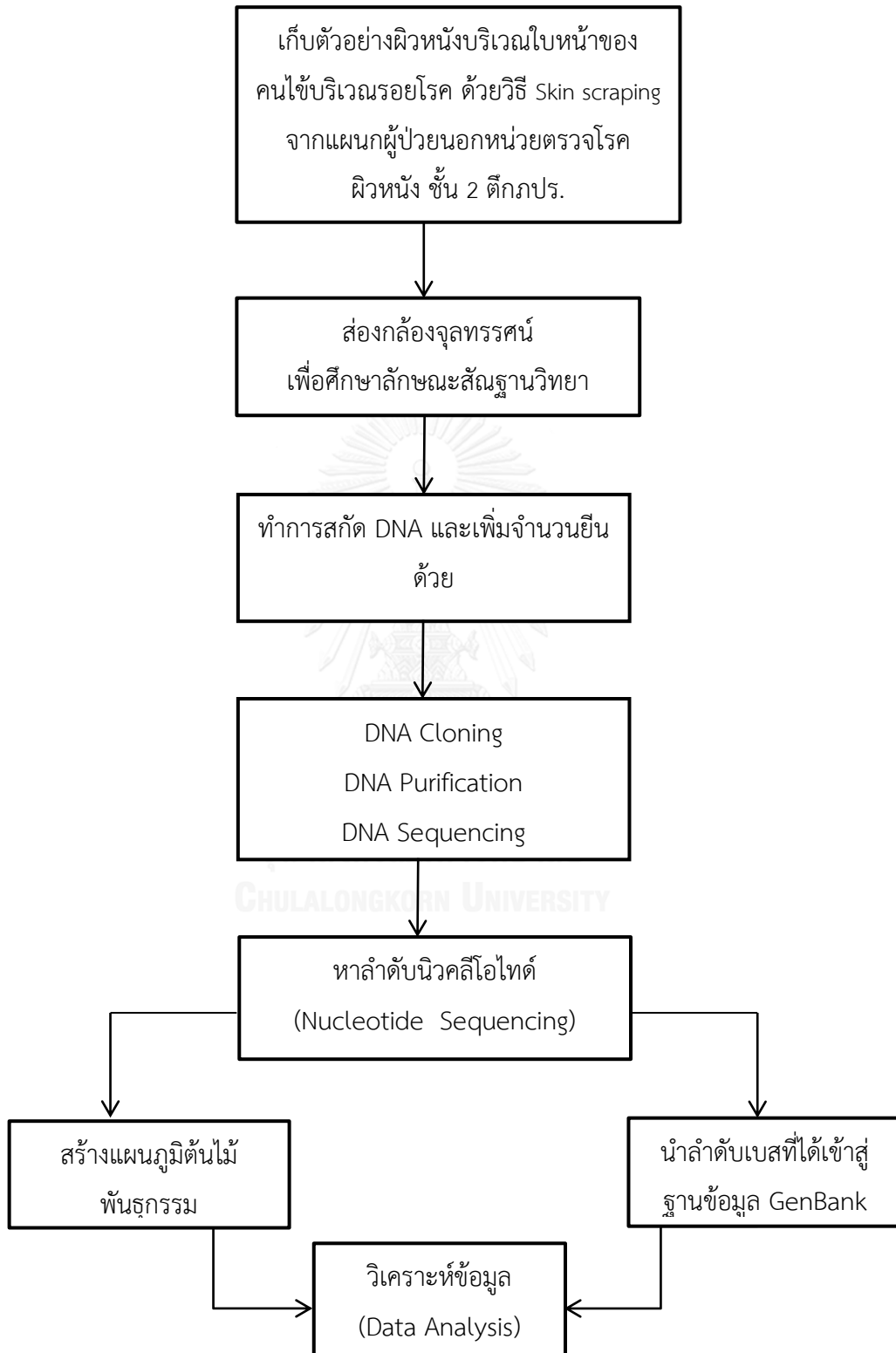
1.4 สมมติฐานของการวิจัย

1. การทำ Semi-Nested PCR ที่ตำแหน่งยีน 18S ribosomal RNA สามารถจำแนกสายพันธุ์ของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ได้
2. ที่ตำแหน่งยีน 18S ribosomal RNA สามารถบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ที่เก็บจากผิวหนังบริเวณใบหน้าได้

1.5 กรอบแนวความคิดงานวิจัย



1.6 การออกแบบการทดลอง



1.7 คำสำคัญ

Demodex folliculorum

Demodex brevis

18S rRNA gene

Phylogenetic tree

1.8 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. *Demodex sp.* เป็นปรสิตที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือ เรียกว่าไรรูขุมขน มักพบได้ในผิวหนังของมนุษย์และสัตว์
2. *Demodex folliculorum* เป็นปรสิตที่อาศัยอยู่บริเวณรูขุมขนมักพบในบริเวณผิวหนังของมนุษย์ดูดสารอาหารบริเวณรากขนกินเป็นอาหาร รูขุมขนจึงกว้างและเกิดการอักเสบ ส่งผลให้เกิดอาการบวมของเนื้อเยื่อรอบๆ รูขุมขน
3. *Demodex brevis* เป็นปรสิตที่อาศัยอยู่บริเวณรูขุมขน มักพบในชั้นผิวหนังที่มีความลึก โดยแหล่งที่พบจะพบบริเวณต่อมไขมัน
4. ยีน 18S rRNA เป็นยีนในนิวเคลียส มีความแปรปรวนสูงระหว่างสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างกัน แต่มีลำดับและความยาวเหมือนกันภายในสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งใช้เป็นเครื่องมือทางพันธุกรรมที่ดี ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้
5. Phylogenetic tree เป็นการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นการหาความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการและจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต โดยสิ่งมีชีวิตที่มีต้นกำเนิดร่วมกันจะมีข้อมูลของโปรตีนและระดับของดีเอ็นเอที่มีความคล้ายคลึงกัน
6. Out group คือ สิ่งมีชีวิตที่นำมาใช้ในการเปรียบเทียบ ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตนี้วิวัฒนาการแยกจากกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา
7. Bootstrap test คือ การทดสอบค่าความเชื่อมั่นทางสถิติจากการสุ่มข้อมูลของสิ่งมีชีวิตในแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการ โดยมีการคำนวณข้อมูลซ้ำ 100 ถึง 1,000 ครั้ง ซึ่งค่าจากการสุ่มที่ได้จะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การใช้เทคนิค Semi-Nested PCR มีประโยชน์ในกรณีที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถระบุสายพันธุ์หรือตัวอย่างไม่สมบูรณ์ที่ไม่สามารถแยกโดยการดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ได้
2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S ribosomal RNA ของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* มีเอกลักษณ์เฉพาะสายพันธุ์ และมีความหลากหลายเพียงพอสำหรับใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ที่เก็บจากผิวหนังบริเวณใบหน้า
3. ข้อมูลที่ได้สามารถเพิ่มเป็นฐานข้อมูลของไร *Demodex* ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปในอนาคตได้



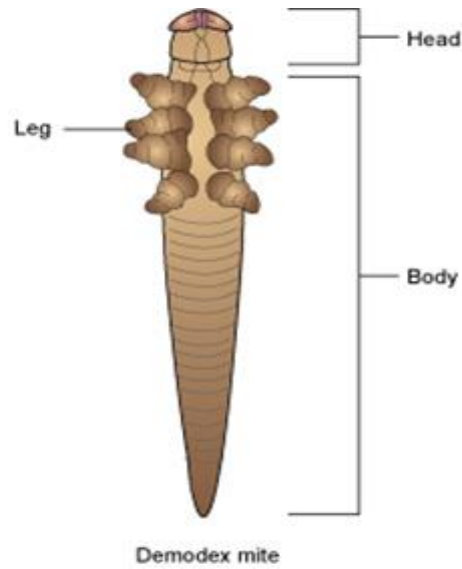
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของ *Demodex spp.*

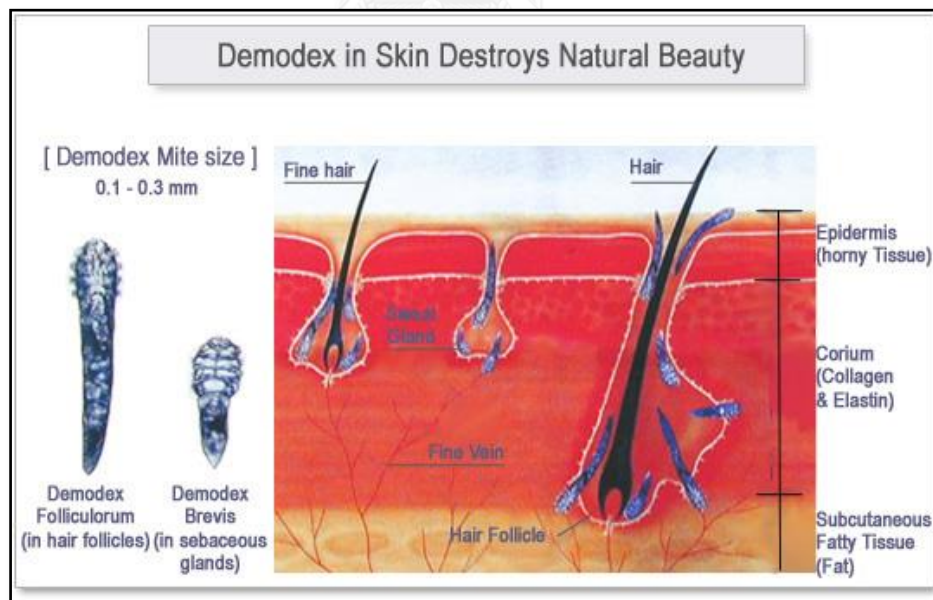
ไร *Demodex spp.* เป็นปรสิตชนิดหนึ่ง (Ectoparasite) ซึ่ง *Demodex* มีรากศัพท์จากภาษากรีกประกอบด้วย 'demos' หมายถึง ไซ หรือน้ำมัน และ 'dex' หมายถึง หนอน ไรชนิดนี้พบครั้งแรกในมนุษย์ เมื่อปี 1841 ค้นพบโดย Henle และ Berger ต่อมาในปี 1842 Carl Gustav Theodor Simon ได้อธิบายลักษณะของไรให้จัดอยู่ใน *Acarus folliculorum* และในปี 1843 จึงได้รับการตั้งชื่อว่า "*Demodex*"

ในภูมิภาคต่างๆทั่วโลก เราสามารถพบไรชนิดนี้ได้มากกว่า 65 สายพันธุ์ จะพบมากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นส่วนใหญ่ [11] เช่น *D. canis* (พบในสุนัข) *D. cati* (พบในแมว) *D. phylloides* (พบในหมู) *D. bovis* (พบในวัวควาย) *D. equi* (พบในม้า) *D. muscardini* (พบในกระรอกจิว) *D. cuniculi* (พบในกระต่าย) และ *D. ratti* (พบในหนู) [12] ซึ่งสายพันธุ์ที่พบได้ในมนุษย์ [13] มี 2 สายพันธุ์ คือ *D. folliculorum* (ค้นพบโดย Simon 1842) และ *D. brevis* (ค้นพบโดย Akbulatova 1963) โดย *D. folliculorum* จะพบบริเวณรูขุมขนโดยจะใช้ส่วนหัวแทงเข้าไปในรูขน ส่วน *D. brevis* จะพบบริเวณต่อมไขมันที่เชื่อมกับรูขุมขนซึ่งจะอยู่ในชั้นที่ลึกกว่า *D. folliculorum* [14] ลักษณะลำตัวของทั้ง 2 สายพันธุ์ จะมีลำตัวยาวคล้ายหนอน มีเส้นพาดขวางที่ท้อง ลักษณะลำตัวกิ่งโปร่งใส ขนาดประมาณ 0.1-0.4 มิลลิเมตร ตัวเต็มวัยมีขา 4 คู่ ส่วนตัวอ่อนมีขา 3 คู่ [15, 16] โดยทั้งสองสายพันธุ์ มีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ *D. folliculorum* จะมีขนาดใหญ่และลำตัวยาวกว่า *D. brevis* [17, 18] มีความยาวประมาณ 300-400 ไมโครเมตร ชอบอาศัยอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เพศผู้ อวัยวะสืบพันธุ์อยู่ระหว่างขาคู่ที่ 1 กับคู่ที่ 2 จะพบอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียอยู่ตรงกลางของขาคู่ที่ 4 ส่วน *D. brevis* จะมีความยาวประมาณ 250-280 ไมโครเมตร มีความกว้างของลำตัวประมาณ 40-45 ไมโครเมตร ชอบอาศัยอยู่เดี่ยวๆ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีขนาดเล็กมากไม่สามารถสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนได้จะพบอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียอยู่บริเวณด้านหลังของขาคู่ที่ 4 [19] โดยเราสามารถแยกความแตกต่างของทั้งสองสายพันธุ์จากกัน โดยใช้ลักษณะดังต่อไปนี้ 1.แหล่งที่อยู่อาศัย *D. folliculorum* จะอาศัยอยู่ในรูขุมขน ส่วน *D. brevis* จะพบในตำแหน่งที่ลึกลงไป คือ บริเวณต่อมไขมัน 2.ขนาดของลำตัวโดย *D. folliculorum* จะมีลำตัวยาวกว่า *D. brevis* 3.ขนาดของไข่



Used Under License
Copyright© Lifelearn Inc.

รูป 1 แสดงส่วนลักษณะส่วนประกอบของไร *Demodex spp.*
(ที่มา: http://tvvet.s3.amazonaws.com/demodectic_mange_2009.jpg)



รูป 2 แสดงตำแหน่งที่อยู่อาศัยของไร *Demodex sp.* ทั้งสองสายพันธุ์
(ที่มา : <http://healthyskinjournals.com/wp-content/uploads/2013/04/demodex-chart.jpg>)

การจัดหมวดหมู่ตามหลักวิทยาศาสตร์ของ ไร *Demodex sp.* (Taxonomic Category)

อาณาจักร (Kingdom) : Animalia

ไฟลัม (Phylum) : Arthropoda

ชั้น (Class) : Arachnida

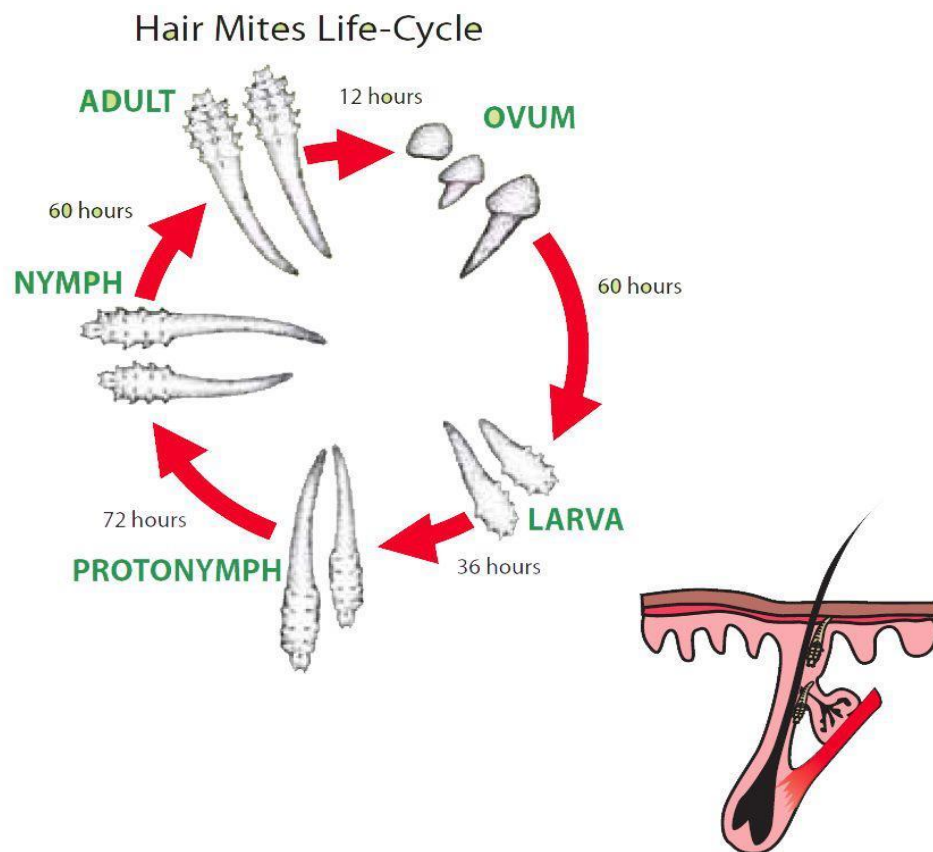
ชั้นย่อย (Subclass) : Acari

อันดับ (Order) : Trombidiformes

วงศ์ (Family) : Demodicidae

สกุล (Genus) : *Demodex*

2.1.1 วงจรชีวิตของ *Demodex sp.*



รูป 3 ภาพแสดงวงจรชีวิตของไร *Demodex sp.* ทั้งสองสายพันธุ์

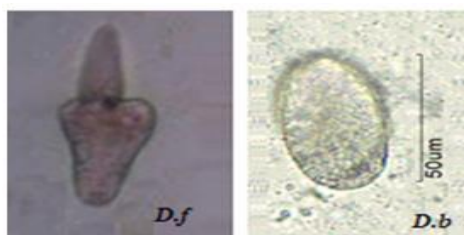
(ที่มา : <http://www.dr-qu.com/demodex.html>)

วงจรชีวิตของ *Demodex sp.* ได้ทำการศึกษาโดย Spickett มีระยะเวลาประมาณ 14 วันครึ่ง จะเริ่มจากการผสมพันธุ์ของตัวผู้และตัวเมียบริเวณรูเปิดของต่อมขน หลังจากนั้นตัวเมีย

จะเข้าไปวางไข่ใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง โดยไข่จะเริ่มฟักตัวจากระยะไข่ (Ovum) ไปสู่ระยะตัวอ่อน (Larva) ใช้ระยะเวลาประมาณ 60 ชั่วโมง หลังจากนั้นระยะตัวอ่อนจะเจริญเป็น ระยะ Protonymph ใช้เวลา 36 ชั่วโมง ต่อมาจะเจริญเป็นระยะ Nymph ใช้เวลา 72 ชั่วโมง และจะเจริญเป็นตัวเต็มวัย (Adult) ภายใน 60 ชั่วโมง ซึ่งขนาดความยาวของลำตัวในระยะต่างๆของการเจริญเติบโตนั้นแสดงในตารางที่ 1 การติดต่อของไร *Demodex* ในมนุษย์นั้น จะไม่อาศัยการติดต่อโดยผ่านโฮสต์ตัวกลาง แต่จะติดต่อจากมนุษย์สู่มนุษย์เท่านั้น โดยไรมักจะเคลื่อนที่เวลากลางคืน หลีกเลียขบริเวณที่มีแสงสว่างในอัตรา 16 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง [20] ซึ่งปริมาณไข่ที่ฟักในแต่ละครั้งนั้น ยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอนอนลักษณะไข่ของตัวไรทั้งสองสายพันธุ์ก็จะมีลักษณะแตกต่างกัน โดย *D. folliculorum* จะมีรูปร่างคล้ายเห็ด ส่วน *D. brevis* จะมีลักษณะเป็นกลมรีดังรูป



รูป 4 แสดงลักษณะรูปร่างของไร *Demodex* sp. จากรยะไข่ จนถึง ระยะตัวเต็มวัย
(ที่มา: <http://www.alinasadventuresinhomemaking.com/2012/06/exploring-our-forehead-parasites.html>)



รูป 5 แสดงลักษณะรูปร่างไข่ ของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* [21]

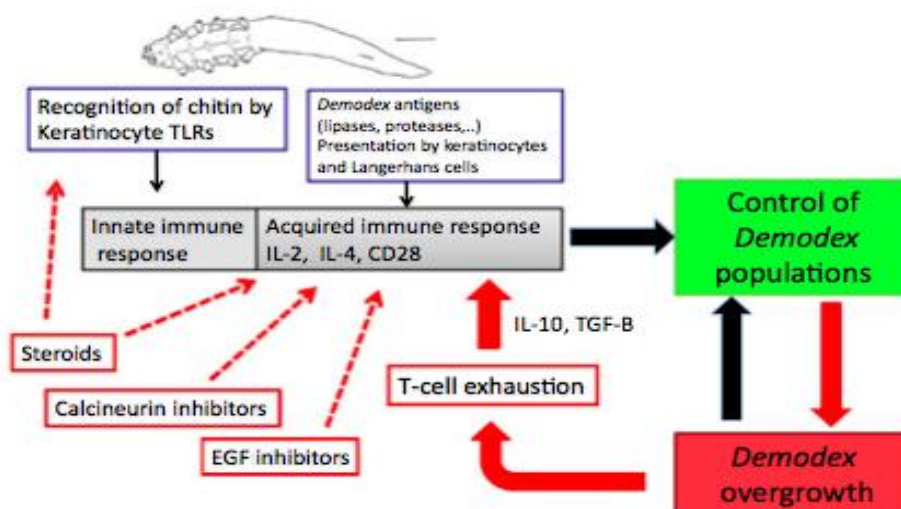
ตารางที่ 1 ตารางแสดงขนาดความยาวของลำตัวในระยะต่างๆ ของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* (มิลลิเมตร)

<i>Demodex folliculorum</i> , mm		Male	Female
Adult total	Length	0.2797	0.294
Adult gnathosoma (mouth and feeding parts)	Length	0.0195	0.0213
	Width	0.024	0.0265
Adult podosoma/prosoma (head-neck)	Length	0.0677	0.075
	Width	0.045	0.0519
Adult opisthosoma (tail)	Length	0.191	0.1979
	Width	0.0327	0.0403
Nymph (deutonymph)	Length	0.392	
	Width	0.0417	
Protonymph	Length	0.3649	
	Width	0.0363	
Larva	Length	0.2827	
	Width	0.0335	
Egg (ovum)	Length	0.1047	
	Width	0.0418	
	Depth	0.0376	
<i>Demodex brevis</i> , mm		Male	Female
Adult total	Length	0.1658	0.2083

(ที่มา : ดัดแปลงจากThe Journal of parasitology1972 vol:58 [16])

2.2 ความสำคัญทางการแพทย์ของไร *Demodex sp.*

ไร *Demodex* จะอยู่ร่วมกันกับมนุษย์ในภาวะอิงอาศัย (commensal) ได้มีหลักฐานพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของไร *Demodex* เนื่องจากได้ติดเชื้อฉวยโอกาส รวมทั้งปัจจัยอื่นที่ทำให้ไรเปลี่ยนรูปแบบจากภาวะอิงอาศัย (commensal) กลายเป็น ภาวะปรสิต (parasite) [22, 23] ถ้าผิวหนังของโฮสต์ มีสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของไรเช่น เกิดอาการผื่นที่ผิวหนัง ต่อมไขมันที่ผิวหนังเกิดการผลิตไขมันเป็นจำนวนมาก แต่จะไม่ทำให้เกิดโรคในคนบุคคลที่มีสุขภาพดี



