

ความซุกของเชื้อลิวมาเนีย และทริพพาโนโซมในรึนฝอยทราย ที่เก็บได้จาก
แหล่งระบาดของโรคลิวมาเนียในประเทศไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Prevalence of *Leishmania* and *Trypanosoma* in sand fly
collected in endemic areas of leishmaniasis, Thailand



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

Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความชุกของเชื้อลิวมาเนีย และทริพพาโนโซมในรึ้นฝอย ทราย ที่เก็บได้จากแหล่งระบาดของโรคลิวมาเนียใน ประเทศไทย
โดย	น.ส.พิมพ์พิลาส ศรีสุชน
สาขาวิชา	ปรสตีวิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์เผด็จ สิริยะเสถียร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. นายแพทย์กนก พฤตวิทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงกัญญรัตน์ กรัยวิเชียร)

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. นายแพทย์กนก พฤตวิทย์)

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

พิมพ์พิลาส ศรีสุธน : ความชุกของเชื้อลิซมาเนีย และทริพาโนโซมในริ้นฝอยทราย ที่เก็บได้จาก แหล่งระบาดของโรคลิซมาเนียในประเทศไทย. (Prevalence of *Leishmania* and *Trypanosoma* in sand flycollected in endemic areas of leishmaniasis, Thailand) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร. นพ.กนก พฤติวิทย์

ริ้นฝอยทราย จัดเป็นแมลงดูดเลือดที่มีขนาดเล็ก อยู่ในวงศ์ Psychodidae อันดับ Diptera ซึ่งเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เพราะเป็นพาหะนำโรคลิซมาเนีย ทั้งในมนุษย์และสัตว์ ในประเทศไทยมีรายงานการพบโรคลิซมาเนียและโรคทริพาโนโซมในมนุษย์ แต่ข้อมูลของแมลงพาหะนำโรค ยังมีอยู่อย่างจำกัด งานวิจัยนี้ จึงได้การศึกษาความชุกของเชื้อลิซมาเนียและเชื้อทริพาโนโซม และความสัมพันธ์ของแมลงพาหะนำโรค ในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรคลิซมาเนีย (จังหวัดสงขลา จังหวัดพัทลุง จังหวัดเชียงราย) และพื้นที่ที่ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคลิซมาเนีย (จังหวัดชุมพร) จำนวนทั้งหมด 500 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นตัวเมีย 276 ตัวอย่าง และตัวผู้ 224 ตัวอย่าง ทำการตรวจหาเชื้อลิซมาเนีย และเชื้อทริพาโนโซม โดยใช้ตำแหน่งของยีน *ITS1* และ *SSU rRNA* ตามลำดับ และระบุชนิดของริ้นฝอยทรายที่ตรวจพบเชื้อ ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยใช้ตำแหน่งของยีน *COI* และ *CytB* ผลตรวจหาเชื้อลิซมาเนีย และทริพาโนโซมในริ้นฝอยทราย พบว่า ริ้นฝอยทรายจากจังหวัดสงขลาจำนวน 180 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *L. martiniquensis* 2 ตัวอย่าง (1.1%) และพบเชื้อ *Trypanosoma* sp. 4 ตัวอย่าง (2.8%) ในริ้นฝอยทราย *Se. khawi* ซึ่งในจำนวนนี้มีการตรวจพบ Co-infection ของเชื้อ *L. martiniquensis* และ *Trypanosoma* sp. ในริ้นฝอยทราย *Se. khawi* 1 ตัวอย่างด้วย ริ้นฝอยทรายจากจังหวัดพัทลุง จำนวน 136 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Trypanosoma* sp. 2 ตัวอย่าง (1.5%) ในริ้นฝอยทราย *Se. khawi* และ *Se. indica* ริ้นฝอยทรายจากจังหวัดเชียงราย 61 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma noyesi* 1 ตัวอย่าง (1.6%) ในริ้นฝอยทราย *Ph. teshi* และริ้นฝอยทรายจากจังหวัดชุมพร จำนวน 123 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* sp. 6 ตัวอย่าง และ *T. noyesi* 2 ตัวอย่าง (8.6%) ในริ้นฝอยทราย *Se. anodontis*, *Ph. asperulus* และ *Ph. betisi* ผลการตรวจหาเชื้อลิซมาเนีย และทริพาโนโซมในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ไม่พบการติดเชื้อลิซมาเนีย และเชื้อทริพาโนโซมในริ้นฝอยทรายเพศผู้เลย จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ของเชื้อลิซมาเนีย และเชื้อทริพาโนโซม กับริ้นฝอยทรายแมลงพาหะนำโรคได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในอนาคตต่อการป้องกัน และควบคุม แมลงพาหะนำโรคลิซมาเนีย และทริพาโนโซมในประเทศไทยได้

สาขาวิชา ปรสตีวิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5974010730 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORD: Leishmania spp.; Trypanosoma spp.; sand flies; vector; Thailand

Pimpilad Srisuton : Prevalence of *Leishmania* and *Trypanosoma* in sand fly collected in endemic areas of leishmaniasis, Thailand. Advisor: Prof. PADET SIRIYASATIEN, M.D.,Ph.D. Co-advisor: Kanok Preativatanyou, M.D.,Ph.D.

Sand flies are blood-sucking insects belonging to the order Diptera and family Psychodidae. They are known as a principal vector of human and animal leishmaniasis worldwide. In Thailand, human autochthonous leishmaniasis and trypanosomiasis have been reported. However, information on vectors for *Leishmania* and *Trypanosoma* in the country is still limited. Therefore, this study was aimed to detect *Leishmania* and *Trypanosoma* DNA from endemic areas (Songkhla, Phatthalung and Chiang Rai provinces) and non-endemic area (Chumphon province) of leishmaniasis. A total of 500 sand flies (276 females and 224 males) were collected. Polymerase Chain Reaction (PCR) anneal specifically to the *ITS1* and *SSU rRNA* gene regions were used to detect *Leishmania* and *Trypanosoma* DNA. The positive sample were identified sand flies species by *COI* and *CytB* gene. The results of PCR analysis were able to detect *Leishmania* and *Trypanosoma* DNA in sand flies samples. 180 samples from Songkhla province we found 1.1% of *L. martiniquensis* and 2.8% of *Trypanosoma* sp. in *Se. khawi*. 136 samples from Phatthalung province we found 1.5% of *Trypanosoma* sp. in *Se. khawi* and *Se. indica*. 61 samples from Chiang Rai province we found 1.6% of *Trypanosoma noyesi* in *Ph. teshi* and 123 samples from Chumphon province we found 8.9% of *Trypanosoma* sp. and *T. noyesi* in *Se. anodontis*, *Ph. asperulus* and *Ph. betisi*. Moreover we found co-infection sample of *L. martiniquensis* and *Trypanosoma* sp. in 1 sample of *Se. khawi* in Songkhla province. However, *Leishmania* and *Trypanosoma* is not detected in the male sand flies. These data indicated that several species of sand flies might be a potential vector of *Leishmania* and *Trypanosoma* parasites in Thailand. Our study could be useful for the future study of vector control for leishmaniasis and trypanosomiasis in Thailand.

Field of Study: Medical Parasitology

Student's Signature

Academic Year: 2018

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณา ความช่วยเหลือ และความอนุเคราะห์จาก บุคคลหลายท่าน ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร หัวหน้าภาควิชาปรสิตวิทยา คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร. นพ. กนก พงศ์วิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมเป็นอย่างยิ่ง ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางในการแก้ไขปัญหา ต่างๆในการทำวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนแล้วเสร็จ

ขอขอบพระคุณ รศ. พญ. กัญญรัตน์ ทรัพย์วิเชียร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ศ. พ.อ. ดร. นพ. มจิรุทธ มุ่งถิ่น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่มีความกรุณาสละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์นี้ และกรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ระดับบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ด้านวิชาการตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการจัดอุปกรณ์วิจัย ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยอย่างดียิ่ง ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. อธิวัฒน์ เพ็งสกุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขต หาดใหญ่ ดร.ปฐมเมษฐ์ โฆษารัตนกุล และ ดร. ภควดี สมหวัง สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ดร. ศรียดาภรณ์ ส.สุวรรณ และ คุณรุ่งฟ้า บุญเสริม ที่ยินดีช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างรีนฝอยทรายสำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุน เงินทุนวิจัยสำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ ดร. อัจฉรา ภูมิ ที่คอยแนะนำเทคนิคและช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆรวมถึงคำปรึกษา ตลอดการทำงานวิจัย และขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆร่วมห้องปฏิบัติการหน่วยกัญญาวิทยา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ในการทำ วิจัยและเป็นกำลังใจตลอดมา

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะแล้วเสร็จไม่ได้หากไม่ได้กำลังใจ และการสนับสนุน จากบิดา มารดา ญาติพี่น้อง และเพื่อนๆทุกคน คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่ผู้มี พระคุณทุกท่านที่มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จของงานวิจัยนี้

พิมพ์พิลาส ศรีสุธน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	1
บทที่ 1 บทนำ.....	2
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	2
1.2 คำถามงานวิจัย.....	5
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	5
1.4 สมมติฐานของการวิจัย.....	5
1.5 กรอบแนวความคิดการวิจัย.....	6
1.6 คำสำคัญ.....	8
1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	8
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10
2.1 ชีววิทยาและลักษณะทั่วไปของริ้นฝอยทราย.....	10
2.1.1 การจัดจำแนกหมวดหมู่ของริ้นฝอยทรายตามหลักวิทยาศาสตร์.....	10
2.2 วงชีวิตของริ้นฝอยทราย (Life cycle of sand fly).....	10
2.3 ความสำคัญทางการแพทย์ของโปรโตซัวในวงศ์ <i>Trypanosomatidae</i>	12

2.4 Leishmaniasis.....	12
2.4.1 วงชีวิตของเชื้อ <i>Leishmania</i>	13
2.4.2 อาการและการแสดงออกของโรคลิชมาเนีย	13
2.4.3 ลิชมาเนียในประเทศไทย.....	14
2.4.4 ลิชมาเนียในแมลงชนิดอื่น.....	16
2.5 Trypanosomiasis	16
2.5.1 วงชีวิตของเชื้อ <i>Trypanosoma gambiense</i>	16
2.5.2 วงชีวิตของเชื้อ <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
2.5.3 อาการและการแสดงออกของโรค	18
2.5.4 โรคทริพาโนโซมในประเทศไทย.....	18
2.6 รื่นฝอยทรายที่พบในประเทศไทย (Sand fly in Thailand).....	18
2.7 <i>Trypanosomatid</i> parasites ในรื่นฝอยทราย	20
2.7.1 การตรวจ <i>Trypanosomatid</i> parasites ในรื่นฝอยทราย.....	21
2.8 การจำแนกชนิดของรื่นฝอยทรายด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยา.....	22
2.8.1 ลักษณะสำคัญที่ใช้แยกรื่นฝอยทรายในแต่ละสกุลที่มีความสำคัญทางการแพทย์.....	22
2.9 การจำแนกชนิดของรื่นฝอยทรายด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยา.....	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.1 รูปแบบการวิจัย	24
3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย	24
3.2.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง(Sample size)	25
3.3 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	25
3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
3.5 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
3.6 โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล	28

3.7 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
3.7.1 การเก็บตัวอย่างริ้นฝอยทราย (Collection of sand flies).....	28
3.7.2 การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological identification of sand fly species).....	28
3.7.3 การสกัดดีเอ็นเอ(DNA extraction).....	29
3.7.4 การตรวจสอบคุณภาพความเข้มข้นของดีเอ็นเอ.....	29
3.7.5 การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยา.....	30
3.7.6 การจำแนก Trypanosomatida parasites ด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยา.....	33
3.7.7 Agarose gel electrophoresis and DNA visualization.....	36
3.7.8 Cloning of PCR products.....	36
3.7.9 ขั้นตอนการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนยีน โดยวิธี Colony PCR.....	37
3.7.10 การสกัด Plasmids.....	38
3.7.11 DNA sequencing.....	39
3.7.12 Nucleotide sequences analysis.....	39
3.7.13 การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree analysis).....	39
3.7.14 การขอขึ้นทะเบียนและการเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์.....	40
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	40
3.9 สถานที่ทดลอง (Experimental place).....	40
3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis).....	40
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	41
4.1 จำนวนตัวอย่างและพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างริ้นฝอยทราย.....	41
4.2 ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Leishmania</i> spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอของริ้นฝอยทราย.....	43
4.3 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน ITS1 โดยเทคนิค Colony PCR	44
4.4 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>ITS1</i> ในเชื้อ <i>Leishmania</i> spp.	46

4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS1* ในเชื้อ *Leishmania* spp. กับฐานข้อมูล NCBI และการระบุ species ของเชื้อ *Leishmania* spp. 46

4.6 ผลการตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอของรึ้นฝอยทรายด้วยยีน *SSU rRNA* 47

4.7 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน *SSU rRNA* โดยเทคนิค Colony PCR 48

4.8 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SSU rRNA* ในเชื้อ *Trypanosoma* spp. ... 51

4.9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SSU rRNA* ในเชื้อ *Trypanosoma* spp. กับฐานข้อมูล NCBI และการระบุ species ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. 51

4.10 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน Cytochrome b เพื่อระบุชนิดของรึ้นฝอยทรายด้วยเทคนิค PCR..... 52

4.11 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน Cytochrome b โดยเทคนิค Colony PCR..... 53

4.12 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytochrome b* 54

4.13 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CytB* ในรึ้นฝอยทราย กับฐานข้อมูล NCBI และการระบุ species ของรึ้นฝอยทราย 55

4.14 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *COI* เพื่อระบุชนิดของรึ้นฝอยทราย ด้วยเทคนิค PCR..... 55

4.15 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน *COI* โดยเทคนิค Colony PCR ... 56

4.16 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI*..... 57

4.17 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ในรึ้นฝอยทราย กับฐานข้อมูล NCBI และการระบุ species ของรึ้นฝอยทราย 58

4.18 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)..... 59

4.19 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรึ้นฝอยทราย 61

4.20 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรึ้นฝอยทรายที่พบเชื้อ..... 62

4.21 ผลการขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์..... 69

4.22 ผลการวิเคราะห์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ 69

4.23 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ	74
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	78
บรรณานุกรม.....	82
ภาคผนวก ก.....	90
ภาคผนวก ข.....	97
ประวัติผู้เขียน.....	107



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายงานผู้ป่วยลิซมาเนียในประเทศไทย.....	15
ตารางที่ 2 ชนิดของรีนฝอยทรายที่พบในแต่ละจังหวัดของประเทศไทย	19
ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน Cytochrome b	31
ตารางที่ 4 ขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน Cytochrome b..	32
ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน COI.....	32
ตารางที่ 6 ขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน COI.....	33
ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวน SSU rRNA gene	34
ตารางที่ 8 ขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่ม จำนวน SSU rRNA gene	34
ตารางที่ 9 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวน ITS1.....	35
ตารางที่ 10 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่ม จำนวน ITS1.....	36
ตารางที่ 11 แสดงส่วนประกอบของสารในขั้นตอน DNA ligation.....	37
ตารางที่ 12 ข้อมูลพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างรีนฝอยทราย	41
ตารางที่ 13 ผลการตรวจหาเชื้อลิซมาเนียในรีนฝอยทราย.....	45
ตารางที่ 14 แสดงผลการเปรียบเทียบเชื้อลิซมาเนียที่ตรวจพบ กับฐานข้อมูล GenBank.....	46
ตารางที่ 15 ผลการตรวจหาเชื้อทริฟพาโนโซมาในรีนฝอยทราย.....	49
ตารางที่ 16 แสดงผลการเปรียบเทียบเชื้อทริฟพาโนโซมาที่ตรวจพบ กับฐานข้อมูล GenBank.....	52
ตารางที่ 17 แสดงผลการเปรียบเทียบยีน CytB ในรีนฝอยทรายกับฐานข้อมูล GenBank.....	55
ตารางที่ 18 แสดงผลการเปรียบเทียบยีน COI ในรีนฝอยทรายกับฐานข้อมูล GenBank.....	58
ตารางที่ 19 แสดงความชุกของการติดเชื้อลิซมาเนียด้วยวิธีการทางสถิติ	59
ตารางที่ 20 แสดงความชุกของการติดเชื้อทริฟพาโนโซมด้วยวิธีการทางสถิติ	60
ตารางที่ 21 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรีนฝอยทรายที่พบเชื้อ	62

ตารางที่ 22 เปอร์เซ็นต์ intraspecific variation ของเชื้อ *Leishmania martiniquensis*..... 70

ตารางที่ 23 เปอร์เซ็นต์ intraspecific variation ของเชื้อ *Trypanosoma* sp. 71

ตารางที่ 24 เปอร์เซ็นต์ intraspecific variation ของเชื้อ *Trypanosoma noyesi*..... 72

ตารางที่ 25 interspecific variation ของ *Trypanosoma* sp. และ *Trypanosoma noyesi*..... 73

ตารางที่ 26 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรีนฝอยทรายจังหวัดเชียงราย..... 102

ตารางที่ 27 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรีนฝอยทรายจังหวัดสงขลา..... 103

ตารางที่ 28 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรีนฝอยทรายจังหวัดพัทลุง..... 104

ตารางที่ 29 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรีนฝอยทรายจังหวัดชุมพร..... 106



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 วงชีวิตของริ้นฝอยทราย	11
รูปที่ 2 วงชีวิตของเชื้อลิขมาเนีย	13
รูปที่ 3 วงชีวิตของเชื้อทริพาโนโซมา	17
รูปที่ 4 พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างริ้นฝอยทราย	24
รูปที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน ITS1 ด้วยวิธี gel electrophoresis	43
รูปที่ 6 แสดงลักษณะของโคโลนีสีขาว และ โคโลนีสีฟ้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar.....	44
รูปที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบการโคลนพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน ITS1 ด้วยวิธี gel electrophoresis.....	45
รูปที่ 8 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของยีน ITS1 ในเชื้อลิขมาเนีย.....	46
รูปที่ 9 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน SSU rRNA ด้วยวิธี gel electrophoresis.....	47
รูปที่ 10 แสดงผลการตรวจสอบการโคลนพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน SSU rRNA ด้วยวิธี gel electrophoresis.....	48
รูปที่ 11 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของยีน SSU rRNA ในเชื้อทริพาโนโซมา.....	51
รูปที่ 12 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน CytB ด้วยวิธี gel electrophoresis.....	53
รูปที่ 13 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน CytB ด้วยวิธี gel electrophoresis.....	54
รูปที่ 14 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของยีน CytB	54
รูปที่ 15 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน COI ด้วยวิธี gel electrophoresis.....	56
รูปที่ 16 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน COI ด้วยวิธี gel electrophoresis	57
รูปที่ 17 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของยีน COI.....	57
รูปที่ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของริ้นฝอยทรายที่ตรวจพบเชื้อลิขมาเนีย และทริพาโนโซม ..	63

รูปที่ 19 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS1 ของเชื้อ Leishmania spp. ที่แยกได้จากดีเอ็นเอของริ้นฝอยทราย.....	75
รูปที่ 20 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ Trypanosoma spp. ที่แยกได้จากดีเอ็นเอของริ้นฝอยทราย	76
รูปที่ 21 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของริ้นฝอยทราย .	77
รูปที่ 22 แผนที่ยีนของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM®- T easy	96
รูปที่ 23 แสดง multiple sequence alignment ของ <i>Trypanosoma</i> spp.....	97
รูปที่ 24 แสดง multiple sequence alignment ของ <i>Leishmania</i> spp.....	99
รูปที่ 25 แสดง multiple sequence alignment ของ ริ้นฝอยทราย	100



สัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
<i>ITS1</i>	Internal transcribed spacer 1
<i>SSU rRNA</i>	Small subunit ribosomal RNA
<i>COI</i>	Cytochrome c oxidase subunit I
<i>CytB</i>	Cytochrome b
bp	Base pair
ddH ₂ O	Deionized distilled water
ddNTP	Dideoxynucleotide triphosphate
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate
g	Gram
ml	Milliliter
mM	millimolar
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	revolutions per minute
<i>taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _m	Melting temperature
μl	Microliter
μM	Micromolar

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยในปัจจุบันมีโรคติดต่ออุบัติใหม่เกิดขึ้นมากมาย ซึ่งเกิดจากปัจจัยหลายประการ เช่น การเปลี่ยนแปลงของตัวเชื้อโรค การดื้อยา รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางนิเวศวิทยาของสัตว์นำโรค และสิ่งแวดล้อมล้วนเป็นปัจจัยที่สำคัญ หากขาดการควบคุมและป้องกันที่มีประสิทธิภาพ จะก่อให้เกิดความสูญเสียชีวิตและทำลายสุขภาพของคนในประเทศไทยได้

โรคลิชมาเนีย จัดเป็นโรคอุบัติใหม่ในประเทศไทย ที่มีสาเหตุอันเกิดจากริ้นฝอยทราย ที่มีเชื้อโปรโตซัวในกลุ่มลิชมาเนีย (*Leishmania* spp.) เป็นพาหะนำโรค โรคนี้ส่วนใหญ่มีการระบาดอยู่ในประเทศแถบตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศอิรัก อิหร่าน ซาอุดีอาระเบีย และในอเมริกาใต้ เช่น ประเทศโคลัมเบีย บราซิล เปรู การระบาดของโรคลิชมาเนียในประเทศไทยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรกระหว่างปี พ.ศ. 2503-2530 เป็นการพบเชื้อลิชมาเนียในผู้ป่วยที่ไปทำงานในประเทศแถบตะวันออกเฉียงใต้ และช่วงที่ 2 ในช่วงปี พ.ศ. 2539 จนถึงปัจจุบัน เป็นการพบเชื้อลิชมาเนียในผู้ป่วยที่ไม่เคยเดินทางออกนอกประเทศมาก่อน (Autochthonous leishmaniasis) (1)

ปัจจุบันสถานการณ์การติดเชื้อในประเทศไทยเฉพาะที่มีรายงาน มีผู้ป่วยจำนวน 26 ราย (1) อาการส่วนใหญ่มีการแสดงออกที่บริเวณอวัยวะภายใน Visceral leishmaniasis (VL) คิดเป็นร้อยละ 46.16 (1, 2) อาการที่แสดงออกบริเวณผิวหนัง Cutaneous leishmaniasis (CL) คิดเป็นร้อยละ 38.46 (1, 2) และ ร้อยละ 15.38 มีอาการที่แสดงออกรวมทั้ง Visceral leishmaniasis และ Cutaneous leishmaniasis (1) ผู้ป่วยด้วยโรคลิชมาเนียในประเทศไทยส่วนใหญ่พบในจังหวัดทางภาคใต้และภาคเหนือ เช่น พังงา (1, 3) สุราษฎร์ธานี (1, 4) นครศรีธรรมราช (2, 5) สงขลา (1, 6) สตูล (1, 7) พัทลุง (1) ตรัง (1, 6, 8) เชียงราย (1, 9) เชียงใหม่ (1, 10) น่าน (1, 11) และ ลำพูน (10, 12)

ริ้นฝอยทราย(Sand fly) ซึ่งเป็นพาหะของโรคลิชมาเนีย จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Psychodidae อยู่ในอันดับ (Order) Diptera (13, 14) เป็นแมลงที่มีขนาดเล็ก มีสีน้ำตาลอ่อน ลำตัวและปีกปกคลุมไปด้วยขน ในขณะที่พัก ปีกบนหลังจะกางออกเป็นรูปตัววี มีขนาดประมาณหนึ่งในสามของยุง ริ้นฝอยทรายจะอาศัยตามแหล่งที่มีความชื้นสูงและอุณหภูมิคงที่ เช่น พื้นหญ้า พื้นป่าและคอกสัตว์เลี้ยง ริ้นฝอยทรายเป็นแมลงที่สามารถพบได้ทั่วไปในเขตร้อน เขตกึ่งร้อน และเขตอบอุ่น

การศึกษาในปัจจุบันพบริ้นฝอยทรายมากกว่า 700 ชนิดจากทั่วโลก และมีประมาณ 70 ชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำโรคลิซมาเนีย และที่ยังสงสัยจะเป็นพาหะได้อีก (suspected vectors) 48 ชนิด ซึ่งริ้นฝอยทรายแต่ละชนิด จะมีความจำเพาะต่อเชื้อลิซมาเนียที่แตกต่างกัน (14-18) ซึ่งเกิดจากหลายปัจจัยเช่น จำนวน รูปร่าง และขนาดของซี่ฟัน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกรองเชื้อเข้าสู่ร่างกายของริ้นฝอยทราย รวมทั้งสภาพสิ่งแวดล้อมในทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อเจริญเติบโต ล้วนมีผลต่อการ อยู่รอดของเชื้อ (14, 15) นอกจากนี้เชื้อโปรโตซัวในกลุ่มลิซมาเนียที่พบในริ้นฝอยทรายแล้ว ยังมีรายงานการพบเชื้อโปรโตซัวในสกุล Trypanosomatid protozoa อื่นอีกด้วย เช่น *Trypanosoma* (19-22) *Blastocrithidia* (19) *Herpetomonas* (19) *Endotrypanum* (23) และ *Leptomonas* (24, 25)

โรคทริพาโนโซม เกิดจากเชื้อโปรโตซัว *Trypanosoma* ซึ่งก่อให้เกิดโรค 2 โรค โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรค และแหล่งที่พบ คือ โรคอเมริกาใต้ทริพาโนโซม (chagas disease) เกิดจากเชื้อ *Trypanosoma cruzi* ซึ่งเป็นโรคระบาดในทวีปอเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ โดยมีมวนดูดเลือด(kissing bug) เป็นพาหะนำโรค และ โรคแอฟริกันทริพาโนโซม (African sleeping sickness) เกิดจากเชื้อ *Trypanosoma brucei* ซึ่งเป็นโรคระบาดบริเวณเขตร้อนของทวีปแอฟริกา โดยมีแมลง tsetse fly เป็นพาหะนำโรค (26) จากงานวิจัยต่างๆพบว่านอกจากแมลงที่เป็นพาหะนำโรคแล้วนั้น ยังมีการพบเชื้อทริพาโนโซมในสัตว์อื่นอีกหลายชนิด เช่น วัว ควาย หนู ม้า หมู สุนัข แกะ กวาง และช้าง เป็นต้น (27-31)

สถานการณ์การติดเชื้อทริพาโนโซมในประเทศไทย ประเทศไทยเป็นประเทศที่ไม่ได้อยู่ในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรคทริพาโนโซมในมนุษย์ (Atypical human trypanosomiasis) แต่มีการพบเชื้อทริพาโนโซมได้ทั่วไปในสัตว์เช่น วัว ควาย หนู (27-29, 31) และนอกจากสัตว์เหล่านี้แล้วยังมีรายการพบเชื้อทริพาโนโซมในริ้นฝอยทรายในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรคลิซมาเนียด้วย (8) แต่ในปี พ.ศ. 2549 ได้มีรายงานการพบเชื้อ *Trypanosoma lewisi* ในผู้ป่วยเป็นครั้งแรก และต่อมาในปีพ.ศ. 2550 มีรายงานการพบเชื้อ *Trypanosoma lewisi-like* (Herpetosoma) อีกครั้ง ซึ่งผู้ป่วยทั้ง 2 รายเป็นเด็กทารกที่อาศัยอยู่ในจังหวัดลำปางเช่นเดียวกัน (32-34)