รูป 6 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและพยาธิกำเนิดของไร *Demodex*
(ที่มา: Immunology and pathogenesis of canine demodicosis [24])

ปกติจะพบไรชนิดนี้ส่วนใหญ่ที่บริเวณใบหน้า ร่องแก้ม หน้าผาก จมูก คาง เปลือกตา เนื่องจากบริเวณเหล่านี้มีต่อมขนและต่อมไขมันอยู่เป็นจำนวนมาก จะไม่พบไรนี้ในเด็กแรกเกิด เนื่องจาก มีการผลิตน้ำมันของต่อมไขมันน้อย การติดต่อของไร *Demodex* จากคนสู่คนนั้นผ่านการสัมผัสผิวหนังของคนที่ติดเชื้อ หรือเกิดจากการติดต่อทางอ้อมผ่านการสัมผัสกับวัตถุที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ เช่น ผ้าขนหนู หวี ผ้าห่ม ฟองน้ำ นอกจากนี้ยังพบจำนวนของไร *Demodex* เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว เบาหวาน เอดส์ ผู้ป่วยที่ได้รับการบำบัดทางเคมีในการรักษาโรคมะเร็ง ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของไร *Demodex* อาทิเช่น ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังแต่ละบุคคล ซึ่งในปี 2010 Lacey และคณะได้มีการศึกษาเบื้องต้นในผู้ป่วย papulopustular rosacea พบว่าระดับ pH ของใบหน้าเพิ่มขึ้น และระดับความชุ่มชื้นลดลง [25] ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของกรดไขมันที่ผิดปกติ ซึ่งอาจเกิดจากการ *D. folliculorum* กินเซลล์ไขมัน เมื่อ *D. folliculorum* เพิ่มจำนวนมากขึ้นอาจทำให้เซลล์เยื่อบุผิวมีการแตกออกเนื่องจากวงจรชีวิตของตัวไรสั้น เมื่อไรกำลังตายลงจึงทำให้เกิดการปล่อยของเสียเข้าสู่รูขุมขน ส่งผลให้เกิดการอักเสบทางผิวหนังได้

ในเรื่องความสำคัญของไร *Demodex spp.* ที่มีความเกี่ยวข้องกับมนุษย์นั้น ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัด แต่จากการค้นคว้าวิจัยอย่างต่อเนื่องพบว่า ไรชนิดนี้ อาจมีความเกี่ยวข้องกับโรคทางผิวหนังของมนุษย์ได้

ปี 2005 Forton และคณะ รายงานว่าสามารถพบไร *Demodex* ในกลุ่มคนวัยผู้ใหญ่ ได้มากถึงเกือบถึง 100 % [7]

และต่อมาในปี 2014 Thoemmes และคณะ รายงานว่า สามารถตรวจพบไร *Demodex* ได้ในคนปกติ อย่างน้อย 1 สายพันธุ์โดยพบมากถึง 100% ในกลุ่มคนที่มีอายุ 18 ปีขึ้นไป [26]

นอกจากนี้ เราสามารถแบ่งลักษณะอาการทางผิวหนังที่เกิดจากพยาธิสภาพของไร *Demodex* ได้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ [27] คือ

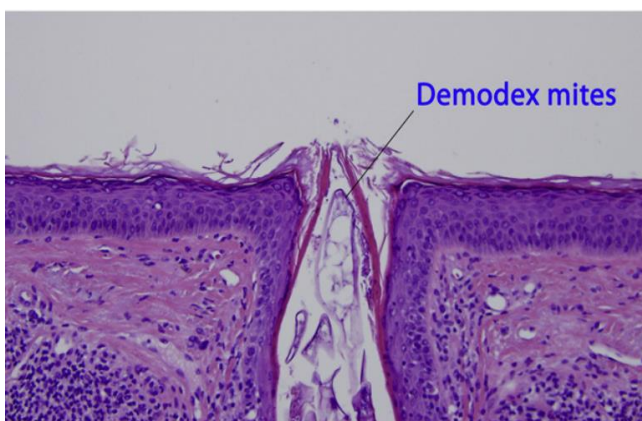
1. Pityriasis folliculorum

ส่วนใหญ่จะพบในผู้ที่ไม่ค่อยล้างทำความสะอาดใบหน้า แต่ใช้ครีมและแต่งหน้ามาก มาด้วยอาการคัน ผิวน้ำแดง แห้ง เป็นขุยร่วมกับอาการอักเสบและคัน ผิวน้ำจะไม่เรียบ ซึ่งจะทำให้ความรู้สึกหยาบคล้ายกระดาษทราย (sandpaper-like)



รูป 7 คนไข้ Pityriasis folliculorum

(ที่มา : J Am Acad Dermatol 2013[28])



รูป 8 ภาพแสดงรูขุมขนที่ประกอบด้วย ไร *Demodex* และเศษเคราติน (keratin debris)

(ที่มา: จาก Clinics in Dermatology 2014 [29])

2. Rosacea- like demodicosis

ลักษณะของผื่นที่พบจะคล้ายกับ Rosacea โดยจะเกิดอาการหน้าแดงอย่างเฉียบพลัน ร่วมกับการมีตุ่มหนอง แดง ขนาดเล็กมีขุยตามรูขุมขน ต่างจาก Rosacea คือ ขุยจะเป็นเกล็ดหรือแผ่นที่ใหญ่กว่า คนไข้ที่มีไร *Demodex* มักหน้ามัน มีประวัติการใช้ยาสเตียรอยด์ ซึ่งมีบางงานวิจัยพบว่าการติดเชื้อของ *D. folliculorum* เป็นจำนวนมากอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิด rosacea-like demodicosis [30, 31]

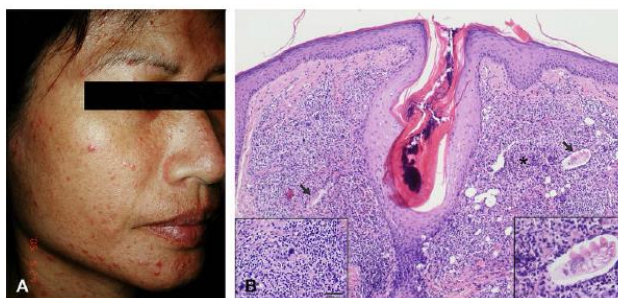


รูป 9 คนไข้ Rosacea- like demodicosis

(ที่มา: <http://demodicosis.blogspot.com/2012/05/symptoms-and-pictures-of-human-demodex.html>)

3. granulomatous rosacea-like

หรือเรียกว่า "demodicidosis gravis" ซึ่งจะมีลักษณะของผื่นที่พบคล้ายกลับ granulomatous rosacea มีการอักเสบที่ส่วนบนของใบหน้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะเกิดบริเวณรอบดวงตาและจมูก จะมีลักษณะเป็นรูปโดม (dome-shape) มีเลือดคั่งภายใน แต่ไม่มีหนอง เกิดผื่นแดงโดยรอบ ผู้ป่วยมักไม่มีประวัติ ผิวน้ำแดง (flushing)



รูป 10 A.คนไข้ granulomatous rosacea-like และ B.ภาพของการอักเสบบริเวณรูขุมขน

โดยมีลูกศรแสดงให้เห็นถึงการพบตัวไร *Demodex*

(ที่มา: J AM ACAD DERMATOL MARCH 2009[32])

นอกจากนี้ยังมีอาการของโรคผิวหนังอื่นๆที่มีความเกี่ยวข้องกับไร *Demodex* หลายชนิดเช่น
 1.Papulopustular rosacea 2.Pustular folliculitis 3.perioral dermatitis 4.Demodex
 Abscesses และ 5.blepharitis[33]

ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้ตรวจพบไร *Demodex*

จากการศึกษาในอดีตจนถึงปัจจุบันได้มีการกล่าวถึงหลายปัจจัย ดังนี้ [2, 7, 9, 27, 34-36]

อาทิ เช่น

- มีการรักษาสุขลักษณะที่ไม่ดี (Poor hygiene)
- การไม่ใช้สบู่ทำความสะอาดใบหน้า
- การใช้ครีม หรือเครื่องสำอาง
- การเกิดโรคผื่นผิวหนังอักเสบบริเวณใบหน้า
- ลักษณะของผิวหนังมัน ซึ่งเนื่องจากการผลิต sebum มากกว่าปกติ
- ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเบื้องต้น ในการใช้เทคนิคใหม่ในการตรวจหาไร *Demodex* ทางคลินิก เช่น การส่องกล้อง dermatoscopy [37]. เทคนิค confocal laser scanning microscopy (CLSM) [38] หรือ high-definition optical coherence tomography [39] ซึ่งเป็นวิธีที่ได้ผลรวดเร็ว ไม่รุกรานร่างกาย ส่วนความถูกต้อง แม่นยำนั้นยังคงอยู่ในขั้นตอนการพิจารณาตรวจสอบ โดยจำนวนไร *Demodex* ที่ตรวจพบนั้น จะขึ้นอยู่กับวิธีที่เลือกใช้ในการตรวจสอบ

2.2.1 โรคที่มีความเกี่ยวข้องกับไร *Demodex spp.*

จากรายงานการศึกษานั้นยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน ในการก่อโรคของไร *Demodex* เนื่องจากสามารถตรวจพบ ไรชนิดนี้ได้บนผิวหนังของคนปกติ แต่ถ้าหากไรมีจำนวนมากกว่า 5 ตัว ต่อตารางเซนติเมตร โดยใช้วิธี standardized skin surface biopsy [8] สามารถก่อให้เกิดโรคทางผิวหนังได้ อาทิเช่น ผื่นผิวหนังอักเสบร่วมกับรอยแดง (Rosacea) [40] หรืออาจเกิดร่วมกับการติดเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus albus* ทำให้เกิดการอักเสบและเกิดผดผื่น หนอง บริเวณผิวหนัง และโรคทางตาที่เรียกว่า blepharitis [41] ยังมีรายงานพบว่าความชุกในการเกิดโรค chronic blepharitis ซึ่งพบว่าการรักษาโดยใช้ tea tree oil (TTO) [42-44] จะช่วยลดการอักเสบของตาจากไรชนิดนี้ได้ เนื่องจาก TTO มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อรา แบคทีเรีย ร่วมกับการรักษาความสะอาดอย่างสม่ำเสมออัตราการเกิดโรคจะเพิ่มขึ้นตามอายุ เช่นในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุในช่วง 3-15 ปี จะมีอัตราการเกิดโรคได้ประมาณ 13% กลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุในช่วง 31-50 ปี จะมีอัตราการเกิดโรคได้ประมาณ 69 %

และกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 70 ปีขึ้นไป จะมีอัตราการเกิดโรคได้ประมาณ 95% [45] และพบว่าการก่อโรคส่วนใหญ่จะพบในผู้ชายมากกว่าผู้หญิงเพราะเพศชายมีการสร้างต่อมไขมันมากกว่าเพศหญิง โดยต่อมไขมันนั้นเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของการเจริญโตของไร *Demodex* [3, 35, 46]

มีการศึกษาเกี่ยวกับความหนาแน่นของ *Demodex* พบว่า บริเวณแก้มของผู้ป่วยที่เป็นโรค rosacea จะมีความหนาแน่นของเชื้อ *Demodex* เป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งการศึกษานี้ใช้วิธี Standardized Skin Surface Biopsy (SSSB) เมื่อตรวจสอบโดยใช้วิธีนี้พบเชื้อ *D. folliculorum* เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจาก *D. brevis* จะอยู่ลึกลงไปในชั้นไขมัน ในปี 2009 Zhao และคณะได้ทำการศึกษาและพบว่า อุณหภูมิมีผลต่อการอยู่รอดของของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* โดยอุณหภูมิที่อยู่รอดได้จะอยู่ในช่วง 5-37 องศาเซลเซียส จะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 16-20 องศาเซลเซียส ซึ่งการศึกษานี้อาจเป็นประโยชน์ในการควบคุมเชื้อ *D. folliculorum* และ *D. brevis* [47] และยังมีรายงานพบว่าแบคทีเรีย *B. oleronius* ที่ แยกได้จาก *D. folliculorum* ช่วยกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในผู้ป่วยที่เป็น papulopustular rosacea [48]

ในปี 2013 Kosik-Bogacka และคณะ ได้ทำการวิจัยในประเทศโปแลนด์ ใช้ผู้ป่วยจำนวน 95 คน โดยมาจาก 5 กลุ่มอาการ Acute leukemias, non-Hodgkin's lymphoma, myeloproliferative syndromes, multiple myeloma และโรคอื่นๆ เช่น myelodysplastic syndrome, hemophagocytic syndrome และผู้ที่มีสุขภาพดี จำนวน 1,091 คนเป็นกลุ่มควบคุม ทำการทดลองเก็บตัวอย่างขนตาทั้งข้างซ้ายและขวา อย่างละ 2 เส้นพบว่า *D. folliculorum* และ *D. brevis* มีเกี่ยวข้องกับการเป็นโรค blepharitis ในอัตราส่วนที่เท่ากัน และพบว่าผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง ไม่ได้เกิดจากการเพิ่มขึ้นของการติดเชื้อ *Demodex spp.*[17] ซึ่งในปีเดียวกัน Sonmez และคณะได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ *Demodex species* ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง (cancer) ชนิดต่างๆ ที่มีอายุในช่วงระหว่าง 38 และ 82 ปี พบว่า ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านม (breast cancer) มีการรบกวนของ *Demodex species* ในปริมาณสูงกว่ามะเร็งชนิดอื่นๆ โดยคิดเป็น 47.4% เนื่องจากเกิดการรบกวนของระบบภูมิคุ้มกันบริเวณผิวหนัง ซึ่งเกิดขึ้นได้โดยบังเอิญ และได้มีการศึกษาในผู้ป่วยที่มีค่า BMI สูงเกินมาตรฐาน (overweight BMI) พบว่า อาจทำให้เกิดการรบกวนของไร *Demodex* เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันลดต่ำลง รวมทั้งมีการใช้ยาสเตียรอยด์ [49]

อุบัติการณ์ ของไร *Demodex* พบว่าเพิ่มขึ้น ในผู้ป่วยที่เป็น โรคมะเร็งเม็ดเลือด (hematologic malignancies), เอ็ดส์ (AIDS) และ เบาหวาน (diabetes mellitus) โดยระบบภูมิคุ้มกันนั้นมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนของไรชนิดนี้[50] ในส่วนของการเกิดโรคโรซาเซีย (Rosacea) นั้นสาเหตุของการเกิดโรคนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อาจเกิดจากความผิดปกติของเส้นเลือดที่ผิวหนัง หรือ อาจมีสาเหตุเกี่ยวข้องกับตัวไร *Demodex* ที่พบบนใบหน้า ที่มีจำนวนมากขึ้น

ผิดปกติทำให้ผิวหนังเกิดการอักเสบและการระคายเคืองขึ้น แต่ก็ยังขาดข้อมูลสนับสนุนที่ชัดเจน [51, 52]

2.3 การรักษา

การรักษาโรค ที่เกิดจากไร *Demodex* นั้น มีการรักษาด้วยยาทาเฉพาะที่ (Topical) และ ยารับประทาน (systemic agents) ซึ่งค่อนข้างใช้ระยะเวลาในการรักษานานหลายเดือน ทั้งนี้ผลของการรักษาจะขึ้นอยู่กับระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย ลักษณะอาการ ซึ่งปัญหาในการรักษาที่เกิดขึ้นคือการกลับเป็นซ้ำของโรค ในปัจจุบันยังไม่มียาที่ใช้ในการรักษาไร *Demodex* โดยตรง ยาที่มีรายงานการใช้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงรายการยาที่ใช้ในรักษา ไร *Demodex sp.*

ยาทาเฉพาะที่ (Topical treatment)	ยารับประทาน (Systemic treatment)
Pilocarpine	Oral ivermectin
Tea tree oil (TTO)	Metronidazole
Topical permethrin cream	Tetracyclines
Lindane	Permethrin
Crotamiton	
Petroleum Jelly	
Melathion	
Metronidazole gel	
Sublimed sulfur ointment	

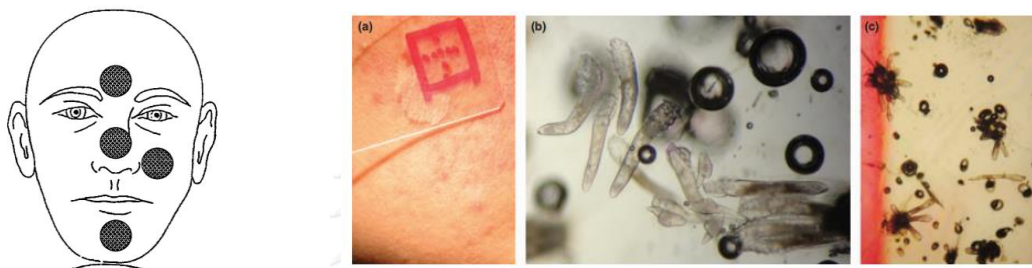
ควรให้ผู้ป่วยทำความสะอาดหน้าทุกวันด้วยสบู่อ่อนๆ รวมทั้งหลีกเลี่ยงการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ทำให้เกิดการอุดตันบนใบหน้า

ในกรณีที่ผู้ป่วยเป็นเรื้อรังอาจต้องให้ยาทาเป็น maintenance : 10% crotamiton cream ทาหลังล้างหน้าตอนเช้า และทา 10% crotamiton plus benzyl benzoate 12% หลังล้างหน้าตอนเย็น นาน 2-12 เดือน [53] [7]

2.4 วิธีการตรวจหาไร *Demodex sp.* ทางห้องปฏิบัติการ

ในปัจจุบันการตรวจหาไรทางห้องปฏิบัติการนั้น มีหลากหลายวิธี สามารถแบ่งได้เป็นแบบ Invasive และ non-invasive อาทิเช่น

- วิธี Standard Skin Surface Biopsy (SSSB) เป็นเทคนิคที่ใช้ Cyanoacrylate glue ใช้สำหรับหาความหนาแน่นของตัวไรในพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตรได้ เป็นการลอกผิวหนังชั้น horny layer มาตรวจสอบ หากพบว่ามีตัวไรมากกว่า 5 ตัว ต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตรจะถือว่ามีความผิดปกติ แต่ข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้หาความหนาแน่นของไรในบริเวณกว้างได้ เนื่องจากมีพื้นที่จำกัดในการเก็บตัวอย่าง [36]



รูป 11 การเก็บตัวอย่างโดยใช้วิธี Standard Skin Surface Biopsy(SSSB)

(ที่มา: ดัดแปลงจาก the American Journal of Forensic Medicine and Pathology • Volume 26, Number 1, March 2005 [35] และ Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 2011 European Academy of Dermatology and Venereology [54])

- วิธี Punch biopsy เป็นวิธีการเก็บตัวอย่างไร โดยการตัดชิ้นเนื้อ เพื่อตรวจสอบหาไร *Demodex* ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ค่อยนิยมเนื่องจากทำให้คนไข้ได้รับความบาดเจ็บ ซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาด้านระบาดวิทยา [51, 55]
- วิธี skin pressurized technique เป็นการเก็บตัวอย่างบริเวณใบหน้า โดยทำการเก็บ sebum ในบริเวณที่มีต่อมไขมันมาก คือ บริเวณต่อมไขมันข้างปีกจมูก ทำได้โดยใช้ spatula ในการบีบ sebum นำตัวอย่างที่ได้ ไปหยดลงบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการใช้วิธีนี้ทำให้มีโอกาสตรวจพบไร *Demodex* ได้สูง เนื่องจากการเก็บตัวอย่างบริเวณรูขุมขน ซึ่งเป็นการเก็บตัวอย่างโดยตรงจากแหล่งที่อยู่

ของไร *Demodex* [56]

- วิธี skin scraping ทำได้โดยใช้ใบมีดขูดบริเวณรอยโรคหรือผิวหนังที่สงสัย หลังจากนั้นนำขุยของผิวหนังที่ขูดได้วางบนสไลด์แล้ว แล้วทำการละลายด้วย 10% KOH (Potassium hydroxide) หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถตรวจพบตัวไรได้ในบริเวณกว้าง และปริมาณมาก เนื่องจากทำการเก็บตัวอย่างทั่วใบหน้า จึงทำให้มีโอกาสเจอไร *Demodex* ได้มากขึ้น แต่มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ในบริเวณที่ลึกพอ และไม่สามารถคำนวณความหนาแน่นของตัวไรต่อพื้นที่ได้[57]



รูป 12 การเก็บตัวอย่างโดยใช้วิธี skin scraping

(ที่มา : <http://en.paperblog.com/advanced-exfoliation-new-year-new-you-part-3-419740/>)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.5 การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับไร *Demodex sp.*

ปี 1998 Roihu และคณะ [58] ได้ทำการศึกษาโดยวิธี Facial Skin Biopsies ในกลุ่มคนที่ เป็นโรค rosacea 80 คน เป็นโรค eczematous eruption จำนวน 40 คน โรค lupus erythematosus discoides จำนวน 40 คนพบว่า จำนวน *D. folliculorum* พบมากที่สุดในกลุ่มคนที่ เป็นโรค rosacea 51% โรค lupus erythematosus discoides 31% และ โรค eczematous eruption 28 % ส่วนบริเวณใบหน้าที่พบมากที่สุด จะอยู่บริเวณ หน้าผาก 49 % รองลงมาคือบริเวณ แก้ม 44% จะพบบ่อยในเพศชายมากกว่าเพศหญิงโดยพบใน เพศชาย 59 % และ เพศหญิง 30 % จากการศึกษาทำให้ทราบว่า *Demodex* มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบในโรค rosacea

ปี 2010 Askin และคณะ [59] ได้มีการเปรียบเทียบการใช้วิธีการตรวจหาไร *Demodex* 2 วิธี คือ Direct microscope examination และ Standardized skin surface biopsy (SSSB) ในผู้ป่วยจำนวน 37 ราย เป็นหญิง 30 คน ชาย 7 คน ในช่วงอายุระหว่าง 16-72 ปี ที่เป็นโรคผิวหนัง Demodicosis ซึ่งเก็บตัวอย่างจากบริเวณแก้มของผู้ป่วย ทำให้ทราบว่าวิธีการตรวจ Standardized skin surface biopsy (SSSB) เป็นวิธีที่ sensitive ดีกว่าการใช้วิธี Direct microscope examination (DME) ซึ่งค่าเฉลี่ยการใช้วิธีตรวจ SSSB มีค่าสูงกว่า DME คือ $(36.5 \pm 8.3$ และ 3.4 ± 1.2 , respectively; $P = 0.0001$)