สำหรับการจำแนกริ้นฝอยทราย อาศัย 2 วิธีหลักในการจำแนก คือ การจำแนกทางสัณฐานวิทยา (Morphological identification) และการจำแนกด้วยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา (Molecular identification) การจำแนกทางสัณฐานวิทยา เป็นการศึกษาโดยใช้อวัยวะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ส่วนหัว (head) ปาก(proboscis) หนวด(antenna) การเรียงตัวของฟัน ออก(thorax) และ

ปีก(wing) เป็นต้น (1) แต่การจำแนกทางสัณฐานวิทยานั้น จำเป็นต้องอาศัยความชำนาญจึงสามารถจำแนกชนิดได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ เพราะริ้นฝอยทรายบางชนิดมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันมาก ในปัจจุบันมีงานวิจัยทั้งในประเทศและต่างประเทศที่ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและอณูชีววิทยาของริ้นฝอยทรายเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกชนิดของริ้นฝอยทราย (Molecular Classification) และเพื่อใช้เป็นระบบฐานข้อมูล โดยทำการศึกษาค้นคว้าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในประชากรริ้นฝอยทรายในพื้นที่ต่างๆ ซึ่งในแต่ละพื้นที่หรือแต่ละประเทศอาจจะมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสได้ (26, 35) ดังนั้นจึงมีการศึกษาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนที่อยู่ภายในนิวเคลียส (Nuclear DNA) เช่น ยีน Elongation factor 1 α (*EF-1 α*), ยีน Intergenic spacers และยีน 18S ribosomal RNA (*18S rRNA*) รวมทั้งมีการศึกษา ยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA) เช่น ยีน Cytochrome C oxidase subunit I (*COI*), ยีน Cytochrome b (*Cytb*) และยีน NADH dehydrogenase 4 (*ND4*) (1, 36, 37) ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ในการวิเคราะห์ยีนของริ้นฝอยทรายในงานวิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้ยีนในไมโทคอนเดรีย เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีจำนวนหลาย copies โดยยีนนี้มีความหลากหลายสูง ในระหว่างสิ่งมีชีวิต (interspecies) และมีความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (intraspecies) จึงสามารถใช้จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ (species identification)

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อการสำรวจริ้นฝอยทรายในพื้นที่ของจังหวัดที่พบผู้ป่วยที่เป็นโรคลิชมาเนียซึ่งเป็นพื้นที่เสี่ยงของการเกิดโรค โดยระบุสายพันธุ์โดยวิธีการทางอณูชีววิทยาโดยใช้ cytochrome b genes และ Cytochrome C oxidase subunit I gene และตรวจหาเชื้อโปรโตซัวในกลุ่ม Trypanosomatid protozoa โดยเฉพาะลิชมาเนีย และ ทริพพานาโซม โดยใช้ internal transcribed spacer 1 (*ITS1*) และ small subunit ribosomal RNA (*SSU rRNA*) genes ในการระบุสายพันธุ์ของลิชมาเนีย และทริพพานาโซม (1, 38) ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้เราเข้าใจลักษณะของแมลงพาหะนำโรค และชนิดของเชื้อโปรโตซัว เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการป้องกันและควบคุมโรคต่อไป

1.2 คำถามงานวิจัย

1.2.1 สามารถตรวจพบเชื้อ *Leishmania* spp. และเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในรึ้นฝอยทรายในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาด และในพื้นที่ที่ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคลิซมาเนียหรือไม่

1.2.2 รึ้นฝอยทรายในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาด และในพื้นที่ที่ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคลิซมาเนีย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.3.1 เพื่อตรวจหาเชื้อ *Leishmania* spp. และเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในรึ้นฝอยทรายในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาด และในพื้นที่ที่ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคลิซมาเนีย

1.3.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของรึ้นฝอยทรายในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาด และในพื้นที่ที่ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคลิซมาเนีย

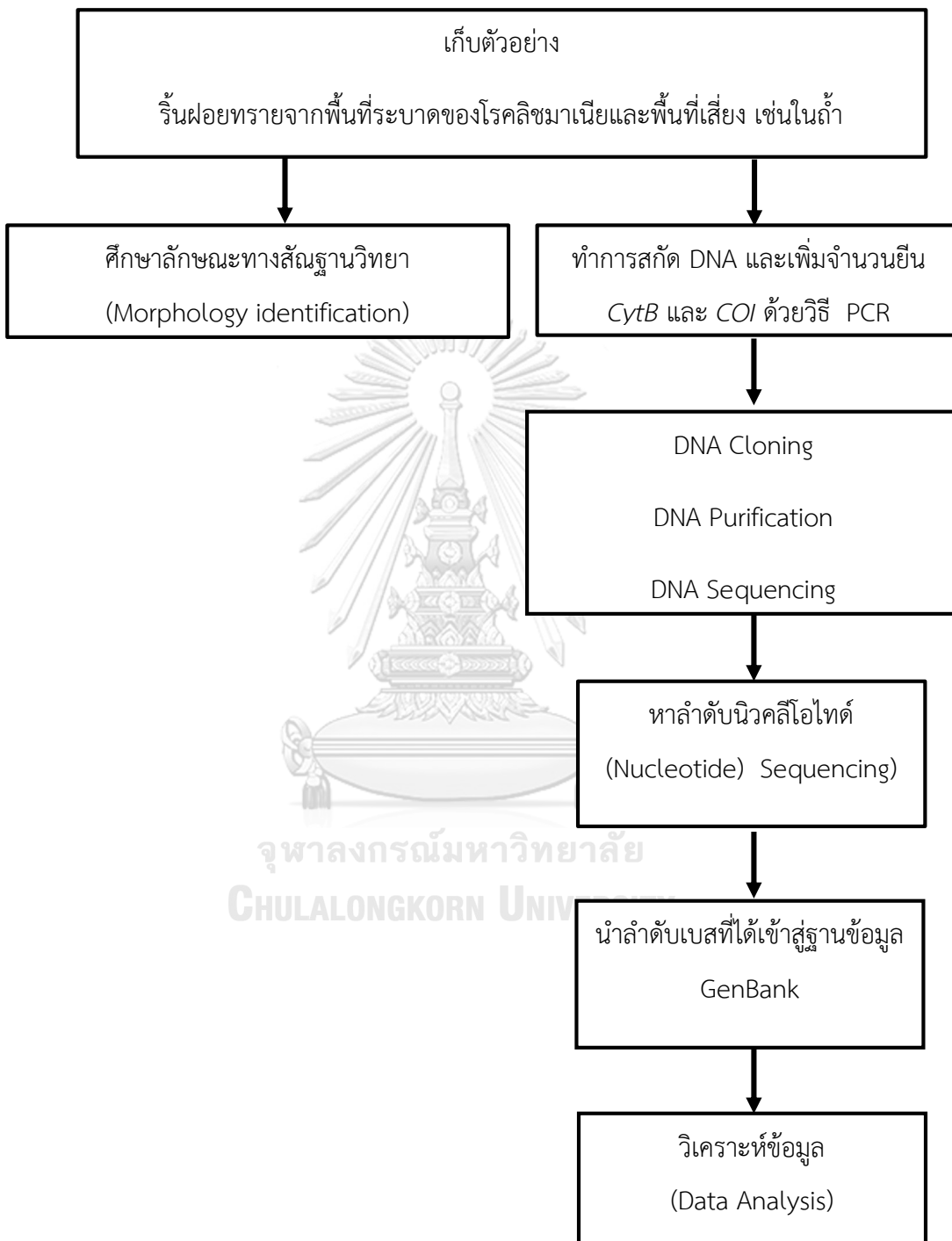
1.4 สมมติฐานของการวิจัย

1.4.1 มีการติดเชื้อ *Leishmania* spp. และเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในรึ้นฝอยทรายในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาด และในพื้นที่ที่ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคลิซมาเนีย

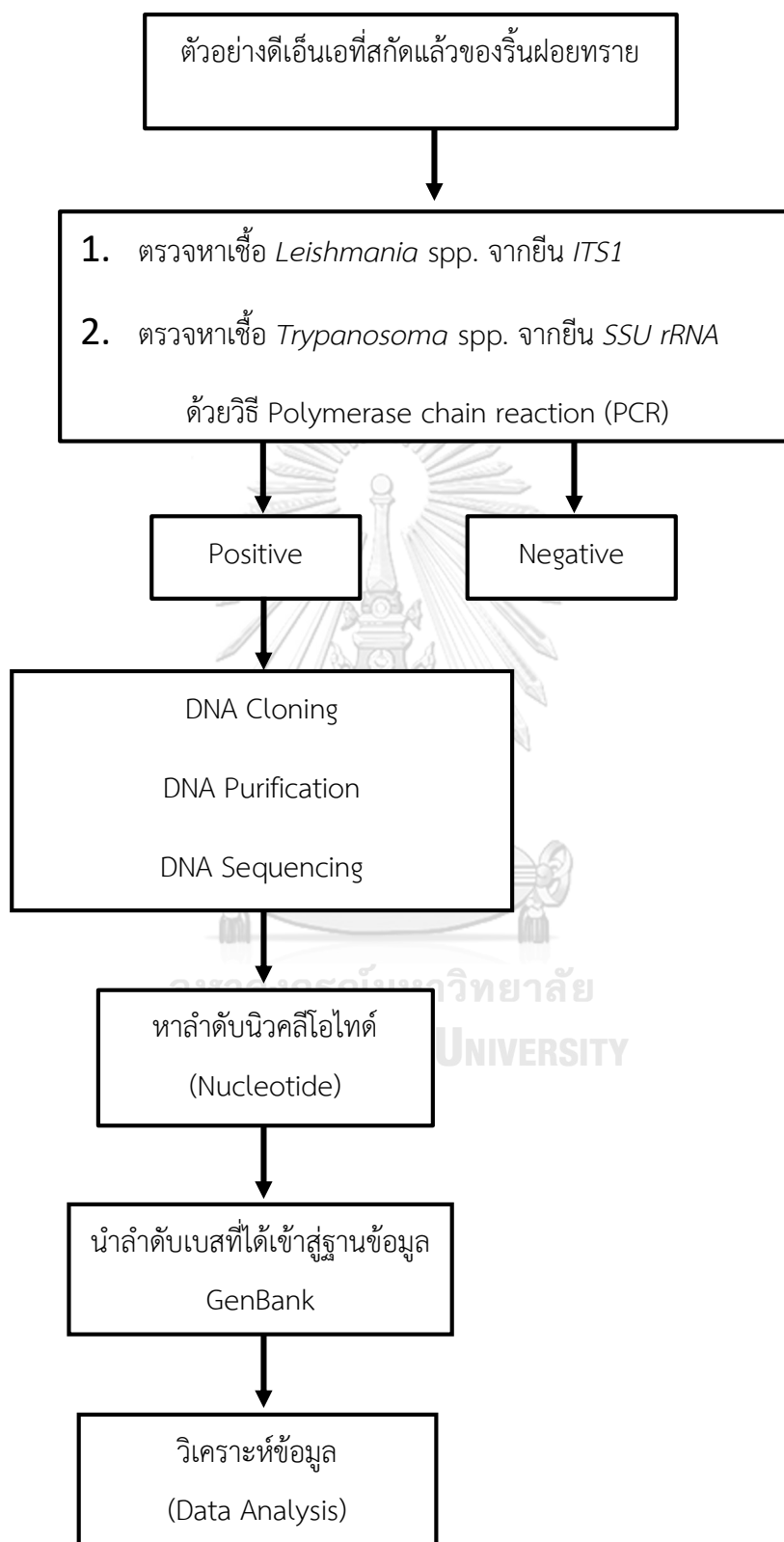
1.4.2 รึ้นฝอยทรายจากพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาด และในพื้นที่ที่ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคลิซมาเนียมีความหลากหลายทางพันธุกรรม

1.5 กรอบแนวความคิดการวิจัย

ส่วนที่ 1 การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของริ้นฝอยทราย



ส่วนที่ 2 การตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างดีเอ็นเอรีนฝอยทราย



1.6 คำสำคัญ

Sand fly
Leishmania
 Leishmaniasis
 Trypanosomiasis
 Trypanosomatidea

1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Phlebotomidae คือวงศ์ย่อยของริ้นฝอยทราย ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Psychodidae เป็นแมลงกลุ่มกัดดูดเลือดที่สำคัญในการนำโรคไลชมาเนีย ประกอบไปด้วยริ้นฝอยทรายที่นำโรคใน 3 สกุล คือ *Phlebotomus*, *Lutzomyia* และ *Sergentomyia*

Leishmania คือสกุลของโปรโตซัวซึ่งเป็นปรสิตในมนุษย์ และสัตว์ ก่อให้เกิดโรคไลชมาเนีย (leishmaniasis) 3 ลักษณะ เช่น visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis และ mucocutaneous leishmaniasis

Trypanosoma คือสกุลของโปรโตซัวซึ่งเป็นปรสิตในมนุษย์ และสัตว์ ก่อให้เกิดโรค Trypanosomiasis แบ่งย่อยออกเป็น 2 โรค ตามสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุและแหล่งที่พบ คือ โรค เหงาหลับ หรือ African trypanosomiasis เกิดจากเชื้อโปรโตซัว *Trypanosoma brucei* โดยมีแมลง tsetse fly เป็นพาหะ แบ่งเป็น 2 สายพันธุ์ย่อยคือ *Trypanosoma brucei gambiense* และ *Trypanosoma brucei rhodesiense* อีกโรคหนึ่งคือโรค American trypanosomiasis หรือ Chagas disease เกิดจากเชื้อโปรโตซัว *Trypanosoma cruzi* โดยมีแมลง มวนเพศผสมชาติ (kissing bug) เป็นพาหะ

Cytochrome b gene คือยีนที่พบได้ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นส่วนประกอบภายในเซลล์ ที่ทำหน้าที่ให้พลังงานแก่เซลล์ ส่วนดีเอ็นเอบนยีน cytochrome b นี้เป็นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ประมาณ 1140 เบส ดีเอ็นเอบริเวณนี้จะสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะสำหรับสัตว์ในแต่ละชนิด

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1.8.1 ทำให้ทราบถึงสถานการณ์ปัจจุบันของ ความชุกของเชื้อ *Leishmania* และเชื้อ *Trypanosoma* ในริ้นฝอยทรายที่เก็บจากแหล่งระบาด และในพื้นที่ที่ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคไลชมาเนีย

1.8.2 ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ชนิดของรีนฝอยทราย และชนิดของเชื้อลิซมาเนีย และ ทริฟฟาโนโซม ในการเป็นพาหะนำโรค เพื่อเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวัง และควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีวิตวิทยาและลักษณะทั่วไปของริ้นฝอยทราย

2.1.1 การจัดจำแนกหมวดหมู่ของริ้นฝอยทรายตามหลักวิทยาศาสตร์

ริ้นฝอยทรายเป็นแมลงขนาดเล็ก จัดอยู่ใน

อาณาจักร (Kingdom): Animalia

ไฟลัม (Phylum): Arthropoda

ชั้น (Class): Insecta

อันดับ (Order): Diptera

อันดับย่อย (Suborder): Nematocera

วงศ์ (Family): Psychodidae

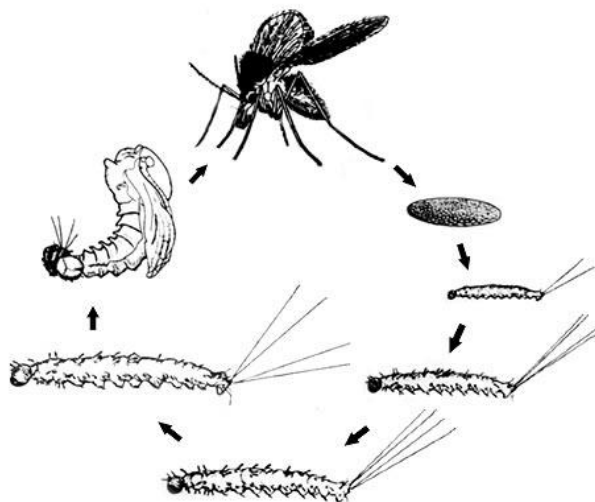
วงศ์ย่อย (subfamily)

: Phlebotominae

ริ้นฝอยทรายสามารถจำแนกออกได้เป็น 6 สกุล (Genera) คือ *Brumptomyia* , *Lutzomyia* , *Phlebotomus* , *Hertigia* , *Sergentomyia* และ *Warileya* แต่มีริ้นฝอยทรายเพียง 3 สกุลที่มีความสำคัญทางการแพทย์ คือ สกุล *Lutzomyia* , สกุล *Phlebotomus* และ สกุล *Sergentomyia* (1) จากการสำรวจพบว่าริ้นฝอยทรายในสกุล *Lutzomyia* จะพบได้ในเขตโลกใหม่เท่านั้น ส่วนสกุล *Phlebotomus* พบได้เฉพาะเขตโลกเก่า และเขตร้อนของทวีปแอฟริกา และสกุล *Sergentomyia* พบได้ทั่วไปในเขตโลกเก่าเท่านั้น (1, 39, 40)

2.2. วงชีวิตของริ้นฝอยทราย (Life cycle of sand fly)

ริ้นฝอยทรายมีการเจริญเติบโตที่มีการเปลี่ยนรูปร่างแบบสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) ประกอบไปด้วย 4 ระยะ คือ ระยะไข่ ระยะตัวอ่อน ระยะดักแด้ และ ระยะตัวเต็มวัย



รูปที่ 1 วงชีวิตของริ้นฝอยทราย

ที่มา Sand fly & Leishmania Research Group by R.dillon (2008)

ระยะไข่ ไข่ของริ้นฝอยทรายมีลักษณะยาวรี มีสีน้ำตาลเข้ม ผิวมัน มีขนาดประมาณ 0.3-0.4 มิลลิเมตร ริ้นฝอยทรายตัวเมีย จะวางไข่เดี่ยวๆในที่ชื้น และไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนภายใน 1-2 สัปดาห์ โดยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และความชื้น (1, 40, 41)

ระยะตัวอ่อน ตัวอ่อนของริ้นฝอยทรายมีสีขาว ลักษณะคล้ายหนอนผีเสื้อ ส่วนหัวและเขี้ยวมีขนาดใหญ่ ลำตัวมี 12 ปล้อง โดยจะแบ่งตัวอ่อนออกเป็น 4 ระยะ (1, 40, 41)

ตัวอ่อนระยะที่ 1 มีลำตัวสีครีม หัวมีสีน้ำตาลเข้ม มีความยาวประมาณ 0.04-0.05 มิลลิเมตร มี Caudal bristles 1 คู่ มีพื้นที่รอบหนวด (antennal tubercle) ที่มีขนาดใหญ่กว่าหนวด (Antenna) ปล้องของหนวดจะมีลักษณะกลม โดยปล้องหนวดปล้องแรกจะยาวและบางมีหนวดขนาดสั้น และมีขนยาวหนึ่งเส้นติดอยู่ด้านข้างของหนวดปล้องสุดท้ายเรียกว่า Arista (1, 40-42)

ตัวอ่อนระยะที่ 2 มีลักษณะคล้ายตัวอ่อนระยะแรก แต่มีขนาดใหญ่กว่า และมี Caudal bristles 2 คู่ (41, 42)

ตัวอ่อนระยะที่ 3 มีลักษณะคล้ายตัวอ่อนระยะแรก และระยะที่สอง แต่มีขนาดใหญ่กว่าตัวอ่อนระยะที่สอง มี Caudal bristles 2 คู่ ส่วนหัว(Head capsule) มี dorsal suture เป็นรูปตัววาย (40, 41)

ตัวอ่อนระยะที่ 4 เป็นตัวอ่อนที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีความยาว 2.2-2.5 มิลลิเมตร มี

Caudal bristles 2 คู่ ความยาวของลำตัวใกล้เคียงกับความยาวของ Caudal พื้นที่ด้านบนของปล้องอก (Tergum area) มี 8 ปล้อง และส่วน caudal lobule มีสีน้ำตาลเข้ม ในส่วนของอกยังไม่พบอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ (Locomotive organs) (40, 41)

ระยะดักแด้ เป็นระยะที่มีขนาดใหญ่กว่าระยะตัวอ่อน ดักแด้จะมีขนาดประมาณ 2.6 มิลลิเมตร เป็นระยะที่จะไม่กินอาหาร และจะทนแล้งได้ดีกว่าระยะตัวอ่อน ดักแด้จะมีผิวหยาบ ด้านบนของส่วนอกมักจะพบคราบของตัวอ่อนระยะที่สี่ติดอยู่ ดักแด้จะใช้เวลา 7-10 วันจึงเจริญเป็นตัวเต็มวัย (1, 41)

ระยะตัวเต็มวัย ริ้นฝอยทรายตัวเต็มวัยจะมีขนาดประมาณ 1.5-4 มิลลิเมตร โดยตัวเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ ลำตัวมีสีเหลือง มีขนทั่วตัว ลักษณะของปีกจะกางออกเป็นรูปตัววี เคลื่อนที่โดยการกระโดด หรือไต่ไปมากกว่าการบิน ริ้นฝอยทรายทั้งเพศผู้และเพศเมียจะกินน้ำหวานเป็นอาหาร แต่ริ้นฝอยทรายเพศเมียเท่านั้นที่มีการดูดเลือดคนหรือสัตว์เพื่อการเจริญเติบโตของไข่ ริ้นฝอยทรายนั้นจะอาศัยอยู่ตามที่สูงๆ เช่น ถ้ำ ป่า โพรงสัตว์ กองไม้ เป็นต้น (1, 41)

2.3 ความสำคัญทางการแพทย์ของโปรโตซัวในวงศ์ *Trypanosomatidae*

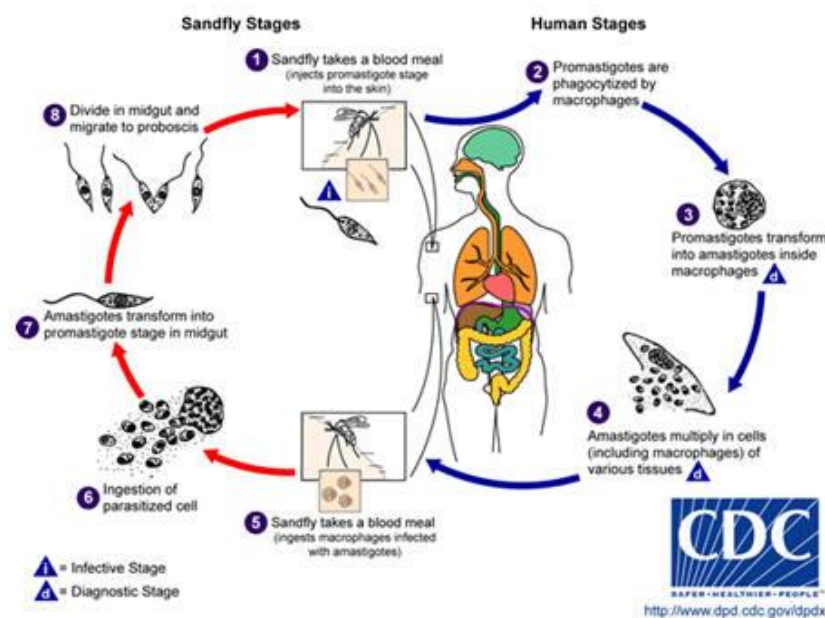
โปรโตซัวในวงศ์ *Trypanosomatidae* อยู่ในอันดับ Trypanosomatida เป็นโปรโตซัวในกลุ่ม แพลกเจลเลต ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อและในเลือด มีรูปร่างยาวเรียว หรือรูปร่างกลม มี 1 นิวเคลียส โปรโตซัวในวงศ์นี้แบ่งได้เป็นหลายกลุ่ม เช่น *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Blastocrithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas* และ *Leptomonas* ซึ่งโปรโตซัวในกลุ่ม *Leishmania* และ *Trypanosoma* มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยก่อให้เกิดโรคที่สำคัญ เช่น leishmaniasis, chagas disease และ sleeping sickness (43, 44)

2.4 Leishmaniasis

โรคไลชมาเนีย เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัว (Obligate intracellular protozoa) ที่มีริ้นฝอยทรายเป็นแมลงพาหะ(3) สามารถติดต่อจากคนสู่คน จากสัตว์สู่คน และจากสัตว์สู่สัตว์ได้ การติดต่อของโรคเกิดจากริ้นฝอยทรายเพศเมียไปกัดคนหรือสัตว์ที่มีเชื้อไลชมาเนียอยู่ เชื้อไลชมาเนียนั้นมีการเจริญเป็น 2 ระยะ คือ ระยะอะแมสติโกต (amastigote) ซึ่งพบในคน และในสัตว์ และระยะโปรแมสติโกต (promastigote) ซึ่งเป็นระยะที่พบในริ้นฝอยทราย

2.4.1 วงชีวิตของเชื้อ *Leishmania*

เมื่อริ้นฝอยทรายที่มีเชื้อกัดคน ริ้นฝอยทรายจะปล่อยเชื้อระยะโปรแมสติโกต (promastigote) เชื้อระยะโปรแมสติโกตจะเข้าสู่เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (macrophage) โดยการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) และ phagolysosome เปลี่ยนเป็นระยะอะแมสติโกต(amastigote) จากนั้นจะมีการเพิ่มจำนวนแบบแบ่งเป็นสอง จนแมคโครฟาจแตกออก เมื่อริ้นฝอยทรายมาดูดเลือดคนที่ติดเชื้อก็จะได้รับเชื้อระยะอะแมสติโกตเข้าไป เชื้อระยะอะแมสติโกตจะเข้าสู่ทางเดินอาหารของริ้นฝอยทราย และจะเจริญไปเป็นระยะ procyclics โดยใช้เวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเจริญต่อไปเป็นระยะ nectomonads โดยใช้เวลา 3-4 วัน จนเข้าสู่ระยะโปรแมสติโกต ซึ่งเป็นระยะติดต่อ และเมื่อริ้นฝอยทรายที่มีเชื้อไปกัดคน เชื้อก็จะเจริญเป็นวัฏจักรต่อไป (1)



รูปที่ 2 วงชีวิตของเชื้อลิชมาเนีย

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

2.4.2 อาการและการแสดงออกของโรคลิชมาเนีย

อาการของโรคลิชมาเนียแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ คือ อาการที่แสดงออกบริเวณผิวหนัง (Cutaneous leishmaniasis) อาการแสดงออกที่บริเวณอวัยวะภายใน (Visceral leishmaniasis) และ อาการแสดงออกที่เยื่อเมือก (Mucocutaneous leishmaniasis)