ปี 2012 Rojas M และคณะ [11] ได้ทำการศึกษา ความแตกต่างของ *D. folliculorum* ในมนุษย์ที่แยกได้จากแหล่งที่อยู่ต่างกันคือ จากบริเวณผิวหนัง และจากขนตา โดยใช้ยีน 16S rDNA และ cytochrome oxidase I (COI) พบว่าการแยกด้วย *D. folliculorum* ที่ได้จากผิวหนังบริเวณแก้ม และขนตามีความแตกต่างกันในด้านลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ปี 2014 Thoemmes M.S. และคณะ [26] ได้ทำการศึกษาไร *Demodex* บนใบหน้าของอาสาสมัคร โดยใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาในการศึกษาการเกิดของไรเดโมเด็กซ์ในมนุษย์ ใช้ 18S rRNA (18S rDNA) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและสายของวิวัฒนาการ ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มอาสาสมัครที่มีอายุ 18 ปีขึ้นไป จะสามารถพบไร *Demodex* ได้เกือบ 100 % และพบไร *Demodex* อย่างน้อยหนึ่งสายพันธุ์บนผิวหนัง ผลการศึกษาจากการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่า *D. brevis* มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *D. folliculorum*

ในการศึกษาทางอณูชีววิทยาเกี่ยวกับ *Demodex* นั้น มีข้อจำกัด 3 ประการ [60] คือ

1. มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับการก่อโรคของไร *Demodex* น้อย เนื่องจากยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า ไรชนิดนี้เป็น pathogenic หรือไม่
2. การสกัด DNA จาก ไร *Demodex* นั้นมีความยากลำบาก เนื่องจาก ไร *Demodex* เป็นปรสิตที่มีขนาดเล็กมาก
3. การที่จะได้จำนวนของไรปริมาณมากนั้นค่อนข้างยาก เนื่องจาก ไร *Demodex* มีความจำเพาะใน host ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแตกต่างกัน และไม่สามารถทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองได้ [47, 61]

2.6 รายงานการศึกษาความชุกของไร *Demodex*

ปี ค.ศ. 1982 Aylesworth และ Vance [4] ได้ทำการศึกษาใน skin biopsy พบ *D. folliculorum* มากกว่า *D. brevis* ซึ่งขึ้นอยู่กับ อายุ และเพศ โดยพบทั้งสองสายพันธุ์ในเพศชาย

มากกว่าเพศหญิง การศึกษานี้บอกได้ว่าระบบนิเวศและการระบาดของ *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการแยกสายพันธุ์ของไร *Demodex* จึงมีความจำเป็น ในการศึกษาบทบาทและความหลากหลายในการก่อโรคต่อไปในอนาคต

ต่อมาในปี 2009 Cao และคณะ [62] ได้มีการศึกษาความชุกในการเกิดโรค ของ *Demodex* ในกลุ่มนักเรียน เมืองทั้งชาน จำนวน 512 ราย พบเชื้อ *D. folliculorum* มากที่สุดถึง 82.3% และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง อีกทั้งยังพบว่า อาสาสมัครที่มีผิวมัน สามารถพบ *Demodex* ได้มากกว่าอาสาสมัครที่มีผิวแห้ง

ในปี 2011 Isa และคณะ[63] ได้ทำการศึกษา Cross-sectional study เกี่ยวกับความชุกของไร *Demodex* และศึกษาผลกระทบของผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิวหนัง และผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว ในกลุ่มอาสาสมัคร นักศึกษาแพทยมหาวิทยาลัย ประเทศมาเลเซีย จำนวน 390 ราย อายุระหว่าง 20-25 ปี โดยใช้วิธีการเก็บ 2 วิธี ได้แก่ Skin scraping และ Cellophane tape method หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการศึกษาพบว่า ทั้งหมดมีความชุกของไร *Demodex* คิดเป็น 17.2 % พบว่าความชุกของไร *Demodex* ในเพศชายมากกว่าเพศหญิง คิดเป็น 21.5% และ 12.8% ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างระหว่าง เชื้อชาติ อายุ ปัญหาของผิวหนังที่ต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ใช้ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิวหนัง และผลิตภัณฑ์ให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว จะพบความชุกของไร *Demodex* ลดลง 11.45 %

ในปี 2011 Horvath และคณะ [64] ได้ศึกษาความชุกของไร *Demodex* และปัจจัยเสี่ยงบริเวณใบหน้าของกลุ่มผู้ใหญ่ ประเทศฮังการี จำนวน 96 ราย พบทั้ง *D. folliculorum* หรือ *D. brevis* โดยรวมคิดเป็น 17.7% ซึ่งพบในเพศชาย 21.9% พบในกลุ่มผู้สูงอายุ 20% จากการศึกษาปัจจัยเสี่ยงพบว่า กลุ่มอาสาสมัครที่ใช้เครื่องสำอางมีแนวโน้มที่พบ *Demodex* ลดลง และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างไร *Demodex* กับ กลุ่มอาสาสมัครที่มีสัตว์เลี้ยง, กลุ่มคนที่ใช้สิ่งของร่วมกัน และกลุ่มคนที่ใกล้ชิดกับผู้สูงอายุ

ในปี 2012 ได้มีการศึกษาในเมืองบาบอล ประเทศอิหร่าน ในกลุ่มนักเรียน ผู้ป่วยและผู้สูงอายุ ในกลุ่มอายุที่แตกต่างกันในช่วงเมษายนถึงกรกฎาคม ปี 2011 ตรวจพบไร *Demodex* 14 ราย คิดเป็น 4.54 % พบมากในกลุ่มอายุ 21-40 ปี อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยจะทำการทดลองเพิ่มเติมในส่วนของการเกิดโรค Demodectosis ในประเทศ รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของการติดเชื้อโรคจากไรและปัญหาผิวหนังต่อไป [65]

ในปี 2014 Karaman และคณะ [66] ได้ทำการศึกษาความชุกของไร *Demodex* จากใบหน้าของนักศึกษามหาวิทยาลัย เมืองออร์ดู ประเทศตุรกี จำนวน 300 ราย อายุระหว่าง 17- 30 ปี โดยใช้วิธี Standardized skin surface biopsy (SSSB) ผลการศึกษาพบว่ามีความชุกของไร

Demodex โดยรวมคิดเป็น 37 % (110/300) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่าง เพศ อายุ ลักษณะผิวหนัง การใช้ผลิตภัณฑ์บำรุงหน้ากับการตรวจพบไร *Demodex*

2.6.1 การศึกษาความชุกของไร *Demodex* ในประเทศไทย

ในปี 2009 สภานนท์และคณะ [67] ซึ่งได้ทำการศึกษาในอาสาสมัคร จำนวน 200 ราย โดยสุ่มจากผู้ที่มารับบริการตรวจสุขภาพที่แผนกผู้ป่วยนอก เวชศาสตร์ป้องกัน โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2552 ถึง มกราคม 2553 เป็น เพศหญิงจำนวน 137 ราย และ เพศชาย 63 ราย ในช่วงอายุระหว่าง 18 - 73 ปี ทำการตรวจหาไร *Demodex* ด้วยวิธีการขูดผิวหนังชั้นนอก (skin scraping) พบว่า มีจำนวนของ *D. folliculorum* หนาแน่นมากที่สุด บริเวณจมูก คิดเป็น 20.5% และพบว่าปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องคือ ผิวหน้าผสม หรือ ผิวมัน ซึ่งในการศึกษานี้พบว่า สามารถพบไร *Demodex* ได้ในคนปกติ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายๆ ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับอาการแสดง

ใน ปี 2012 พุทธานุกาพันธ์ และคณะ [68] ได้ศึกษาหาความหนาแน่นของ *D. folliculorum* ในผู้ป่วยที่มีผื่นผิวหนังบนใบหน้า โดยทำการสุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่มีผื่นบริเวณใบหน้า จำนวน 150 และผิวปกติจำนวน 150 ราย ได้ทำการตรวจหาไร *Demodex* ด้วยวิธี Standardized skin surface biopsies ที่ตำแหน่ง หน้าผาก แก้ม จมูก และรอยโรคที่สงสัย ผลการศึกษาพบว่า ตรวจพบไร *Demodex* ในกลุ่มที่มีผื่นบนหน้า 59 ราย คิดเป็น (39.3%) และ 45 ราย คิดเป็น (30 %) ในกลุ่มคนปกติ พบว่าแก้มเป็นบริเวณที่มีความหนาแน่นของไร *Demodex* มากที่สุด จากการศึกษาทำให้ทราบว่า ผู้ที่มีผื่นผิวหนังอักเสบ และรูขุมขนอักเสบจะมีความหนาแน่นของไร *Demodex* มากกว่ากลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ

2.7 การศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์.

เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายด้านอณูพันธุศาสตร์

2.7.1 การเพิ่มปริมาณยีน 18S ribosomal RNA (18S rRNA) ด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR

การเพิ่มปริมาณยีนด้วย เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction) ถูกค้นพบ เมื่อปี ค.ศ. 1983 โดย Mullis [69] เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ให้ได้ปริมาณมาก ในระยะเวลาอันรวดเร็ว มีความไวสูง โดยเลียนแบบกระบวนการธรรมชาติ ในหลอดทดลอง (in vitro) โดยไม่ต้องอาศัยเซลล์โฮสต์ เริ่มจากดีเอ็นเอเป้าหมายชิ้นเดียวหรือเซลล์เดียว ปัจจัยสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ที่สำคัญ คือต้องทราบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน เพื่อที่จะสร้างนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวสั้นๆ (oligonucleotide primer) ประมาณ 20-30 เบส

จำนวน 2 เส้นที่สามารถจับกับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มจำนวน นอกจากนี้ในการทำ PCR ต้องใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอที่ทนความร้อน (thermostable) เพื่อช่วยในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ เอนไซม์ DNA polymerase ที่นิยมใช้แยกได้จากพวก archaea จากแบคทีเรียที่เติบโตได้ในน้ำพุร้อนที่เรียกว่า *Thermus aquaticus* จึงเรียกชื่อเอนไซม์นี้ว่า *Taq polymerase* โดยมี สารละลาย Mg^{+} เป็นปัจจัยร่วม นอกจากนี้แล้วการทำปฏิกิริยา PCR ต้องการนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นและมีบัฟเฟอร์เป็นตัวควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาทั้งหมดจะเกิดขึ้นในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycle) สามารถทำปฏิกิริยาทุกขั้นตอนอัตโนมัติ โดยทั่วไปจะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ประมาณ 30-40 รอบ ซึ่งในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction) 1 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

- ขั้นตอน Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอต้นแบบสายคู่ ให้เกิดการคลายตัวออกเป็นสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อนประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจน
- ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงให้เหลือประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส อาจมากหรือน้อยกว่านี้ซึ่งขึ้นอยู่กับความยาวของลำดับเบสไพรเมอร์และค่า melting temperature (T_m) เพื่อให้ดีเอ็นเอ เกิดการจับคู่กันกับไพรเมอร์สายคู่สม (complementary) ในขณะที่อุณหภูมิลดลงนั้นอาจเกิดการที่สายดีเอ็นเอต้นแบบอาจเกิดการกลับมาจับคู่กันได้ (reanneal) แต่เนื่องจากไพรเมอร์มีขนาดเล็กและมีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้มีโอกาสจับคู่กับสายดีเอ็นเอต้นแบบได้ก่อน โดยเกาะที่ตำแหน่งที่เป็นคู่สมกัน (complementary)
- ขั้นตอน Extension หรือ Synthesis เป็นขั้นตอนการเติมนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยเริ่มจากปลาย 3' ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ ขั้นตอนนี้อาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Taq DNA polymerase* ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างจากทิศ 5' ไป 3'

เมื่อครบ ทั้ง 3 ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาแล้วในแต่ละรอบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอนั้นจะได้จำนวนของ

ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ (exponential) สามารถคำนวณปริมาณขึ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบของ PCR ได้จากสูตร 2^n เมื่อ n คือ จำนวนรอบของปฏิกิริยา ทำให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นเรื่องที่สะดวกและง่าย เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ได้รับการนิยมน้อย่างกว้างขวาง **ดังรูปที่ 13**

เทคนิค Semi-Nested PCR ที่ใช้ในงานวิจัยจะต่างจาก PCR คือจะใช้ไพรเมอร์ 3 เส้น ให้มีความจำเพาะและความไว ในการเข้าทำปฏิกิริยามากขึ้น ส่วนขั้นตอนอื่นๆนั้นอาศัยหลักการเดียวกับการทำ PCR

2.7.2 การศึกษาลำดับของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing)

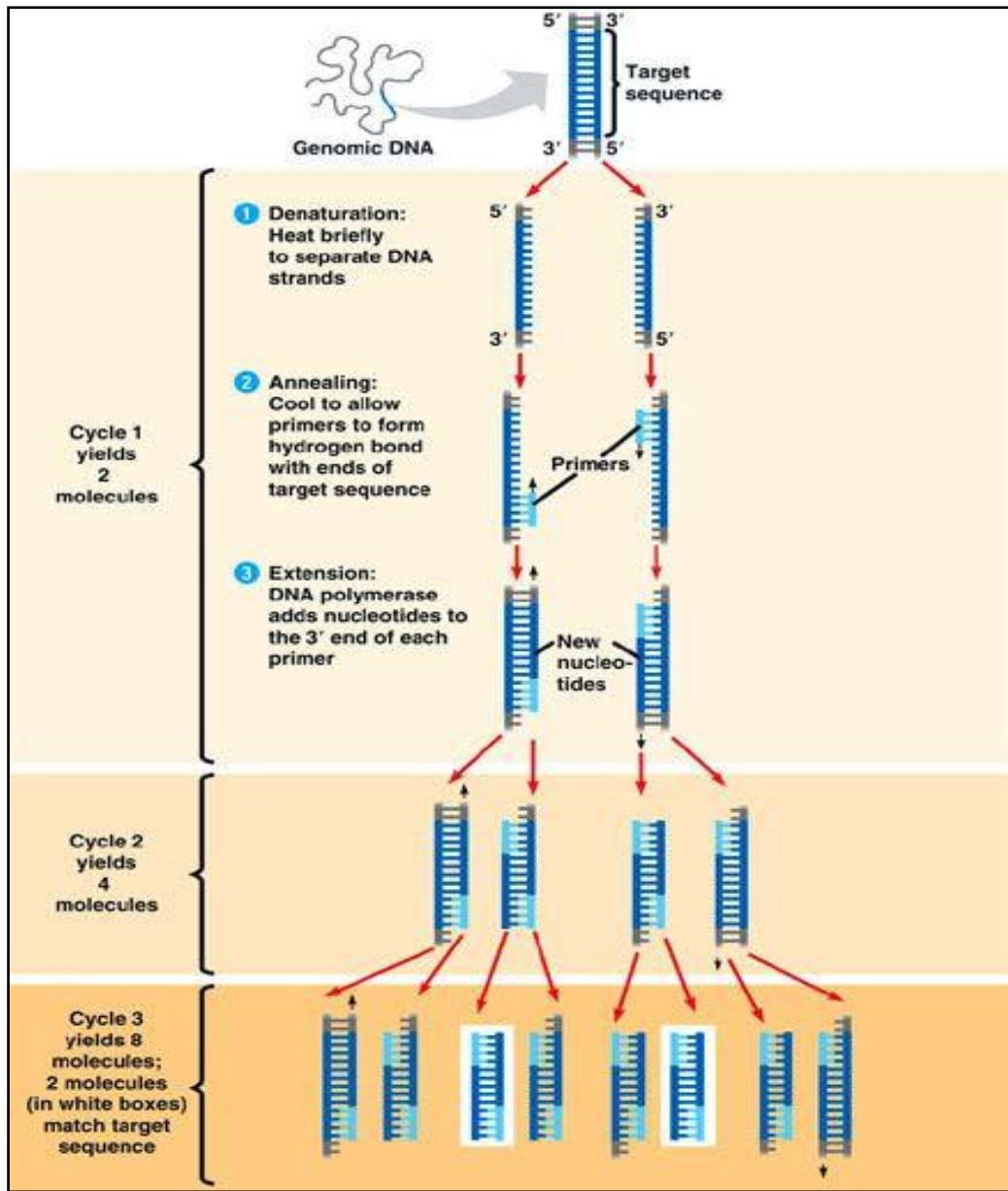
การทำ DNA Sequence เป็นวิธีถูกพัฒนาโดย Sanger และคณะ [70] ใช้หลักการเลียนแบบกระบวนการ DNA replication เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบสายเดียวที่ต้องการหาลำดับเบส เป็นต้นแบบในการจำลองสายคู่สมในหลอดแก้ว โดยขั้นแรก จะทำการใส่ไพรเมอร์สายสั้นๆ เพื่อให้เกิดการจับคู่ หลังจากนั้นแยกนำดีเอ็นเอต้นแบบไปใส่ในหลอดแก้ว 4 เพื่อจำลองตัวเอง ในแต่ละหลอดนั้นจะเติมเอนไซม์ DNA polymerase และ dNTP 4 ชนิด (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) ในปริมาณที่เหมาะสม นอกจากนี้ในแต่ละหลอดยังมีการเติม dideoxynucleotide (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไทด์จนจบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำให้ DNA polymerase ไม่สามารถเติมนิวคลีโอไทด์ตัวต่อไปในดีเอ็นเอสายใหม่ได้ เนื่องจากขาดหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3' ในโมเลกุลของน้ำตาลดีออกซีไรโบส ซึ่งเรียกวิธีการหาลำดับเบสโดยใช้ ddNTP ว่า dideoxy chain termination DNA sequencing โดยกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดขึ้นจะมีการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าทาง 3' ของไพรเมอร์ จนกระทั่งถึงตำแหน่งที่เอนไซม์เอา dideoxynucleotide เข้าไปแบบสุ่ม กระบวนการสังเคราะห์ก็จะยุติลง เมื่อครบปฏิกิริยา ในแต่ละหลอดจะมีดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีขนาดแตกต่างกัน แล้วนำเอาดีเอ็นเอใหม่ที่เกิดขึ้นจากแต่ละปฏิกิริยาไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้วิธี polyacrylamide gel electrophoresis และทำ autoradiography จะปรากฏแถบสีดำบนฟิล์มเอกซเรย์ การอ่านลำดับเบสนั้นจะเริ่มจากด้านล่างของแผ่นทางด้าน 5' ของสายดีเอ็นเอและอ่านเรียงขึ้นไปทางด้าน 3' ของสายดีเอ็นเอ ต่อมาได้ทำการพัฒนาโดยใช้สารฟลูออเรสเซนต์แทนสารกัมมันตภาพรังสีเพื่อลดอันตรายที่จะเกิดขึ้นแก่ผู้ทำการทดลอง ในปัจจุบันสามารถทำปฏิกิริยาทั้ง 4 ชนิด ได้ภายในหลอดเดียว เนื่องจากมีสารฟลูออเรสเซนต์เรืองแสงให้สีต่างกัน แล้วนำไปแยกด้วยเทคนิค capillary electrophoresis ซึ่งมีเครื่องอ่านผลโดยวัดจากสีที่เกิดขึ้นทำให้สามารถระบุชนิดของเบสได้ เครื่องมืออัตโนมัตินี้เรียกว่า เครื่องอัตโนมัติ (automated machines) ซึ่งทำให้สามารถหาลำดับเบสได้หลาย

นิวคลีโอไทด์ต่อวัน รวดเร็ว และใช้เวลาน้อยกว่าแบบเดิม ข้อมูลที่ได้จะถูกระบุออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ **ดังรูปที่ 14 และ 15**

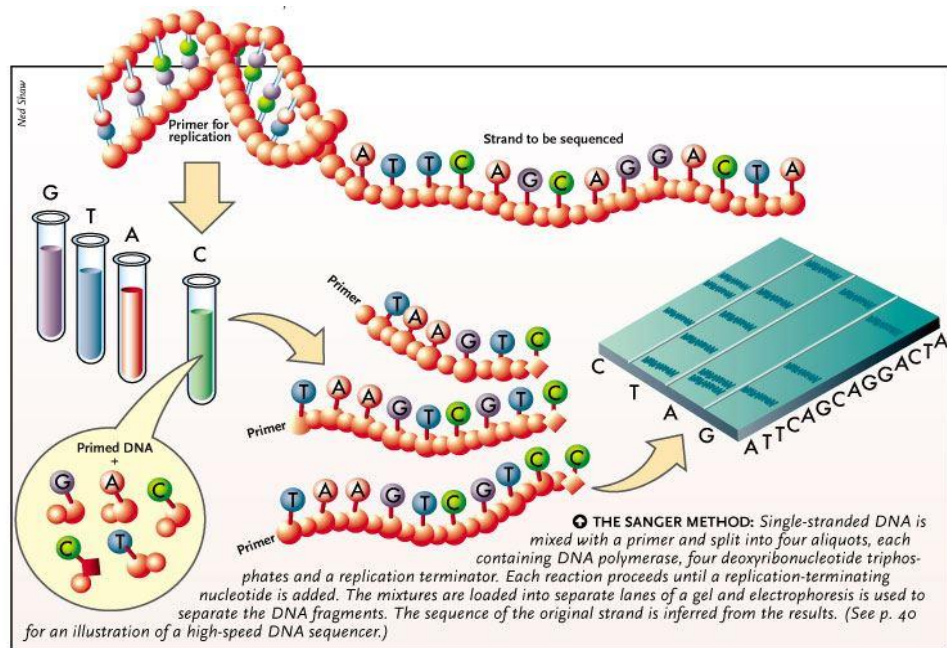
2.7.3 การศึกษาชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatic)

หรือ เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ชีววิทยาเชิงคำนวณ (Computational Biology) คือ ศาสตร์ด้านการเรียนรู้ ที่มีการนำเอาเทคโนโลยีสารสนเทศด้านคอมพิวเตอร์ในการจัดการเปรียบเทียบ วิเคราะห์ คำนวณ ประมวลผล มีการประยุกต์ความรู้จากหลายสาขา อาทิเช่น สถิติ วิทยาการคอมพิวเตอร์ ชีววิทยาของเซลล์ คณิตศาสตร์ เคมี สารสนเทศ ตลอดจนนำมาประยุกต์ในด้านชีววิทยาโมเลกุล เพื่อใช้ในการค้นหาคำตอบทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพอย่างเป็นระบบ ซึ่งเป็นการเชื่อมโยงข้อมูลกับการสืบค้นหรือประมวลผลเทียบเคียงกับฐานข้อมูลออนไลน์สากล เช่น ฐานข้อมูลของดีเอ็นเอ จะสืบค้นจากฐานข้อมูลสากล Genbank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีข้อมูลของดีเอ็นเอมากที่สุดของประเทศสหรัฐอเมริกา การสืบค้นหาความคล้ายคลึงของข้อมูล DNA RNA และโปรตีนจากฐานข้อมูล เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในสิ่งมีชีวิตนั้น จะใช้โปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ซึ่งจะมีการเปรียบเทียบเพื่อช่วยในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (evolutionary basis of alignment) เปรียบเทียบลำดับเบสเพื่อให้สามารถวัดเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%identity) หรือ ความคล้ายคลึง (similarity) ระหว่างยีนหรือโปรตีนนั้นๆ โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) นั้น จะใช้ในการเปรียบเทียบสายดีเอ็นเอ หรือโปรตีนหลายๆเส้นพร้อมกัน (multiple alignment)

ในการศึกษาด้าน phylogenetic tree นั้น เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพ ความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ รวมทั้งบรรพบุรุษที่มีต้นกำเนิดร่วมกันในระดับดีเอ็นเอ และโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกัน โดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในการวิเคราะห์ **ดังรูปที่ 16**

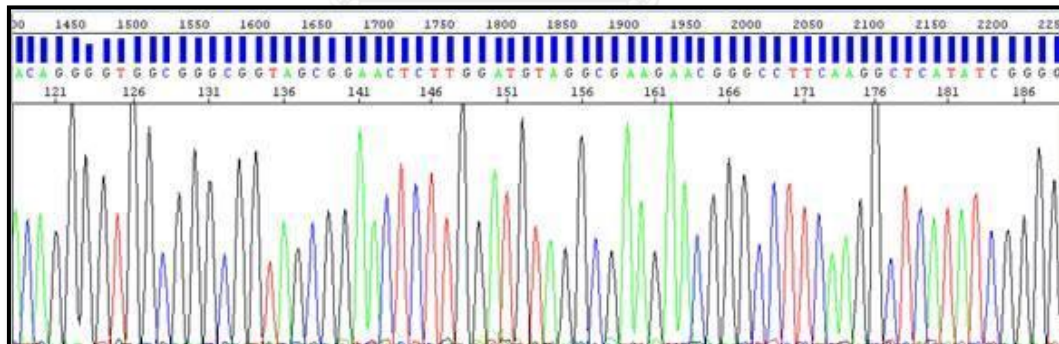


รูป 13 แสดงกระบวนการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction)
(ที่มา: <http://schoolworkhelper.net/pcr-uses-steps-purpose/>)



รูป 14 แสดงขั้นตอนการทำ DNA sequencing

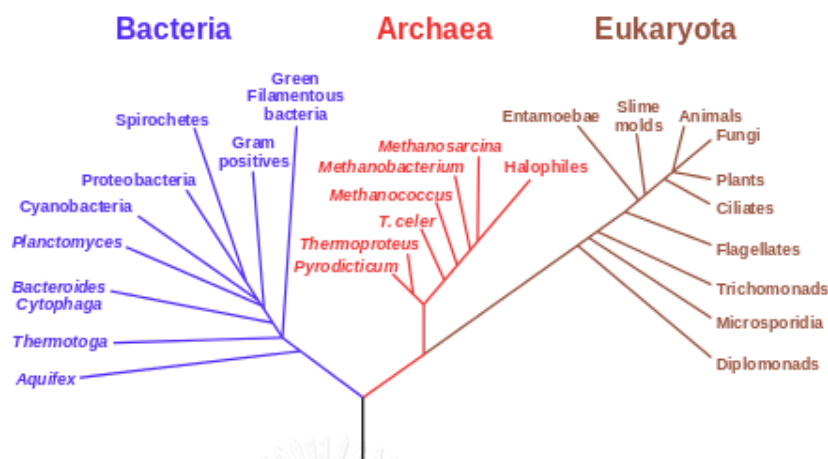
(ที่มา <http://nanohub.org/site/resources/2013/05/17816/slides/012.01.jpg>)



รูป 15 แสดง chromatograph จากการใช้เครื่อง Automated

(ที่มา <http://www.lwrw.org/Part2.htm>)

Phylogenetic Tree of Life



รูป 16 แสดงตัวอย่างภาพแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

(ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/Phylogenetic_tree)

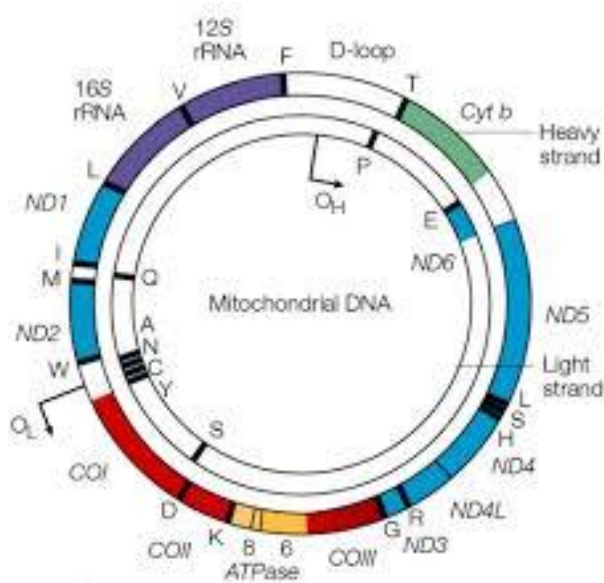
2.8 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลดีเอ็นเอ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้น จะใช้เครื่องหมายของทางโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือ DNA marker ที่ใช้ในการบ่งชี้เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ในด้านความแตกต่าง ที่บ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในการศึกษาเชิงวิวัฒนาการ บริเวณที่ใช้ในการศึกษานั้นสามารถใช้ศึกษาได้สองส่วนคือ บริเวณ ส่วนที่เป็นยีนที่ถอดเป็นรหัสพันธุกรรม (coding sequence) และบริเวณส่วนที่เป็นยีนที่ไม่ถอดเป็นรหัสพันธุกรรม (non-coding sequence) ทั้งนี้เราสามารถเลือกศึกษาได้ในยีนบนดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA gene) และ ยีนบนดีเอ็นเอนิวเคลียส (Nuclear DNA gene)

2.8.1 ยีนบนดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA gene)

ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียทำหน้าที่สำคัญคือ เป็นแหล่งผลิต ATP ให้แก่เซลล์ มีลักษณะเป็นวงกลมสายคู่ (circular double-stranded DNA) ประกอบด้วยยีน 37 ยีน มีความยาวประมาณ 16.5 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าจีโนมในนิวเคลียส สามารถพบในไซโทพลาซึมเท่านั้น ทำให้เซลล์ลูกที่ได้มีการถ่ายทอดมาจากแม่ตั้งนั้นการถ่ายทอดทางบรรพบุรุษจึงไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (non-Mendelian inheritance) แต่เป็นการถ่ายทอดจากเพศแม่เท่านั้น (maternal inheritance) จะเกิดกระบวนการถอดรหัสได้ rRNA 2 ชนิด เกิดกระบวนการแปลรหัสได้ tRNA 22 ชนิด และโปรตีนอีก 13 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยของ เอนไซม์ NADH dehydrogenase 7

หน่วย ได้แก่ ND1 ND2 ND3 ND4 ND4L ND5 ND6 (60 เบสเซ็นต์ของทั้งหมด) หน่วยย่อยของ เอนไซม์ cytochrome C oxidase 3 หน่วย ได้แก่ *COXI*, *COXII*, *COXIII*, หน่วยย่อยของเอนไซม์ ATP synthase 2 หน่วย ได้แก่ ATP6, ATP8 เอนไซม์ Cytochrome b 1 หน่วย ได้แก่ *Cytb* อีกทั้งยังมีกลไกในการป้องกันความผิดพลาดและระบบการซ่อมแซมตัวเอง (repairing system) ที่มีประสิทธิภาพต่ำ ทำให้เกิดความผิดพลาดของดีเอ็นเอในไมโทคลอนเดรียรวมทั้งการจำแนกสายพันธุ์เกิดขึ้นได้ การศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์โดยใช้ยีนไมโทคลอนเดรีย นั้น มีข้อจำกัดคือ ยีนมีขนาดเล็ก จึงใช้เป็นตัวแทนภาพรวมด้านวิวัฒนาการได้ไม่ดี



รูป 17 mitochondrial DNA gene

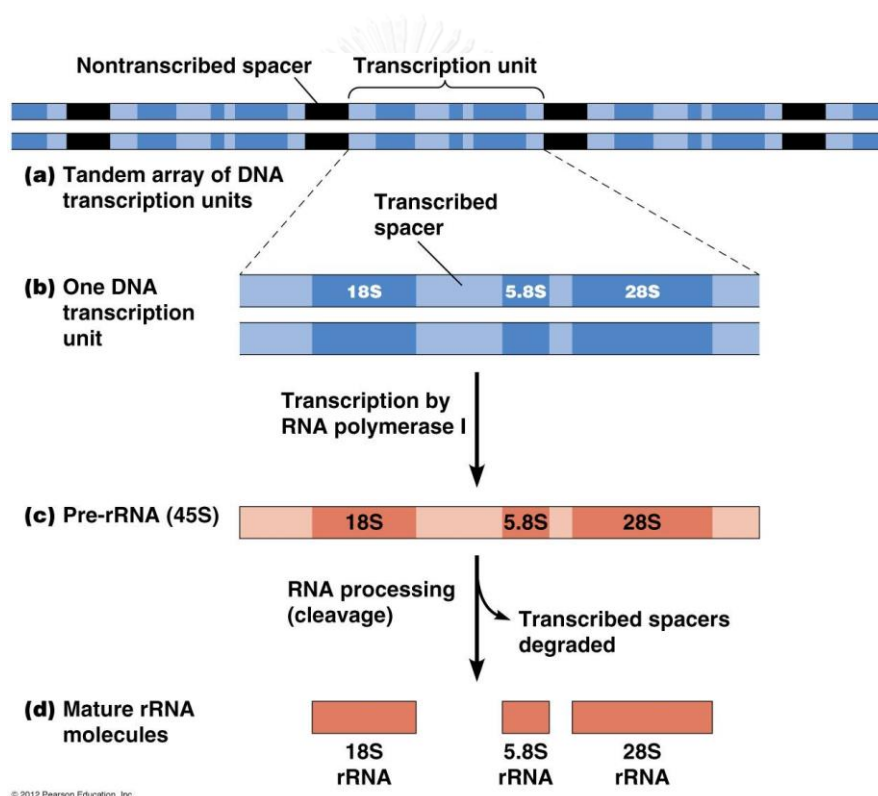
ที่มา <http://www.nature.com/scitable/topicpage/mtdna-and-mitochondrial-diseases-903>

2.8.2 ยีนบนดีเอ็นเอนิวเคลียส (Nuclear DNA gene)

ในส่วนของยีนบนนิวเคลียสจีโนมนั้นจะมีกระบวนการถอดรหัสจากดีเอ็นเอกลายเป็นอาร์เอ็นเอ โดยมีโมเลกุลอาร์เอ็นเอที่ได้จากกระบวนการถอดรหัส (transcription) เพื่อสร้างโปรตีน แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ 1. messenger RNA หรือ mRNA ทำหน้าที่นำข้อมูลทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอที่ถ่ายทอด เพื่อไปควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่ไรโบโซม 2. ribosomal RNA หรือ rRNA ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซม 3. transfer RNA หรือ tRNA ทำหน้าที่ในการนำกรดอะมิโนมาส่งให้ตรงกับรหัสบน mRNA เข้าไปยังไรโบโซมเพื่อทำการสังเคราะห์โปรตีน ยีนในกลุ่ม rRNA จะมีการเรียงต่อกันยาวแบบซ้ำๆ ในทิศทางเดียวกัน (tandem repeat) เรียกว่า rRNA transcription unit ของ

ยูคาริโอตนั้นมีตั้งแต่ 50 – 500 ชุดจะประกอบด้วยยีน 28S, 18S และ 5.8S rRNA ซึ่งจะมีการเรียงต่อกันโดยแต่ละยีนจะถูกคั่นด้วย spacer ยกเว้น 5S rRNA จะอยู่เป็นยีนเดี่ยวแยกไปในตำแหน่งอื่นบนโครโมโซม นอกจากนี้ยังพบว่ายีนบนบริเวณกลุ่มนี้ เป็นแบบอนุรักษ์ (conserved genes) มีความยาวปานกลาง มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการนำยีน 18S rRNA มาทำการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเพื่อบอกถึงความแตกต่างของจีนัสหรือสปีชีส์ โดยมีรายงานว่านิยมใช้ในการศึกษาในสิ่งมีชีวิตจำพวกไร (Acari) [71-73] เพื่อจัดลำดับหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิต ทำให้สามารถช่วยในการแก้ปัญหาการจำแนกไรแบบดั้งเดิมในอดีตได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ยีน 18S rRNA เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของไร *Demodex* ในประเทศไทย



รูป 18 nuclear DNA gene

(ที่มา: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-21/21_14.jpg)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study) งานวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติ จาก คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok หมายเลข IRB No. 175/57

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

3.2.1 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population)

คือ ประชากรเพศชายและหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป ที่มารับบริการการรักษาที่ แผนกหน่วยตรวจโรคผิวหนัง ชั้น 2 ตึก ภปร. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมการศึกษา (Inclusion criteria)

- ประชากรเพศชายหรือเพศหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปี ขึ้นไป
- คนไข้ที่มารับการรักษาที่แผนกหน่วยตรวจโรคผิวหนัง ชั้น 2 ตึก ภปร. โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยมีอาการทางผิวหนังที่สงสัยว่าจะเกิดจากการติดเชื้อของไร Demodex จากอาการ รอยแดง ผื่น การแสบคันบริเวณใบหน้า เป็นต้น

เกณฑ์ในการคัดเลือกรับจากการศึกษา (Exclusion criteria)

- ผู้ที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
- กลุ่มบุคคลพิเศษ (หญิงตั้งครรภ์ และ หญิงให้นมบุตร)

3.2.2 การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection)

ทำการเก็บตัวอย่างโดยการใช่วิธี Skin scraping (วิธีการขูดผิวหนัง) ซึ่งตำแหน่งที่ขูด ผิวหนังบริเวณใบหน้าจะทำการขูดทั่วใบหน้า ได้แก่ บริเวณแก้มทั้งสองข้าง หน้าผาก คาง ผิวหน้า บริเวณรอยโรค เป็นต้น โดยนำขุยของผิวหนังที่ขูดได้ มาวางบนสไลด์แล้วละลายด้วย 10% KOH (Potassium Hydroxide) แล้วนำสไลด์แก้วไปตรวจหาเชื้อ ไร Demodex (ในการขูดผิวหนังนั้นจะทำการขูดโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ แผนกผิวหนัง) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้นผู้วิจัยรับตัวอย่างที่

ได้ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50mL ที่ประกอบด้วย สารละลายแอลกอฮอล์ 70% เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอของไร ในขั้นตอนต่อไป

3.2.3 ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample size)

อาศัยอุบัติการณ์ของโรคจากการรายงานของ(Horváth A et al., 2011) และ (Zhongguo Ji Sheng Chong et al., 2009)

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

จากสูตร ที่ความเชื่อมั่นที่ 95% หรือ $\alpha = 0.05$, $Z_{\alpha/2} = 1.96$

$$e = Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 p(1-p)}{e^2}$$

กำหนดค่า $e = 0.12$ (หมายถึงการยอมรับให้เกิดความผิดพลาดได้ 12 %)

แทนค่า

$$n = \frac{(1.96)^2 \times (0.27) \times (0.73)}{(0.12)^2}$$

$$n = 53 \text{ ตัวอย่าง}$$

ดังนั้น ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างประมาณ 53 ตัวอย่าง

3.3 เครื่องมือ

- 3.3.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสาร DNA (Veriti 96 well Thermal cycle AB Applied Biosystems)
- 3.3.2 ตู้อบ BE 400 (Memmert)
- 3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker series Eppendorf)
- 3.3.4 เครื่อง Gel doc (Bio-Rad)
- 3.3.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Eppendorf centrifuge 5417R)
- 3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Eppendorf centrifuge 5430R)
- 3.3.7 เครื่อง Dry Bath Incubator (Clearer Scientific Ltd.)
- 3.3.8 เครื่อง vortex (FINEVORTEX)
- 3.3.9 เครื่อง Mini Centrifuge (Extra gene)

- 3.3.10 เครื่อง Electrophoresis (Bio-Rad, Sub-Cell GT)
- 3.3.11 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80° C Freezer Thermo (Thermal scientific)
- 3.3.12 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20°C (Cool Sanyo)
- 3.3.13 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4°C (Pharmaceutical Refrigerator)
- 3.3.15 ไมโครปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 0.1-10, 2- 20, 20- 200, 100-1000 µl
- 3.3.16 ปิเปตทิป pipette tip (Eppendorf)
- 3.3.17 เครื่องชั่ง Digital balance ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius German)
- 3.3.18 เครื่องไมโครเวฟ (R-220 Sharp)
- 3.3.19 เครื่องปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.3.20 กล้องจุลทรรศน์ (Nikon eclipse50i)
- 3.3.21 ตู้สำหรับเตรียมส่วนผสม PCR (cabinet PCR-01)
- 3.3.22 ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ Autoclave (HIRAYAMA HA-3D Japan)
- 3.3.23 ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ Autoclave (HVE-50 Japan)

3.4 อุปกรณ์

- 3.4.1 ถังมือยาง
- 3.4.2 นาฬิกาจับเวลา
- 3.4.3 กระบอกตวงขนาด 100 250 และ 1000 ml
- 3.4.4 หลอด flacon ขนาด 15 และ 50 ml
- 3.4.5 ปากคีบ (Forceps)
- 3.4.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.4.7 หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
- 3.4.8 พาราฟิล์ม (parafilm)
- 3.4.9 กระจาดชก
- 3.4.10 กล้องโพรบ
- 3.4.11 หลอดสำหรับทำ PCR
- 3.4.12 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- 3.4.13 หลอดหยด (dropper)
- 3.4.14 Loop และ spreader
- 3.4.15 ขวดแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารเคมี

3.5 สารเคมี

- 3.5.1 ชุดสกัดสำเร็จรูปสำหรับสกัด DNA (Invisorb[®] Spin Tissue Mini Kit)
 - 3.5.2 ชุดสกัดสำเร็จรูปสำหรับสกัด Plasmid(Invisorb[®] Plasmid Mini Two)
 - 3.5.3 สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธี Agarose gel electrophoresis
 - 3.5.4 ชุดสารเคมีในขั้นตอนการเตรียม PCR
 - 3.5.5 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Lueria-Bertani (LB) Agar, LB broth, SOB และ SOC medium
 - 3.5.6 สารเคมีสำหรับการเตรียม Competent cells
 - 3.5.7 สารเคมีในการตรวจสอบการ Clone
- หมายเหตุ : รายละเอียดการเตรียมแสดงใน ภาคผนวก ก

3.6 โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

- 3.6.1 โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.1.3.0 เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการ วิเคราะห์ข้อมูล รวมทั้งเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ใช้ในการอ่านกราฟ electropherograms และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่าง ความเหมือน ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะแสดงผลออกมาในรูปของ Sequence Identity Matrix
- 3.6.2 โปรแกรม nucleotide BLASTN 2.2.26+ (Basic Local Alignment Search Tools) เป็นโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้ตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ เทียบกับฐานข้อมูลโดยเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน Genbank
- 3.6.3 โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 (MEGA 6.0) โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสร้างแผนภูมิต้นไม้
- 3.6.4 โปรแกรม Bankit โปรแกรมออนไลน์ที่ใช้ในการเพิ่มข้อมูล ขอเลขทะเบียน (accession number) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ลงไปในฐานข้อมูล Genbank

3.7 การดำเนินการวิจัย

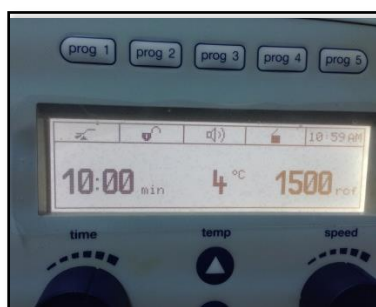
วิธีดำเนินการวิจัย

3.7.1 การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological species identification)

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เพื่อจำแนกชนิดของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* เมื่อได้สไลด์จากการเก็บตัวอย่างแล้ว โดยนำสไลด์ที่ได้มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกข้อมูลที่สังเกตได้ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปรวบรวมวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป



นำตัวอย่างสไลด์ใส่ลงในหลอด หลอด flacon ขนาด 50 ml หลังจากนั้นใส่สารละลายแอลกอฮอล์ 70% ประมาณ 20 mL เพื่อนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ



ทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างไร *Demodex* ที่ความเร็ว 1,500 rcf เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอน แล้วย้ายตัวอย่างไรที่เก็บได้ไปทำการสกัด DNA ตามชุดสกัดสำเร็จรูป



การวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยา

3.7.2 การสกัด DNA

เป็นการสกัด DNA จากตัวอย่างไร *Demodex* sp. โดยมีขั้นตอนการสกัดตามชุดสกัดสำเร็จรูปของบริษัท Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitex, Germany)[®] ที่เก็บได้จากผิวหนังบริเวณใบหน้า

ขั้นตอนการสกัด DNA มีดังนี้

1. ใส่ตัวอย่างของไร *Demodex* sp. ลงไปใน หลอด ขนาด 1.5ml หลังจากนั้นใส่ Lysis Buffer G ปริมาตร 400 μ l และ Proteinase K 40 μ l แล้วทำการผสมให้เข้ากันโดยการ vortex
2. นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 56^oC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำมาทำการปั่นเพื่อแยกตะกอน ที่ความเร็วรอบ 11,000rpm เป็นเวลา 2 นาที
3. นำสารละลายส่วนใส supernatant ใส่ใน หลอด 1.5ml หลอดใหม่ เติม Binding Buffer A ปริมาตร 200 μ l แล้วทำการ vortex เพื่อผสมให้เข้ากัน
4. เทสารทั้งหมดลงใน Spin Filter 2.0ml แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 2 นาที เมื่อครบกำหนด นำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000rpm เทส่วนใสทิ้ง เก็บ Spinfilter ไว้
5. เติม Wash Buffer ปริมาตร 550 μ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000rpm แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

6. ทำการปั่นแห้งเพื่อกำจัดเอทานอล ที่ความเร็ว 11,000 rpm นาน 4 นาที เมื่อครบกำหนด นำ Spinfilter มาใส่ในหลอด ขนาด 1.5 ml ที่เตรียมไว้ เติม Elution Buffer ปริมาตร 40 μ l แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที
7. เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปปั่นที่ความเร็ว 11,00 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ Spinfilter แล้วก็ได้ดีเอ็นเอของไร *Demodex* ทั้งหมด หลังจากได้ดีเอ็นเอแล้วนำไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอ ต้นแบบต่อไป