- อาการที่แสดงออกบริเวณผิวหนัง (Cutaneous leishmaniasis; CL) ส่วนใหญ่จะเกิดบริเวณที่โดนริ้นฝอยทรายกัด ผิวหนังบริเวณนั้นจะเกิดเป็นตุ่มแดง

และอาจลุกลามเป็นแผลขนาดใหญ่ได้ โดยที่ขอบของแผลจะมีลักษณะนูน และแผลนี้อาจจะใช้เวลาหลายปีกว่าจะหายสนิท (1, 10)

- อาการที่แสดงออกบริเวณอวัยวะภายใน (Visceral leishmaniasis; VL)

หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า โรคคาลา อาซา (Kala Azar) ผู้ป่วยมักจะมีอาการอ่อนเพลีย มีไข้ต่ำๆ คลื่นไส้ อาเจียน ผิวหนังแห้ง ตับและม้ามโต และบางรายมีอาการต่อมน้ำเหลืองโต เกล็ดเลือดต่ำด้วย ถ้าไม่ได้รับการรักษาจะทำให้เสียชีวิตได้ (10)

- อาการที่แสดงออกทางเยื่อเมือก (Mucocutaneous leishmaniasis; ML)

อาการที่แสดงออกจะคล้ายกับอาการที่เกิดขึ้นที่ผิวน้ำ แต่จะเกิดแผลลุกลามที่อวัยวะที่มีเยื่อเมือก เช่น ปาก และ จมูก ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ ซีด อ่อนเพลีย น้ำหนักลด และอาจทำให้รูปร่างผิวดำจากเดิม หากอาการรุนแรงและไม่ได้รับการรักษาจะทำให้เสียชีวิตได้เช่นกัน (1, 10)

2.4.3 ลิซมาเนียในประเทศไทย

โรคลิซมาเนียจัดเป็นโรคอุบัติใหม่ในประเทศไทย นับตั้งแต่ปี พ.ศ.2503 ที่มีการพบลิซมาเนียในผู้ป่วยที่มีการเดินทางกลับมาจากประเทศแถบตะวันออกกลาง ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคนี้ ในประเทศไทยพบผู้ป่วยลิซมาเนียเฉพาะที่มีรายงาน จำนวน 24 ราย โดยส่วนใหญ่เชื้อที่พบคือเชื้อ *L. martiniquensis* (10) และ *L. siamensis* (8) และมีรายงานว่าพบผู้ป่วยที่เกิดจากเชื้อ *L. donovani* จำนวน 1 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัดน่าน(11) และ *L. infantum* 1 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ที่กรุงเทพมหานคร (45) อีกด้วย

อาการแสดงออกของโรคลิซมาเนียในประเทศไทยมีทั้งอาการที่แสดงออกบริเวณอวัยวะภายใน อาการที่แสดงออกบริเวณผิวน้ำ และอาการที่แสดงออกบริเวณอวัยวะภายในร่วมกับอาการที่แสดงออกบริเวณผิวน้ำ ซึ่งโรคลิซมาเนียนั้นเป็นโรคที่สามารถพบได้ทั้งในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติ และผู้ป่วยที่มีความคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเอดส์

ตารางที่ 1 รายงานผู้ป่วยลิซมาเนียในประเทศไทย

ลำดับ	ปี	จังหวัด	อายุ/เพศ	เพศ	อาการ แสดง	สายพันธุ์ที่ตรวจพบ	Ref.
1	2539	สุราษฎร์ธานี	3	หญิง	VL	ไม่ระบุสายพันธุ์	(46)
2	2542	ตรัง	30	ชาย	CL	<i>L. martiniquensis</i>	(6)
3	2548	น่าน	40	ชาย	VL	<i>L. donovani</i>	(4)
4	2549	พังงา	55	ชาย	VL	<i>L. martiniquensis</i>	(47)
5	2549	สงขลา	62	หญิง	VL	<i>L. siamensis</i>	(2)
6	2550	กทม.	66	ชาย	VL	<i>L. infantum</i>	(47)
7	2550	นครศรีธรรมราช	44	ชาย	VL	ไม่ระบุสายพันธุ์	(2)
8	2550	สงขลา	81	ชาย	VL	ไม่ระบุสายพันธุ์	(2)
9	2551	สงขลา	52	หญิง	CL	ไม่ระบุสายพันธุ์	(2)
10	2551	เขียงราย	36	ชาย	CL	ไม่ระบุสายพันธุ์	(2)
11	2551	นครศรีธรรมราช	71	ชาย	CL	ไม่ระบุสายพันธุ์	(2)
12	2552	สงขลา	44	ชาย	VL	ไม่ระบุสายพันธุ์	(2)
13	2552	จันทบุรี	37	ชาย	VL	<i>L. martiniquensis</i>	(48)
14	2553	ตรัง	30	ชาย	CL,VL	ไม่ระบุสายพันธุ์	(6)
15	2553	ตรัง	32	หญิง	VL	<i>L. siamensis</i>	(8)
16	2554	สงขลา	46	ชาย	CL,VL	<i>L. martiniquensis</i>	(6)
17	2554	เขียงราย	45	หญิง	CL	<i>L. martiniquensis</i>	(9)
18	2555	ลพบุรี	3	หญิง	CL	ไม่ระบุสายพันธุ์	(49)
19	2555	ลำพูน	52	ชาย	VL	<i>L. martiniquensis</i>	(12)
20	2556	สตูล	5	หญิง	VL	<i>L. martiniquensis</i>	(7)
21	2556	นครศรีธรรมราช	45	หญิง	CL	ไม่ระบุสายพันธุ์	(5)
22	2557	พัทลุง	40	หญิง	CL,VL	<i>L. martiniquensis</i>	(1)
23	2557	น่าน	57	หญิง	CL	<i>L. orientalis</i>	(50)
24	2558	เขียงใหม่	48	ชาย	CL,VL	<i>L. martiniquensis</i>	(10)
25	2558	ลำพูน	38	ชาย	CL	<i>L. martiniquensis</i>	(10)
26	2558	กาญจนบุรี	42	หญิง	CL	<i>L. siamensis</i>	(51)

2.4.4 ลิขมาเนียในแมลงชนิดอื่น

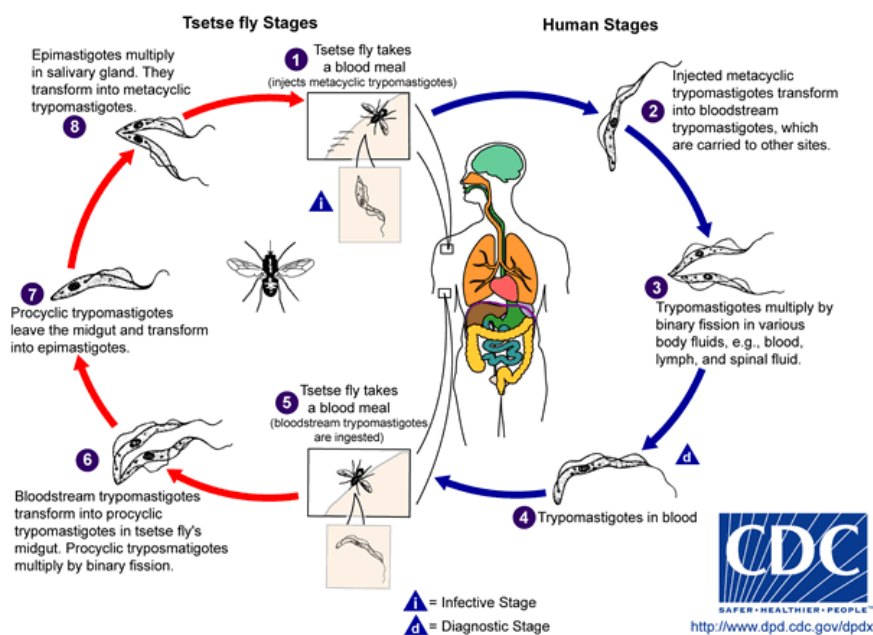
ริ้นฝอยทรายเป็นพาหะนำโรคลิขมาเนีย แต่ในปัจจุบัน มีรายงานการพบเชื้อ ลิขมาเนียในริ้นน้ำเค็มด้วย ริ้นน้ำเค็ม(Biting midges) เป็นแมลงที่มีขนาดเล็ก ลำตัวสีดำ หรือเทา พบได้ทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่นโดยอาศัยตามชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน จัดอยู่ในวงศ์ Ceratopogonidae ตัวเต็มวัยเพศเมียจะกัดดูดเลือดจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ชนิดของริ้นน้ำเค็มที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขในเมืองไทย มี 2 สกุล ได้แก่ *Culicoides* และ *Leptoconops* ซึ่งก่อให้เกิดโรคสมองอักเสบ และยุงนำโรคเท้าช้าง (filariasis) ในละตินอเมริกาอีกด้วย (52) และนอกจากริ้นน้ำเค็มจะเป็นพาหะของโรคสมองอักเสบ และโรคเท้าช้างแล้ว ยังมีงานวิจัยที่พบเชื้อลิขมาเนียในริ้นน้ำเค็ม สกุล *Culicoides* ซึ่งสามารถติดเชื้อได้ตามธรรมชาติ แต่ความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อลิขมาเนียยังไม่ทราบแน่ชัด ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต (47)

2.5 Trypanosomiasis

โรคทริพาโนโซม เป็นโรคที่เกิดจากโปรโตซัวในสกุล *Trypanosoma* โดยแบ่งย่อยออกเป็น 2 โรค ตามสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุและแหล่งที่พบของโรค คือ โรคแอฟริกันทริพาโนโซม ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Trypanosoma gambiense* และ โรคอเมริกันทริพาโนโซม ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Trypanosoma cruzi*

2.5.1 วงชีวิตของเชื้อ *Trypanosoma gambiense*

เมื่อแมลง tsetse fly ที่มีเชื้อกัดคน ทำให้ metacyclic trypomastigotes เข้าสู่กระแสเลือด เชื้อปรสิตจะเข้าสู่ระบบน้ำเหลือง และจะมีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวน ระยะ trypomastigotes จะออกมาในกระแสเลือด เมื่อแมลง tsetse fly กัดคน trypomastigotes จะเข้าไปเพิ่มจำนวนใน mid-gut และ hind-gut ในลำไส้ของแมลง แล้วเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น procyclic trypomastigotes แล้วเคลื่อนที่เข้าสู่ต่อมน้ำลาย ปรสิตจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น epimastigote หลังจากนั้น epimastigote จะเปลี่ยนไปเป็น metacyclic trypomastigotes และพร้อมที่จะเข้าสู่กระแสเลือดคนต่อไป (53)



รูปที่ 3 วงชีวิตของเชื้อทริพาโนโซมา

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

2.5.2 วงชีวิตของเชื้อ *Trypanosoma cruzi*

เมื่อมวนเพชฌฆาต (Kissing bug) ตูดเลือดคนแล้วปล่อยอุจจาระที่มี trypomastigotes form ของปรสิต ไร่ข้าง ๆ บาดแผล trypomastigotes จะเข้าสู่บาดแผล ไปสู่ กล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อเรียบของลำไส้ แล้วเปลี่ยนรูปเป็น amastigotes form ซึ่ง จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนใน host cell เมื่อแบ่งได้ปริมาณมาก amastigotes จะแตกออกจาก กัน แล้วเปลี่ยนรูปร่างเป็น promastigote , epimastigote form และ trypomastigotes form ตามลำดับ จากนั้น trypomastigotes จะออกจาก host cell เข้าสู่ peripheral blood ต่อมาเมื่อมวนเพชฌฆาต ตูดเลือดคนเข้าไป trypomastigotes form จะเปลี่ยนรูป เป็น amastigotes form ในหลอดอาหารของแมลง amastigotes จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน แล้วเคลื่อนที่ไปที่ลำไส้ใหญ่ส่วน rectum จากนั้นเปลี่ยนรูปเป็น metacyclic trypomastigotes ซึ่งเป็นระยะติดต่อเข้าสู่คน โดยจะเข้าสู่คนได้ทั้งบริเวณที่ถูกแมลงกัดกัด บาดแผลอื่น ๆ และสามารถไชผ่านเยื่อเมือกได้ (53)

2.5.3 อาการและการแสดงออกของโรค

โรคแอฟริกันทริพาโนโซม (African trypanosomiasis) หรือเรียกอีกชื่อว่า โรค African sleeping sickness เป็นโรคที่พบบริเวณเขตร้อนของแอฟริกา เกิดจากเชื้อ *Trypanosoma gambiense* หรือ *Trypanosoma rhodesiense* ซึ่งมีแมลง tsetse fly เป็นพาหะนำโรค อาการของโรคจะเริ่มจาก ต่อม้ำเหลืองโต มีไข้สูง เมื่อเชื้อเข้าสู่ประสาทส่วนกลางจะมีอาการเซื่องซึม มือสั่น อาการคล้ายคนนอนหลับ เป็นมากอาจทำให้ถึงตายได้ (53)

โรคอเมริกันทริพาโนโซม (American trypanosomiasis) หรือเรียกอีกชื่อว่า Chagas' disease เป็นโรคที่พบในอเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ เกิดจากเชื้อ *Trypanosoma cruzi* ซึ่งมีมวนเพชฌฆาต (Kissing bug) เป็นพาหะนำโรค อาการของโรค ผู้ป่วยจะมีไข้สูง ต่อม้ำเหลือง โต และม้าม โต หัวใจเต้นผิดปกติ และอาจทำให้ตายได้ (53)

2.5.4 โรคทริพาโนโซมในประเทศไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ไม่ได้อยู่ในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรคทริพาโนโซมในมนุษย์ แต่มีรายงานการเกิดทริพาโนโซมในสัตว์มาเป็นเวลานาน ซึ่งเป็นปัญหาต่อปศุสัตว์ และเศรษฐกิจของประเทศ จากงานวิจัยของ Desquesnes M. Et al. ในปี 2013 มีการพบเชื้อ *Trypanosoma evansi* ที่ส่งผลกระทบต่อปศุสัตว์ และสัตว์เลี้ยงของประเทศไทย เช่น ม้า วัว ควาย และสุนัข โดยพบว่าสัตว์เหล่านี้จะมีไข้ เกิดภาวะซีด มีน้ำหนักลด ผอมแห้ง เบื่ออาหาร และอาจทำให้ตายได้ (30)

ประเทศไทยพบโรคทริพาโนโซมในมนุษย์เป็นครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2549 ในผู้ป่วยเด็กที่อาศัยอยู่ในจังหวัดลำปาง พบว่ามีการติดเชื้อ *Trypanosoma lewisi* และอีกครั้งในปี พ.ศ. 2550 พบเชื้อ *T. lewisi-like* ในเด็กแรกเกิดที่อาศัยอยู่ในจังหวัดลำปางเช่นเดียวกัน โดยอาการที่ตรวจพบ จะมีไข้สูง ไอ มีภาวะซีด (anemia) และมีน้ำหนักต่ำกว่าเกณฑ์ (32-34)

2.6 ไร้นฝอยทรายที่พบในประเทศไทย (Sand fly in Thailand)

ไร้นฝอยทรายที่พบในประเทศไทย มีการรายงานแล้วทั้งหมด 27 ชนิด คือ *Phlebotomus stantoni*, *Ph. (Euphlebotomus) mascomai*, *Ph. major major*, *Ph. argentipes*, *Ph. teshi*, *Ph. hoepplii*, *Ph. asperulus*, *Ph. philippinensis gouldi*, *Ph. barquesae*, *Sergentomyia punjabensis*, *Se. (Neophlebotomus) iyengari*, *Se. (Parrotomyia) barraudi*, *Se. indica*, *Se. (Neophlebotomus) gemmea*, *Se. perturbans*, *Se. hibernus*, *Se. sylvatica*, *Se. dentata*, *Se. bailyi*, *Se. anodontis*, *Se. mahadevani*, *Se. quatei*, *Se. hodgsoni*,

Se. (Neophlebotomus) khawi, *Nemopalpus vietnamensis*, *Idiophlebotomus longiforceps* และ *Chinius barbazani* (1, 41, 52, 54)

ตารางที่ 2 ชนิดของริ้นฝอยทรายที่พบในแต่ละจังหวัดของประเทศไทย

จังหวัด	ชนิดของริ้นฝอยทรายที่พบ
เชียงใหม่	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Ph. stantoni</i> , <i>Se. indica</i> , <i>Se. anodontis</i> , <i>Se. iyengari</i> , <i>Se. silvatica</i> , <i>Se. barraudi</i> , <i>Se. bailyi</i>
ตาก	<i>Se. barraudi</i>
นครศรีธรรมราช	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Se. gemmea</i> , <i>Se. barraudi</i> , <i>Se. iyengari</i> , <i>Se. perturbans</i>
หนองคาย	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Ph. stantoni</i> , <i>Ph. teshi</i> , <i>Ph. hoeplii</i> , <i>Se. iyengari</i> , <i>Se. anodontis</i> , <i>Se. barraudi</i> , <i>Se. silvatica</i> , <i>N. vietnamensis</i>
นครราชสีมา	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Ph. philippinensis gouldi</i> , <i>Se. silvatica</i> , <i>Se. mahadevani</i> , <i>Se. barraudi</i>
นครนายก	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Ph. stantoni</i> , <i>Se. barraudi</i> , <i>Se. gemmea</i> , <i>Se. indica</i> , <i>Se. iyengari</i> , <i>Se. perturbans</i>
นนทบุรี	<i>Se. gemmea</i> , <i>Se. indica</i>
น่าน	<i>Ph. stantoni</i> , <i>Se. gemmea</i> , <i>Se. barraudi</i>
บุรีรัมย์	<i>Ph. stantoni</i> , <i>Se. bailyi</i> , <i>Se. barraudi</i> , <i>Se. gemmea</i> , <i>Se. indica</i>
ปทุมธานี	<i>Se. barraudi</i>
ปราจีนบุรี	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Se. anodontis</i>
แพร่	<i>Se. barraudi</i> , <i>Se. gemmea</i> , <i>Se. indica</i> , <i>Se. iyengari</i> , <i>Se. perturbans</i>
พิษณุโลก	<i>Se. bailyi</i>
เพชรบุรี	<i>Se. bailyi</i>
พังงา	<i>Ph. stantoni</i> , <i>Se. gemmea</i> , <i>Se. barraudi</i> , <i>Se. indica</i>
พระนครศรีอยุธยา	<i>Ph. stantoni</i> , <i>Se. barraudi</i> , <i>Se. bailyi</i> , <i>Se. barraudi</i>
ราชบุรี	<i>Ph. mascomai</i> , <i>Ph. barguesae</i> , <i>Chinius barbazani</i>
ลพบุรี	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Se. bailyi</i> , <i>Se. barraudi</i> , <i>Se. dentata</i> , <i>Se. sylvatica</i>
เลย	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Ph. stantoni</i> , <i>Ph. teshi</i> , <i>Ph. hoeplii</i> , <i>Se. indica</i> , <i>Se. anodontis</i>
ลำปาง	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Ph. stantoni</i> , <i>Ph. hoeplii</i> , <i>Se. barraudi</i> , <i>Se. anodontis</i>
ลำพูน	<i>Se. barraudi</i>
สระบุรี	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Ph. philippinensis gouldi</i> , <i>Ph. hoeplii</i> , <i>Ph. stantoni</i> ,

	<i>Ph. major major, Ph. teshi, Se. barraudi, Se. anodontis, Se. bailyi, Se. dentata, Se. iyengari, Se. silvatica, Se. gemmea, Se. indica, Se. perturbans</i>
สุพรรณบุรี	<i>Se. gemmea, Se. indica</i>
สุราษฎร์ธานี	<i>Ph. stantoni, Se. perturbans</i>
สตูล	<i>Ph. argentipes, Se. barraudi, Se. iyengari, Se. gemmea, Se. indica</i>
อุดรธานี	<i>Se. barraudi, Se. iyengari</i>
อุบลราชธานี	<i>Se. barraudi, Se. gemmea, Se. indica, Se. iyengari, Se. punjabensis, N. vietnamensis</i>
กาญจนบุรี	<i>Phlebotomus argentipes, Ph. stantoni, Ph. teshi, Ph. hoeplii, Ph. asperulus, Sergentomyia anodontis, Se. bailyi, Se. barraudi, Se. hodgsoni, Se. iyengari, Se. quatei, Se. silvatica</i>
กำแพงเพชร	<i>Ph. stantoni, Se. bailyi, Se. barraudi</i>
กรุงเทพมหานคร	<i>Ph. stantoni, Se. barraudi, Se. indica, Se. bailyi</i>
ขอนแก่น	<i>Se. iyengari, Nemopalpus vietnamensis</i>
จันทบุรี	<i>Ph. philippinensis gouldi, Se. barraudi, Se. iyengari</i>
เชียงราย	<i>Ph. argentipes, Se. barraudi, Se. indica, Se. iyengari</i>
สงขลา	<i>Ph. stantoni, Se. barraudi, Se. indica, Se. iyengari, Se. hibernus</i>

2.7 Trypanosomatid parasites ในรึนฝอยทราย

นอกจากรึนฝอยทรายจะเป็นพาหะของเชื้อลิซมาเนียแล้ว ในงานวิจัยต่างๆยังตรวจพบโปรโตซัวในวงศ์ Trypanosomatid ชนิดอื่นๆอีกด้วย เช่น การตรวจพบ *Trypanosoma* sp. ในรึนฝอยทรายชนิด *Sergentomyia africana africana* ในประเทศกาน่า (20) และตรวจพบ *Trypanosoma* sp. ในรึนฝอยทรายชนิด *Phlebotomus kazeruni* ที่เก็บจากประเทศปากีสถาน (22) นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบ *Blastocrithidia* sp. ในรึนฝอยทรายชนิด *Nyssomyia whitmani* (19) การตรวจพบ *Endotrypanum* sp. ในรึนฝอยทรายชนิด *Lutzomyia longipalpis* (47) การตรวจพบ *Herpetomonas* sp. ในรึนฝอยทรายชนิด *Pintomyia fischeri* (19) และ การตรวจพบ *Leptoona* sp. ในรึนฝอยทรายชนิด *Lutzomyia* spp. (25)

2.7.1 การตรวจ *Trypanosomatid* parasites ในรีนฝอยทราย

ในปัจจุบันวิธีที่ใช้ตรวจหาเชื้อโปรโตซัวในวงศ์ Trypanosomatidae โดยเฉพาะโปรโตซัวในสกุล *Leishmania* และ *Trypanosoma* มีด้วยกันหลายวิธี ไม่ว่าจะเป็นการทดสอบทางภูมิคุ้มกัน (agglutination test, indirect fluorescent antibody, ELISA, immunochromatic strip test) หรือการตรวจโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (PCR) ซึ่งเทคนิคทางอณูชีววิทยา เป็นวิธีที่ได้รับความนิยม เพราะมีความไวและความจำเพาะสูง

ในการจำแนกชนิดของโปรโตซัวในสกุล *Leishmania* ด้วยวิธี PCR ได้มีการศึกษาในหลายยีน ยกตัวอย่างอื่นที่มีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนีย เช่น Kinetoplast DNA (*kDNA*), the small subunit ribosomal RNA (*SSU rRNA*) และ internal transcribed spacer (*ITS*)(1, 38) โดย *ITS1* เป็นยีนที่นิยมใช้ในการตรวจลิชมาเนีย เพราะยีนบริเวณนี้มีความจำเพาะสูง และมีหลากหลายพอสมควรในการแยกแยะเชื้อโปรโตซัวในกลุ่มลิชมาเนีย (38) นอกจากนี้ยังมีลำดับเบสของยีน *ITS1* ในฐานข้อมูลของ NCBI อยู่เป็นจำนวนมาก และในงานวิจัยของ Spanakos et al. ในปี 2007 ได้ทำการออกแบบ primers ที่ใช้สำหรับขยายส่วนของยีน *ITS1* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจำแนกลิชมาเนียได้ และ primer นี้ นอกจากจะใช้แยกโปรโตซัวในกลุ่ม *Leishmania* ได้แล้ว primer นี้ ยังจำแนก Trypanosomatidae อื่นๆ ได้ด้วย ยกเว้นกลุ่ม *Endotrypanum* (1, 6) โดยเชื้อลิชมาเนียที่พบในประเทศไทยจะมี PCR product ขนาดประมาณ 371-379 bp (35)

LeF5'-TCC GCC CGA AAG TTC ACC GAT A-3'

LeR5'-CCA AGT CAT CCA TCG CGA CAC G-3'

นอกจาก primer ที่ใช้ตรวจ *Leishmania* จะสามารถตรวจ *Trypanosoma* ได้ ในงานวิจัยของ Noyes ในปี 1999 ยังมีการออกแบบ primer สำหรับการตรวจโปรโตซัวในกลุ่ม trypanosomes โดยเฉพาะ โดยการขยายส่วนของยีน *SSU rRNA* เพื่อเพิ่มความจำเพาะยิ่งขึ้น PCR product ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 927 bp (35, 53, 55-57)

TRY927F 5'-GAA ACA AGA AAC ACG GGA G-3'

TRY927R 5'-CTA CTG GGC AGC TTG GA-3'

2.8 การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยา

โดยทั่วไปนักวิทยาศาสตร์จะจำแนกริ้นฝอยทรายโดยใช้อวัยวะที่สำคัญ เช่น ส่วนหัว ปาก หนวด การเรียงตัวของฟัน ออก ปีก ระยะเวลาของอวัยวะเพศผู้ ลักษณะของ clasper ในเพศผู้ และลักษณะของถุงเก็บน้ำเชื้อในเพศเมีย ซึ่งริ้นฝอยทรายแต่ละชนิดนั้นจะมีลักษณะเหล่านี้ที่แตกต่างกันออกไป วิธีการจำแนกทางสัณฐานวิทยานี้จึงต้องอาศัยความชำนาญจึงจะจำแนกได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

2.8.1 ลักษณะสำคัญที่ใช้แยกริ้นฝอยทรายในแต่ละสกุลที่มีความสำคัญทางการแพทย์

Phlebotomus ลักษณะของริ้นฝอยทรายในสกุลนี้ ในเพศเมียจะไม่มี cibarium teeth หรือถ้ามีก็มักจะมีอยู่ในรูปของ spicules ที่มีการเรียงตัวแบบไม่แน่นอน ไม่มี pigment patch และในส่วนของท้องปล้องที่ 2-6 จะมีขนตั้งตรงอยู่เป็นจำนวนมาก โดยลักษณะของ female style จะมี spine จำนวน 3-5 spines (58)

Sergentomyia ลักษณะของริ้นฝอยทรายในสกุลนี้ เพศเมียจะมี cibarium teeth เรียงตัวเป็นแถวในแนวขวางอยู่ทางด้าน posterior แต่ในบางครั้งอาจจะมีฟันหน้าโผล่ขึ้นมา และจะขึ้นมาในลักษณะซี่ขึ้น ริ้นฝอยทรายในสกุลนี้จะมี pigment patch และในส่วนของท้องปล้องที่ 2-6 จะมีขน ลักษณะของขนจะขึ้นแบบนอนราบ ลักษณะของ female style จะมี spine หลัก 4 spines และมี accessory seta (58, 59)