3.7.2.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณและประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

โดยจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ซึ่งดีเอ็นเอนั้นสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้ มาคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากสูตร

$$\text{สูตรหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{Dilution factor}$$

ถ้าวัดความเข้มข้นของค่า (A_{260}/A_{280}) ได้ค่าที่อยู่ในช่วง 1.80 – 2.0 แสดงว่าดีเอ็นเอ ที่สกัดได้มีคุณภาพดี แต่หากมีค่าต่ำกว่า 1.80 แสดงว่าตัวอย่างสารละลายมีโปรตีนและสารละลายฟีนอลปะปนอยู่ในสารละลาย แต่ถ้ามีค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนอยู่ในสารละลาย

3.7.3 การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR

การออกแบบไพรเมอร์ (primer)

เป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถนำมาใช้ในงานวิจัยได้อย่างมีความจำเพาะต่อยีน 18SrRNA จากฐานข้อมูลสากล (Genbank) ภายใต้ปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้โปรแกรม <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> โดยเริ่มจากการขั้นแรกคือ

1. ค้นหา sequence จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ไปที่ช่อง search เลือก nucleotide พิมพ์คำว่า *Demodex* gene 18S หลังจากนั้นคลิกที่ search เพื่อเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18SrRNA ของ *Demodex* แต่ละสายพันธุ์ เช่น *D. folliculorum* (accession no. GU377177, HQ728000, JN885464 และ JN885463) *D. brevis*

(accession no. GU377178, HQ727999, JN885466 และ JN885465) และ *D. canis* (accession no. JN885469, HQ727998, JN885468 และ JN885467) และ มนุษย์ (Human) (accession no. AP000902 และ AL390066) และ มนุษย์ (Human) (accession no. AP000902 และ AL390066)

- หลังจากนั้นแล้วคลิกที่ FASTA เพื่อดูลำดับเบสของ *Demodex* sp. เมื่อได้ลำดับเบสแล้วให้ทำการคัดลอกไฟล์ที่อยู่ในรูปแบบ FASTA ไปวางในโปรแกรม Notepad
- บันทึกไฟล์ให้อยู่ในรูปแบบของ .txt file แล้วเปิดโปรแกรม ClustalX 1.81 คลิกที่ File เลือก Load Sequences
- ทำการ alignment เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด คลิกที่ Alignment เลือก Do Complete Alignment หลังจากนั้นทำการ save sequence โดยทำการเลือก format ให้อยู่ในรูปแบบของ GCG/MSF
นำไฟล์ที่บันทึกไว้มาเปิดโดยใช้โปรแกรม GENEDOC แล้วทำการ Copy Select Block to Bitmap เลือก Copy 256 Color DIB นำไปวางในโปรแกรม Microsoft word เลือกบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดโดยสามารถจับไร *Demodex* ได้ทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งมีขนาดประมาณ 17-30 เบส และทำการคำนวณค่า Tm (Melting temperature) ของไพรเมอร์ จากสูตร $Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$ จากนั้นใช้โปรแกรมตรวจสอบลักษณะของไพรเมอร์ (โปรแกรม Oligocal) เพื่อตรวจหาการเกิด Hairpin และ self-complementary :ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบได้แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' - 3')	Length	Tm(°C)
Dm2 F	5' TAA CAG GTG ACG GGG AAT C-3'	19	54
Dmm2 R	5' TAG TGG TTG ACC CAA TAA CA-3'	20	51
DDm2 R	5' AAC ACY CGG TAA AGA GC-3'	17	52

หมายเหตุ: $Y = C/T$

ขั้นตอนการทำ Semi-Nested PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่เราสนใจ โดยการใส่ไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอ ของเชื้อ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน ทำให้ได้ PCR product ขนาดต่างกัน โดย *D. folliculorum* จะให้ขนาดของ PCR product ประมาณ 382 bp. ส่วน *D. brevis* ให้ขนาดของ PCR product ประมาณ 317 bp. จากนั้นทำการ

ใส่ส่วนประกอบอื่นๆ ในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งมีส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา แสดง
 ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา Semi-Nested PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร(μ l)
10x <i>Taq</i> buffer	2.5
2mM dNTPs	2.5
10 μ M Forward primer (Dm2F)	1
10 μ M Reverse primer (Dmm2R)	1
10 μ M Reverse primer (DDm2R)	1
50mM MgCl ₂	1.25
Template DNA	5
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.2
ddH ₂ O	10.55
ปริมาตรรวมทั้งหมด	25

หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Veriti[®] 96-Well Fast Thermal Cycler เพื่อตั้งอุณหภูมิและ
 เวลาที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนซึ่งมีหลักการดังนี้

1. เครื่องจะทำการเพิ่มอุณหภูมิตามที่กำหนดในขั้นตอนแรก คือ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เพื่อเตรียม DNA ต้นแบบให้แยกเป็น DNA สายเดี่ยว (Initial PCR activation step)
2. ต่อมาจะเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR จำนวน 35 รอบ ตามลำดับโดยเริ่มจากอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ DNA เกิดการสภาพ (Denaturation)
3. ทำการลดอุณหภูมิลงเหลือ 54.7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สาย DNA เกิดการจับอย่างจำเพาะกับไพรเมอร์ (Annealing)
4. หลังจากนั้นทำการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการเพิ่มความยาวให้สายนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase (Extension) ขั้นตอนนี้ใช้เวลา 1 นาที เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72°C นาน 7 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ DNA เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (Final extension) ตารางที่ 5

5. หลังจากนั้นทำการเก็บผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เก็บไว้ที่ 2-4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอนของการทำ Semi-Nested PCR โดยใช้เครื่อง Thermal cycle condition

ขั้นตอน (Step)	เวลา (นาที)	อุณหภูมิ(°C)	จำนวนรอบ (Cycle)
1. Initial PCR activation step:	3	95	1
2. ปฏิกิริยาลูกโซ่ของ PCR 3 ขั้นตอน ประกอบด้วย			} 35
- Denaturation	30 วินาที	95	
- Annealing	1	54.7	
- Extension	1	72	
Final extension	5	72	1

3.7.4 Agarose gel electrophoresis

เป็นการตรวจและวิเคราะห์ผลของ PCR product โดย Agarose gel electrophoresis เป็นการใช้กระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้น สำหรับแยก DNA ขนาดต่างๆ ซึ่ง DNA นั้นมีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปสู่ด้านที่มีประจุบวก DNA ที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่า DNA ขนาดใหญ่ จากนั้นจะนำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วย Ethidium bromide โดย Ethidium bromide จะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างสาย DNA เมื่อนำไปส่องด้วยแสง Ultraviolet จะทำให้สามารถมองเห็นแถบของ DNA ได้ ซึ่งเราจะทราบขนาดของ DNA ได้โดยการเปรียบเทียบกับ DNA marker ทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของ PCR product ได้

3.7.5 การโคลนนิ่งยีน 18S เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.7.5.1 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (DNA ligation)

เป็นการนำ DNA ที่เราสนใจมาเชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์ โดยอาศัย เอนไซม์ T₄ DNA ligase ให้เกิดเป็น ดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ pGEM[®]-T Easy Vector System I ของบริษัท (Promega, USA) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงส่วนประกอบและสัดส่วนที่ใช้ในขั้นตอนเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์

สารองค์ประกอบ	ปริมาณ (µl)
2x Rapid ligation buffer	5
pGEM [®] T- easy vector (50 ng/µl)	1
T4 ligase enzyme (5 U/µl)	1
PCR product (50 ng/µl)	2
ddH ₂ O	1
รวม	10

3.7.5.2 ขั้นตอนการ Transformation ในการถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้า competent cell โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน

เป็นขั้นตอนที่นำเข้าสู่โฮสต์เซลล์ในที่ใช้เชื้อ *Escherichia coli DH5α* ที่อยู่ในสภาวะเหมาะสมพร้อมที่จะรับเป็น Recombinant DNA เรียกว่า competent cell เข้าไปเพิ่มจำนวน ให้มีปริมาณมากโดยเริ่มจากนำ competent cell ที่ตู้ - 80 องศาเซลเซียส มาทำการละลาย โดยตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งให้ละลายประมาณ 10 นาที เมื่อละลายแล้ว ใช้ปิเปตดูด competent cell ใส่หลอดที่มีสารละลายที่ทำการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับ recombinant DNA หลังจากนั้นแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วนำไปทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยการนำไปแช่น้ำแข็ง 2 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปเติม SOC medium ปริมาตร 250 µl แล้วนำไปบ่มที่เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายมา spread บนจานเพาะเชื้อ LB agar ที่ส่วนผสมของ Ampicillin 100 µg/ml, Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.7.5.3 การคัดเลือกโคโลนี E. coli ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม (Blue/white Screen)

การตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector โดยแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายถอด DNA พาหะนั้นจะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มียา Ampicillin เนื่องจากพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector มียีนที่ดื้อต่อยา Ampicillin และมี *lac Z*

gene ที่ผลิตเอนไซม์ เอนไซม์ β - galactosidase โดยเอนไซม์ เอนไซม์ β - galactosidase จะทำการย่อยสาร X-Gal เกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า ซึ่งแสดงว่าไม่มีชิ้นส่วน DNA ที่เราสนใจแต่เมื่อ *lac Z* gene ได้รับชิ้นส่วน DNA เข้าไปสอดแทรก *lac Z* gene จึงไม่สามารถผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ได้ ดังนั้นจึงไม่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อย X-Gal ที่อยู่จนเพาะเชื้อได้ จึงทำให้เกิดเป็นโคโลนีสีขาวขึ้น

3.7.5.4 การทำ Colony PCR เพื่อตรวจสอบผลการโคลน

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ DNA เป้าหมาย โดยการตรวจสอบโคโลนีที่เราเลือกกว่า มีชิ้นส่วน DNA ที่เราสนใจแทรกอยู่ โดยเลือกโคโลนีสีขาวประมาณ 5 โคโลนีต่อ 1 plate ที่ต้องการยืนยันเป็น DNA template ซึ่งในการทำโคโลนี PCR นี้ จะลดปริมาตรรวมทั้งหมดเหลือ 10 μ l โดยจะนำไม้จิ้มฟันขีดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar สำหรับเป็น Master plate เพื่อนำไปเลี้ยงลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB broth ปริมาตร 5 μ l ที่มีส่วนผสมของ Ampicillin 100 μ g/ml เพื่อนำไปใช้ในการสกัดพลาสมิดต่อไป หลังจากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ DNA โดยการแยกขนาดของ DNA ใน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1.5% แล้วนำเจลที่ได้ไปตรวจดูภายใต้แสง Ultraviolet ซึ่งสามารถมองเห็นแถบสีของ DNA หลังจากนั้นทำการเก็บรวบรวมข้อมูลเพื่อนำไปใช้สำหรับในการวิเคราะห์ผลต่อไป

3.7.6 การสกัดพลาสมิดทีเอ็นเอ

เป็นการสกัดพลาสมิดทีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ทำให้เซลล์แตก เหลือเฉพาะพลาสมิดที่มีความบริสุทธิ์โดยมีขั้นตอนการสกัดตามบริษัท Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Kit (Stratec Molecular GmbH, Berlin)

ขั้นตอนในการสกัดพลาสมิด มีดังนี้

1. ทำการตกตะกอนเซลล์ โดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000rpm เป็นเวลา 5 นาที
2. หลังจากนั้นเติมสารละลาย A ปริมาตร 250 μ l ทำผสม (vortex) ให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย B ปริมาตร 250 μ l (ผสมอย่างเบาๆ)
3. เติมสารละลาย C ปริมาตร 250 μ l (ผสมอย่างเบาๆ) แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
4. เทสารทั้งหมดลงใน Spin Filter 2.0ml แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบกำหนด นำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000rpm เทส่วนใสทิ้ง เก็บ filter ไว้
5. เติม Wash Buffer 750 μ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000rpm แล้วเทส่วนใสทิ้ง

6. ทำการปั่นแห้งที่ความเร็ว 13,000rpm 3 นาที เมื่อครบกำหนด นำ SpinFilter มาใส่ในหลอด ขนาด 1.5 ml ที่เตรียมไว้ เติม Elution Buffer ปริมาตร 50 μ l แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที
7. เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000 rpm 1 นาที

จากนั้นนำสารละลายที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientetic) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร เหมือนขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบคุณภาพก่อนทำการส่งเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.7.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing)

ซึ่งในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในงานวิจัยนี้ได้รับการวิเคราะห์จากบริษัท AIT biotech (ประเทศสิงคโปร์) โดยมีบริษัท Prima Scientific CO.,LTD. เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ เป็นตัวกลางในการจัดส่ง ซึ่งในแต่ละตัวอย่างจะส่งหาลำดับเบสตัวอย่างละ 2 โคลน โดยส่งปริมาตร 30 μ l

3.7.7.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น ผลของการวิเคราะห์จะออกมาในรูปแบบของกราฟ electropherogram ใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.3.0 โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วนของยีน 18S rRNA ในรูปแบบ Fasta format ไว้ในโปรแกรม Notepad เพื่อใช้วิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3.7.7.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S กับฐานข้อมูล NCBI

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTN 2.2.26+ เป็นโปรแกรมที่ใช้ตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ เทียบกับฐานข้อมูล NCBI (Genbank) ทั้งหมด ซึ่งผลของการเปรียบเทียบจะถูกวิเคราะห์ด้วยค่าทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญและแสดงผลเป็นค่า Percentage Identities

3.7.7.3 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างภายในสายพันธุ์เดียวกัน

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำตัวอย่างมา align ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecific - divergence) ทำการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment

Editor version 7.1.3.0 เลือกใช้ โหมด Sequence identity matrix ซึ่งจากการคำนวณจะได้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นหาได้จากสูตร

สูตรการคำนวณ

เปอร์เซ็นต์ความต่าง = $100 - \text{เปอร์เซ็นต์ความเหมือน}$ (จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์)

3.7.8 การสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis)

ใช้โปรแกรม MEGA version 6.0 สร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมจากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ distance matrix โดยใช้วิธี Neighbor-joining method ซึ่งกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับ แบบ Kimura-2-parameter model และทำการทดสอบทางสถิติของการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis) ด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ โดยใช้ *Syngophylidae* sp. เป็น outgroup

3.7.9 การขอขึ้นทะเบียนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับของนิวคลีโอไทด์ของไร Demodex ที่ตำแหน่งยีน 18S มาขึ้นขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) เข้าไปในฐานข้อมูลออนไลน์ โดยใช้ โปรแกรม BankIt เพื่อใช้ในการยื่นขอเลขทะเบียนและใช้เผยแพร่ข้อมูลลงในฐานข้อมูล NCBI (Genbank)

บทที่ 4

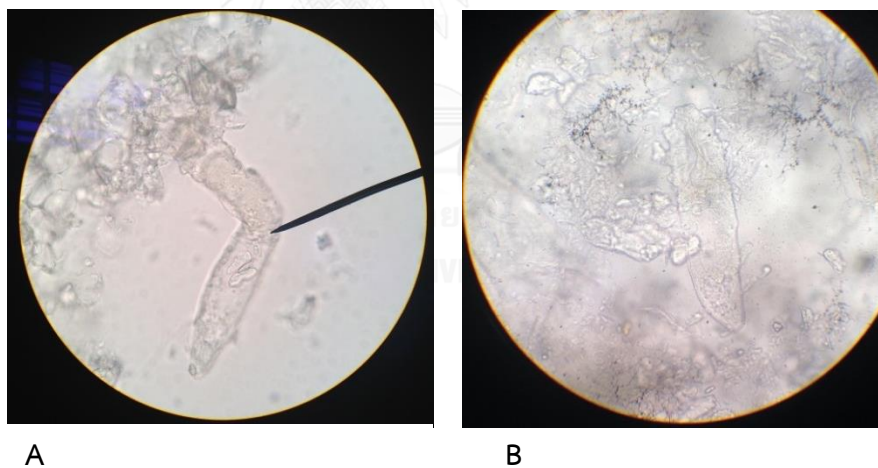
ผลการทดลอง

4.1 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ประชากรเพศชายหรือหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป ผู้ที่มารับบริการการรักษาที่แผนกหน่วยตรวจโรคผิวหนัง ชั้น 2 ตึก ภปร. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 62 คน เป็นเพศชาย 9 คน เป็นเพศหญิง 53 คน

4.2 ผลของการศึกษาทางลักษณะสัณฐานวิทยา

พบว่าลักษณะรูปร่างของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* จะมีลักษณะ แตกต่างกัน ซึ่ง *D. folliculorum* จะมีลักษณะลำตัวที่เรียวยาวคล้ายกระสวย ส่วน *D. brevis* นั้น จะมีลำตัวที่อ้วนสั้นกว่า *D. folliculorum* ดังรูปที่ 19



รูป 19 แสดงลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของ *D. folliculorum* และ *D. brevis*

ภาพ A แสดงรูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาของ *D. folliculorum*

ภาพ B แสดงรูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาของ *D. brevis*

ตารางที่ 7 ผลการตรวจ โดยใช้ Microscopic examination และ Semi-nested PCR

Microscopic	ผลการตรวจ	จำนวน (คน)	จำนวนตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ(%)
	พบ	21(ชาย 4/หญิง 17)	33.87
	ไม่พบ	41	66.13
	รวม	62	100%
Semi-Nested PCR	พบ	36(ชาย 6/หญิง 30)	58%
	ไม่พบ	26	42%
	รวม	62	100%

หมายเหตุ : พบ ใน Microscopic examination หมายถึง ส่องแล้วเจอตัวไร *Demodex* หรือ เจอซากของไร *Demodex*

จากตารางที่ 7 พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับการตรวจโดยใช้วิธี Microscopic examination มีจำนวน 21 คน คิดเป็นร้อยละ 33.87% พบในเพศชาย 4 คน เพศหญิง 17 คน ซึ่งเมื่อใช้วิธีการตรวจด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา Semi-Nested PCR พบว่าให้ผลบวก จำนวน 36 คน คิดเป็นร้อยละ 58% พบในเพศชาย 6 คน เพศหญิง 30 คน

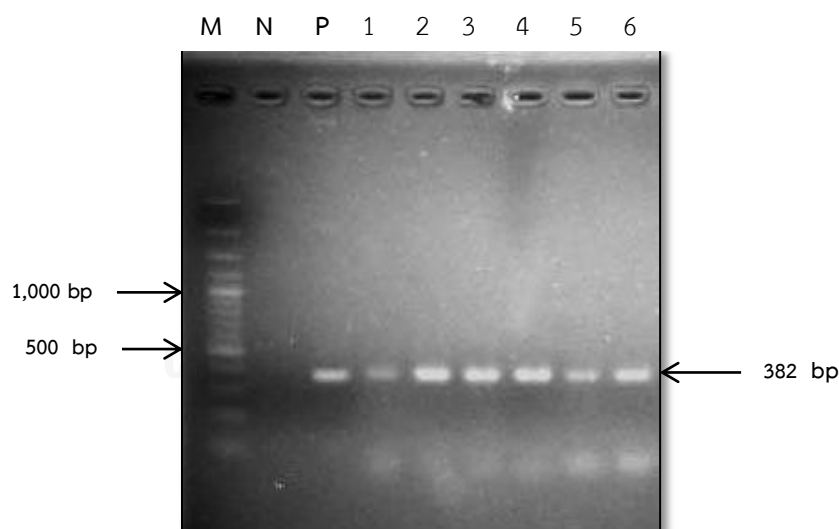
4.3 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 18Sr RNA โดยเทคนิค Semi-nested PCR

ทำการนำตัวอย่างดีเอ็นเอของไร *Demodex* ที่เก็บด้วยวิธี Skin scraping จากผู้ที่มาใช้บริการที่แผนกหน่วยตรวจโรคผิวหนังชั้น 2 ตึก ภปร.โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 62 ตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ เพื่อตรวจหาไร *Demodex* โดยใช้ไพรเมอร์ 3 เส้นที่ทำการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์ ที่ คือ Dm2 F (5' TAA CAG GTG ACG GGG AAT C-3'), Dmm2 R(5' TAG TGG TTG ACC CAA TAA CA-3') และ DDm2 R(5' AAC ACY CGG TAA AGA GC-3') ใช้เทคนิค Semi-Nested PCR ภายใต้ปฏิกิริยาในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้เครื่อง Thermal cycle ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของ PCR ด้วยการรันเจล 1.5% Agarose gel electrophoresis ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปตรวจดูภายใต้แสง UV จะให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *D. folliculorum* ประมาณ 382 bp (รูปที่ 20), *D. brevis*

ประมาณ 317 bp (รูปที่ 21) โดยเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน(DNA ladder) ซึ่งให้ผลบวกต่อ *D. folliculorum* จำนวน 25 ตัวอย่างและ ผลบวกต่อ *D. brevis* จำนวน 11 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 สรุปผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไรต์โมเด็กที่ตำแหน่งยีน 18srRNA ด้วยวิธี Semi-nested PCR

การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR	จำนวนตัวอย่างให้ผลบวก (%)
<i>D. folliculorum</i>	25/62 (40.3%)
<i>D. brevis</i>	11/62 (17.7%)
รวม	36/62 (58%)



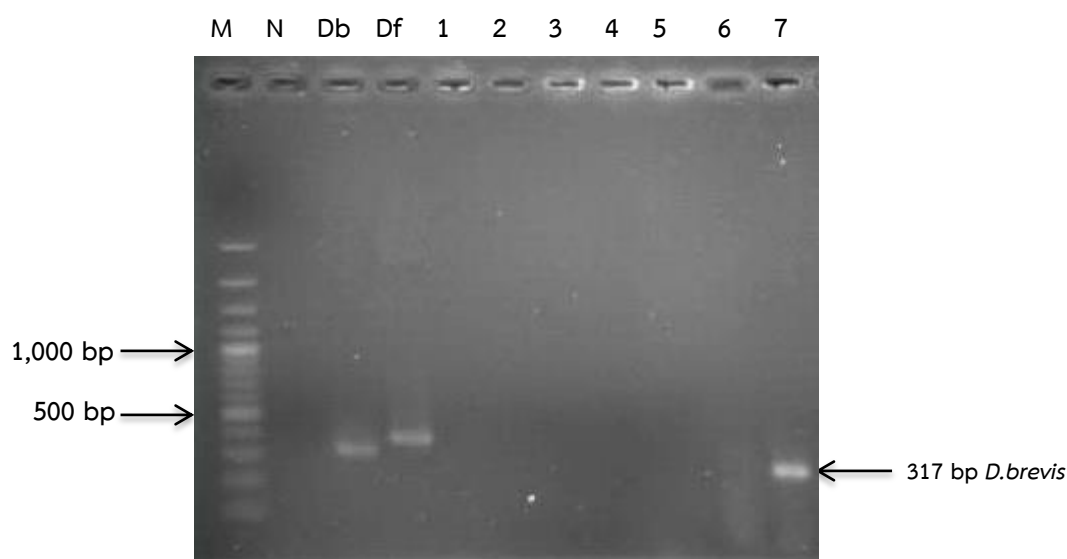
รูป 20 แสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของ PCR บริเวณชิ้นส่วนของยีน 18S โดยใช้วิธี gel electrophoresis บน 1.5% Agarose gel ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากตัวอย่างไร *D. folliculorum*

Lane M : DNA ขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

Lane N: Negative control โดยใช้ น้ำ ddH₂O

Lane P: Positive control

Lane 1-7: ตัวอย่างที่พบว่าเป็น *D. folliculorum*



รูป 21 แสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของ PCR บริเวณชิ้นส่วนของยีน 18SrRNA โดยใช้วิธี gel electrophoresis บน 1.5% Agarose gel ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากตัวอย่างไร *D. brevis*

Lane M : DNA ขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

Lane N : Negative control โดยใช้น้ำ ddH₂O

Lane Db : Positive control ของ *D. brevis*

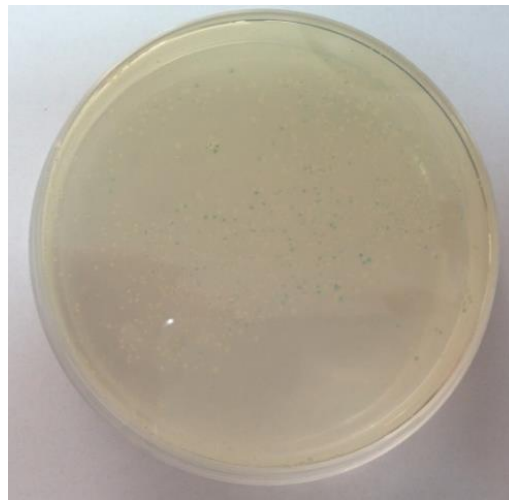
Lane Df : Positive control ของ *D. folliculorum*

Lane 1-7 : ตัวอย่างไร *Demodex*

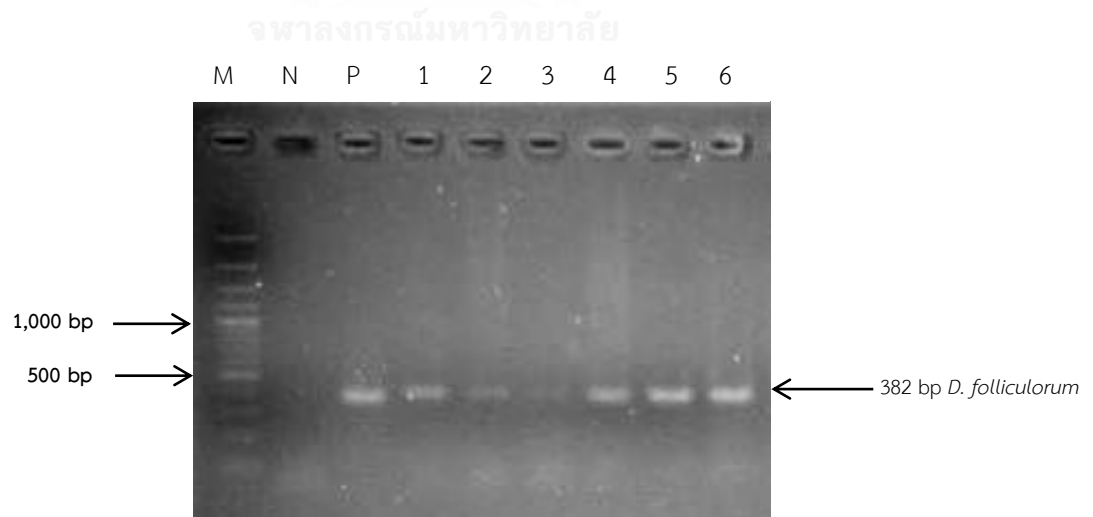
4.4 ผลการตรวจสอบการโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน 18SrRNA โดยใช้เทคนิค colony PCR

หลังจากนำไปไร *Demodex* ไปทำการสกัด ดีเอ็นเอตามชุดสกัดสำเร็จรูป และเพิ่มจำนวน โดยใช้เทคนิค Semi-Nested PCR แล้ว นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ ไปทำการ ligation เพื่อเชื่อมต่อยีน 18SrRNA เข้ากับ pGem-T easy vector แล้วทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ competent cell โฮสต์เซลล์ในที่นี่ใช้เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่อยู่ในสภาวะเหมาะสม ด้วยการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที หลังจากนั้นทำการตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector โดยการเลือกโคโลนี ซึ่งเอนไซม์ β -galactosidase จะทำการย่อยสาร X-Gal เกิดเป็นโคโลนีสีฟ้าแสดงว่าไม่มีชิ้นส่วน DNA ที่เราสนใจ แต่เมื่อ *lac Z* gene ได้รับชิ้นส่วน DNA เข้าไปสอดแทรก *lac Z* gene ทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ได้ จึงทำให้เกิดเป็นโคโลนีสีขาวขึ้น โดยนำโคโลนีสีขาวที่เลือก (รูปที่ 22) ไป

ตรวจสอบด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR เช่นเดิม แต่ลดสัดส่วนของปฏิกิริยาลงเหลือเพียงหลอดละ 10 ไมโครลิตร ซึ่งเราจะใช้โคลนีสีขาวที่เลือกแทนดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วนำไปตรวจสอบทำผลิตภัณฑ์ของ PCR ด้วยการรันเจล 1.5% Agarose gel electrophoresis ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ตั้งชั้นตอนที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งจะให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของไร *Demodex* แตกต่างกันทั้งสองสายพันธุ์ โดย *D. folliculorum* มีขนาดประมาณ 382 bp หากเป็น *D. brevis* จะให้ขนาดประมาณ 317 bp (รูปที่ 23)



รูป 22 แสดง โคลนีสีฟ้าและโคลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar ที่มีส่วนผสมของยา Ampicillin



รูป 23 แสดงผลการตรวจสอบการโคลนพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน 18Sโดยใช้วิธี gel electrophoresis บน 1.5% Agarose gel ภายใต้อุณหภูมิ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากตัวอย่างไร *D. brevis*

Lane M : DNA ขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

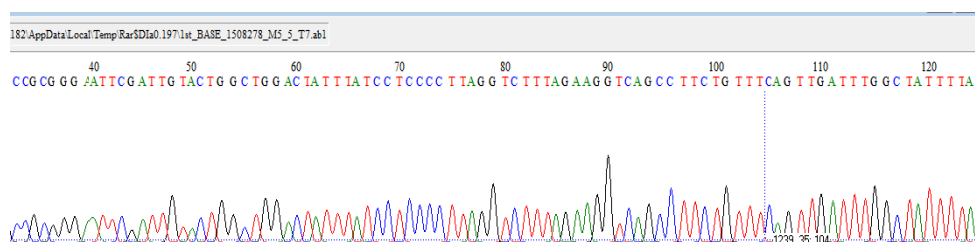
Lane N : Negative control โดยใช้ น้ำ ddH₂O

Lane P : Positive control

Lane 1-6 : ตัวอย่างโคลนที่พลาสมิดดีเอ็นเอมีชิ้นส่วนของยีน 18SrRNA

4.5 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยนำผลจากการตรวจสอบการโคลน นำโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน 18SrRNA เลี้ยงลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB broth ปริมาตร 5 μ l ที่มีส่วนผสมของ Ampicillin 100 μ g/ml เพื่อนำไปใช้ในการสกัดพลาสมิด ตามชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป หลังจากนั้นนำเอาพลาสมิดที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientetific) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร เหมือนขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบคุณภาพ แล้วทำการส่งเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท AIT biotech ประเทศสิงคโปร์ โดยมีบริษัท Prima Scientific CO.,LTD. เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ เป็นตัวกลางในการจัดส่ง ในแต่ละตัวอย่างจะส่งหาลำดับเบสตัวอย่างละ 2 โคลน ปริมาตร 30 μ l ซึ่งลำดับของนิวคลีโอไทด์จะแสดงในรูปของกราฟ chromatogram แล้วทำการเปรียบเทียบโดยการหา multiple sequence alignment วิเคราะห์จากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.3.0 โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วนของยีน 18SrRNA (รูปที่ 24) ในรูปแบบ Fasta format ไว้ในโปรแกรม Notepad เพื่อใช้วิเคราะห์ข้อมูลต่อไป



รูป 24 แสดงตัวอย่างกราฟ chromatogram ที่ได้จากการนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4.6 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18SrRNA ของไร Demodex กับฐานข้อมูลสากล

หลังจากได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำไปเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (Genbank) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ nucleotide blast (BLASTN) ซึ่งผลของการเปรียบเทียบจะวิเคราะห์ด้วยค่าทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญซึ่งแสดงผลเป็นค่าเปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับข้อมูล Percentage Identities (%) ซึ่งจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไร *Demodex* ที่เก็บได้จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มารับบริการที่แผนกผิวหนัง หน่วยตรวจโรคชั้น 2 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์นั้น พบว่าไร *D. folliculorum* มีค่า Percentage Identities (%) อยู่ระหว่าง 99-100 เปอร์เซ็นต์ (เฉลี่ย 99.04 %) และ *D. brevis* มีค่า Percentage Identities (%) 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลสากล GenBank (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 แสดงผลการเปรียบเทียบไร Demodex กับฐานข้อมูลสากล GenBank

ลำดับ	รหัส	Microscope	Semi-Nested PCR	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)	สายพันธุ์	% identity	Accession No.
1	S1	-	-	NA	NA	NA	NA
2	S2	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
3	S3	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
4	S4	+	+	317	<i>D. brevis</i>	100	KF745892
5	S5	-	-	NA	NA	NA	NA
6	S6	-	-	NA	NA	NA	NA
7	S7	-	-	NA	NA	NA	NA
8	S8	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
9	S9	-	-	NA	NA	NA	NA
10	S10	-	-	NA	NA	NA	NA
11	S11	-	-	NA	NA	NA	NA
12	S12	-	-	NA	NA	NA	NA
13	S13	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
14	S14	-	-	NA	NA	NA	NA
15	S15	-	-	NA	NA	NA	NA
16	S16	-	-	NA	NA	NA	NA
17	S17	-	-	NA	NA	NA	NA
18	S18	-	-	NA	NA	NA	NA

19	S19	-	-	NA	NA	NA	NA
20	S20	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
21	S21	-	-	NA	NA	NA	NA
22	S22	-	-	NA	NA	NA	NA
23	S23	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
24	S24	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
25	S25	-	-	NA	NA	NA	NA
26	S26	-	+	317	<i>D. brevis</i>	100	KF745892
27	S27	-	-	NA	NA	NA	NA
28	S28	-	+	317	<i>D. brevis</i>	100	KF745885
29	S29	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
30	S30	-	-	NA	NA	NA	NA
31	S31	+	+	317	<i>D. brevis</i>	100	KF745885
32	S32	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
33	S33	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
34	S34	-	-	NA	NA	NA	NA
35	S35	-	-	NA	NA	NA	NA
36	S36	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
37	S37	+	+	317	<i>D. brevis</i>	100	KF745885
38	S38	-	-	NA	NA	NA	NA
39	S39	-	-	NA	NA	NA	NA
40	S40	-	-	NA	NA	NA	NA
41	S41	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
42	S42	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
43	S43	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	JN885463
44	S44	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	100	KF745889
45	S45	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
46	S46	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
47	S47	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
48	S48	+	+	317	<i>D. brevis</i>	100	KF745885
49	S49	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
50	S50	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
51	S51	+	+	317	<i>D. brevis</i>	100	KF745885
52	S52	-	-	NA	NA	NA	NA

53	S53	-	-	NA	NA	NA	NA
54	S54	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
55	S55	+	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
56	S56	+	+	317	<i>D. brevis</i>	100	KF745885
57	S57	+	+	317	<i>D. brevis</i>	100	KF745885
58	S58	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
59	S59	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
60	S60	+	+	317	<i>D. brevis</i>	100	KF745885
61	S61	-	+	382	<i>D. folliculorum</i>	99	KF745889
62	S62		+	317	<i>D. brevis</i>	100	KF745885

หมายเหตุ: + คือ ตัวอย่างให้ผลบวก, - คือ ตัวอย่างที่ให้ผลลบ, NA คือ ไม่มีข้อมูล

4.7 ผลการขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์

นำตัวอย่างจากการวิจัยที่ทำการส่งหาลำดับเบสสั้น ไปขอขึ้นทะเบียนเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ (Accession no) โดยใช้โปรแกรมโปรแกรมออนไลน์ Bankit รวมทั้งใช้เผยแพร่ข้อมูลลงในฐานข้อมูล NCBI (Genbank) ซึ่ง ผลของการยื่นขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 36 ตัวอย่าง มีลำดับ ตั้งแต่ KT211866 ถึง KT211901แสดงในตารางที่ 10

4.8 ผลการวิเคราะห์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์

ทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม clustalW ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 จากนั้นเลือกโหมด sequence identity matrix ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific variation ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง *D. folliculorum* เท่ากับ 0-2.1% (รูปที่ 25 และตารางที่ 11) แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง *D. brevis* ไม่มีความแตกต่างกันภายในสายพันธุ์ เปอร์เซ็นต์ intraspecific variation เท่ากับ 0% (รูปที่ 26 และตารางที่ 12)

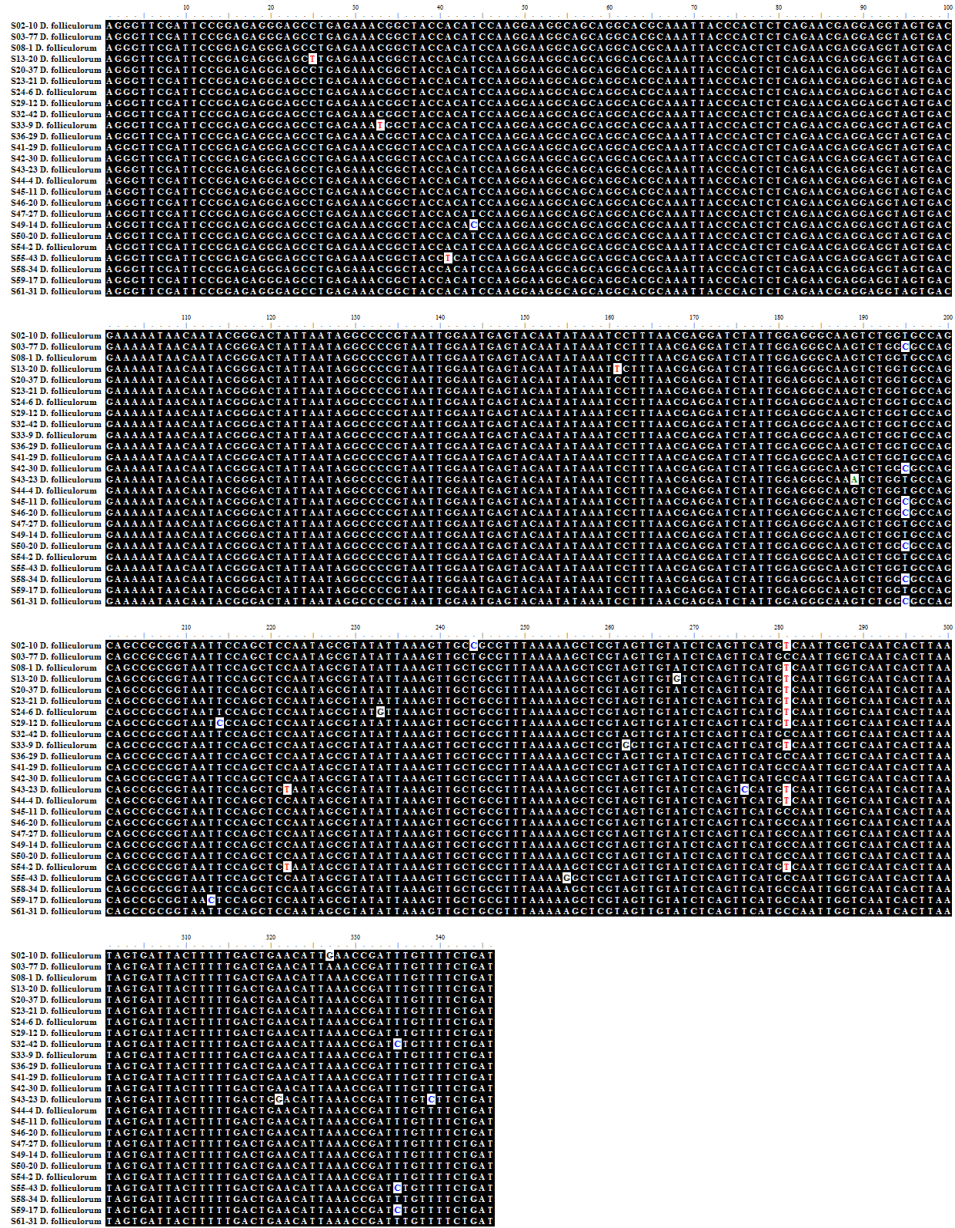
ทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์เนื่องจากขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกันคือ ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *D. folliculorum* ประมาณ 382 bp และ *D. brevis* ประมาณ 317 bp ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างชัดเจนโดยเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ คือ

ประมาณ 20% (20-20.3%) (รูปที่ 27 และตารางที่ 13) แต่เมื่อตัดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เท่ากันที่ ขนาด317 bp พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์เพียง 0.4-1.5% (รูปที่ 28 และตารางที่ 14)

ตารางที่ 10 แสดงเลขทะเบียนของลำดับนิวคลีโอไทด์

Code	Accession no.	Species
S02-10	KT211866	<i>Demodex folliculorum</i>
S03-77	KT211867	<i>Demodex folliculorum</i>
S08-1	KT211868	<i>Demodex folliculorum</i>
S13-20	KT211869	<i>Demodex folliculorum</i>
S20-37	KT211870	<i>Demodex folliculorum</i>
S23-21	KT211871	<i>Demodex folliculorum</i>
S24-6	KT211872	<i>Demodex folliculorum</i>
S29-12	KT211873	<i>Demodex folliculorum</i>
S32-42	KT211874	<i>Demodex folliculorum</i>
S33-9	KT211875	<i>Demodex folliculorum</i>
S36-29	KT211876	<i>Demodex folliculorum</i>
S41-29	KT211877	<i>Demodex folliculorum</i>
S42-30	KT211878	<i>Demodex folliculorum</i>
S43-23	KT211879	<i>Demodex folliculorum</i>
S44-4	KT211880	<i>Demodex folliculorum</i>
S45-11	KT211881	<i>Demodex folliculorum</i>
S46-20	KT211882	<i>Demodex folliculorum</i>
S47-27	KT211883	<i>Demodex folliculorum</i>
S49-14	KT211884	<i>Demodex folliculorum</i>
S50-20	KT211885	<i>Demodex folliculorum</i>
S54-2	KT211886	<i>Demodex folliculorum</i>
S55-43	KT211887	<i>Demodex folliculorum</i>
S58-34	KT211888	<i>Demodex folliculorum</i>
S59-17	KT211889	<i>Demodex folliculorum</i>

S61-31	KT211890	<i>Demodex folliculorum</i>
S04-22	KT211891	<i>Demodex brevis</i>
S26-5	KT211892	<i>Demodex brevis</i>
S28-5	KT211893	<i>Demodex brevis</i>
S31-22	KT211894	<i>Demodex brevis</i>
S37-3	KT211895	<i>Demodex brevis</i>
S48-28	KT211896	<i>Demodex brevis</i>
S51-2	KT211897	<i>Demodex brevis</i>
S56-52	KT211898	<i>Demodex brevis</i>
S57-17	KT211899	<i>Demodex brevis</i>
S60-35	KT211900	<i>Demodex brevis</i>
S62-28	KT211901	<i>Demodex brevis</i>



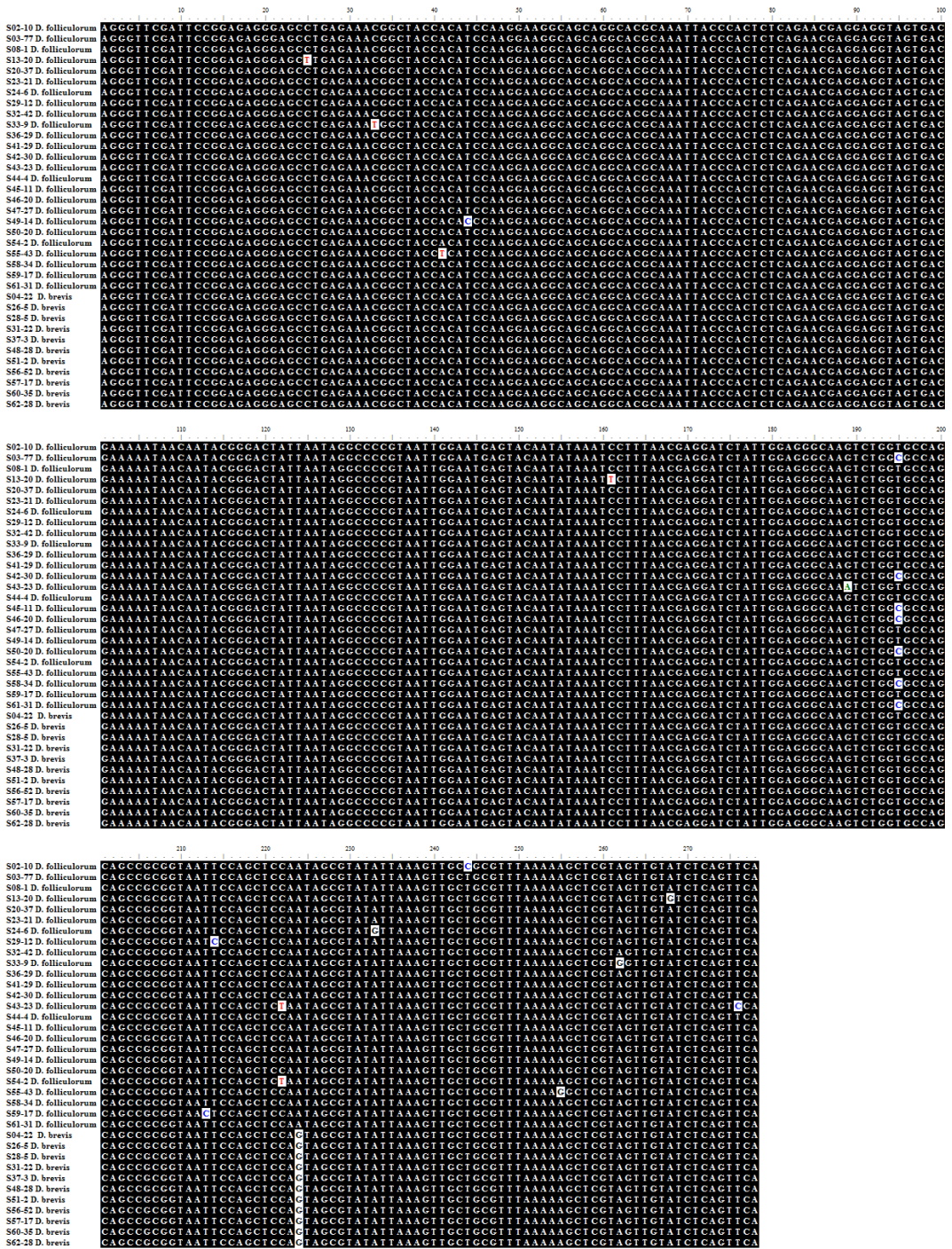
รูป 25 ผลการเปรียบเทียบ multiple alignment แสดงตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ D. folliculorum