Lutzomyia ลักษณะของริ้นฝอยทรายในสกุลนี้ มี posterior teeth เรียงตัวเป็นแถวในแนวขวาง และในเพศเมีย cibarium มี anterior teeth ตั้งแต่ 1 แถว จนถึงหลายแถว (58)

2.9 การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา

เนื่องจากการจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยานั้น จำเป็นจะต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการจำแนก เพราะริ้นฝอยทรายเป็นแมลงที่มีขนาดเล็ก และบางชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย จึงจำแนกความแตกต่างได้ยาก และอาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดได้ นักวิทยาศาสตร์จึงได้นำวิธีการทางอณูชีววิทยามาใช้ในการจำแนกชนิดของริ้นฝอยทราย ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) วิธีนี้นอกจากจะสามารถใช้เพื่อศึกษาการจัดเรียงของดีเอ็นเอแล้ว ยังสามารถใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม และศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ โดยบริเวณของยีนที่ถูกใช้ในการระบุสายพันธุ์ มีทั้ง

บริเวณยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในนิวเคลียส เช่น ยีน *ITS1* และ *ITS2* เป็นต้น และยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย เช่น ยีน *Cytochrome b*, *COI*, *COII*, *COIII* และ *NADH1* เป็นต้น และส่วนใหญ่ในงานวิจัยต่างๆพบว่า มากกว่าร้อยละ 50 ของยีนที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของรีนฝอยทราย คือยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (36) เพราะยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียสามารถพบได้ในเซลล์ที่มีชีวิตทุกเซลล์ของร่างกาย และมีจำนวน *copies* ต่อเซลล์อยู่ในหลักพัน ในขณะที่ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีเพียง 2 *copies* ต่อหนึ่ง somatic cell จึงทำให้การศึกษารีนฝอยทรายโดยใช้ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียเป็นที่นิยมมากกว่า จากการศึกษาวิจัยต่างๆจำนวน 137 รายการ พบว่า มีการใช้ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียกว่าร้อยละ 54 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยีน *Cytochrome b* เป็นยีนที่นิยมมากที่สุดในการใช้จำแนกชนิดของรีนฝอยทราย คิดเป็นร้อยละ 36.5 รองลงมาคือยีน *ITS2* คิดเป็นร้อยละ 14.6 ยีน *COI* ร้อยละ 11.67 และยีนอื่นๆอีก น้อยกว่า ร้อยละ 6.5 (38) ส่วนในประเทศไทยงานวิจัยต่างๆที่ได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของรีนฝอยทราย นิยมใช้ยีน *Cytochrome b* (35, 60-62) , *ITS2* (60, 61) และ *COI* (62) เช่นเดียวกัน

ในงานวิจัยนี้จึงใช้ยีนที่อยู่บนไมโทคอนเดรียในการจำแนกชนิดของรีนฝอยทราย โดยการขยายส่วนของ ยีน *Cytochrome b* โดยใช้ primer N1N-PDR และ C3B-PDR PCR product ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 500 bp (35)

N1N-PDR: 5' - CAY-ATT-CAACCW- GAA-TGA-TA -3'

C3B-PDR: 5' - GGT-AYW-TTG-CCTCGA- WTT-CGW-TAT-GA -3'

และทำการขยายส่วนของยีน *COI* โดยใช้ primer LepF และ LepR PCR product ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 700 bp (63, 64)

LepF 5' - ATT-CAA-CCA-ATC-ATA-AAG-ATA-TT - 3'

LepR 5' - AAA-CTT-CTG-GAT-GTC-CAA-AAAA - 3'

บทที่ 3

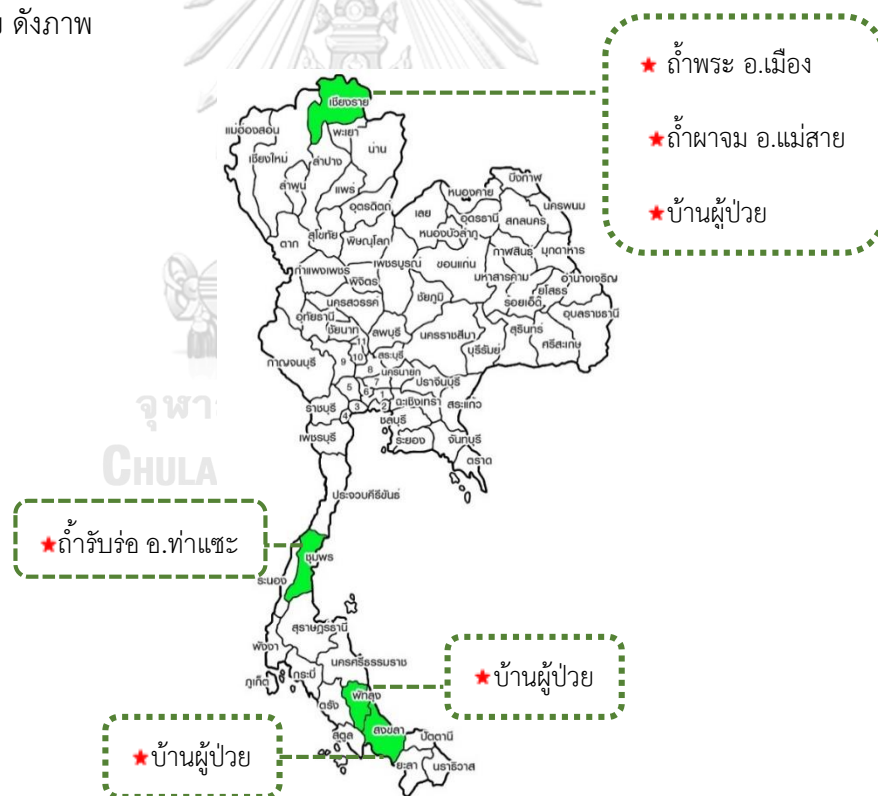
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study) โดยงานวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ใบรับรอง 019/2561

3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย

ทำการสำรวจจิ้งจอกที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคพิษสุนัขบ้า ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีรายงานว่าพบผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าอยู่ ประกอบด้วยจังหวัดทางภาคเหนือ 1 จังหวัด คือ จังหวัดเชียงราย และจังหวัดทางภาคใต้ 2 คือ จังหวัดสงขลา และ จังหวัดพัทลุง และทำการสำรวจจิ้งจอกที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคพิษสุนัขบ้าในพื้นที่ที่ไม่ได้เป็นพื้นที่เสี่ยงของโรคพิษสุนัขบ้าด้วย ดังภาพ



รูปที่ 4 พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างจิ้งจอก

3.2.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง(Sample size)

จำนวนตัวอย่างที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาความผันแปรของยีน Cytochrome b ใน ริ้นฝอยทรายในครั้งนี้ ได้อาศัยข้อมูลจากการศึกษาประชากรของริ้นฝอยทราย ที่ตรวจพบโปรโตซัวในวงศ์ Trypanosomatidae จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (35) ซึ่งเท่ากับ 2.22% ขนาดของประชากรตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในครั้งนี้ คำนวณได้จากสูตร

$$n = \frac{Z^2 \alpha_{/2} P(1-P)}{e^2}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 \times (0.0222) \times (0.9778)}{(0.03)^2}$$

$$n = 92.65$$

โดยจะต้องทำการเก็บตัวอย่างริ้นฝอยทรายอย่างน้อยจังหวัดละ 93 ตัวอย่าง

n = ขนาดตัวอย่าง

α = ค่าความผิดพลาดในการสรุปผลอ้างอิงจากตัวอย่างสู่ประชากร

Z = confidence coefficient ได้จากระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด ($1-\alpha$)

กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% หรือ $\alpha = 0.05$ ($Z_{\alpha/2} = 1.96$)

P = ค่าสัดส่วนจากการศึกษาที่ผ่านมา

e = ค่าความคลาดเคลื่อนสูงสุดที่ยอมรับได้ระหว่างสัดส่วนในประชากร

กำหนดให้ e = 0.1 (ยอมรับให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ 10 %)

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) รุ่น Veriti บริษัท GenPlus® ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.2 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) รุ่น Master Cycler PROS บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี

3.3.3 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 °C รุ่น LG บริษัท LG® ประเทศไทย

3.3.4 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20 °C รุ่น Whirlpool บริษัท Sanyo® ประเทศไทย

3.3.5 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -80 °C รุ่น Forma 900 series บริษัท Thermo scientific®ประเทศไทย

สหรัฐอเมริกา

- 3.3.6 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ Incubator shaker รุ่น Innova®43 บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
- 3.3.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5430 R บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
- 3.3.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5417 R บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
- 3.3.9 เครื่องไมโครเวฟ, รุ่น LG บริษัท LG ประเทศจีน
- 3.3.10 เครื่องเขย่าผสมสาร Vortex รุ่น FINEVORTEX (FinePCR) ประเทศเกาหลี
- 3.3.11 เครื่อง Dry bath Incubator บริษัท Cleaver Scientific® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.12 เครื่อง gel electrophoresis รุ่น Biorad sub-cell® RT บริษัท Bio-Rad® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.13 เครื่องถ่ายภาพ gel documentation รุ่น Gel Doc™ XR บริษัท Bio-Rad® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.14 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม spectrophotometer รุ่น Nanodrop 2000c บริษัท Thermo scientific® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.15 เครื่องซั่งน้ำหนักตศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น Sartorius ประเทศเยอรมนี
- 3.3.16 เครื่อง Autoclave (ตั้งฆ่าเชื้อ) รุ่น HIRAYAMA HA-3D ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.17 เครื่อง Autoclave (ตั้งฆ่าเชื้อ) รุ่น HVE-50 ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.18 กล้องจุลทรรศน์ ชนิด Stereo microscope
- 3.3.19 กล้องจุลทรรศน์ ชนิด Light microscope
- 3.3.20 ตู้สำหรับเตรียมสาร PCR (PCR cabinet) รุ่น PCR-01 ประเทศไทย
- 3.3.21 ไมโครปิเปตขนาด 0.1-10, 2-20, 20-200 และ 100-1000 μ l บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
- 3.3.22 เครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับวิเคราะห์ผล

3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.4.1 หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml บริษัท ExtraGene,Inc®
- 3.4.2 หลอด PCR ขนาด 0.2 ml บริษัท ExtraGene,Inc®
- 3.4.3 ปิเปตทิป ขนาด 0.1-10, 200 และ 1000 μ l

- 3.4.4 หลอด centrifuge ขนาด 15 และ 50 ml
- 3.4.5 ปากคีบ (forceps)
- 3.4.6 ถังมือยาง
- 3.4.7 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 3.4.8 Loop เขี่ยเชื้อและ spreader
- 3.4.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.4.10 ขวดแก้วสำหรับเตรียมสารเคมี ขนาด 100, 500 และ 1000 ml
- 3.4.11 ก่อ้งโฟมสำหรับใส่น้ำแข็ง
- 3.4.12 นาฬิกาจับเวลา
- 3.4.13 กระดาษทิชชูสำหรับทำความสะอาด
- 3.4.14 หยดหยด (dropper)
- 3.4.15 พาราฟิล์ม (parafilm)
- 3.4.16 แท่งบดตัวอย่าง

3.5 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.5.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อสำเร็จรูป (Invisorb® Spin Tissue Mini Kit บริษัท STRASTEC Molecular GmbH ประเทศเยอรมนี)
- 3.5.2 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Invisorb® Spin Plasmid Mini Two บริษัท STRASTEC Molecular GmbH ประเทศเยอรมนี)
- 3.5.3 ชุดโคลนสำหรับ PCR product บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.5.4 ชุดสารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR บริษัท Bioron ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.5.5 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-bertani (LB medium)
- 3.5.6 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร SOB และ SOC medium
- 3.5.7 สารเคมีสำหรับเตรียม competent cell (E. coli สายพันธุ์ DH5 α)
- 3.5.8 สารเคมีสำหรับเตรียม gel electrophoresis
- 3.5.9 Ethanol ความเข้มข้น 70% และ 95%

หมายเหตุ: รายละเอียดและวิธีการเตรียมสารเคมีแสดงในภาคผนวก

3.6 โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล

3.6.1 โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.0.5.3

เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และอ่านกราฟ chromatogram จากผล sequencing และสามารถวิเคราะห์ความเหมือนและความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยแสดงค่าออกเป็นค่า sequence identity matrix

3.6.2 โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version X (MEGA X)

เป็นโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

3.6.3 โปรแกรม nucleotide blast (BLASTN)

เป็นโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งจะเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล genbank

3.6.4 โปรแกรม Bankit

เป็นโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้สำหรับส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อขอเลขทะเบียน (accession number) เพื่อเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

3.7 วิธีดำเนินการวิจัย

3.7.1 การเก็บตัวอย่างริ้นฝอยทราย (Collection of sand flies)

- ทำการเก็บตัวอย่างริ้นฝอยทราย โดยใช้กับดักแสงไฟ(CDC light traps) โดยตั้งกับดักไว้เหนือพื้นดิน 1-1.5 เมตร ตั้งแต่เวลา 18.00 น. และทำการเก็บกับดักเวลา 06.00 น. รวมทั้งสิ้นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำกับดักที่มีแมลงอยู่ภายในไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อให้แมลงที่อยู่ภายในกับดักสลบ หลังจากนั้นทำการแยกริ้นฝอยทรายออกจากแมลงชนิดอื่นๆและทำการแยกเพศของริ้นฝอยทรายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo Microscope)
- เก็บริ้นฝอยทรายหลอดละ 1 ตัว ไว้ใน Lysis buffer G ปริมาตร 200 μ l

3.7.2 การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological identification of sand fly species)

วางริ้นฝอยทรายลงบนสไลด์ที่มี normal saline และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำการตัดส่วนหัว และสามปล้องสุดท้ายของส่วนท้องของริ้นฝอยทราย ซึ่งเป็นส่วนที่มี spermatheca อยู่ อวัยวะที่ถูกตัดออกจะถูกวางลงบนสไลด์ที่มีน้ำยา Hoyer แล้วปิดด้วย

กระจกปิดสไลด์ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบชนิดของรีนฝอยทรายโดยใช้คีย์ในการจำแนก (1, 13, 35)

3.7.3 การสกัดดีเอ็นเอ(DNA extraction)

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปจาก Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Invitek GmbH, ประเทศเยอรมนี)

1. เติม Lysis buffer G อีก 200 μL และ proteinase K ปริมาตร 20 μL จากนั้นใช้ไม้บดตัวอย่างจนละเอียด นำไปผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าบนเครื่อง Vortex จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 52°C ประมาณ 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มแล้ว ให้นำตัวอย่างมาปั่นตกตะกอน ประมาณ 2 นาที ด้วยความเร็ว 11,000 rpm

2. ย้ายส่วนใส (supernatant) ใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่ จากนั้นใส่สารละลาย Binding buffer A ปริมาตร 200 μL (ผสมให้เข้ากันเบาๆ)

3. ย้ายใส่ในหลอดที่มีชุดตัวกรอง (spin filter) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที จากนั้นปั่นตกด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสที่ปั่นตกทิ้ง

4. ใส่สารละลาย Wash buffer ปริมาตร 550 μL แล้วปั่นล้างด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสที่ปั่นตกทิ้ง (ทำซ้ำในขั้นตอนการปั่นล้างด้วยสารละลาย Wash buffer อีก 1 ครั้ง)

5. ปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อเอา Ethanol ออก

6. ย้ายชุดตัวกรองไปใส่ในหลอด microcentrifuge จากนั้นใส่ elution buffer ปริมาตร 40 μL (ทำการ prewarm elution buffer ที่อุณหภูมิ 52°C ก่อนนำมาใช้) บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm นำชุดตัวกรองทิ้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำดีเอ็นเอไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.7.4 การตรวจสอบคุณภาพความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยนำสารละลายดีเอ็นเอของรีนฝอยทรายที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้

3.7.5 การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา

การระบุชนิดของริ้นฝอยทรายด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอใน ส่วนของบริเวณยีนที่เราสนใจให้มีจำนวนมากพอที่จะไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการศึกษา ครั้งนี้ จะทำการเพิ่มจำนวนของ *CytB* gene และ *COI* gene

Amplification of *CytB* gene โดยใช้ Primer N1 N-PDR: 5' - CAY-ATT-CAACCW- GAA-TGA-TA -3' และ C3B-PDR: 5' - GGT-AYW-TTG-CCTCGA- WTT-CGW-TAT-GA -3' (1, 35, 62, 65) และใช้สารละลายสัสดส่วนที่พอเหมาะ (ตารางที่ 3) และ ปฏิกริยาของวิธี PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 4) โดยเริ่มจากขั้นตอน initial denaturation เพื่อเป็นการแยกสายดีเอ็นเอเส้นคู่ออกจากกัน จากนั้นเป็นขั้นตอน denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว ต่อด้วยขั้นตอน annealing ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงทำให้ primer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน จากนั้นขั้นตอน extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของ primer ที่เป็นต้นแบบ แต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) และ สุดท้ายคือขั้นตอน final extension เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วนำไปตรวจสอบดู PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis โดย PCR product ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 500 bp

Amplification of *COI* gene โดยใช้ primer LepF 5' - ATT-CAA-CCA-ATC-ATA-AAG-ATA-TT - 3' และ LepR 5' - AAA-CTT-CTG-GAT-GTC-CAA-AAAA - 3' และ ใช้สารละลายสัสดส่วนที่พอเหมาะ (ตารางที่ 5) และปฏิกริยาของวิธี PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 6) ซึ่งทั้ง Primer และ ปฏิกริยา PCR ที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้รับการดัดแปลงจากงานวิจัยของ Bounamous ปี 2009 โดย PCR product ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 700 bp (63, 66)

โดยเริ่มจากขั้นตอน initial denaturation เพื่อเป็นการแยกสายดีเอ็นเอเส้นคู่ออกจากกัน จากนั้นเป็นขั้นตอน denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว ต่อด้วยขั้นตอน annealing ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงทำให้ primer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน จากนั้นขั้นตอน extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย

5' ของ primer ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) และสุดท้ายคือขั้นตอน final extension เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วนำไปตรวจสอบดู PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน Cytochrome b

สารส่วนประกอบ	ปริมาตรสาร(μl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	2.5
2.5 mM dNTPs	2
Primer N1N-PDR	1
Primer C3B-PDR	1
<i>Taq</i> polymerase	0.2
DNA template	5
ddH ₂ O	10.8
รวม	25

ตารางที่ 4 ขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน Cytochrome b

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา	จำนวนรอบ(cycle)
1. Initial denaturation	95	3 min	1
2. PCR step			5
- Denaturation	95	30 sec	
- Annealing	40	40 sec	
- Extension	72	1 min	
- Denaturation	95	30 sec	35
- Annealing	44	30 sec	
- Extension	72	1 min	
3. Final extension	72	7 min	1

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน COI

สารส่วนประกอบ	ปริมาตรสาร(µl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	2.5
2.5 mM dNTPs	2
Primer LepF	1
Primer LepR	1
Taq polymerase	0.2
DNA template	5
ddH ₂ O	10.8
รวม	25

ตารางที่ 6 ขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *COI*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา	จำนวนรอบ(cycle)
1. Initial denaturation	94	3 min	1
2. PCR step			5
- Denaturation	94	30 sec	
- Annealing	45	1.30 min	
- Extension	72	1 min	
- Denaturation	94	30 sec	35
- Annealing	51	1.30 min	
- Extension	72	1 min	
3. Final extension	68	10 min	1

3.7.6 การจำแนก *Trypanosomatidea* parasites ด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยา

การจำแนกชนิดของโปรโตซัวในวงศ์ *Trypanosomatidea* ด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยา โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนยีนที่เราสนใจให้มีจำนวนมากพอที่จะไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ ในการตรวจหาโปรโตซัวในสกุล *Trypanosoma* จะใช้การเพิ่มจำนวนของ *SSU rRNA* gene โดยใช้ TRY927F และ TRY927R เป็น primer โดย primer ตัวนี้นอกจากใช้ตรวจโปรโตซัวในสกุล *Trypanosoma* แล้ว ยังสามารถตรวจหาโปรโตซัวในวงศ์ *Trypanosomatidea* ได้ด้วย ส่วนการเพิ่มจำนวนของ *ITS1* จะใช้ในการตรวจ *Leishmania* spp. และ *Trypanosoma* DNA โดยใช้ LeF and LeR เป็น primer (1, 35, 38, 67)

Amplification of the *SSU rRNA* gene

โดยใช้ Primers TRY927F: 5'- GAA-ACA-AGA-AAC-ACG-GGA-G- 3' และ TRY927R: 5'- CTA-CTG-GGC-AGC-TTG-GA- 3' และใช้สารละลายส่วนที่พอเหมาะ (ตารางที่ 7) และปฏิกิริยาของวิธี PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 8) โดย PCR product ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 927 bp (35, 67)

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวน *SSU rRNA* gene

สารส่วนประกอบ	ปริมาตรสาร(μl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	1.25
2.5 mM dNTPs	2.5
Primer TRY927F	0.4
Primer TRY927R	0.4
<i>Taq</i> polymerase	0.2
DNA template	5
ddH ₂ O	12.75
รวม	25

ตารางที่ 8 ขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่ม จำนวน *SSU rRNA* gene

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา	จำนวนรอบ(cycle)
1. Initial denaturation	95	5 min	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	45 sec	10
- Annealing	53	1 min	
- Extension	72	1.30 min	
- Denaturation	95	45 sec	30
- Annealing	53	1 min	
- Extension	72	1.30 min	
3. Final extension	72	7 min	1

Amplification of the *ITS1* region

โดยใช้ Primers LeR: 5' - CCA-AGT-CAT-CCA-TCG-CGA-CAC-G- 3' และ LeF: 5'-TCC-GCC-CGA-AAG-TTC-ACC-GAT-A- 3' และใช้สารละลายส่วนที่พอเหมาะ (ตารางที่ 9) และปฏิกิริยาของวิธี PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 10) โดย PCR product ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 379 bp (1, 35, 40)

ตารางที่ 9 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวน *ITS1*

สารส่วนประกอบ	ปริมาตรสาร(µl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	1.25
2.5 mM dNTPs	2.5
Primer LeF	0.4
Primer LeR	0.4
<i>Taq</i> polymerase	0.2
DNA template	5
ddH ₂ O	12.75
รวม	25

ตารางที่ 10 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่ม จำนวน *ITS1*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา	จำนวนรอบ(cycle)
1. Initial denaturation	95	5 min	1
2. PCR step			} 40
- Denaturation	95	1 min	
- Annealing	50	1 min	
- extension	72	1 min	
3. Final extension	72	7 min	1

3.7.7 Agarose gel electrophoresis and DNA visualization

เตรียมแผ่นเจลสำหรับใช้ในการรันดีเอ็นเอโดยใช้วุ้น Agarose ความเข้มข้น 1.5 % จากนั้นนำ PCR product ที่ผสมกับ loading buffer หยอดลงในช่องวุ้นจนครบทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงใส่ negative control, positive control และ DNA marker ลงในช่องวุ้นที่เหลือตามลำดับ รันเจลด้วยไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 30-40 นาที หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปแช่ในสารละลาย ethidium bromid เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำประมาณ 20 นาที และนำเจลที่ได้เข้าเครื่องถ่ายภาพเจลด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (gel documentation)

3.7.8 Cloning of PCR products

- **Ligation of PCR products** เป็นการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ เมื่อเพิ่มจำนวนยีนที่เราสนใจด้วยวิธี PCR แล้ว นำยีนที่สนใจมาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ (vector) ชนิด plasmid เรียกว่าขั้นตอน DNA ligation โดยใช้ pGEM®-T Easy (Promega® ประเทศสหรัฐอเมริกา) เป็น vector ในขั้นตอนการทำ ligation ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 11 เมื่อผสมเรียบร้อยแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ประมาณ 12-16 ชั่วโมง

ตารางที่ 11 แสดงส่วนประกอบของสารในขั้นตอน DNA ligation

สาร	ปริมาตร (μ l)
2x Rapid ligation buffer	2.5
pGEM® T easy vector (50 ng/ μ l)	0.5
T4 ligase enzyme (5 U/ μ l)	0.5
PCR product (50 ng/ μ l)	1.5
รวม	5

-Transformation เป็นการนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell โดยวิธีกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) ในที่นี้ใช้เชื้อ *Escherichia coli DH5 α* เป็น competent cell โดยนำ competent cell ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งให้ละลายประมาณ 10 นาที เมื่อละลายแล้ว จากนั้นค่อยๆดูด competent cell ปริมาตร 30 μ l ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมอยู่ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเกาะที่ permeable site บริเวณผนังเซลล์ของ competent cell หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell โดยกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยการนำไปแช่น้ำแข็ง 2 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปเติม SOC medium ปริมาตร 960 μ l แล้วนำไปปั่นแบบเขย่าที่ความเร็ว 170 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายมา spread บนจานเพาะเชื้อ LB agar ที่มีส่วนผสมของ Ampicillin 100 μ g/ml , Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) 40 μ l และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) 40 μ l จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.7.9 ขั้นตอนการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนยีน โดยวิธี Colony PCR

พลาสมิดชนิด pGEM®-T Easy vector มียีนที่ต้านต่อยา Ampicillin ดังนั้นเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดนี้ จึงสามารถเจริญบนอาหารชนิดแข็ง (LB agar) ที่มียา Ampicillin ได้ ดังนั้นจึงสามารถคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมออกจากเซลล์

แบคทีเรียชนิดอื่นที่อาจปนเปื้อนได้ และจากคุณสมบัติของพลาสมิดที่ได้รับการออกแบบให้มีมียีน lacZ ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ β -galactosidase ที่ย่อยสาร X-gal แล้วทำให้โคโลนีแบคทีเรียมีสีฟ้า เมื่อส่วนของยีนที่เราศึกษาสามารถแทรกเข้าไปในส่วนของยีน lacZ บริเวณ clone insert ส่วนของยีน lacZ นั้นจึงแยกออกจากกัน ยีน lacZ จึงไม่สามารถทำงานได้ทำให้ไม่มีการสร้างเอนไซม์ β -galactosidase มาย่อย X-gal ได้ โคโลนีของแบคทีเรียที่ได้จะมีสีขาว ด้วยเทคนิคนี้จึงสามารถตรวจสอบแยกโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดที่มียีนที่เราสนใจออกจากเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มียีนได้