แสดง % intraspecific variation ของ *D. folliculorum* จากการทำ sequence identity matrix

Seq>	502-10 D. folliculorum ID	503-77 D. folliculorum ID	508-1 D. folliculorum ID	513-20 D. folliculorum ID	520-37 D. folliculorum ID	523-21 D. folliculorum ID	524-6 D. folliculorum ID	529-12 D. folliculorum ID	532-42 D. folliculorum ID	533-9 D. folliculorum ID	536-29 D. folliculorum ID	541-29 D. folliculorum ID	542-30 D. folliculorum ID	543-23 D. folliculorum ID	544-4 D. folliculorum ID	546-20 D. folliculorum ID	547-27 D. folliculorum ID	549-14 D. folliculorum ID	550-20 D. folliculorum ID	554-2 D. folliculorum ID	555-43 D. folliculorum ID	558-34 D. folliculorum ID	559-17 D. folliculorum ID	561-31 D. folliculorum ID	
502-10 D. folliculorum ID	0.988 ID																								
503-77 D. folliculorum ID	0.994	0.994 ID																							
508-1 D. folliculorum ID	0.985	0.985	0.991 ID																						
513-20 D. folliculorum ID	0.994	0.994	1	0.991 ID																					
520-37 D. folliculorum ID	0.994	0.994	1	0.991 ID	1 ID																				
523-21 D. folliculorum ID	0.991	0.991	0.997	0.988	0.997	0.997 ID																			
524-6 D. folliculorum ID	0.991	0.991	0.997	0.988	0.997	0.997 ID	0.994 ID																		
529-12 D. folliculorum ID	0.991	0.991	0.997	0.988	0.997	0.997 ID	0.994	0.991 ID																	
532-42 D. folliculorum ID	0.988	0.994	0.985	0.994	0.994	0.991	0.991	0.988 ID																	
533-9 D. folliculorum ID	0.988	0.988	0.994	0.985	0.994	0.991	0.991	0.988 ID	0.991																
536-29 D. folliculorum ID	0.991	0.997	0.997	0.988	0.997	0.997	0.994	0.994	0.997	0.991 ID															
541-29 D. folliculorum ID	0.991	0.997	0.997	0.988	0.997	0.997	0.994	0.994	0.997	0.991	1 ID														
542-30 D. folliculorum ID	0.988	1	0.994	0.985	0.994	0.994	0.991	0.991	0.994	0.988	0.997	0.997 ID													
543-23 D. folliculorum ID	0.979	0.979	0.985	0.976	0.985	0.985	0.982	0.982	0.979	0.979	0.982	0.982	0.979 ID												
544-4 D. folliculorum ID	0.994	0.994	1	0.991	1	0.997	0.997	0.994	0.994	0.994	0.985 ID														
545-11 D. folliculorum ID	0.988	1	0.994	0.985	0.994	0.994	0.991	0.991	0.994	0.988	0.997	0.997	1	0.979	0.994 ID										
546-20 D. folliculorum ID	0.988	1	0.994	0.985	0.994	0.994	0.991	0.991	0.994	0.988	0.997	0.997	1	0.979	0.994	1 ID									
547-27 D. folliculorum ID	0.991	0.997	0.997	0.988	0.997	0.997	0.994	0.994	0.997	0.991	1	1	0.997	0.982	0.997	0.997 ID									
549-14 D. folliculorum ID	0.988	0.994	0.994	0.985	0.994	0.994	0.991	0.991	0.994	0.988	0.997	0.997	0.994	0.979	0.994	0.994	0.997 ID								
550-20 D. folliculorum ID	0.988	1	0.994	0.985	0.994	0.994	0.991	0.991	0.994	0.988	0.997	0.997	1	0.979	0.994	1	0.997	0.994 ID							
554-2 D. folliculorum ID	0.991	0.991	0.997	0.988	0.997	0.997	0.994	0.994	0.991	0.991	0.994	0.994	0.991	0.988	0.997	0.991	0.991	0.991	0.994	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991 ID
555-43 D. folliculorum ID	0.982	0.988	0.988	0.979	0.988	0.988	0.985	0.985	0.994	0.982	0.991	0.991	0.988	0.973	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.985 ID	
558-34 D. folliculorum ID	0.988	1	0.994	0.985	0.994	0.994	0.991	0.991	0.994	0.988	0.997	0.997	1	0.979	0.994	1	0.997	0.994	1	0.991	0.988	0.988	0.988	0.985 ID	
559-17 D. folliculorum ID	0.985	0.991	0.991	0.982	0.991	0.988	0.988	0.988	0.997	0.985	0.994	0.994	0.991	0.976	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.988	0.991	0.988	0.991	0.991 ID	
561-31 D. folliculorum ID	0.988	1	0.994	0.985	0.994	0.994	0.991	0.991	0.994	0.988	0.997	0.997	1	0.979	0.994	1	0.997	0.994	1	0.991	0.988	0.988	0.991	0.991 ID	

แสดง % interspecific variation ของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* จากการทำ sequence identity matrix

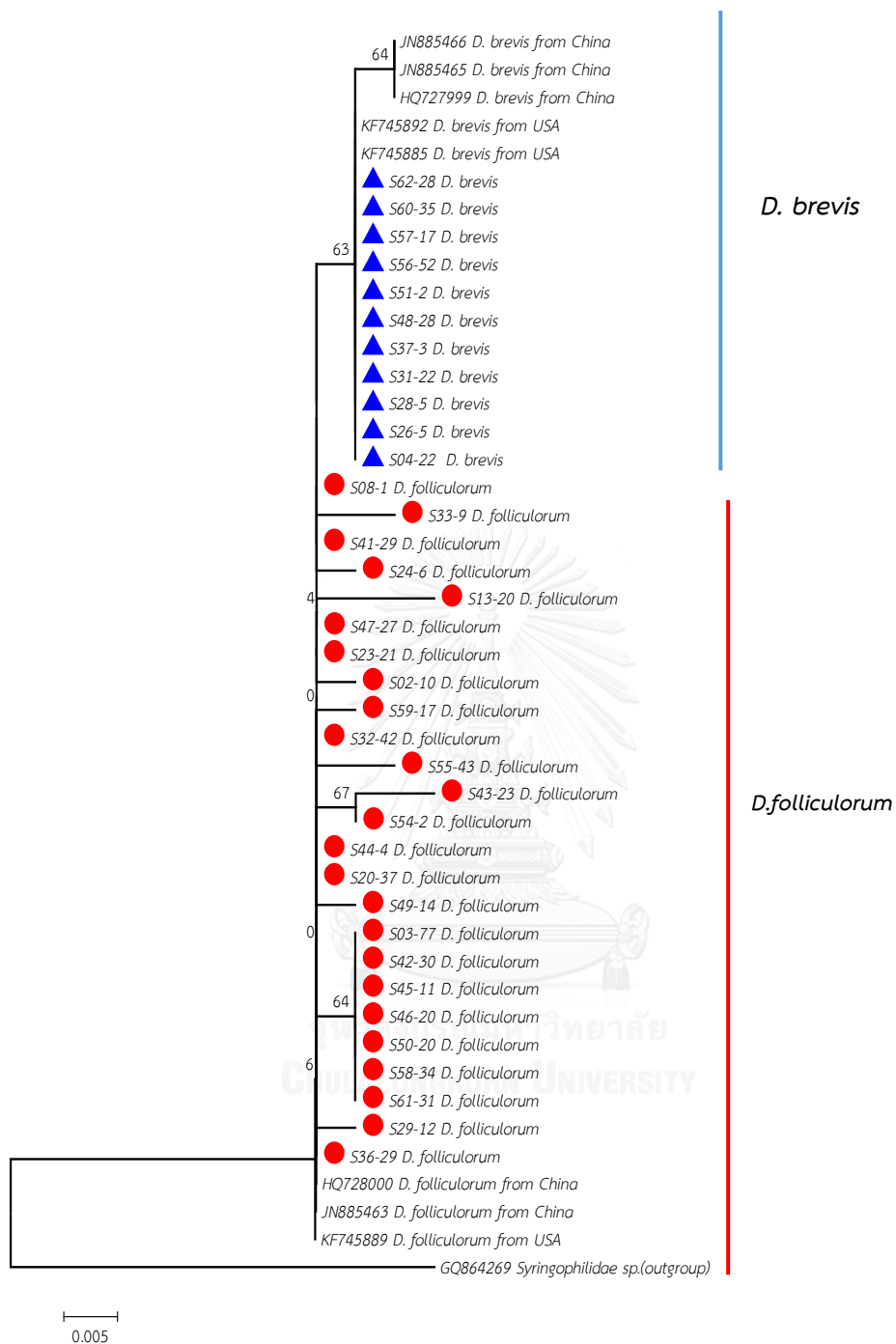
Sequence Identity Matrix Input Alignment File: Unlited	592-10.D	593-17.D	598-1.D	615-13.20.D	620-37.D	625-21.0	632-57.D	635-21.0	638-42.D	642-29.D	643-30.0	643-23.0	644-4.D	645-11.D	646-20.0	647-27.D	649-14.D	650-20.D	656-2.D	655-5.D	655-43.D	655-34.D	659-17.D	661-31.0	662-22.D	656-5.D	658-5.D	653-22.D	653-13.0	656-28.D	655-2.D	656-52.D	657-17.D	660-35.D	662-28.D	brevis		
592-10.D	1.000																																					
593-17.D	0.994	1.000																																				
598-1.D	0.985	0.991	1.000																																			
615-13.20.D	0.994	0.994	0.994	1.000																																		
620-37.D	0.991	0.991	0.991	0.991	1.000																																	
625-21.0	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	1.000																																
632-57.D	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	1.000																															
635-21.0	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	1.000																														
638-42.D	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	1.000																													
642-29.D	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	1.000																												
643-30.0	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	1.000																											
643-23.0	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	1.000																										
644-4.D	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	1.000																									
645-11.D	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	1.000																								
646-20.D	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	1.000																							
647-27.D	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	1.000																						
649-14.D	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	1.000																					
650-20.D	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	1.000																				
654-2.0	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	1.000																			
654-2.0	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	1.000																		
655-48.D	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	1.000																	
655-48.D	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	1.000																
656-2.D	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	1.000															
656-2.D	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	1.000														
656-52.D	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	1.000													
657-17.D	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	1.000											
657-17.D	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	1.000										
660-35.D	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997
662-28.D	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997



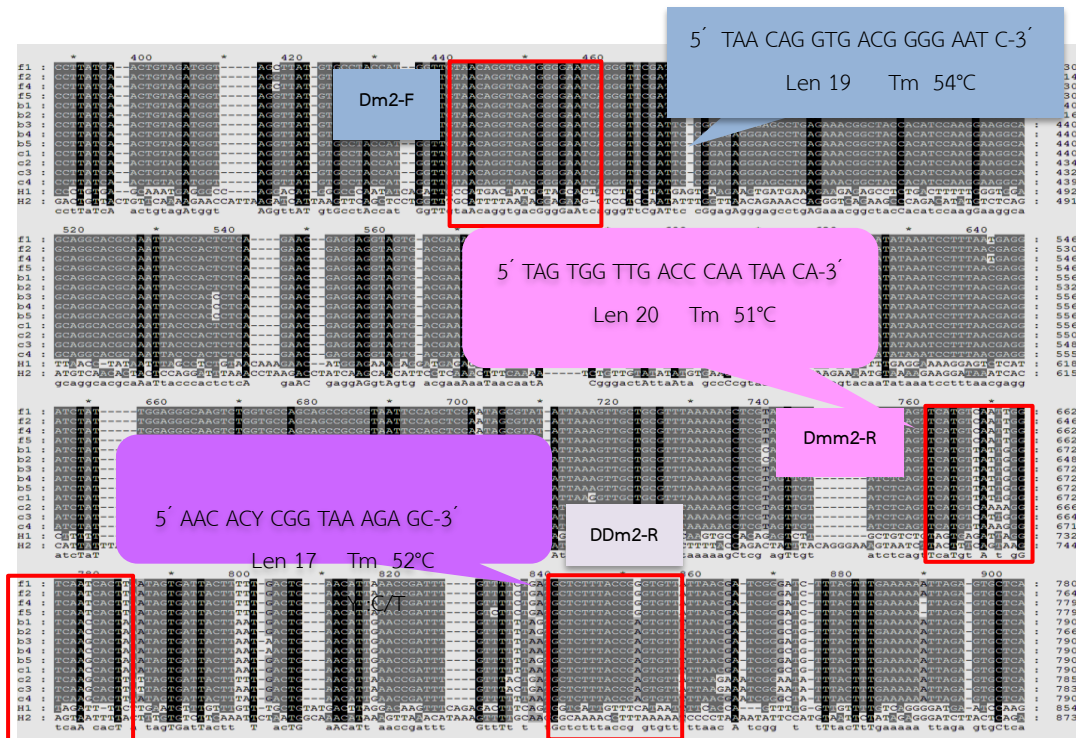
รูป 28 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* โดยตัดความยาวของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ให้เท่ากัน

4.9 ผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม

จากผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม โดยแสดง Phylogenetic tree Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อตรวจสอบการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) และตรวจความน่าเชื่อถือทางสถิติโดยใช้ค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ใช้ *Syringophilidae sp.* เป็น outgroup **ดังรูปที่ 29** พบว่าไร Demodex ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถแบ่งไร Demodex ออกเป็น 2 กลุ่ม แยกกลุ่มออกเป็น *D. folliculorum* และ *D. brevis* อย่างชัดเจนด้วยค่า bootstrap test 99-100% ซึ่งพบว่า *D. brevis* น่าจะมีลำดับวิวัฒนาการมาจาก *D. folliculorum* และเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูลสากล GenBank ของ *D. folliculorum* (HQ728000 *D. folliculorum* from China, JN885463 *D. folliculorum* from China และ KF745889 *D. folliculorum* from USA) และ *D. brevis* (HQ727999 *D. brevis* from China, JN885466 *D. brevis* from China, JN885465 *D. brevis* from China, KF745885 *D. brevis* from USA และ KF745892 *D. brevis* from USA) พบว่า *D. folliculorum* อยู่ในกลุ่มเดียวกับที่มีศึกษาในประเทศจีนและสหรัฐอเมริกา แต่สำหรับ *D. brevis* พบว่าอยู่ในกลุ่มของ Demodex ที่แยกได้จากคนในประเทศสหรัฐอเมริกาและแยกออกจากกลุ่มของ Demodex ที่แยกได้จากคนในประเทศจีนได้อย่างชัดเจน (**รูปที่ 29**)



รูป 29 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18srRNA ของไร *Demodex* โดยใช้ Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model โดย กำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบโดยใช้ *Syringophilidae sp* (GQ864269) เป็น outgroup



รูป 30 แสดงการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน Semi-nested PCR

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ไร *Demodex* เป็นปรสิตที่มีขนาดเล็กมาก มีหลากหลายสายพันธุ์ สามารถพบได้ทั่วโลก อาศัยอยู่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไรแต่ละสายพันธุ์จะอาศัยอยู่ในโฮสต์ที่มีความจำเพาะ ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า สายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และเกี่ยวข้องกับมนุษย์มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า ไรที่พบในมนุษย์นั้นมีบทบาทในการก่อโรคหรือไม่ แต่พบว่าหากมีไร *Demodex* เพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าปกติอาจทำให้เกิดโรคได้ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไรทั้งสองสายพันธุ์ มีรูปร่างที่ลักษณะความยาวของลำตัวที่แตกต่างกัน โดยได้มีการรายงานการศึกษาของ Desch และ Nutting ในปี 1972 พบว่า *D. folliculorum* จะมีความยาวของตัวเต็มวัยประมาณ 0.2797 มิลลิเมตร ส่วน *D. brevis* ประมาณ 0.1658 มิลลิเมตร แหล่งที่อยู่อาศัยก็มีความแตกต่างกัน กล่าวคือ *D. brevis* จะอยู่อาศัยลึกกว่า พบบริเวณต่อมไขมันใต้ผิวหนังเมื่อเปรียบเทียบกับ *D. folliculorum* จะอาศัยอยู่บนชั้นของผิวหนังที่ตื้นกว่า ดังนั้นจึงส่งผลให้การติดต่อของ ไร *D. folliculorum* เกิดขึ้นได้บ่อยกว่า *D. brevis* ส่งผลให้การสืบพันธุ์เพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งการศึกษาทางคลินิกเพื่อตรวจหาไร *Demodex* นั้น จะใช้การตรวจสอบหาตัวไร *Demodex* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งการวินิจฉัยนี้สามารถระบุได้ว่าพบหรือไม่พบตัวไร แต่ในด้านการแยกสายพันธุ์ของไรทั้งสองสายพันธุ์นั้น อาจเกิดความผิดพลาดได้เนื่องจากระยะตัวอ่อนของ *D. folliculorum* อาจมีความยาวของลำตัวใกล้เคียงกับ *D. brevis* ในระยะตัวเต็มวัย และบางตัวอย่างอาจจะพบว่ามีเพียงบางส่วนของตัวไรจึงทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของชนิดไร *Demodex* ได้ ดังนั้นจึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะใช้วิธีทางอนุชีววิทยาเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของไร *Demodex* และหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไร โดยใช้วิธีทางอนุชีววิทยา

ซึ่งการศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์ของไรนั้น ได้มีการศึกษาวิจัยในต่างประเทศหลายงานวิจัย ไม่ว่าจะเป็น ไรที่พบในสัตว์ หรือไรที่พบในคน รวมทั้งศึกษาภายในอินโมโตคลอนเดรียและยีนในนิวเคลียส ในประเทศไทยนั้นยังไม่มีรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไร *Demodex* บริเวณยีน 18SrRNA ที่พบในมนุษย์ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ไร *Demodex* ที่พบในมนุษย์โดยทำการเก็บตัวอย่างบริเวณใบหน้าของผู้ที่มาใช้บริการ รักษาที่แผนกผิวหนัง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยใช้วิธี Skin Scraping จำนวน 62 คน เป็นเพศชาย 9 คน เพศหญิง 53 คน เมื่อตรวจสอบด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) พบว่า ตรวจเจอเชื้อไร *Demodex* จำนวน 21 ราย คิดเป็น 33.87

% พบในเพศชาย 4 คน เพศหญิง 17 คน หลังจากนั้น นำตัวอย่างทั้งหมดมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป หลังจากนั้นใช้เทคนิค ในการตรวจสอบทางอนุชีววิทยา ด้วยวิธี Semi-Nested PCR เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของ *Demodex* ซึ่งข้อดีของการใช้เทคนิค Semi-nested PCR นี้คือ สามารถแยกสายพันธุ์ของ *Demodex* ที่พบในมนุษย์ ได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาได้มีการออกแบบให้มีความไวและมีความจำเพาะต่อไร *Demodex* ที่พบในมนุษย์เท่านั้น โดยจะไม่จับกับ ดีเอ็นเอของมนุษย์ ซึ่งสามารถตรวจสอบผลได้รวดเร็ว ภายใน 1 ปฏิกิริยา ด้วยผลวิธี gel electrophoresis โดยไรทั้งสองสายพันธุ์จะให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR แตกต่างกันคือ *D. folliculorum* จะให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 382 bp ส่วน *D. brevis* จะให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 317 bp ผลการตรวจสอบพบว่า จำนวนคนที่ให้ผลบวกต่อ *D. folliculorum* มี 25 ราย คิดเป็น 40.3% และ *D. brevis* มี 11 ราย คิดเป็น 17.7 % ซึ่งพบ *D. folliculorum* มากกว่า *D. brevis* ประมาณ 2 เท่า ซึ่งเป็นไปได้เนื่องจาก *D. folliculorum* บนชั้นของผิวหนังที่ตื้นกว่า *D. brevis* โดย *D. brevis* นั้นจะอาศัยอยู่ลึกลงไปในต่อมไขมันเมื่อเก็บตัวอย่าง อาจจะไม่ลึกเพียงพอจึงสามารถพบ *D. folliculorum* ได้มากกว่า *D. brevis* ซึ่งจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้พบว่า พบว่าไร *D. folliculorum* มีค่า Percentage Identities (%) เฉลี่ย 99.04 % ซึ่งคล้ายกับ Accession no. KF745889 (ศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา) และ JN885463 (ศึกษาในประเทศจีน) สำหรับ *D. brevis* มีค่า Percentage Identities (%) เท่ากับ 100 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลสากล GenBank เลข Accession no. KF745892 (ศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา) และ KF745885 (ศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา)

การศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของไร *D. folliculorum* และ *D. brevis* พบว่าใน *D. folliculorum* มีเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายภายในสายพันธุ์เดียวกันประมาณ 0-2.1% แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง *D. brevis* ไม่มีความแตกต่างกันภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecific variation=0%) และเมื่อเทียบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ เนื่องจากขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกันคือ ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *D. folliculorum* ประมาณ 382 bp และ *D. brevis* ประมาณ 317 bp ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างชัดเจนโดยเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ คือประมาณ 20% แต่เมื่อตัดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เท่ากัน พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์เพียง 0.4-1.5% ซึ่งการศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของไร *Demodex* โดยอาศัยเทคนิคทางอนุชีววิทยา บริเวณยีนในนิวเคลียส 18SrRNA ซึ่ง Zhao และคณะ (2012) พบว่ายีนที่ตำแหน่ง 18SrDNA เหมาะสำหรับการศึกษาในระดับสิ่งมีชีวิตต่างวงศ์ (inter-family) แต่ไม่เหมาะสำหรับในการศึกษา ภายในวงศ์เดียวกัน (intra-family) ซึ่ง