ทำการเลือกโคโลนีที่มีสีขาวในแต่ละตัวอย่าง โดยเลือกประมาณ 5-10 colony ต่อ 1 plate มาตรวจสอบด้วยวิธี Colony PCR โดยเตรียมส่วนประกอบในขั้นตอน PCR ซึ่งสารที่ใช้ในปฏิกิริยาและสภาวะ PCR ที่เหมาะสมใช้เหมือนในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนยีนที่กล่าวแล้วข้างต้น จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันจิ้ม colony ที่เลือกไว้ใส่ในหลอด PCR ที่มี master mix ของ PCR อยู่ ผสมให้เข้ากันแล้วขีดลงบน plate ต้นแบบ (master plate) จากนั้นเมื่อทำ PCR เสร็จแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1.5 % เพื่อดูว่ามีชิ้นส่วนของยีนที่เราสนใจหรือไม่ ส่วน master plate นั้นนำไปบ่มที่ 37 °C เพื่อรอนำ colony ที่ให้ผลโคลนที่เป็น Positive จากวิธี colony PCR ไปเตรียมเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

3.7.10 การสกัด Plasmids

ขั้นตอนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของบริษัท Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (Invitex GmbH, ประเทศเยอรมนี)

1. นำเชื้อแบคทีเรีย (E. coli strain DH5 α) ที่เลี้ยงไว้ในปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน ด้วยความเร็วรอบ 11,000 rpm เวลาประมาณ 3 นาที เทส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง
2. ใส่สาร Solution A ปริมาตร 250 μ l และนำไป Vortex เพื่อทำการละลายตะกอนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. ใส่สาร Solution B ปริมาตร 250 μ l ผสมขึ้นลงเบาๆ ประมาณ 4-6 ครั้ง
4. ใส่สาร Solution C ปริมาตร 250 μ l ผสมขึ้นลงเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. ย้ายส่วนใสใส่ลงในเซตตัวกรอง (Spin filter) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง

6. ทำการล้างตะกอนของ DNA Plasmid โดยใช้ Wash solution ปริมาตร 750 μl จากนั้นปั่นล้างตะกอนด้วยความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง
7. ปั่นแห้งด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเอา ethanol ออก
8. ย้ายตัวกรองใส่ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml จากนั้นใส่ elution solution ปริมาตร 50 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เมื่อครบเวลา ปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
9. เมื่อได้ DNA Plasmid แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) เหมือนขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ หลังจากนั้นแบ่งสารละลายที่มี DNA Plasmid ปริมาตร 30 μl เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

3.7.11 DNA sequencing

ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในงานวิจัยนี้ จะได้รับการวิเคราะห์จากบริษัท Macrogen Inc. (ประเทศเกาหลี) โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตัวอย่างละ 2 ชุด โดยตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเออย่างน้อยคือ 100-150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และมีปริมาตรอย่างน้อย 20 μl

3.7.12 Nucleotide sequences analysis

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ซึ่งจะแสดงค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (percentage identities) จากนั้นหาเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecific divergence) ในแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7 โดยเลือก sequence identity matrix จะได้ค่า % identity แล้วนำค่า % identity มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความต่าง} = 100 - \text{เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์}$$

3.7.13 การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree analysis)

การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version X (MEGA X) โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS1*, *SSU rRNA* และ *COI* โดยใช้ Maximum likelihood และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับ

นิวคลีโอไทด์แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และตรวจความน่าเชื่อถือทางสถิติโดยใช้ Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ

3.7.14 การขอขึ้นทะเบียนและการเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน *ITS1*, *SSU rRNA*, *CytB* ของเชื้อและรีนฝอยทรายที่ได้จะนำไปยื่นขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) โดยใช้โปรแกรมแบบออนไลน์ BankIt เพื่อเผยแพร่และเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะในประเทศไทยลงในฐานข้อมูล NCBI (GenBank)

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

- 3.8.1 วิเคราะห์ค่าความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม nucleotideblast, BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytb*, *COI*, *ITS1* และ *SSU rRNA* ของรีนฝอยทราย ลิขมาเนีย และทริฟพานโซม ตามลำดับ จากฐานข้อมูลของ NCBI
- 3.8.2 หาเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% identity) ภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecific divergence) ด้วยโปรแกรม Bioedit
- 3.8.3 วิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA X โดยใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytb*, *ITS1* และ *SSU rRNA* ของรีนฝอยทราย ลิขมาเนีย และทริฟพานโซม ตามลำดับ

3.9 สถานที่ทดลอง (Experimental place)

สถานที่ทดลองการวิจัยในครั้งนี้จัดทำขึ้น ณ ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เพื่อวิเคราะห์ความชุกของการติดเชื้อลิขมาเนีย และทริฟพานโซมในแต่ละพื้นที่ ว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้ Fisher's exact Test

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 จำนวนตัวอย่างและพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างรีนฝอยทราย

งานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างรีนฝอยทรายจากพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัด เชียงราย (ถ้ำผาจอม 13 ตัวอย่าง ถ้ำพระ 46 ตัวอย่าง บ้านผู้ปวย 2 ตัวอย่าง) จำนวน 61 ตัวอย่าง จังหวัดสงขลา (บ้านผู้ปวย) จำนวน 180 ตัวอย่าง จังหวัดพัทลุง (บ้านผู้ปวย) จำนวน 136 ตัวอย่าง และจังหวัดชุมพร (ถ้ำรับร่อ) จำนวน 123 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งหมด 500 ตัวอย่าง

ตารางที่ 12 ข้อมูลพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างรีนฝอยทราย

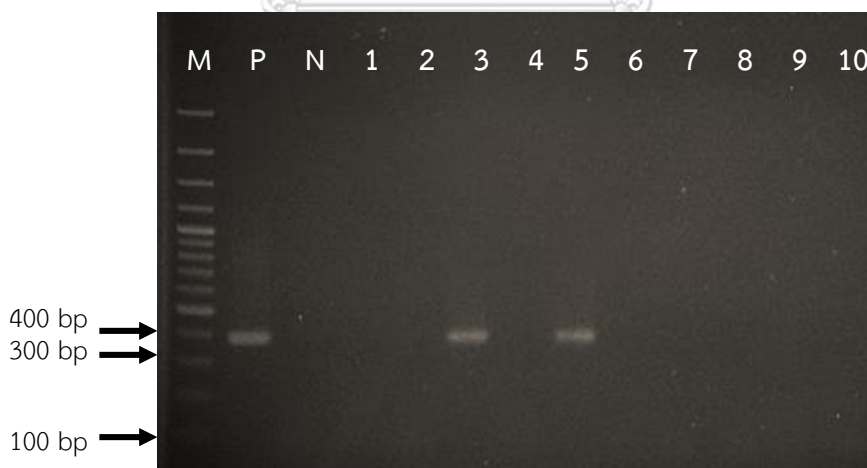
จังหวัด	สถานที่เก็บตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	จำนวน
เชียงราย	ถ้ำผาจอม (รหัส BC) ถ้ำพระ (รหัส CC) และ รหัส DC) บ้านผู้ปวย รหัส (C)	CC2-9, CC2-10, CC2-11, CC3-3, CC4-1	5(M)
		BC1-1, BC1-2, BC1-3, BC2-1, BC2-2, BC2-3, BC2-4, BC2-5, BC2-6, BC2-7, BC2-8, BC2-9, BC3-1, CC1-1, CC1-2, CC1-3, CC1-4, CC1-5, CC1-6, CC1-7, CC1-8, CC1-9, CC2-1, CC2-2, CC2-3, CC2-4, CC2-5, CC2-6, CC2-7, CC2-8, CC2-12, CC2-13, CC3-1, CC3-2, C4-1, C4-2, DC1-1, DC1-2, DC1-3, DC1-4, DC2-1, DC2-2, DC2-3, DC2-4, DC2-5, DC2-6, DC2-7, DC2-8, DC2-9, DC2-10, DC2-11, DC2-12, DC3-1, DC3-2, DC3-3, DC4-1	56(F)
สงขลา	บ้านผู้ปวย	SK1M, SK2M, SK3M, SK4M, SK5M, SK6M, SK7M, SK8M, SK9M, SK10M, SK11M, SK12M, SK13M, SK14M, SK15M, SK16M, SK17M, SK18M, SK19M, SK20M, SK21M, SK22M, SK23M, SK24M, SK25M, SK26M, SK27M, SK28M, SK29M, SK30M, SK31M, SK32M, SK33M, SK34M, SK35M, SK36M, SK37M, SK38M, SK39M, SK40M, SK41M, SK42M, SK43M, SK44M, SK45M, SK46M, SK47M, SK48M, SK49M, SK50M, SK51M, SK52M, SK53M, SK54M, SK55M,SK56M, SK57M, SK58M, SK59M, SK60M, SK61M,SK62M, SK63M ,SK64M, SK65M, SK66M, SK67M, SK68M, SK69M, SK70M, SK71M, SK72M, SK73M,SK74M, SK75M, SK76M, SK77M, SK78M ,SK79M, SK80M, SK81M, SK82M, SK83M, SK84M, SK85M,SK86M, SK87M, SK88M, SK89M, SK90M, SK91M,SK92M, SK93M, SK94M, SK95M, SK96M, SK97M, SK98M, SK99M, SK100M, SK101M, SK102M, SK103M, SK104M, SK105M, SK106M, SK107M, SK108M, SK109M, SK110M, SK111M, SK112M, SK113M, SK114M, SK115M, SK116M, SK117M, SK118M, SK119M, SK120M, SK121M, SK122M,SK123M, SK124M, SK125M, SK126M, SK127M, SK128M, SK129M, SK130M, SK131M, SK132M, SK133M, SK134M, SK135M, SK136M, SK137M, SK138M, SK139M, SK140M, SK141M, SK142M, ASKM2-2	143(M)

สงขลา		SK1F, SK2F, SK3F, SK4F, SK5F, SK6F, SK7F, SK8F, SK9F, SK10F, SK11F, SK12F, SK13F ,SK14F, SK15F, SK16F, ASKT5-1, ASKT6-1, BSKT6-5, BSKT6-6, BSKT6-7, CSKB4-1, ASKT1-1, ASKT2-1, ASKT2-3, ASKBE3-1,ASKT3-2, BSKT4-1, BSKT4-2, BSKT4-3, BSKT4-4, BSKT4-5 ,BSKBE6-1, BSKT6-2, BSKT6-3, BSKBE6-4, SK4-1	37(F)
พัทลุง	บ้านผู้ป่วย	PL1M, PL2M, PL3M, PL4M, PL5M, PL6M, PL7M, PL8M, PL9M, PL10M, PL11M, PL12M, PL13M, PL14M, PL15M, PL16M, PL17M, PL18M, PL19M, PL20M, PL21M ,PL22M, PL23M, PL24M, PL25M, PL26M, PL27M, PL28M, PL29M, PL30M, PL31M,PL32M, PL33M, PL34M, PL35M, PL36M, PL37M, PL38M, PL39M, PL40M, PL41M, PL42M, PL43M,PL44M, PL45M, PL46M, PL47M, PL48M, PL49M , PL50M, PL51M, PL52M, PL53M, PL54M, PL55M, PL56M, PL57M, PL58M, PL59M, PL60M, PL61M, PL62M, PL63M, PL64M, PL65M, PL66M, PL67M, PL68M, PL69M, PL70M, DPLTMG43, DPLTMG48,	72(M)
		PL4-1, CPLT1-1, CPLT1-2, CPLT1-3, CPLT1-4, CPLT5-1, CPLT5-2, CPLT5-3, CPLT5-4, CPLT5-5, CPLT5-6, CPLT5-7, CPLT5-8, DPLEMG1, DPLEMG2, DPLBMG3, DPLTMG33, DPLTMG35, DPLTMG36, DPLTMG37, DPLTMG38, DPLTMG40, DPLTMG41, DPLTMG42, DPLTMG44, DPLTMG45, DPLTMG46, DPLTMG47, DPLTMG49, DPLTMG50, DPLTMG51, DPLTMG52, DPLEBTT1, DPLTTT2, DPLTTT3, DPLTTT4, DPLTTT5, DPLTTT6, DPLTTT7, DPLTTT8, DPLTTT9, DPLTTT10, DPLETEP1, DPLTE2, DPLTTP3, DPLTTL1, DPLTTL2, DPLTTL3, DPLTTL4, DPLTTL5, DPLTTL6, DPLTTL7, DPLTTL8, DPLTTL9, DPLTTL10, DPLTTL11, DPLTTL12, DPLTTL13, DPLTTL14, DPLTTL15, DPLTTL16, DPLTTL17, DPLTTL18	64(F)
ชุมพร	ถ้ำรับร่อ	ECPT1-2, ECPT2-11, ECPT2-18, ECPE6-16,	4(M)
		ECPT1-1, ECPT1-3, ECPT1-4, ECPT1-5, ECPT1-6, ECPT1-7, ECPT1-8, ECPT1-9, ECPT1-10, ECPT1-11, ECPT1-12, ECPT1-13, ECPE1-15, ECPE1-16, ECPE1-17, ECPE1-18, ECPBE1-19, ECPE1-20, ECPT2-1, ECPT2-2, ECPT2-3, ECPT2-4, ECPT2-5, ECPT2-6, ECPT2-7, ECPT2-8, ECPT2-9, ECPT2-10, ECPT2-12, ECPT2-13, ECPT2-14, ECPT2-15, ECPT2-16, ECPT2-17, ECPBE2-19, ECPT3-1, ECPT5-1, ECPT5-2, ECPT5-3, ECPT5-4, ECPT5-5, ECPT5-6, ECPT5-7, ECPT5-8, ECPT5-9, ECPT5-10, ECPT5-11, ECPT5-12, ECPT5-13, ECPT5-14, ECPT5-15, ECPT5-144, ECPE5-145, ECPT6-1, ECPT6-2, ECPT6-3, ECPT6-4, ECPT6-5, ECPT6-6, ECPT6-7, ECPT6-8, ECPT6-9, ECPT6-10, ECPT6-11, ECPT6-12, ECPT6-13, ECPT6-14, ECPT6-15, ECPBE6-	119(F)

		171, ECPBE6-172, ECPE6-173, ECPE6-174, ECPE6-175, ECPE6-176, CP8-1, CP8-2, CP8-3, CP8-4, CP8-5, CP8-6, CP8-7, CP8-8, CP8-9, CP8-10, CP8-11, CP8-12, CP8-13, CP8-14, CP8-15, CP8-16, CP8-17, CP8-18, CP8-19, CP8-20, CP8-21, CP8-22, CP8-23, CP8-24, CP8-25, CP8-26, CP8-27, CP8-28, CP8-29, CP8-30, CP8-31, CP8-32, CP8-33, CP8-34, CP8-35, CP8-36, CP8-37, CP8-38, CP8-39, CP8-40, CP8-41, CP8-42, CP8-43, CP8-44, CP8-45	
รวม		500 ตัวอย่าง	

4.2 ผลการตรวจหาเชื้อ *Leishmania* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอของรีนฝอยทราย

การตรวจหาเชื้อ *Leishmania* spp. ในรีนฝอยทราย ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยนำรีนฝอยทรายจำนวน 500 ตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยเพิ่มจำนวนยีน *ITS1* เพื่อตรวจหาเชื้อ *Leishmania* โดยใช้ Primers LeR: 5'- CCA-AGT-CAT-CCA-TCG-CGA-CAC-G- 3' และ LeF: 5'-TCC-GCC-CGA-AAG-TTC-ACC-GAT-A- 3' ภายใต้ปฏิกิริยา PCR ที่สภาวะเหมาะสม ตามที่ได้อธิบายไว้ในบทที่ 3 หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยการรันเจล 1.5 % agarose gel electrophoresis ใช้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็น PCR product ที่มีขนาดประมาณ 379 bp (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *ITS1* ด้วยวิธี gel electrophoresis (1.5 % agaroses gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

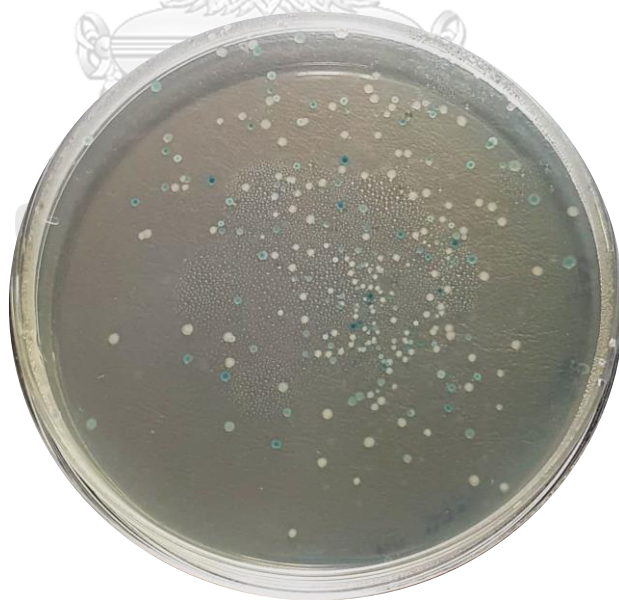
Lane P คือ Positive control

Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

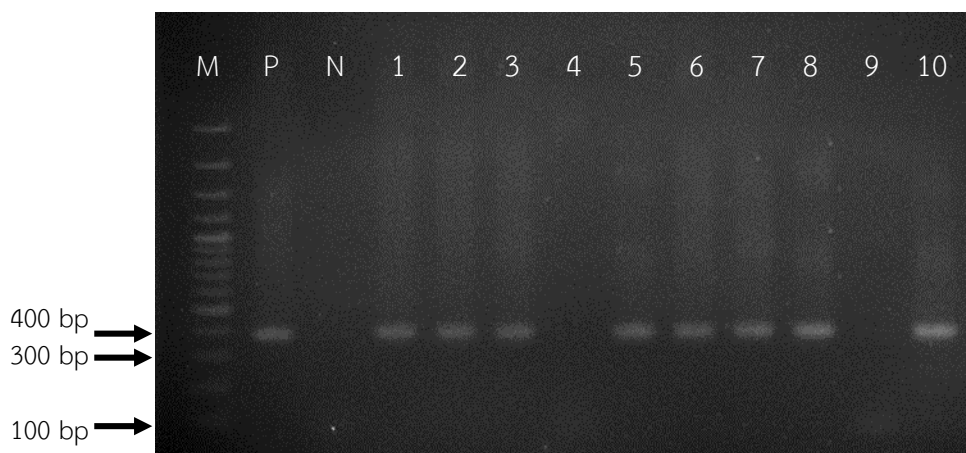
Lane 1-10 คือ PCR product ของเชื้อลิซมาเนีย (แสดงผลบางส่วน)

4.3 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน ITS1 โดยเทคนิค Colony PCR

หลังจากการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ PCR product ของยีน *ITS1* ที่มีขนาดประมาณ 371-379 bp นำ PCR product ที่ได้ไปทำการ ligation เพื่อเชื่อมต่อยีน *ITS1* เข้ากับ pGEM-T® easy vector แล้วทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ Competent cell (*E. coli* DH5α) พลาสมิดเวกเตอร์ชนิด pGEM®-T easy vector จะมีคุณสมบัติของพลาสมิดที่มียีน lacZ ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ที่สามารถย่อยสาร X-gal ซึ่งจะทำให้ colony แบคทีเรียมีสีฟ้าแต่เมื่อมียีนที่เราศึกษาคือยีน *ITS1* แทรกเข้าไปในส่วนของยีน lacZ บริเวณ clone insert ยีน lacZ จึงไม่สามารถทำงานได้ทำให้ไม่มีการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase มาย่อย X-gal colony ของแบคทีเรียที่ได้จะมีสีขาว (รูปที่ 6) เราจึงเลือก colony สีขาวมาทดสอบด้วยเทคนิค colony PCR โดยเตรียมสารในปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสมเหมือนการเพิ่มจำนวนยีน *ITS1* แต่ในการทำด้วย colony PCR นั้นจะใช้ colony ของแบคทีเรียแทนดีเอ็นเอต้นแบบ หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis ตามด้วยย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็นโคลนที่มีขนาดประมาณ 379 bp (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 แสดงลักษณะของโคโลนีสีขาว และ โคโลนีสีฟ้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar



รูปที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบการโคลนพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *ITS1* ด้วยวิธี *gel electrophoresis*

(1.5 % agarose gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

Lane P คือ Positive control

Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

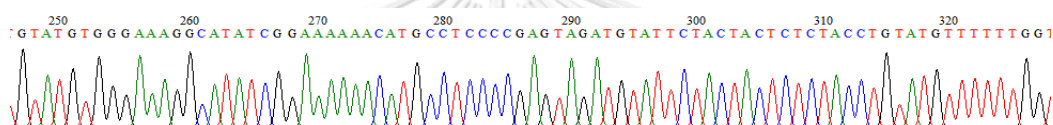
Lane 1-10 คือ โคลนที่พลาสมิดดีเอ็นเอมีชิ้นส่วนของยีน *ITS1* (แสดงผลบางส่วน)

ตารางที่ 13 ผลการตรวจหาเชื้อลิซมาเนียในรินฝอยทราย

จังหวัด	ผลการตรวจ (<i>ITS1</i>)			ชนิดของ รินฝอยทราย ที่พบเชื้อ	คิดเป็นร้อยละ
	จำนวน ตัวอย่างที่ พบเชื้อ	จำนวนตัวอย่าง ทั้งหมด	เชื้อที่พบ (รหัสตัวอย่าง)		
เชียงราย	0	61	-	-	0
สงขลา	2	180	<i>L.martiniquensis</i> (ASKBE3-1)	<i>Se. khawi</i>	1.1
			<i>L.martiniquensis</i> (SK4-1)	<i>Se. khawi</i>	
พัทลุง	0	136	-	-	0
ชุมพร	0	123	-	-	0

4.4 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS1* ในเชื้อ *Leishmania* spp.

นำโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน *ITS1* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเออย่างน้อยคือ 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และมีปริมาตร 20 μl นำส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี ตัวอย่างละ 2 โคลน ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์จะแสดงในรูปของกราฟ chromatogram (รูปที่ 8) จากนั้นทำการวิเคราะห์เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เนื่องจากตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะมีส่วนของพลาสมิดเวกเตอร์ตีคบริเวณหัวและท้ายของเส้น insert gene (ยีน *ITS1*) อยู่ เราจึงต้องทำการตัดส่วนของเวกเตอร์ออกโดยวิเคราะห์จากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program จากนั้นเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ลงในโปรแกรม notepad



รูปที่ 8 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของยีน *ITS1* ในเชื้อลิซมาเนีย

4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS1* ในเชื้อ *Leishmania* spp. กับฐานข้อมูล NCBI และการระบุ species ของเชื้อ *Leishmania* spp.

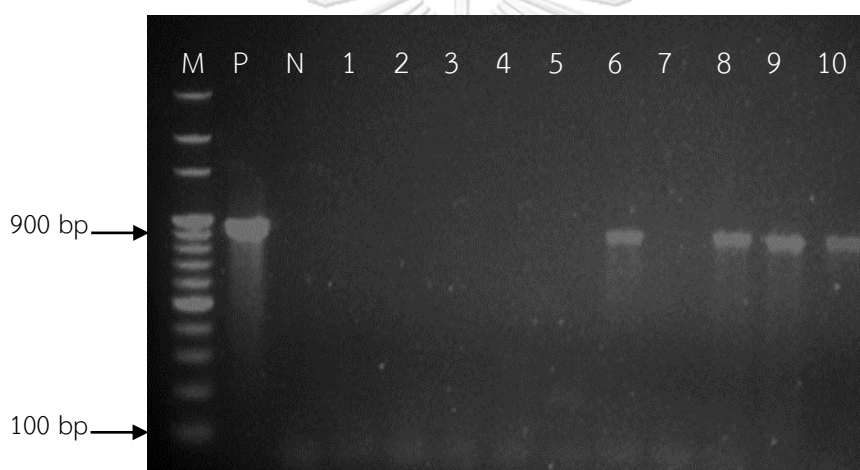
หลังจากได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (Genbank) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ nucleotide blast (BLASTN) ซึ่งผลของการเปรียบเทียบจะวิเคราะห์ด้วยค่าทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงผลเป็นค่าเปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับข้อมูล Percentage Identities (%) ซึ่งจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อลิซมาเนียที่ตรวจได้จากกรีนฝอยทราย พบว่าเชื้อ *Leishmania martiniquensis* มีค่า Percentage Identities (%) 99% เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลสากล Genbank

ตารางที่ 14 แสดงผลการเปรียบเทียบเชื้อลิซมาเนียที่ตรวจพบ กับฐานข้อมูล GenBank

ลำดับ	รหัส	จังหวัด	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp.)	สายพันธุ์	% Identities	Accession No.
1	ASKBE3-1	สงขลา	379	<i>L. martiniquensis</i>	99	JX195637
2	SK4-1	สงขลา	377	<i>L. martiniquensis</i>	99	JX195637

4.6 ผลการตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอของรึ้นฝอยทรายด้วยยีน *SSU rRNA*

การตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในรึ้นฝอยทราย ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยนำรึ้นฝอยทรายจำนวน 500 ตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยเพิ่มจำนวนยีน *SSU rRNA* เพื่อตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma* โดยใช้ Primers TRY927F: 5'- GAA-ACA-AGA-AAC-ACG-GGA-G- 3' และ TRY927R: 5'- CTA-CTG-GGC-AGC-TTG-GA- 3' ภายใต้ปฏิกิริยา PCR ที่สภาวะเหมาะสม ตามที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อที่ 3.7.6 หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยการรันเจล 1.5 % agarose gel electrophoresis ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็น PCR product ที่มีขนาดประมาณ 927 bp (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *SSU rRNA* ด้วยวิธี *gel electrophoresis* (1.5 % agarose gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

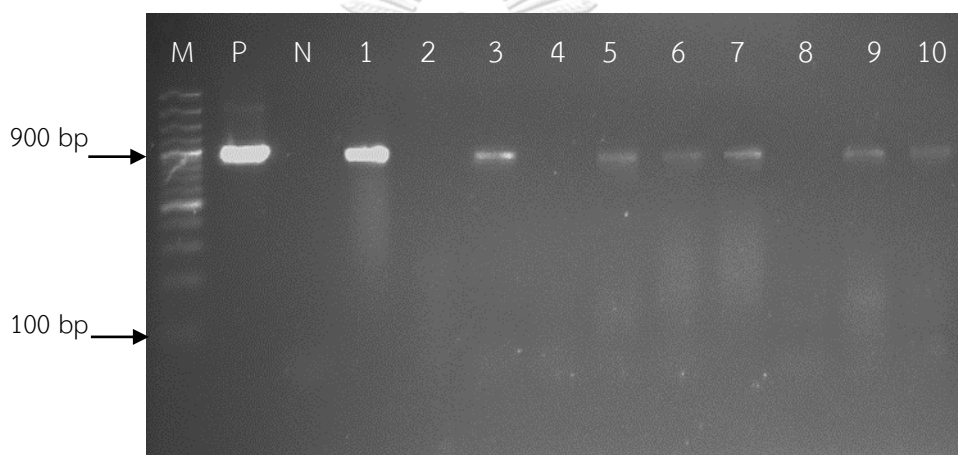
Lane P คือ Positive control

Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

Lane 1-10 คือ PCR product ของเชื้อทริพพาโนโซมา (แสดงผลบางส่วน)

4.7 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน *SSU rRNA* โดยเทคนิค Colony PCR

หลังจากการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ PCR product ของยีน *SSU rRNA* ที่มีขนาดประมาณ 927 bp นำ PCR product ที่ได้ไปทำการ ligation เพื่อเชื่อมต่อยีน *SSU rRNA* เข้ากับ pGEM-T® easy vector แล้วทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ Competent cell (*E. coli* DH5α) หลังจากนั้นเลือกโคโลนีสีขาวมาทดสอบด้วยเทคนิค colony PCR โดยเตรียมสารในปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสมเหมือนการเพิ่มจำนวนยีน *SSU rRNA* หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis ตามด้วยย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็นโคลนที่มีขนาดประมาณ 927 bp (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงผลการตรวจสอบการโคลนพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *SSU rRNA* ด้วยวิธี gel electrophoresis

(1.5 % agarose gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

Lane P คือ Positive control

Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

Lane 1-10 คือ โคลนที่พลาสมิดดีเอ็นเอมีชิ้นส่วนของยีน *SSU rRNA* (แสดงผลบางส่วน)

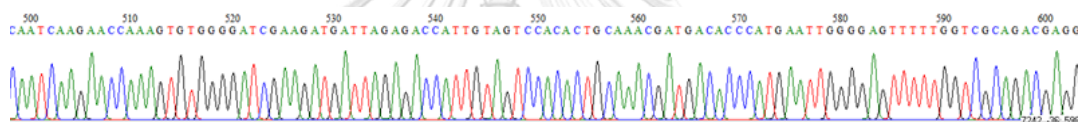
ตารางที่ 15 ผลการตรวจหาเชื้อทริพาโนโซมาในรื้อนฝอยทราย

จังหวัด	ผลการตรวจ (SSU rRNA)			ชนิดของ รื้อนฝอยทราย ที่พบเชื้อ	คิดเป็นร้อยละ
	จำนวน ตัวอย่าง ที่พบเชื้อ	จำนวน ตัวอย่าง ทั้งหมด	เชื้อที่พบ (รหัสตัวอย่าง)		
เชียงราย	1	61	<i>T. noyesi</i> (BC1-1)	<i>Ph. teshi</i>	1.6
พัทลุง	2	136	<i>Trypanosoma</i> sp. (CPLT1-2)	<i>Se. khawi</i>	1.5
			<i>Trypanosoma</i> sp. (CPLT1-3)	<i>Se. indica</i>	
สงขลา	5	180	<i>Trypanosoma</i> sp. (ASKBE3-1)	<i>Se. khawi</i>	2.8
			<i>Trypanosoma</i> sp. (ASKT3-2)	<i>Se. khawi</i>	
			<i>Trypanosoma</i> sp. (BSKT4-3)	<i>Se. khawi</i>	
			<i>Trypanosoma</i> sp. (BSKBE6-1)	<i>Se. khawi</i>	
			<i>Trypanosoma</i> sp. (BSKT6-2)	<i>Se. khawi</i>	

จังหวัด	ผลการตรวจ (SSU rRNA)			ชนิดของ รีนฝอยทรายที่ พบเชื้อ	คิดเป็น ร้อยละ
	จำนวน ตัวอย่าง ที่พบเชื้อ	จำนวน ตัวอย่าง ทั้งหมด	เชื้อที่พบ (รหัสตัวอย่าง)		
ชุมพร	11	123	<i>Trypanosoma</i> sp. (ECPE1-20)	<i>Ph. asperulus</i>	8.9
			<i>Trypanosoma</i> sp. (ECPT5-13)	<i>Se.anodontis</i>	
			<i>Trypanosoma</i> sp. (ECPT5-144)	<i>Ph.asperulus</i>	
			<i>Trypanosoma</i> sp. (CP8-16)	<i>Ph. betisi</i>	
			<i>Trypanosoma</i> sp. (CP8-17)	<i>Ph. betisi</i>	
			<i>Trypanosoma</i> sp. (CP8-22)	<i>Se. anodontis</i>	
			<i>Trypanosoma</i> sp. (CP8-23)	<i>Se. anodontis</i>	
			<i>T. noyesi</i> (CP8-24)	<i>Se. anodontis</i>	
			<i>T. noyesi</i> (CP8-30)	<i>Ph. asperulus</i>	
			<i>Trypanosoma</i> sp. (CP8-31)	<i>Se. anodontis</i>	
<i>T. noyesi</i> (CP8-35)	<i>Se. anodontis</i>				

4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SSU rRNA* ในเชื้อ *Trypanosoma* spp.

นำโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน *SSU rRNA* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเออย่างน้อยคือ $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ และมีปริมาตร $20 \mu\text{l}$ นำส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Inc. (ประเทศเกาหลี) ตัวอย่างละ 2 โคลน ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์จะแสดงในรูปแบบของกราฟ chromatogram (รูปที่ 11) จากนั้นทำการวิเคราะห์เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เนื่องจากตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะมีบางส่วนของพลาสมิดเวกเตอร์ติดบริเวณหัวและท้ายของเส้น insert gene (ยีน *SSU rRNA*) อยู่ เราจึงต้องทำการตัดส่วนของเวกเตอร์ออกโดยวิเคราะห์จากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program จากนั้นเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ลงในโปรแกรม notepad



รูปที่ 11 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของยีน *SSU rRNA* ในเชื้อทริพาโนโซมา

4.9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SSU rRNA* ในเชื้อ *Trypanosoma* spp. กับฐานข้อมูล NCBI และการระบุ species ของเชื้อ *Trypanosoma* spp.

หลังจากได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (Genbank) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ nucleotide blast (BLASTN) ซึ่งผลของการเปรียบเทียบจะวิเคราะห์ด้วยค่าทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงผลเป็นค่าเปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับข้อมูล Percentage Identities (%) ซึ่งจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทริพาโนโซมาที่ตรวจได้จาก รีนฝอยทราย พบว่าเชื้อ *Trypanosoma* sp. มีค่า Percentage Identities (%) อยู่ระหว่าง 96-100% เชื้อ *Trypanosoma noyesi* มีค่า Percentage Identities (%) อยู่ระหว่าง 98-99% เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลสากล Genbank

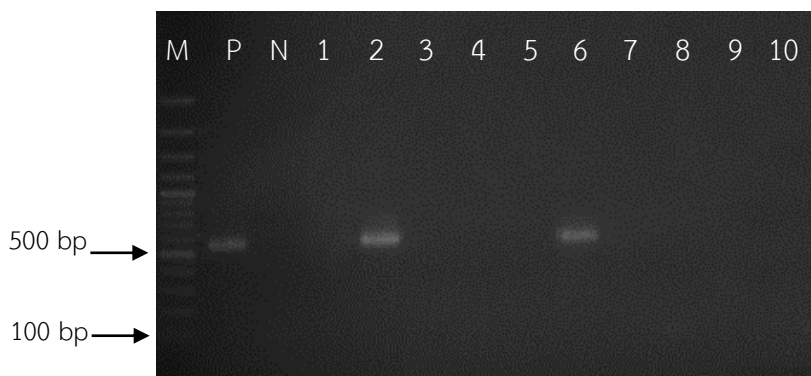
ตารางที่ 16 แสดงผลการเปรียบเทียบเชื้อทริพพาโนโซมาที่ตรวจพบ กับฐานข้อมูล GenBank

ลำดับ	รหัส	จังหวัด	ขนาด ผลิตภัณฑ์ (bp.)	สายพันธุ์	% Identities	Accession No.
1	ECPE1-20	ชุมพร	878	<i>Trypanosoma</i> sp.	100	MH989559
2	ECPT5-13	ชุมพร	948	<i>Trypanosoma</i> sp.	99	MH989559
3	ECPT5-144	ชุมพร	948	<i>Trypanosoma</i> sp.	99	MH989559
4	CP8-16	ชุมพร	959	<i>Trypanosoma</i> sp.	98	MH989559
5	CP8-17	ชุมพร	949	<i>Trypanosoma</i> sp.	99	MH989559
6	CP8-22	ชุมพร	949	<i>Trypanosoma</i> sp.	99	MH989559
7	CP8-23	ชุมพร	880	<i>Trypanosoma</i> sp.	99	MH989559
8	CP8-24	ชุมพร	936	<i>Trypanosoma noyesi</i>	99	KX008320
9	CP8-30	ชุมพร	937	<i>Trypanosoma noyesi</i>	98	KX008320
10	CP8-31	ชุมพร	946	<i>Trypanosoma</i> sp.	96	MH989559
11	CP8-35	ชุมพร	939	<i>Trypanosoma noyesi</i>	98	KX008320
12	BC1-1	เชียงราย	934	<i>Trypanosoma noyesi</i>	98	KX008320
13	CPLT1-2	พัทลุง	950	<i>Trypanosoma</i> sp.	99	MH989559
14	CPLT1-3	พัทลุง	949	<i>Trypanosoma</i> sp.	100	MH989559
15	ASKBE3-1	สงขลา	949	<i>Trypanosoma</i> sp.	99	MH989559
16	ASKT3-2	สงขลา	961	<i>Trypanosoma</i> sp.	99	MH989559
17	BSKT4-3	สงขลา	986	<i>Trypanosoma</i> sp.	99	MH989559
18	BSKBE6-1	สงขลา	877	<i>Trypanosoma</i> sp.	99	MH989559
19	BSKT6-2	สงขลา	952	<i>Trypanosoma</i> sp.	99	MH989559

4.10 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน Cytochrome b เพื่อระบุชนิดของริ้นฝอยทรายด้วยเทคนิค PCR

การศึกษาความผันแปรของยีน *CytB* จากตัวอย่างริ้นฝอยทรายที่มีเชื้อลิซมาเนีย และเชื้อทริพพาโนโซม จำนวน 20 ตัวอย่าง นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Primer N1N-PDR: 5'- CAY-ATT-CAACW- GAA-TGA-TA -3' และ C3B-PDR: 5'- GGT-AYW-TTG-CCTCGA- WTT-CGW-TAT-GA -3' ภายใต้ปฏิกิริยา PCR ที่สภาวะเหมาะสม ตามที่ได้อธิบายไว้ในบทที่ 3 หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยการรันเจล 1.5 % agarose

gel electrophoresis ใช้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็น PCR product ที่มีขนาดประมาณ 500 bp (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *CytB* ด้วยวิธี gel electrophoresis

(1.5 % agarose gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

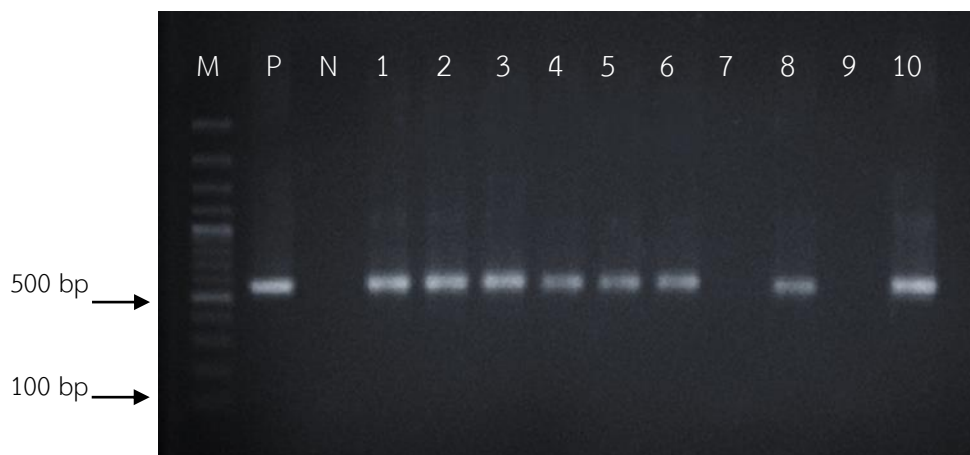
Lane P คือ Positive control

Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

Lane 1-10 คือ PCR product ของเชื้อทริพพาโนโซมา (แสดงผลบางส่วน)

4.11 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน Cytochrome b โดยเทคนิค Colony PCR

หลังจากการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ PCR product ของยีน *CytB* ที่มีขนาดประมาณ 550 bp นำ PCR product ที่ได้ไปทำการ ligation เพื่อเชื่อมต่อยีน *CytB* เข้ากับ pGEM-T® easy vector แล้วทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ Competent cell (*E. coli* DH5 α) หลังจากนั้นเลือกโคโลนีสีขาวมาทดสอบด้วยเทคนิค colony PCR โดยเตรียมสารในปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสมเหมือนการเพิ่มจำนวนยีน *CytB* หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis ตามด้วยย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็นโคลนที่มีขนาดประมาณ 500 bp (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *CytB* ด้วยวิธี *gel electrophoresis*

(1.5 % agarose gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

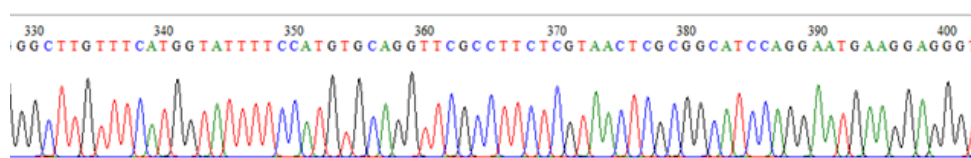
Lane P คือ Positive control

Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

Lane 1-10 คือ PCR product ของเชื้อทริฟาโนโซมา (แสดงผลบางส่วน)

4.12 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytochrome b*

นำโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน *CytB* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเออย่างน้อยคือ $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ และมีปริมาตร $20 \mu\text{l}$ นำส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Inc. (ประเทศเกาหลี) ตัวอย่างละ 2 โคลน ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์จะแสดงในรูปของกราฟ chromatogram (รูปที่ 14) จากนั้นทำการวิเคราะห์เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เนื่องจากตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะมีบางส่วนของพลาสมิดเวกเตอร์ติดบริเวณหัวและท้ายของเส้น insert gene อยู่ เราจึงต้องทำการตัดส่วนของเวกเตอร์ออกโดยวิเคราะห์จากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program จากนั้นเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ลงในโปรแกรม notepad



รูปที่ 14 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของยีน *CytB*

4.13 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CytB* ในรึ้นฝอยทราย กับฐานข้อมูล NCBI และการระบุ species ของรึ้นฝอยทราย

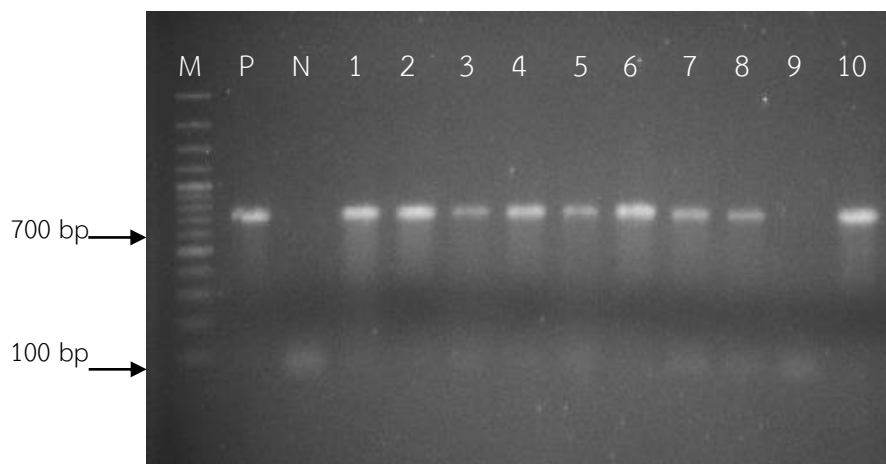
หลังจากได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (Genbank) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ nucleotide blast (BLASTN) ซึ่งผลของการเปรียบเทียบจะวิเคราะห์ด้วยค่าทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงผลเป็นค่าเปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับข้อมูล Percentage Identities (%) ซึ่งจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของรึ้นฝอยทราย พบว่า มีค่า Percentage Identities (%) อยู่ระหว่าง 85-91% เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลสากล Genbank

ตารางที่ 17 แสดงผลการเปรียบเทียบยีน *CytB* ในรึ้นฝอยทรายกับฐานข้อมูล GenBank

ลำดับ	รหัส	จังหวัด	ขนาด ผลิตภัณฑ์ (bp.)	สายพันธุ์	% Identities	Accession No.
1	CP8-16	ชุมพร	542	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	85	JN036724
2	CP8-35	ชุมพร	539	<i>Sergentomyia gemmea</i>	91	JX852706

4.14 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *COI* เพื่อระบุชนิดของรึ้นฝอยทราย ด้วยเทคนิค PCR

การศึกษาความผันแปรของยีน *COI* จากตัวอย่างรึ้นฝอยทรายที่มีเชื้อลีชมาเนีย และเชื้อทริพาโนโซม จำนวน 20 ตัวอย่าง นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer LepF 5'ATTCAACCAATCATAAAGATATT 3' และ LepR 5'AAACTTCTGGATGTCCAAAAA 3' ภายใต้ปฏิกิริยา PCR ที่สภาวะเหมาะสม ตามที่ได้อธิบายไว้ในบทที่ 3 หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยการรันเจล 1.5 % agarose gel electrophoresis ใช้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็น PCR product ที่มีขนาดประมาณ 700 bp (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *COI* ด้วยวิธี *gel electrophoresis*

(1.5 % agarose gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

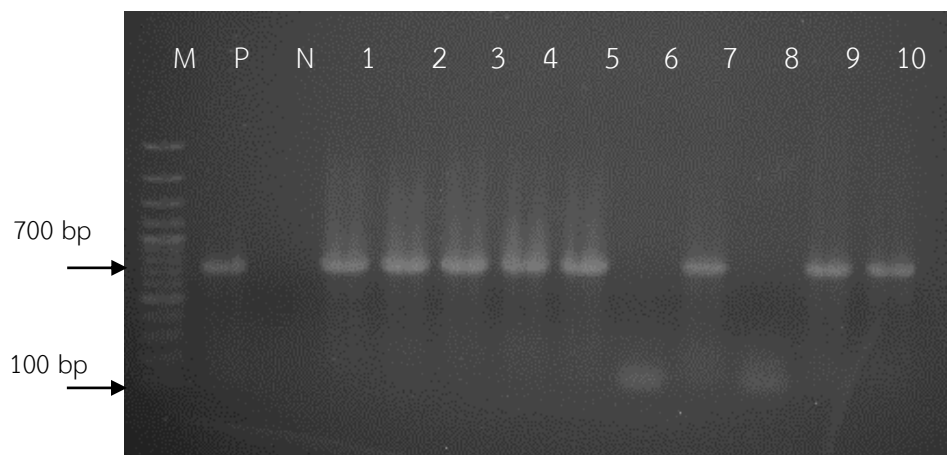
Lane P คือ Positive control

Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

Lane 1-10 คือ PCR product ของเชื้อทริพาโนโซมา (แสดงผลบางส่วน)

4.15 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน *COI* โดยเทคนิค Colony PCR

หลังจากการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ PCR product ของยีน *COI* ที่มีขนาดประมาณ 700 bp นำ PCR product ที่ได้ไปทำการ ligation เพื่อเชื่อมต่อยีน *COI* เข้ากับ pGEM-T® easy vector แล้วทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ Competent cell (*E. coli* DH5 α) หลังจากนั้นเลือกโคโลนีสีขาวมาทดสอบด้วยเทคนิค colony PCR โดยเตรียมสารในปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสมเหมือนการเพิ่มจำนวนยีน *COI* หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis ตามด้วยย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็นโคลนที่มีขนาดประมาณ 700 bp (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *COI* ด้วยวิธี *gel electrophoresis* (1.5 % agarose gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

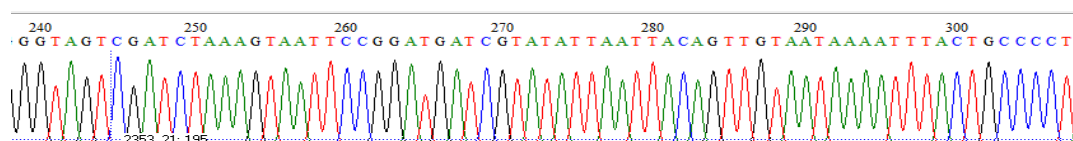
Lane P คือ Positive control

Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

Lane 1-10 คือ PCR product ของเชื้อทริพพาโนโซมา (แสดงผลบางส่วน)

4.16 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI*

นำโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน *COI* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเออย่างน้อยคือ $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ และมีปริมาตร $20 \mu\text{l}$ นำส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen Inc. (ประเทศเกาหลี) ตัวอย่างละ 2 โคลน ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์จะแสดงในรูปของกราฟ chromatogram (รูปที่ 17) จากนั้นทำการวิเคราะห์เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เนื่องจากตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จะมีบางส่วนของพลาสมิดเวคเตอร์ติดบริเวณหัวและท้ายของเส้น insert gene (ยีน *COI*) อยู่ เราจึงต้องทำการตัดส่วนของเวคเตอร์ออกโดยวิเคราะห์จากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program จากนั้นเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ลงในโปรแกรม notepad



รูปที่ 17 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของยีน *COI*

4.17 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ในริ้นฝอยทราย กับฐานข้อมูล NCBI และการระบุ species ของริ้นฝอยทราย

หลังจากได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (Genbank) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ nucleotide blast (BLASTN) ซึ่งผลของการเปรียบเทียบจะวิเคราะห์ด้วยค่าทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงผลเป็นค่าเปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับข้อมูล Percentage Identities (%) ซึ่งจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของริ้นฝอยทราย พบว่า มีค่า Percentage Identities (%) อยู่ระหว่าง 87-99% เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลสากล Genbank

ตารางที่ 18 แสดงผลการเปรียบเทียบยีน *COI* ในริ้นฝอยทรายกับฐานข้อมูล GenBank

ลำดับ	รหัส	จังหวัด	ขนาด ผลิตภัณฑ์ (bp.)	สายพันธุ์	% Identities	Accession No.
1	ECPE1-20	ชุมพร	708	<i>Lutzomyia reburra</i>	87	KC921283
2	ECPT5-13	ชุมพร	710	<i>Sergentomyia koloshanensis</i>	91	KF137560
3	ECPT5-144	ชุมพร	707	<i>Lutzomyia reburra</i>	88	KC921283
4	CP8-16	ชุมพร	708	<i>Lutzomyia panamensis</i>	89	GU909460
5	CP8-17	ชุมพร	708	<i>Lutzomyia panamensis</i>	89	GU909460
6	CP8-22	ชุมพร	708	<i>Sergentomyia koloshanensis</i>	91	KF137560
7	CP8-23	ชุมพร	708	<i>Sergentomyia koloshanensis</i>	91	KF137560
8	CP8-24	ชุมพร	708	<i>Sergentomyia koloshanensis</i>	91	KF137560
9	CP8-30	ชุมพร	708	<i>Lutzomyia reburra</i>	88	KC921283
10	CP8-31	ชุมพร	709	<i>Sergentomyia koloshanensis</i>	91	KF137560
11	CP8-35	ชุมพร	708	<i>Sergentomyia koloshanensis</i>	91	KF137560
12	BC1-1	เชียงราย	708	<i>Lutzomyia yuilli yuilli</i>	87	KC921321
13	CPLT1-2	พัทลุง	708	<i>Sergentomyia gemmea</i>	98	LC136894

14	CPLT1-3	พัทลุง	708	<i>Sergentomyia indica</i>	99	MK603820
15	ASKBE3-1	สงขลา	708	<i>Sergentomyia gemmea</i>	98	LC136894
16	ASKT3-2	สงขลา	708	<i>Sergentomyia gemmea</i>	98	LC136894
17	BSKT4-3	สงขลา	708	<i>Sergentomyia gemmea</i>	98	LC136894
18	BSKBE6-1	สงขลา	708	<i>Sergentomyia gemmea</i>	98	LC136894
19	BSKT6-2	สงขลา	708	<i>Sergentomyia gemmea</i>	98	LC136894
20	SK4-1	สงขลา	708	<i>Sergentomyia gemmea</i>	98	LC136894

4.18 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

การวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เพื่อวิเคราะห์ความชุกของการติดเชื้อไลชมาเนีย และทริพาโนโซมในแต่ละพื้นที่ พบว่า

ในจังหวัดสงขลามีความชุกของการติดเชื้อไลชมาเนียมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 1.1 จังหวัดเชียงราย จังหวัดพัทลุง และจังหวัดชุมพร ไม่มีการติดเชื้อไลชมาเนียเลย ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 0 จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ความชุกของการติดเชื้อไลชมาเนียของทั้ง 4 จังหวัด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 19) ส่วนการติดเชื้อทริพาโนโซม พบว่า จังหวัดชุมพรมีความชุกของการติดเชื้อทริพาโนโซมมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 8.9 รองลงมาคือจังหวัดสงขลา จังหวัดเชียงราย และจังหวัดพัทลุง คิดเป็นร้อยละ 2.8 , 1.6 และ 1.5 ตามลำดับ และจากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ความชุกของการติดเชื้อทริพาโนโซมของทั้ง 4 จังหวัด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 19 แสดงความชุกของการติดเชื้อไลชมาเนียด้วยวิธีการทางสถิติ

		Crosstab			
		Leishmania		Total	
		positive	negative		
Province	Chiang Rai	Count	0	61	61
		% within Province	0.0%	100.0%	100.0%
		% within Leishmania	0.0%	12.2%	12.2%
		Adjusted Residual	-.5	.5	
	Songkhla	Count	2	178	180
		% within Province	1.1%	98.9%	100.0%
		% within Leishmania	100.0%	35.7%	36.0%
		Adjusted Residual	1.9	-1.9	
	Phatthalung	Count	0	136	136
		% within Province	0.0%	100.0%	100.0%
		% within Leishmania	0.0%	27.3%	27.2%
		Adjusted Residual	-.9	.9	
	Chumphon	Count	0	123	123
% within Province		0.0%	100.0%	100.0%	
% within Leishmania		0.0%	24.7%	24.6%	
Adjusted Residual		-.8	.8		
Total	Count	2	498	500	
	% within Province	.4%	99.6%	100.0%	
	% within Leishmania	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests			
Pearson Chi-Square	Value	df	Asymp. Sig (2 sided)
Likelihood Ratio	3.570 ^a	3	.312
Linear-by-Linear	4.101	3	.251
Association	.855	1	.355
N of Valid Cases	500		

a. 4 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .24.