สอดคล้องกับการศึกษาของ Mangold, A. J., ในปี 1998 พบว่า *Demodex* มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน 18SrRNA ในระดับเดียวกันกับสิ่งมีชีวิตอาณาจักรอื่นๆ จำพวกไร (Acari) เทียบ (Ticks: Ixodidae) เช่นเดียวกับการศึกษาตัวอย่างของไร *Demodex* ในประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศบราซิล [26] ที่แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายและความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของไร *Demodex* ที่มีความเกี่ยวข้องกับมนุษย์โดยเทียบกับไร *Demodex* ที่พบในสัตว์

การศึกษาทางวิวัฒนาการจากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree) พบว่าทำให้สามารถจัดกลุ่มทางวิวัฒนาการได้ 2 กลุ่มที่ยืนตำแหน่ง 18SrRNA ได้แก่ กลุ่มของ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ภายใน *Demodex* และพบว่า *D. brevis* น่าจะมีวิวัฒนาการที่แยกมาจาก *D. folliculorum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์เก่าแก่ที่มีมานาน อีกทั้งพบว่า *D. folliculorum* อยู่ในกลุ่มเดียวกับไร *D. folliculorum* ที่มีศึกษาในประเทศจีนและสหรัฐอเมริกา แต่สำหรับ *D. brevis* พบว่าอยู่ในกลุ่มของ *D. brevis* ที่แยกได้จากคนในประเทศสหรัฐอเมริกาและแยกออกจากกลุ่มของ *Demodex* ที่แยกได้จากคนในประเทศจีนได้อย่างชัดเจน ในปี 2014 ได้มีการศึกษาของ Thoemmes และคณะ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไร *Demodex* ที่พบในมนุษย์ที่ตำแหน่งยีน 18SrDNA สามารถจัดกลุ่มของ *Demodex* ที่พบในมนุษย์ คล้ายกับไร *Demodex* ที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกา และนอกจากนี้ยังพบว่า *D. brevis* และ *D. folliculorum* เป็นไรที่มีวิวัฒนาการร่วมกัน รายงานการศึกษาในปี 1963 ของ Akbulatova และคณะกล่าวว่าประวัติวิวัฒนาการของไรที่พบในมนุษย์นั้น ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน โดยเชื่อว่าในคนแต่ละคน จะพบ *Demodex* อย่างน้อยหนึ่งสายพันธุ์ พบว่า *D. brevis* นั้นได้รับการแยกมาจาก *D. folliculorum* ซึ่งมีความใกล้เคียงกัน

การศึกษารั้งนี้ เป็นประโยชน์เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการศึกษาไร *Demodex* ในการแยกสายพันธุ์ได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ อีกทั้งข้อมูลที่ได้ยังใช้เป็นฐานข้อมูลของไร *D. folliculorum* และ *D. brevis* ในประเทศไทยเพื่อใช้ในการศึกษาด้านระบาดวิทยาของประเทศไทยต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในยีนส่วนที่เป็นนิวเคลียส 18SrRNA ซึ่งในอนาคตน่าจะมีการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไร *Demodex* ในแต่ละสายพันธุ์มากขึ้น รวมทั้งการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ให้มีความไว และความจำเพาะต่อโรรมากขึ้น นอกจากนี้ในการศึกษาไร *Demodex* นี้ ยังมีข้อจำกัดอยู่มากเนื่องจากตัวไร *Demodex* เป็นปรสิต ขนาดเล็ก ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า รวมทั้งไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ จึงทำได้ยาก

สำหรับการสกัดดีเอ็นเอไร *Demodex* เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาทางอณูชีววิทยานั้นต้องใช้จำนวนไร
ในปริมาณมาก มีขนาดตัวที่เล็กมาก ดีเอ็นเอที่ได้จึงมีปริมาณน้อย นอกจากนี้ไวยังง่ายต่อการ
autolyze เมื่ออยู่ในหลอดทดลอง ซึ่งคาดว่าในอนาคตควรมีการศึกษาเกี่ยวกับไร *Demodex* ที่พบ
ในมนุษย์มากขึ้น



ภาคผนวก



ภาคผนวก
การเตรียมสารเคมีที่ใช้วิจัย

ขั้นตอนการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารละลาย 10X TAE

ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tris base	48.44	กรัม
Na ₂ EDTA	7.44	กรัม
CH ₃ COONa ₃ H ₂ O	27.22	กรัม

ละลายส่วนประกอบต่างๆแล้ว ทำการปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.8 โดยใช้ glacial acetic acid 17.0 มิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

2 SOB Solution

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	1.25	กรัม
NaCl	0.125	กรัม
KCl	625	ไมโครลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียม สารละลาย 1M KCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

KCl	0.7455	กรัม
-----	--------	------

ละลายโดยใช้น้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส

4. การเตรียม 2M (MgCl₂·6H₂O + MgSO₄·7H₂O)

MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.033	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.465	กรัม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันโดยใช้น้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นกรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ ก่อนนำไปแบ่งใช้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียม 2M Glucose

Glucose	3.6	กรัม
---------	-----	------

ละลายโดยใช้น้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส

6. SOC Solution

SOB	970	ไมโครลิตร
2M (MgCl ₂ · 6H ₂ O + MgSO ₄ · 7H ₂ O)	20	ไมโครลิตร
2M Glucose	10	ไมโครลิตร

7. การเตรียม X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside)

ทำการละลาย X-gal 20 มิลลิกรัม ในสารละลาย Dimethylformamide ให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องกรอง สารละลายที่ได้จะมีลักษณะใส ไม่มีสี

8. การเตรียม IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)

ทำการละลาย Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside 2 กรัม ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 8 มิลลิลิตร

เมื่อละลายเข้ากันแล้ว ทำการปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นกรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ ก่อนนำไปแบ่งใช้

9. การเตรียมสารละลาย 6X loading Buffer

Bromophenol blue	0.01	กรัม
Tris-HCl (pH 6.8)	1.25	มิลลิลิตร
Glycerol	15	มิลลิลิตร

ทำการผสม Bromophenol blue และ Tris-HCl จากนั้นทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 5

มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม glycerol 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-bertani Agar (LB Agar)

ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Yeast Extract	2.5	กรัม
NaCl	5	กรัม

Tryptone	5	กรัม
----------	---	------

Agar	10	กรัม
------	----	------

ทำการผสมส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-bertani Broth (LB Broth)

ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Yeast Extract	2.5	กรัม
---------------	-----	------

NaCl	5	กรัม
------	---	------

Tryptone	5	กรัม
----------	---	------

ทำการผสมส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. การเตรียมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

ทำการเตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายมีค่าเท่ากับ 100 µg/ml โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย และนำไป

กรองด้วย 0.22 ไมโครเมตรฟิลเตอร์ หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

13. ชุดสำเร็จรูป Tissue สำหรับการสกัด Genomic DNA (Invisorb spin mini kit) ประเทศเยอรมันนี

ประกอบด้วย

Lysis Buffer G

Proteinase K

Binding Buffer T

Wash Buffer

Elute Buffer

14. สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase Chain Reaction (PCR) Thermo scientific®

ประกอบด้วย

10x Taq Buffer

2mM dNTP
 25mM MgCl₂
 Taq DNA Polymerase

15. ชุดสำเร็จรูป ในการสกัด Plasmid (Invisorb® Spin Plasmid Mini Two)

ประกอบด้วย

Solution A
 Solution B
 Solution C
 Wash Solution
 Elution Solution

16. ชุดโคลนสำเร็จรูป สำหรับ PCR product (DNA ligation)

2X Rapid Ligation Buffer
 pGEM[®] – T easy vector
 T4 DNA ligase

17. การเตรียมสารเคมี ที่ใช้ในการเตรียม competent cell

Medium A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

MgSO ₄	1.23	กรัม
Glucose	1.00	กรัม

ทำการละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นกรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Medium B ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

MgSO ₄	0.295	กรัม
Polyethyleneglycol(PEG)	1.2	กรัม
Glycerol	3.6	มิลลิลิตร

ทำการละลายสารเคมี MgSO₄ และ PEG ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) ประมาณ 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม Glycerol 3.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) เพื่อปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม competent cell

1. ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยการนำ Stock ของเชื้อ *E.coli* มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็งที่ไม่ใส่ยาแอมพิซิลิน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 16-18 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ single colony
2. นำ single colony มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ไม่ใส่ยาแอมพิซิลิน เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
3. นำ Medium A ที่เตรียมไว้ มาแบ่งใส่หลอด ปริมาตร 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่เชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm นำไปวัด OD ที่ A₆₀₀ ให้ได้ค่าประมาณ 0.4 – 0.6 (โดยใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที)
4. เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำหลอดที่ตกตะกอนมาแช่ในน้ำแข็ง ทั้งส่วนของ supernatant แล้วใส่ Medium A ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นดูดลงเบาๆ
5. ใส่ Medium B ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป แล้วใช้ปิเปตดูดขึ้นดูดลงเบาๆ เพื่อให้สารผสมเข้าด้วยกัน
6. นำมาแบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปแช่ไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส



รายการอ้างอิง

1. Lacey, N., K. Kavanagh, and S.C. Tseng, *Under the lash: Demodex mites in human diseases*. Biochem (Lond), 2009. **31**(4): p. 2-6.
2. Baima, B. and M. Sticherling, *Demodicidosis revisited*. Acta Derm Venereol, 2002. **82**(1): p. 3-6.
3. Andrews, J.R., *The prevalence of hair follicle mites in caucasian New Zealanders*. N Z Med J, 1982. **95**(711): p. 451-3.
4. Aylesworth, R. and J.C. Vance, *Demodex folliculorum and Demodex brevis in cutaneous biopsies*. J Am Acad Dermatol, 1982. **7**(5): p. 583-9.
5. Damian, D. and M. Rogers, *Demodex infestation in a child with leukaemia: treatment with ivermectin and permethrin*. Int J Dermatol, 2003. **42**(9): p. 724-6.
6. Forton, F., *Standardized skin surface biopsy: method to estimate the Demodex folliculorum density, not to study the Demodex folliculorum prevalence*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2007. **21**(9): p. 1301-2.
7. Forton, F., et al., *Demodicosis and rosacea: epidemiology and significance in daily dermatologic practice*. J Am Acad Dermatol, 2005. **52**(1): p. 74-87.
8. Forton, F. and B. Seys, *Density of Demodex folliculorum in rosacea: a case-control study using standardized skin-surface biopsy*. Br J Dermatol, 1993. **128**(6): p. 650-9.
9. Okyay, P., et al., *Prevalence of Demodex folliculorum in young adults: relation with sociodemographic/hygienic factors and acne vulgaris*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2006. **20**(4): p. 474-6.
10. Zhao, Y.E., et al., *Complete sequence analysis of 18S rDNA based on genomic DNA extraction from individual Demodex mites (Acari: Demodicidae)*. Exp Parasitol, 2012. **131**(1): p. 45-51.
11. de Rojas, M., et al., *Morphobiometrical and molecular study of two populations of Demodex folliculorum from humans*. Parasitol Res, 2012. **110**(1): p. 227-33.

12. English, F.P., *Variant of Demodex folliculorum infesting the eyelids*. Br J Ophthalmol, 1971. **55**(11): p. 747-9.
13. English, F.P. and W.B. Nutting, *Demodicosis of ophthalmic concern*. Am J Ophthalmol, 1981. **91**(3): p. 362-72.
14. Holzchuh, F.G., et al., *Clinical treatment of ocular Demodex folliculorum by systemic ivermectin*. Am J Ophthalmol, 2011. **151**(6): p. 1030-1034.e1.
15. Basta-Juzbasic, A., J.S. Subic, and S. Ljubojevic, *Demodex folliculorum in development of dermatitis rosaceiformis steroidica and rosacea-related diseases*. Clin Dermatol, 2002. **20**(2): p. 135-40.
16. Desch, C. and W.B. Nutting, *Demodex folliculorum (Simon) and D. brevis akbulatova of man: redescription and reevaluation*. J Parasitol, 1972. **58**(1): p. 169-77.
17. Kosik-Bogacka, D.I., et al., *Demodex folliculorum and Demodex brevis in healthy and immunocompromised patients*. Ophthalmic Epidemiol, 2013. **20**(3): p. 159-63.
18. Zhao, Y.E. and L.P. Wu, *RAPD-SCAR marker and genetic relationship analysis of three Demodex species (Acari: Demodicidae)*. Parasitol Res, 2012. **110**(6): p. 2395-402.
19. Jing, X., G. Shu ling, and L. Ying, *Environmental scanning electron microscopy observation of the ultrastructure of Demodex*. Microsc Res Tech, 2005. **68**(5): p. 284-9.
20. Norn, M.S., *The follicle mite (Demodex folliculorum)*. Eye Ear Nose Throat Mon, 1972. **51**(5): p. 187-91.
21. Zhao, Y.E., et al., *Molecular identification and phylogenetic study of Demodex caprae*. Parasitol Res, 2014. **113**(10): p. 3601-8.
22. Dahl, M.V., A.J. Ross, and P.M. Schlievert, *Temperature regulates bacterial protein production: possible role in rosacea*. J Am Acad Dermatol, 2004. **50**(2): p. 266-72.
23. Whitfeld, M., et al., *Staphylococcus epidermidis: a possible role in the pustules of rosacea*. J Am Acad Dermatol, 2011. **64**(1): p. 49-52.

24. Ferrer, L., I. Ravera, and K. Silbermayr, *Immunology and pathogenesis of canine demodicosis*. *Vet Dermatol*, 2014. **25**(5): p. 427-e65.
25. Lacey, N. and F.C. Powell, "*Rosacea and Demodex folliculorum*". *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. 2010, Ed. Zouboulis, C. C., Katsambas, A. D., & Kligman, A. M. Springer 628-637.
26. Thoemmes, M.S., et al., *Ubiquity and diversity of human-associated Demodex mites*. *PLoS One*, 2014. **9**(8): p. e106265.
27. Karıncaoglu, Y., et al., *The clinical importance of demodex folliculorum presenting with nonspecific facial signs and symptoms*. *J Dermatol*, 2004. **31**(8): p. 618-26.
28. Tinklepaugh, A.J. and B.B. Wilson, *Pityriasis folliculorum: a novel therapy for a diagnostically challenging condition*. *J Am Acad Dermatol*, 2013. **69**(5): p. e276-7.
29. Elston, C.A. and D.M. Elston, *Demodex mites*. *Clin Dermatol*, 2014. **32**(6): p. 739-43.
30. Erbagci, Z. and O. Ozgoztasi, *The significance of Demodex folliculorum density in rosacea*. *Int J Dermatol*, 1998. **37**(6): p. 421-5.
31. Morras, P.G., et al., *Rosacea-like demodicidosis in an immunocompromised child*. *Pediatr Dermatol*, 2003. **20**(1): p. 28-30.
32. Hsu, C.K., M.M. Hsu, and J.Y. Lee, *Demodicosis: a clinicopathological study*. *J Am Acad Dermatol*, 2009. **60**(3): p. 453-62.
33. Powell, F.C., *Clinical practice. Rosacea*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(8): p. 793-803.
34. Pena, G.P. and J.S. Andrade Filho, *Is demodex really non-pathogenic?* *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2000. **42**(3): p. 171-3.
35. Ozdemir, M.H., et al., *Prevalence of Demodex in health personnel working in the autopsy room*. *Am J Forensic Med Pathol*, 2005. **26**(1): p. 18-23.
36. Forton, F. and M. Song, *Limitations of standardized skin surface biopsy in measurement of the density of Demodex folliculorum. A case report*. *Br J Dermatol*, 1998. **139**(4): p. 697-700.

37. Segal, R., et al., *Dermoscopy as a diagnostic tool in demodicidosis*. Int J Dermatol, 2010. **49**(9): p. 1018-23.
38. Longo, C., et al., *In vivo detection of Demodex folliculorum by means of confocal microscopy*. Br J Dermatol, 2012. **166**(3): p. 690-2.
39. Maier, T., et al., *High-definition optical coherence tomography for the in vivo detection of demodex mites*. Dermatology, 2012. **225**(3): p. 271-6.
40. Wilkin, J.K., *Rosacea. Pathophysiology and treatment*. Arch Dermatol, 1994. **130**(3): p. 359-62.
41. Elston, D.M., *Demodex mites: facts and controversies*. Clin Dermatol, 2010. **28**(5): p. 502-4.
42. Gao, Y.Y., et al., *In vitro and in vivo killing of ocular Demodex by tea tree oil*. Br J Ophthalmol, 2005. **89**(11): p. 1468-73.
43. Gao, Y.Y., et al., *Clinical treatment of ocular demodecosis by lid scrub with tea tree oil*. Cornea, 2007. **26**(2): p. 136-43.
44. Messenger, S., et al., *Assessment of the antibacterial activity of tea tree oil using the European EN 1276 and EN 12054 standard suspension tests*. J Hosp Infect, 2005. **59**(2): p. 113-25.
45. Czepita, D., W. Kuzna-Grygiel, and D. Kosik-Bogacka, *[Investigations on the occurrence as well as the role of Demodex folliculorum and Demodex brevis in the pathogenesis of blepharitis]*. Klin Oczna, 2005. **107**(1-3): p. 80-2.
46. Nutting, W.B. and A.C. Green, *Pathogenesis associated with hair follicle mites (Demodex spp.) in Australian Aborigines*. Br J Dermatol, 1976. **94**(3): p. 307-12.
47. Zhao, Y.E., N. Guo, and L.P. Wu, *The effect of temperature on the viability of Demodex folliculorum and Demodex brevis*. Parasitol Res, 2009. **105**(6): p. 1623-8.
48. Lacey, N., et al., *Mite-related bacterial antigens stimulate inflammatory cells in rosacea*. Br J Dermatol, 2007. **157**(3): p. 474-81.
49. Sonmez, O.U., et al., *Associations between Demodex species infestation and various types of cancer*. Acta Parasitol, 2013. **58**(4): p. 551-5.
50. Akilov, O.E. and K.Y. Mumcuoglu, *Immune response in demodicosis*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2004. **18**(4): p. 440-4.

51. Crawford, G.H., M.T. Pelle, and W.D. James, *Rosacea: I. Etiology, pathogenesis, and subtype classification*. J Am Acad Dermatol, 2004. **51**(3): p. 327-41; quiz 342-4.
52. Yamasaki, K. and R.L. Gallo, *The molecular pathology of rosacea*. J Dermatol Sci, 2009. **55**(2): p. 77-81.
53. Forton, F., et al., *Demodex folliculorum and topical treatment: acaricidal action evaluated by standardized skin surface biopsy*. Br J Dermatol, 1998. **138**(3): p. 461-6.
54. Forton, F.M., *Papulopustular rosacea, skin immunity and Demodex: pityriasis folliculorum as a missing link*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2012. **26**(1): p. 19-28.
55. Bonnar, E., P. Eustace, and F.C. Powell, *The Demodex mite population in rosacea*. J Am Acad Dermatol, 1993. **28**(3): p. 443-8.
56. Zhao, Y.E., et al., *Facial dermatosis associated with Demodex: a case-control study*. J Zhejiang Univ Sci B, 2011. **12**(12): p. 1008-15.
57. Rusiecka-Ziolkowska, J., M. Nokieli, and M. Fleischer, *Demodex - an old pathogen or a new one?* Adv Clin Exp Med, 2014. **23**(2): p. 295-8.
58. Roihu, T. and A.L. Kariniemi, *Demodex mites in acne rosacea*. J Cutan Pathol, 1998. **25**(10): p. 550-2.
59. Askin, U. and D. Seckin, *Comparison of the two techniques for measurement of the density of Demodex folliculorum: standardized skin surface biopsy and direct microscopic examination*. Br J Dermatol, 2010. **162**(5): p. 1124-6.
60. Zhao, Y.E., L. Hu, and J.X. Ma, *Molecular identification of four phenotypes of human Demodex mites (Acari: Demodicidae) based on mitochondrial 16S rDNA*. Parasitol Res, 2013. **112**(11): p. 3703-11.
61. Zhao, Y.E., N. Guo, and L.P. Wu, *Influence of temperature and medium on viability of Demodex folliculorum and Demodex brevis (Acari: Demodicidae)*. Exp Appl Acarol, 2011. **54**(4): p. 421-5.
62. Cao, Y.S., et al., *[Facial Demodex infection among college students in Tangshan]*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, 2009. **27**(3): p. 271-3.

63. Isa, N.H., et al., *Demodicosis among university medical students in Malaysia and the effects of facial cleanser and moisturizer usage*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2011. **42**(6): p. 1375-80.
64. Horvath, A., et al., *Risk factors and prevalence of Demodex mites in young adults*. Acta Microbiol Immunol Hung, 2011. **58**(2): p. 145-55.
65. Mohammad RezaYoussefi, Rabeeh Tabari Pour, and Mohammad Taghi Rahimi, *Prevalence of Demodex Mites (Acari: Demodicidae) Parasitizing Human in Babol, North of Iran*. Academic Journal of Entomology, 2012. **5**(1): p. 62-64.
66. Karaman U, et al., *[The epidemiology of demodex mites at the college students living in dormitories in the city of Ordu]*. Turkiye Parazitol Derg, 2014. **38**(3): p. 166-71.
67. วีรุทัย สภานนท์, การศึกษาความชุกของการตรวจพบไรเดโมเด็กซ์บนใบหน้าของผู้ที่มาตรวจสุขภาพที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 2552, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. p. 118.
68. อรพิน พุทธานุภาพพันธ์, et al., ความหนาแน่นของ *DEMODEX FOLLICULORUM* ในผู้ป่วยที่มีผื่นผิวหนังบนใบหน้า. 2555: สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์. p. 251-261.
69. Brown, T.A., *Gene cloning and DNA analysis:an introduction* Vol. 6. 2010, West Sussex,England:: Blackwell Publishing.
70. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
71. Mangold, A.J., M.D. Bargues, and S. Mas-Coma, *18S rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae)*. Parasitol Res, 1998. **84**(1): p. 31-7.
72. Klompen, H., M. Lekveishvili, and W.C.t. Black, *Phylogeny of parasitiform mites (Acari) based on rRNA*. Mol Phylogenet Evol, 2007. **43**(3): p. 936-51.
73. Dabert, M., et al., *Molecular phylogeny of acariform mites (Acari, Arachnida): strong conflict between phylogenetic signal and long-branch attraction artifacts*. Mol Phylogenet Evol, 2010. **56**(1): p. 222-41.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ปวันรัตน์ ตรีชั้น เกิดวันจันทร์ ที่ 16 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2532 ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 8 ซอยอนุรักษ์ 2 ถนน ตำรงมุกดา ตำบลศรีบุญเรือง อำเภอเมือง จังหวัดมุกดาหาร 49000

E-mail Address :pawanrat_1@hotmail.com ประวัติการศึกษา ปีพ.ศ. 2555 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