ตารางที่ 20 แสดงความชุกของการติดเชื้อทริพาโนโซมด้วยวิธีการทางสถิติ

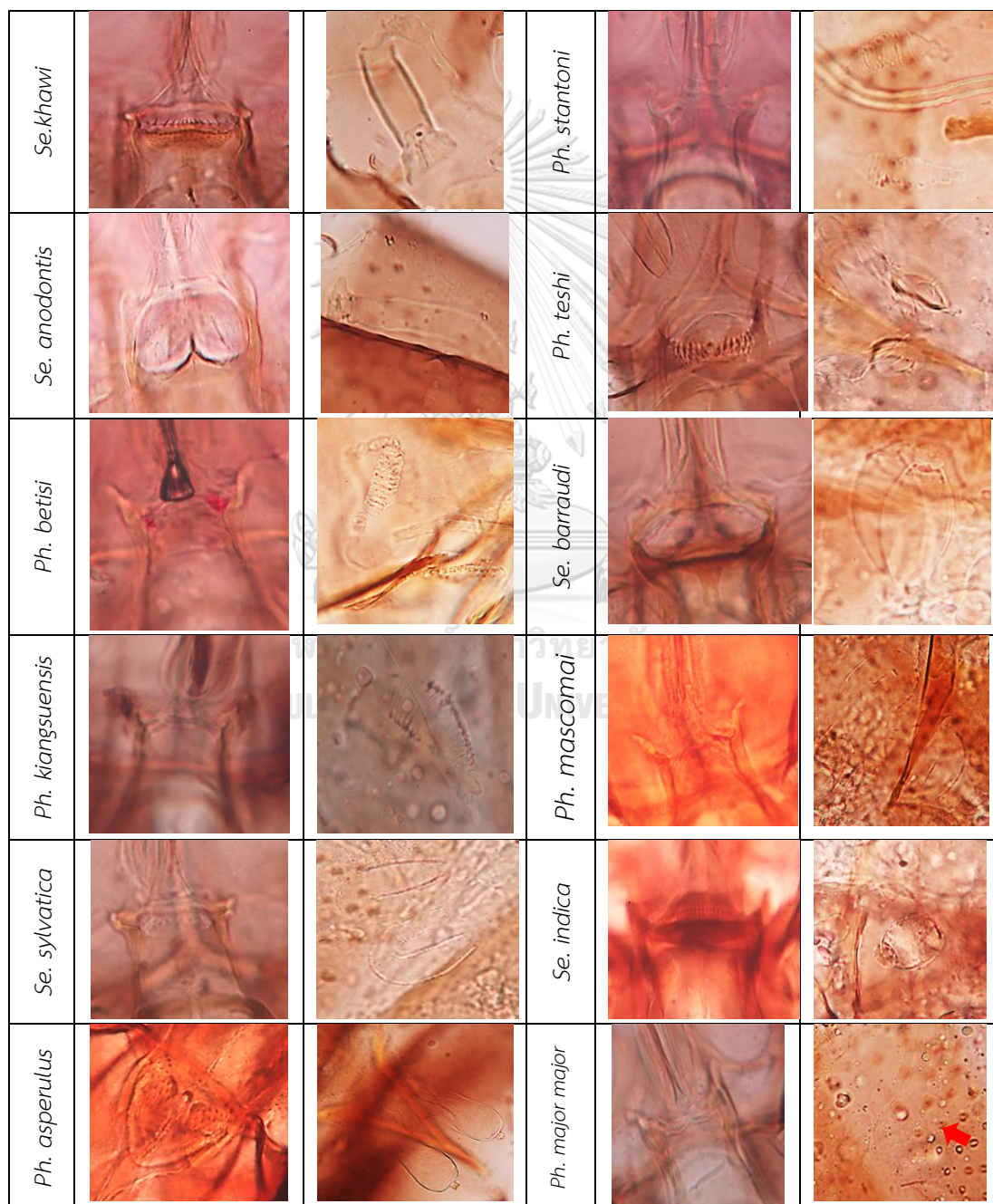
Crosstab					
			Trypanosoma		Total
			positive	negative	
Province	Chiang Rai	Count	1	60	61
		% within Province	1.6%	98.4%	100.0%
		% within Trypanosoma	5.3%	12.5%	12.2%
		Adjusted Residual	-.9	.9	
	Songkhla	Count	5	175	180
		% within Province	2.8%	97.2%	100.0%
		% within Trypanosoma	26.3%	36.4%	36.0%
		Adjusted Residual	-.9	.9	
	Phatthalung	Count	2	134	136
		% within Province	1.5%	98.5%	100.0%
		% within Trypanosoma	10.5%	27.9%	27.2%
		Adjusted Residual	-1.7	1.7	
	Chumphon	Count	11	112	123
		% within Province	8.9%	91.1%	100.0%
		% within Trypanosoma	57.9%	23.3%	24.6%
		Adjusted Residual	3.4	-3.4	
Total	Count	19	481	500	
	% within Province	3.8%	96.2%	100.0%	
	% within Trypanosoma	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests			
Pearson Chi-Square	Value	df	Asymp. Sig (2 sided)
Likelihood Ratio	12.212 ^a	3	.007
Linear-by-Linear	10.686	3	.014
Association	6.596	1	.010
N of Valid Cases	500		

a. 2 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.32.

4.19 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรึ้นฝอยทราย

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของรึ้นฝอยทรายเทศเมีย จำนวน 276 ตัวอย่าง พบว่าเป็นรึ้นฝอยทราย *Se. khawi* 80 ตัวอย่าง *Se. anodontis* 72 ตัวอย่าง *Ph. betisi* 41 ตัวอย่าง *Ph. kiangsuensis* 21 ตัวอย่าง *Se. sylvatica* 16 ตัวอย่าง *Ph. asperulus* 14 ตัวอย่าง *Ph. stantoni* 9 ตัวอย่าง *Ph. teshi* 7 ตัวอย่าง *Se. barraudi* 6 ตัวอย่าง *Ph. mascomai* 5 ตัวอย่าง *Se. indica* 3 ตัวอย่าง และ *Ph. major major* 2 ตัวอย่าง



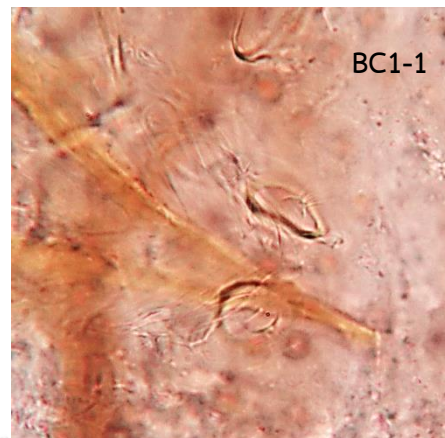
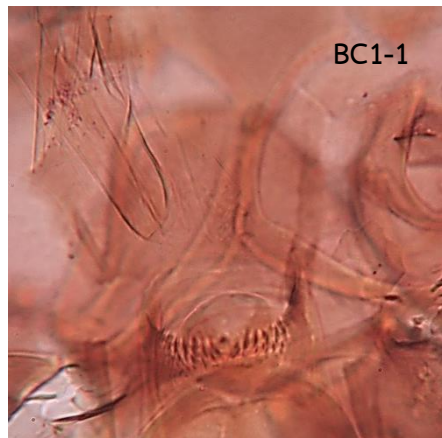
4.20 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรื้อนฝอยทรายที่พบเชื้อ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยดูจากลักษณะของ Pharynx , Cibarium และ Spermatheca ของรื้อนฝอยทรายจำนวน 20 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อลิซมาเนีย และเชื้อทริฟพาโนโซม พบรื้อนฝอยทรายชนิด *Phlebotomus teshi* จำนวน 1 ตัวอย่าง *Sergentomyia khawi* จำนวน 7 ตัวอย่าง *Sergentomyia indica* จำนวน 1 ตัวอย่าง *Phlebotomus asperulus* จำนวน 3 ตัวอย่าง *Phlebotomus betisi* จำนวน 2 ตัวอย่าง และ *Sergentomyia anodontis* จำนวน 6 ตัวอย่าง (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรื้อนฝอยทรายที่พบเชื้อ

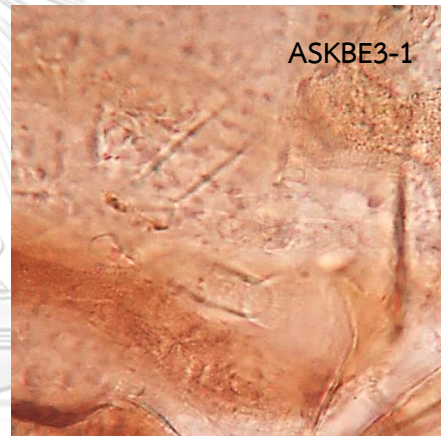
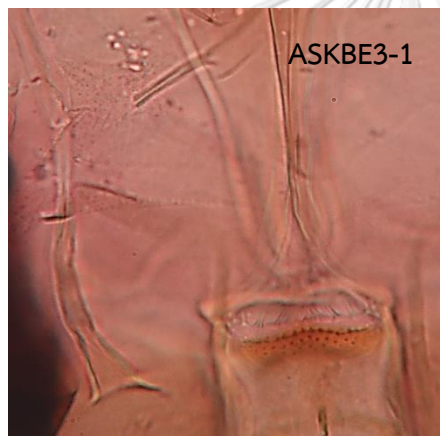
ลำดับ	จังหวัด	รหัสตัวอย่าง	เชื้อที่พบ	ชนิดของรื้อนฝอยทราย
1	เชียงราย	BC1-1	<i>Trypanosoma noyesi</i>	<i>Phlebotomus teshi</i>
2	สงขลา	ASKBE3-1	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sergentomyia khawi</i>
3	สงขลา	ASKBE3-1	<i>Leishmania martiniquensis</i>	<i>Sergentomyia khawi</i>
4	สงขลา	BSKT4-3	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sergentomyia khawi</i>
5	สงขลา	BSKBE6-1	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sergentomyia khawi</i>
6	สงขลา	BSKBE6-2	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sergentomyia khawi</i>
7	สงขลา	SK4-1	<i>Leishmania martiniquensis</i>	<i>Sergentomyia khawi</i>
8	พัทลุง	CPLT1-2	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sergentomyia khawi</i>
9	พัทลุง	CPLT1-3	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sergentomyia indica</i>
10	ชุมพร	ECPE1-20	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Phlebotomus asperulus</i>
11	ชุมพร	ECPT5-13	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sergentomyia anodontis</i>
12	ชุมพร	ECPT5-144	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Phlebotomus asperulus</i>
13	ชุมพร	CP8-16	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Phlebotomus betisi</i>
14	ชุมพร	CP8-17	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Phlebotomus betisi</i>
15	ชุมพร	CP8-22	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sergentomyia anodontis</i>
16	ชุมพร	CP8-23	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sergentomyia anodontis</i>
17	ชุมพร	CP8-24	<i>Trypanosoma noyesi</i>	<i>Sergentomyia anodontis</i>
18	ชุมพร	CP8-30	<i>Trypanosoma noyesi</i>	<i>Phlebotomus asperulus</i>
19	ชุมพร	CP8-31	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Sergentomyia anodontis</i>
20	ชุมพร	CP8-35	<i>Trypanosoma noyesi</i>	<i>Sergentomyia anodontis</i>

รูปที่ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรึ้นฝอยทรายที่ตรวจพบเชื้อลิซมาเนีย และทริพาโนโซม



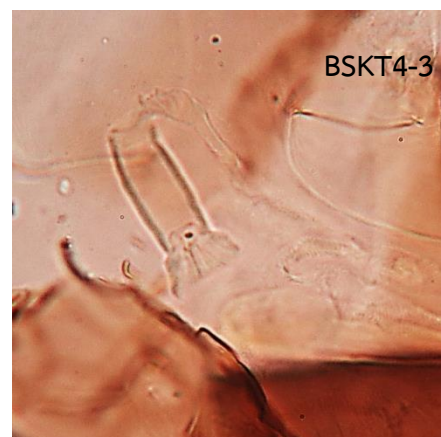
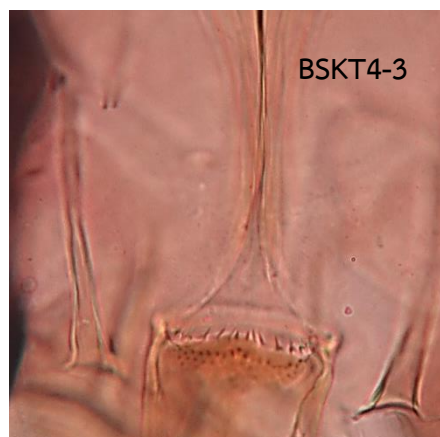
BC1-1 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Phlebotomus teshi*

BC1-1 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus teshi*



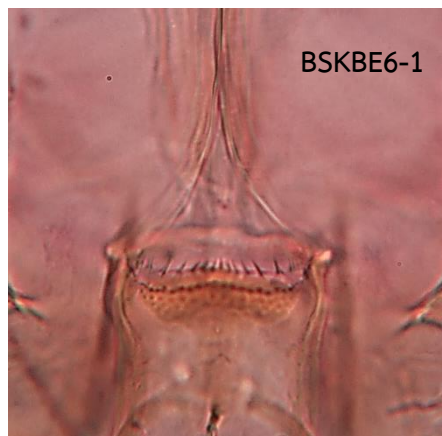
ASKBE3-1 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia khawi*

ASKBE3-1 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Sergentomyia khawi*



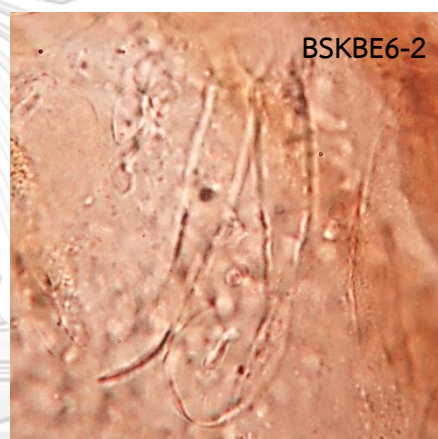
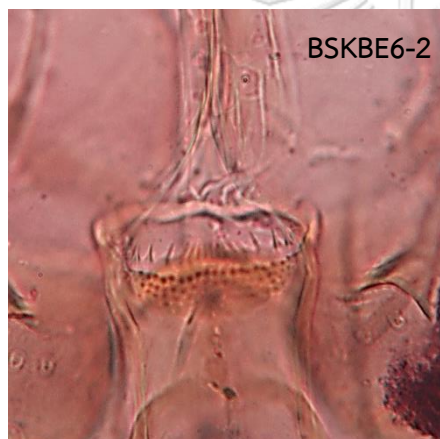
BSKT4-3 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia khawi*

BSKT4-3 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Sergentomyia khawi*



BSKBE6-1 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia khawi*

BSKBE6-1 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Sergentomyia khawi*



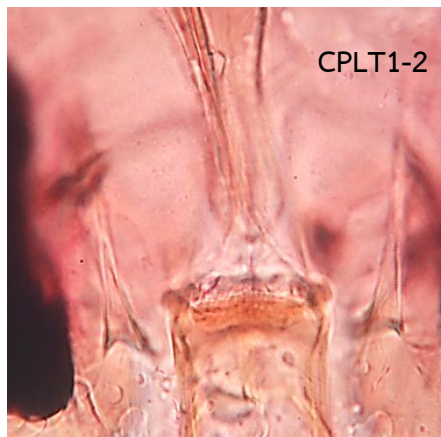
BSKBE6-2 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia khawi*

BSKBE6-2 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Sergentomyia khawi*



SK4-1 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia khawi*

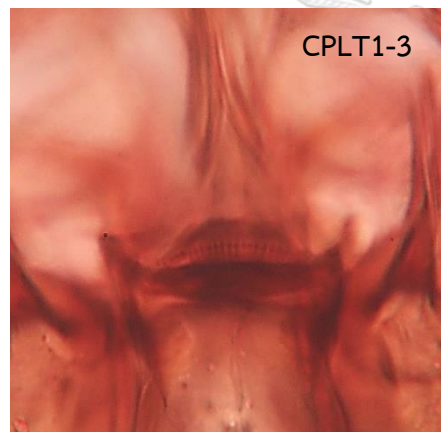
SK4-1 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Sergentomyia khawi*



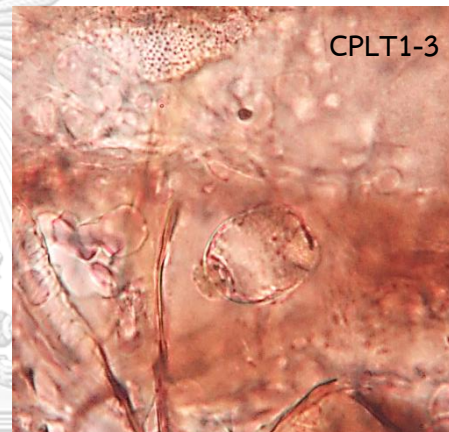
CPLT1-2 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia khawi*



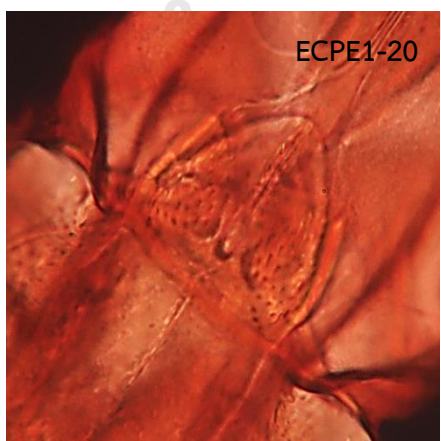
CPLT1-2 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Sergentomyia khawi*



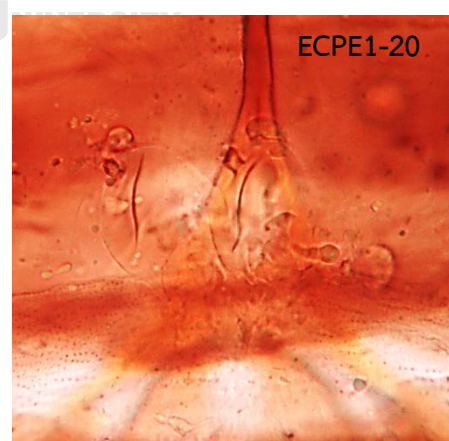
CPLT1-3 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia indica*



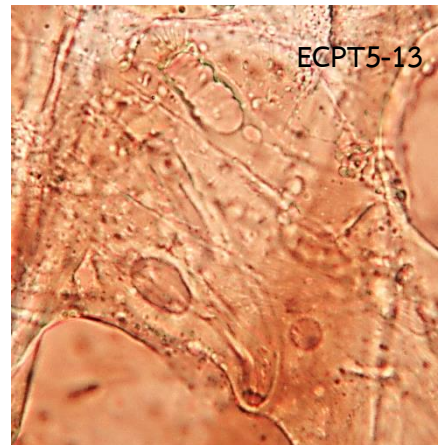
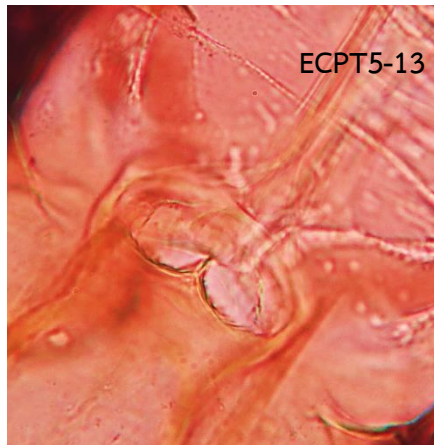
CPLT1-3 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Sergentomyia indica*



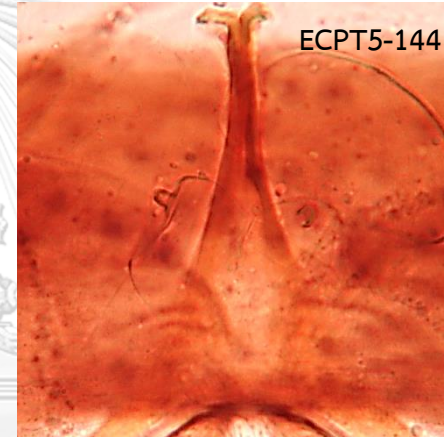
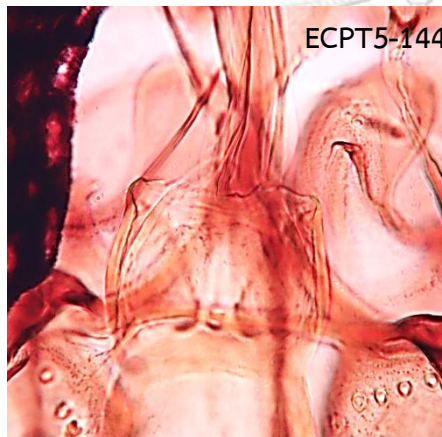
ECPE1-20 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Phlebotomus asperulus*



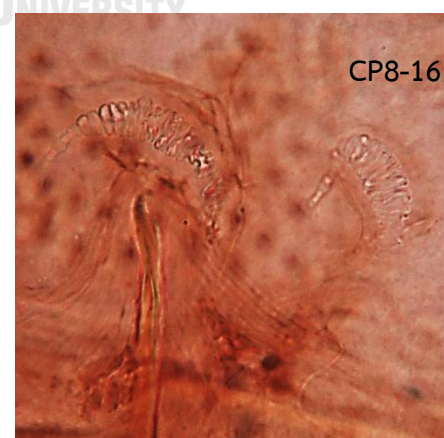
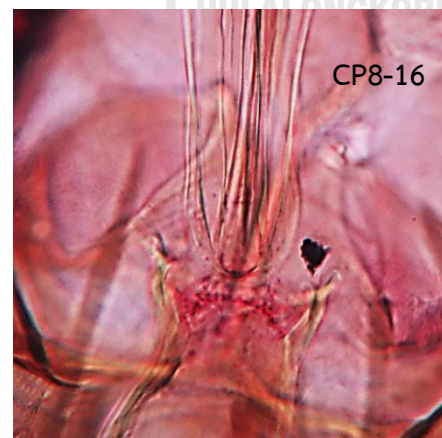
ECPE1-20 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus asperulus*



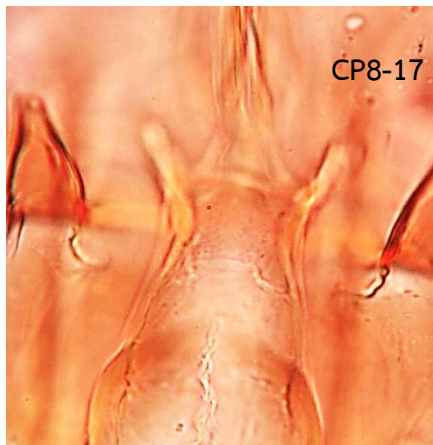
ECPT5-13 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia anodontis*
 ECPT5-13 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus anodontis*



ECPT5-144 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Phlebotomus asperulus*
 ECPT5-144 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus asperulus*

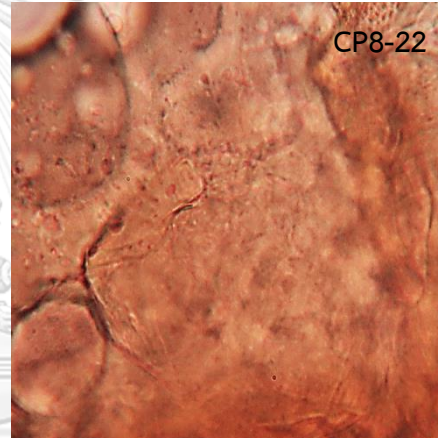
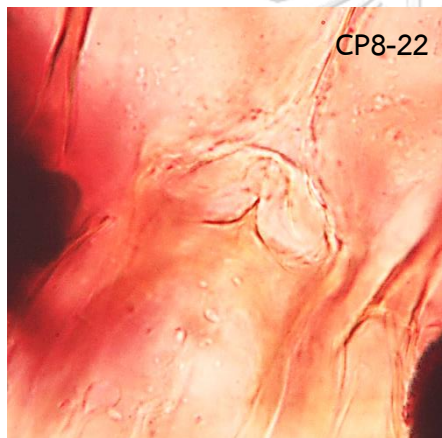


CP8-16 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Phlebotomus betisi*
 CP8-16 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus betisi*



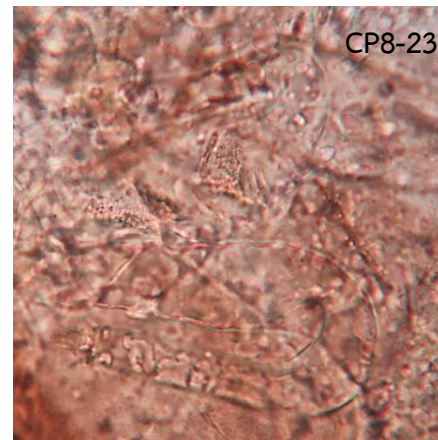
CP8-17 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Phlebotomus betisi*

CP8-17 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus betisi*



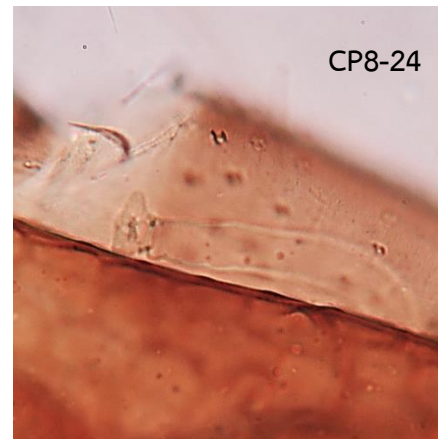
CP8-22 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia anodontis*

CP8-22 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus anodontis*

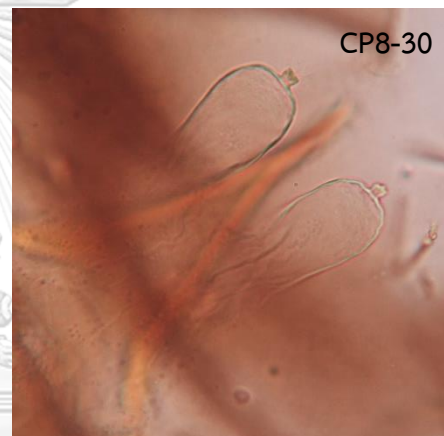


CP8-23 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia anodontis*

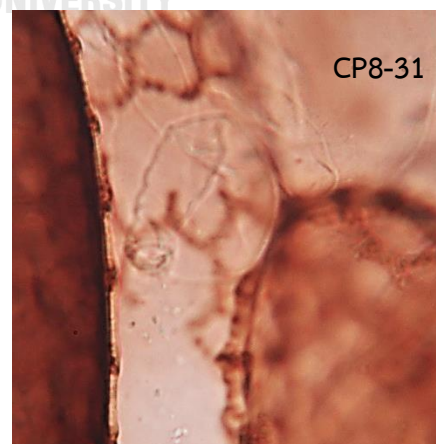
CP8-23 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus anodontis*



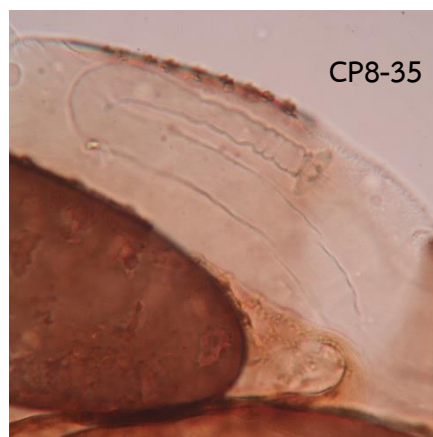
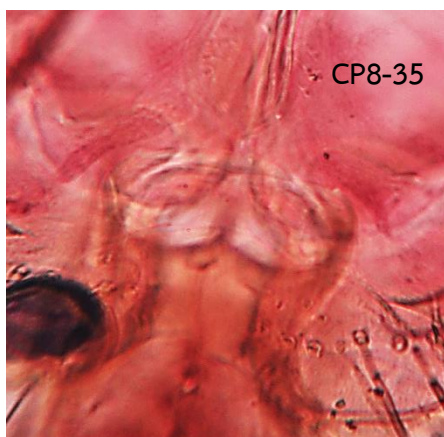
CP8-24 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia anodontis*
 CP8-24 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus anodontis*



CP8-30 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Phlebotomus asperulus*
 CP8-30 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus asperulus*



CP8-31 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia anodontis*
 CP8-31 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus anodontis*



CP8-35 ภาพซ้าย แสดงลักษณะ Cibarium ของ *Sergentomyia anodontis*

CP8-35 ภาพขวา แสดงลักษณะ Spermatheca ของ *Phlebotomus anodontis*

4.21 ผลการขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS1* ยีน *SSU rRNA* และยีน *COI* ของเชื้อไลชมาเนีย เชื้อทริพพาโนโซม และรีนฝอยทรายตามลำดับ ได้จากการเตรียมข้อมูลเพื่อส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยื่นขอเลขทะเบียน (accession number) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่าง โดยเข้าใช้แบบออนไลน์จากโปรแกรมออนไลน์ Bankit เพื่อเพิ่มข้อมูลและเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ลงไปในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการส่งตัวอย่างจำนวน 41 โคลนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไลชมาเนีย เชื้อทริพพาโนโซม และรีนฝอยทรายที่ได้ทำการศึกษา สำหรับผลการการยื่นขอเลขทะเบียน (accession number) คือ MK603807-MK603827 และ MK807977-MK807996

4.22 ผลการวิเคราะห์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์

การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ (intraspecific variation) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบ (alignment) ด้วยโปรแกรม clustal W ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.0.5.3 จากนั้นทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ (intraspecific variation) โดยเลือกโหมด sequence identity matrix

ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ (intraspecific variation) ของเชื้อไลชมาเนีย พบว่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific variation ของเชื้อ *Leishmania martiniquensis*. เท่ากับ 0.3-0.8% (ตารางที่ 22)

ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ของเชื้อทริพพาโนโซม (intraspecific variation) พบว่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific variation ของเชื้อ *Trypanosoma sp.* เท่ากับ 0.5-17.3% (ตารางที่ 23) และ เปอร์เซ็นต์ intraspecific variation

ของเชื้อ *Trypanosoma noyesi* เท่ากับ 1-2.6%(ตารางที่ 24) ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อทริพาฟาโนโซม พบว่าเปอร์เซ็นต์ interspecific variation เท่ากับ 8.9-16.4% (ตารางที่ 25)

Code	SK4-1	ASKBE3-1	LE-San1	LEBM-So
SK4-1	—			
ASKBE3-1	0.992			
LE-San1	0.992	0.994		
LEBM-So	0.994	0.997	0.997	—

ตารางที่ 22 เปอร์เซ็นต์ intraspecific variation ของเชื้อ *Leishmania martiniquensis*

Code	ECPE1-20	ECPT5-13	ECPT5-144	CP8-16	CP8-17	CP8-22	CP8-23	BC1-1	CPLT1-2A	CPLT1-2B	ASKBE3-1	ASKT3-2	BSKT4-3	BSKBEG-1	BSKT6-2
ECPE1-20	-														
ECPT5-13	0.904														
ECPT5-144	0.904	0.995													
CP8-16	0.904	0.971	0.969												
CP8-17	0.908	0.99	0.988	0.975											
CP8-22	0.907	0.988	0.986	0.976	0.995										
CP8-23	0.977	0.913	0.913	0.899	0.921	0.919									
BC1-1	0.827	0.911	0.911	0.887	0.904	0.902	0.836								
CPLT1-2A	0.924	0.969	0.969	0.968	0.973	0.972	0.905	0.885							
CPLT1-2B	0.923	0.979	0.976	0.976	0.983	0.981	0.906	0.893	0.988						
ASKBE3-1	0.9	0.993	0.991	0.969	0.988	0.986	0.911	0.909	0.965	0.974					
ASKT3-2	0.908	0.967	0.967	0.965	0.974	0.969	0.898	0.882	0.977	0.982	0.963				
BSKT4-3	0.88	0.955	0.953	0.942	0.959	0.958	0.885	0.872	0.943	0.951	0.94				
BSKBEG-1	0.976	0.921	0.921	0.898	0.916	0.914	0.986	0.846	0.902	0.903	0.922	0.895	0.882		
BSKT6-2	0.909	0.989	0.987	0.972	0.993	0.991	0.917	0.903	0.973	0.985	0.985	0.974	0.963	0.913	-

ตารางที่ 23 เปอร์เซ็นต์ความแปรผันภายในสปีชีส์ของเชื้อ *Trypanosoma* sp.

Code	CP8-24	CP8-30	CP8-35	BC1-1
CP8-24	-			
CP8-30	0.979			
CP8-35	0.99	0.976		
BC1-1	0.99	0.974	0.985	-

ตารางที่ 24 เปอร์เซ็นต์ความแปรผันภายในสายพันธุ์ (*Trypanosoma noyesi*)

Code	ECPE1-20	ECPT5-13	ECPT5-144/CP8-16	CP8-17	CP8-22	CP8-23	CP8-31	CPLT1-2A	CPLT1-2B	ASKBE3-1	ASKT3-2	BSKT4-3	BSKBEG-1	BSKT6-2	CP8-24	CP8-30	CP8-35	BC1-1
ECPE1-20	-																	
ECPT5-13	0.92																	
ECPT5-144	0.92	0.995																
CP8-16	0.899	0.958	0.956															
CP8-17	0.918	0.978	0.976	0.975														
CP8-22	0.916	0.976	0.974	0.976	0.995													
CP8-23	0.992	0.917	0.917	0.896	0.917	0.915												
CP8-31	0.912	0.918	0.918	0.893	0.913	0.911	0.915											
CPLT1-2A	0.924	0.993	0.991	0.964	0.983	0.982	0.919	0.915										
CPLT1-2B	0.923	0.985	0.983	0.971	0.992	0.99	0.92	0.916	0.989									
ASKBE3-1	0.916	0.993	0.991	0.958	0.978	0.976	0.915	0.918	0.991	0.983								
ASKT3-2	0.906	0.96	0.96	0.96	0.971	0.967	0.903	0.901	0.964	0.975	0.958							
BSKT4-3	0.889	0.947	0.945	0.942	0.959	0.958	0.885	0.882	0.952	0.96	0.945	0.94						
BSKBEG-1	0.994	0.921	0.921	0.896	0.916	0.914	0.99	0.917	0.918	0.919	0.922	0.903	0.885					
BSKT6-2	0.92	0.982	0.98	0.972	0.993	0.991	0.917	0.913	0.986	0.996	0.98	0.974	0.963	0.917				
CP8-24	0.843	0.898	0.897	0.889	0.906	0.904	0.84	0.844	0.902	0.911	0.896	0.89	0.877	0.84	0.908			
CP8-30	0.84	0.895	0.896	0.884	0.905	0.901	0.837	0.839	0.899	0.908	0.892	0.891	0.874	0.837	0.905	0.979		
CP8-35	0.839	0.894	0.893	0.886	0.906	0.902	0.836	0.84	0.898	0.907	0.892	0.894	0.876	0.836	0.907	0.99	0.976	
BC1-1	0.84	0.898	0.897	0.883	0.902	0.9	0.837	0.846	0.898	0.907	0.898	0.885	0.873	0.843	0.904	0.99	0.974	0.985

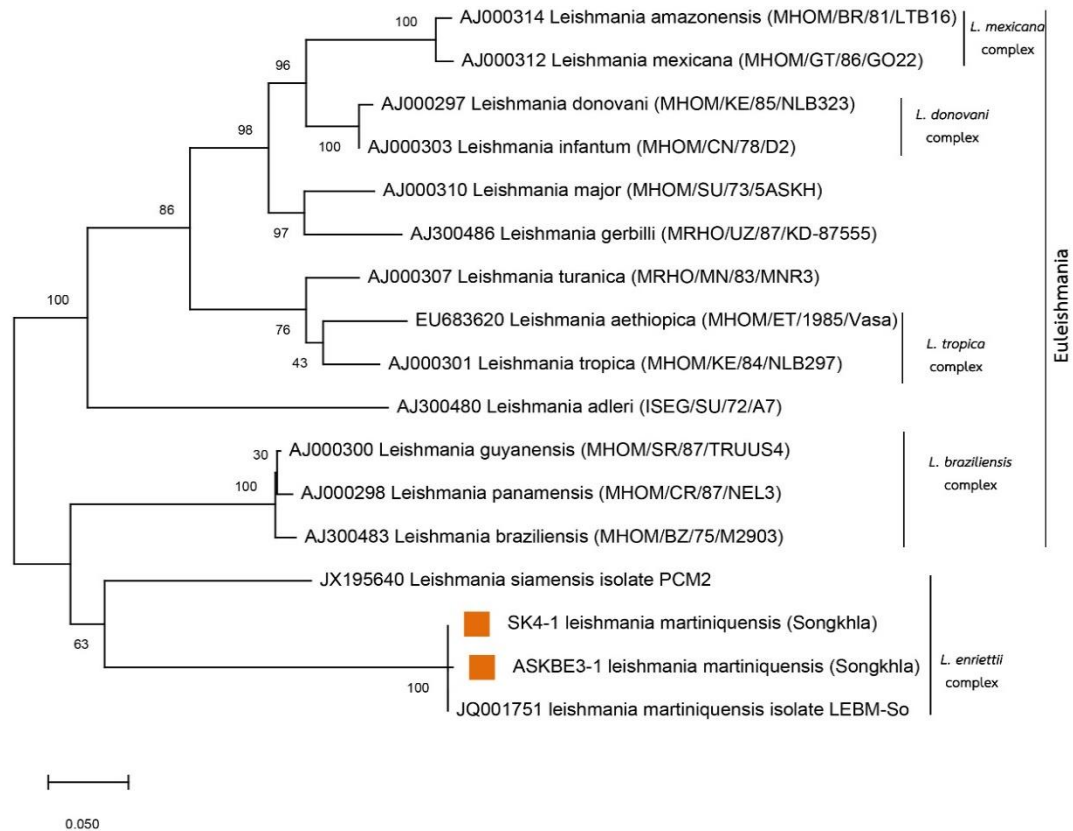
ตารางที่ 25 interspecific variation ของ *Trypanosoma* sp. และ *Trypanosoma*

4.23 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ

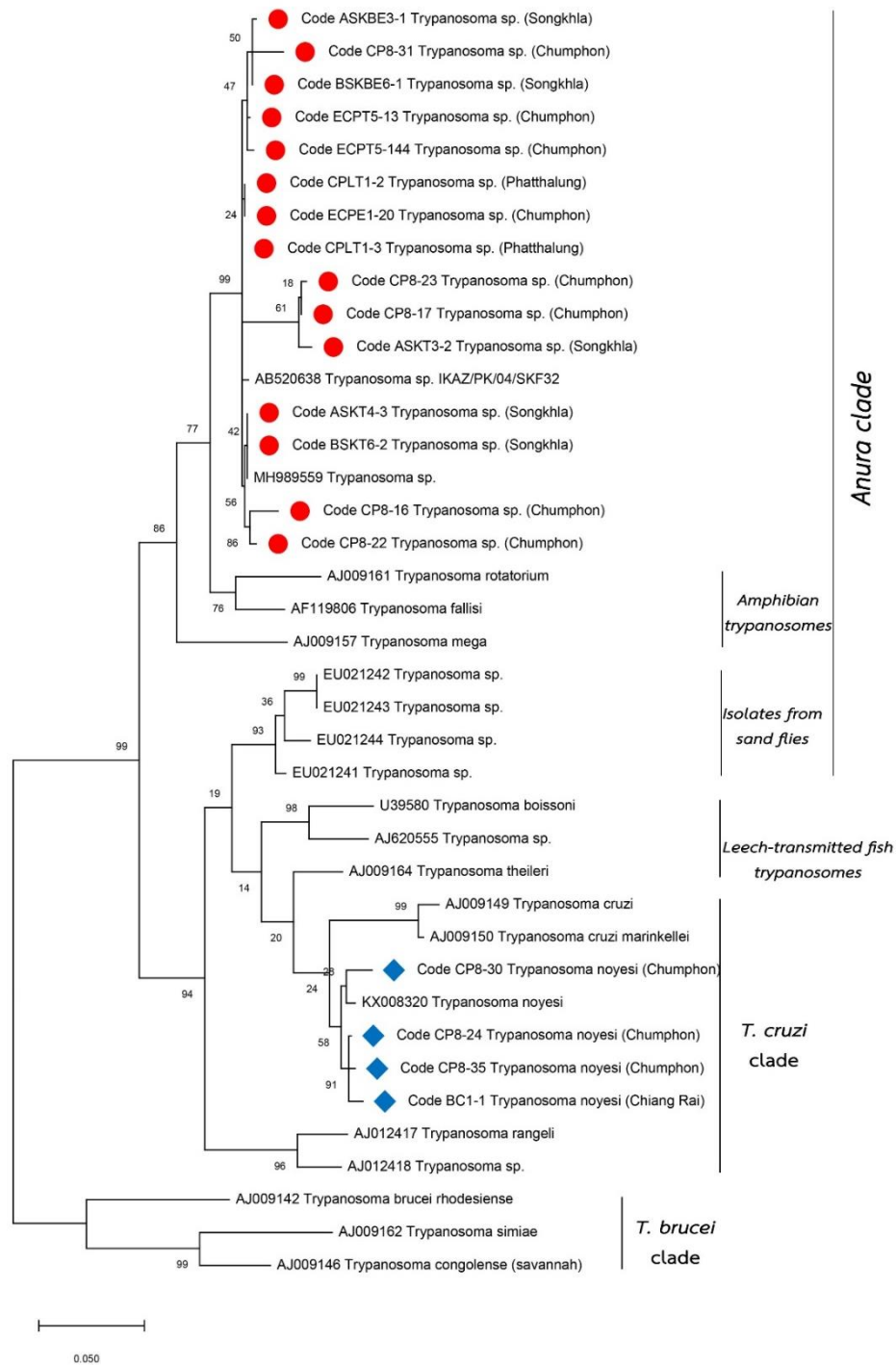
จากการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม MEGA version X โดยวิธี maximum likelihood method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) และตรวจความน่าเชื่อถือทางสถิติโดยใช้ bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ (68) จากผลการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของลิซมาเนีย จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *ITS1* และเปรียบเทียบเทียบกับ reference sequence จากฐานข้อมูล GenBank ตัวอย่างรหัส ASKBE3-1 และ SK4-1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Leishmania martiniquensis* (acc no.JQ001751) (69) (รูปที่ 19)

จากผลการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของทริพพาโนโซม จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *SSU rRNA* และเปรียบเทียบเทียบกับ reference sequence จากฐานข้อมูล GenBank ตัวอย่างรหัส CP8-16, CP8-17, CP8-22, CP8-23, CP8-31, ECPE1-20, ECPT5-13, ECPT5-144, CPLT1-2, CPLT1-3, ASKBE3-1, ASKT3-2, BSKT4-3, BSKBE6-1, BSKT6-2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Trypanosoma* spp. (acc no.MH989559, AB520638) และ ตัวอย่างรหัส CP8-24, CP8-30, CP8-35, BC1-1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Trypanosoma noyesi* (acc no.KX008320) (22) (รูปที่ 20)

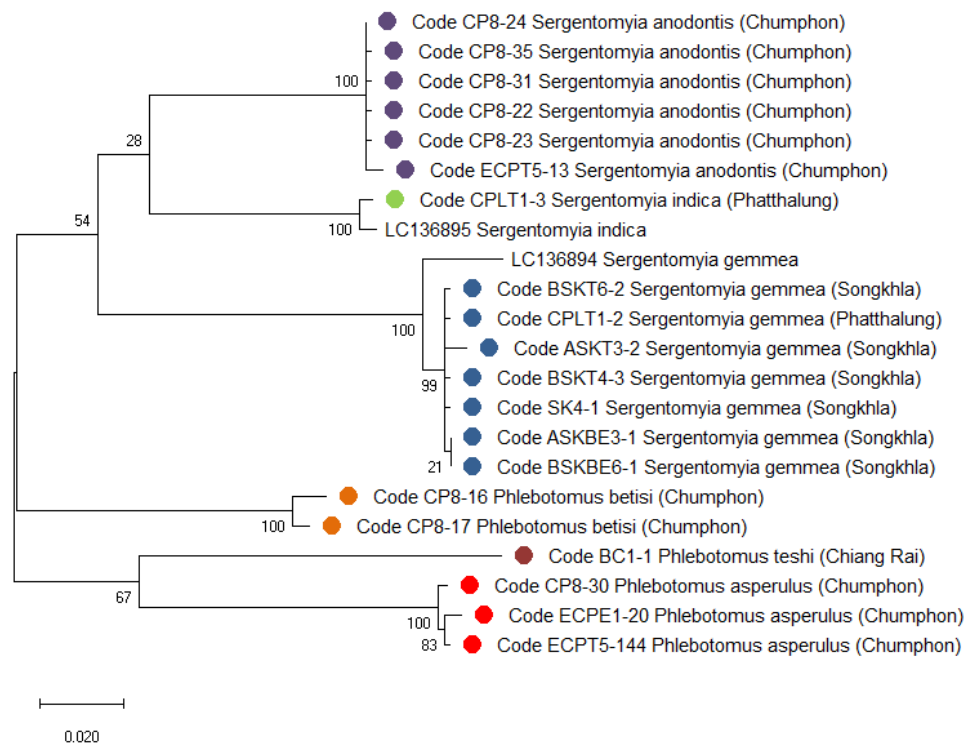
จากผลการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของริ้นฝอยทราย จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *COI* สามารถแยกกลุ่มของริ้นฝอยทราย ได้ 6 กลุ่ม คือ *Sergentomyia anodontis*, *Sergentomyia indica*, *Sergentomyia khawi*, *Phlebotomus betisi*, *Phlebotomus teshi* และ *Phlebotomus asperulus* และเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของฐานข้อมูล GenBank ตัวอย่างรหัส CPLT1-3 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Sergentomyia indica* (acc no.LC136895) และตัวอย่างรหัส ASKBE3-1, ASKT3-2, BSKT4-3, BSKBE6-1, BSKT6-2, CPLT1-2, SK4-1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Sergentomyia gemmea* (acc no. LC136894) และในส่วนของ *Sergentomyia anodontis* ตัวอย่างรหัส CP8-22, CP8-23, CP8-24, CP8-31, CP8-35, ECPT5-13, *Phlebotomus betisi* ตัวอย่างรหัส CP8-16, CP8-17 *Phlebotomus teshi* ตัวอย่างรหัส BC1-1 และ *Phlebotomus asperulus* ตัวอย่างรหัส CP8-30, ECPE1-20, ECPT5-144 ไม่พบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งของยีน *COI* ใน ฐานข้อมูล GenBank แต่ใช้การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (รูปที่ 21)



รูปที่ 19 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS1* ของเชื้อ *Leishmania* spp. ที่แยกได้จากติเอ็นเอของรื้อนฝอยทราย โดยใช้ maximum likelihood method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ



รูปที่ 20 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SSU rRNA* ของเชื้อ *Trypanosoma* spp. ที่แยกได้จากดีเอ็นเอของรึ้นฝอยทราย โดยใช้ maximum likelihood method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ



รูปที่ 21 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ของริ้นฝอยทราย โดยใช้ maximum likelihood method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

รึ้นฝอยทรายเป็นปรสิตภายนอกที่มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยเป็นพาหะของโรค ลิซมาเนีย การศึกษาในปัจจุบันพบรึ้นฝอยทรายมากกว่า 700 ชนิด และมีประมาณ 70 ชนิดที่สามารถ เป็นพาหะนำโรคลิซมาเนีย และที่ยังสงสัยว่าจะจะเป็นพาหะอีก 48 ชนิด ซึ่งรึ้นฝอยทรายแต่ละชนิดมี ความจำเพาะต่อเชื้อลิซมาเนียที่แตกต่างกัน (14-16) ดังนั้นความแม่นยำในการจำแนกสายพันธุ์จึงมี ความสำคัญต่อการป้องกันและควบคุมโรคเป็นอย่างยิ่ง การระบุสายพันธุ์โดยการศึกษาลักษณะทาง สัณฐานวิทยา เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการจำแนกชนิดของรึ้นฝอยทราย แต่วิธีการดังกล่าว ต้องอาศัย ความเชี่ยวชาญอย่างสูงทางด้านอนุกรมวิธาน จึงจะสามารถจำแนกชนิดได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ในขณะที่การศึกษาทางอณูชีววิทยา สามารถศึกษาได้จากยีนที่อยู่ทั้งในไมโทเคลียส และยีนใน ไมโตคอนเดรีย โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาไปเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank เพื่อระบุชนิด ซึ่งมีความจำเพาะสูงในการตรวจ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษานิวคลีโอไทด์ของ รึ้นฝอย ทรายด้วยกัน 2 วิธี คือ ศึกษาชนิดของรึ้นฝอยทรายด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ในบริเวณ *CytB* และ บริเวณ *COI* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย ร่วมกับ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรึ้นฝอยทรายด้วย เพื่อให้เกิดความแม่นยำของข้อมูล มากที่สุด

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการตรวจหาเชื้อลิซมาเนีย และทริพาโนโซมในรึ้นฝอยทรายจำนวน 500 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นรึ้นฝอยทรายเพศเมีย จำนวน 276 ตัวอย่าง และ รึ้นฝอยทรายเพศผู้ จำนวน 224 ตัวอย่าง ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรึ้นฝอยทรายเฉพาะเพศเมีย โดยดู จากลักษณะของ Cibarium และ Spermatheca (58) พบรึ้นฝอยทรายทั้งหมด 12 สายพันธุ์ ที่เก็บจากจังหวัดสงขลา 37 ตัวอย่าง (*Se. khawi* 78.38%, *Se. anodontis* 10.81%, *Ph. stantoni* และ *Se. barraudi* อย่างละ 5.41%) จังหวัดพัทลุง 64 ตัวอย่าง (*Se. khawi* 78.13%, *Ph. kiangsuensis* 9.38%, *Ph. betisi* และ *Se. barraudi* อย่างละ 4.69% และ *Se. indica* 3.13%) จังหวัดเชียงราย 56 ตัวอย่าง (*Se. anodontis* 37.71%, *Se. sylvatica* 26.79, *Ph. stantoni* และ *Ph. teshi* อย่างละ 12.5%, *Ph. mascomai* 7.14%, *Se. khawi* และ *Se. indica* อย่างละ 1.79%) และจังหวัดชุมพร 119 ตัวอย่าง (*Se. anodontis* 40.34%, *Ph. betisi* 31.93%, *Ph. kiangsuensis* 12.60%, *Ph. asperulus* 11.76%, *Ph. major major* 1.68%, *Se. sylvatica* และ *Ph. mascomai* อย่างละ 0.84%) จากการศึกษาพบว่า รึ้นฝอยทรายในแต่ละ จังหวัดมีจำนวนและสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน เนื่องจากความหลากหลายและจำนวนประชากรของ

รึ้นฝอยทราย จะมีความสัมพันธ์กับนิเวศวิทยา เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ฤดูกาล อาหารของรึ้นฝอย ทราย ชนิดของสัตว์รังโรค และจำนวนของสัตว์รังโรค (70)

นอกจากนี้เรายังใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้สำหรับการจำแนกชนิดของรึ้นฝอยทรายที่ให้ ผลบวกต่อเชื้อลิซมาเนีย และทริฟพาโนโซม จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยการเพิ่มขึ้นส่วนของยีน *CytB* และ *COI* ด้วยวิธี PCR พบว่า ยีน *CytB* ให้ผลบวก 2 ตัวอย่าง และยีน *COI* ให้ผลบวก 20 ตัวอย่าง และเมื่อนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งของยีน *CytB* ที่ตรวจได้ไปทำการเปรียบเทียบกับ ข้อมูลนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank พบว่า สามารถระบุชนิดของรึ้นฝอยทรายได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Ph. perniciosus* และ *Se. gemmea* แต่เมื่อนำไปจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เป็นรึ้นฝอยทราย *Ph. betisi* และ รึ้นฝอยทราย *Se. anodontis* ส่วนที่ตำแหน่งของยีน *COI* เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank พบว่า สามารถระบุชนิดได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Se.khawi* (35%) และ *Se. indica* (5%) ส่วนอีก 4 สายพันธุ์ ไม่พบข้อมูลนิวคลีโอไทด์ใน ฐานข้อมูล GenBank ผู้วิจัยจึงใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามาช่วยในการจำแนก พบว่า เป็นรึ้นฝอย ทราย *Se.anodontis* (30%), *Ph. asperulus* (15%), *Ph. betisi* (10%) และ *Ph. teshi* (5%) และในงานวิจัยนี้พบว่า ตำแหน่งของยีน *CytB* ให้ผลบวกทาง PCR น้อยกว่าตำแหน่งของยีน *COI* โดย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Depaquit et al. (2015) ที่มีรายงานการศึกษาชนิดของรึ้นฝอยทรายด้วย วิธี PCR โดยการเปรียบเทียบยีนไมโทคอนเดรีย ระหว่าง ยีน *CytB* และ ยีน *COI* แสดงให้เห็นว่า ยีน *CytB* เป็น marker พื้นฐานสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของรึ้นฝอยทราย แต่ยีน *COI* เป็น marker ที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่า จึงทำให้ยีน *COI* มีความสามารถในการ ตรวจรึ้นฝอยทรายได้ดีกว่า (71) และในการศึกษานี้การจำแนกชนิดของรึ้นฝอยทรายด้วยวิธีทาง อณูชีววิทยาและ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่ตรงกัน หรือไม่พบข้อมูลในฐานข้อมูลเป็นบางตัวอย่าง เป็นเพราะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CytB* และ *COI* ในฐานข้อมูล GenBank ยังมีข้อมูลอยู่อย่าง จำกัด จึงต้องอาศัยการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยามาใช้ในการจำแนกร่วมกันด้วย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งยีน *COI* ของรึ้นฝอยทราย พบว่า ผลการเปรียบเทียบความหลากหลายภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecific variation) ของทั้ง 6 สายพันธุ์ (*Se.khawi* *Se.anodontis*, *Ph. asperulus*, *Ph. betisi*, *Se. indica* และ *Ph. teshi*) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความต่างอยู่ระหว่าง 0-1.3% และผลการเปรียบเทียบความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ (interspecific variation) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความต่างอยู่ระหว่าง 9.9-16.4% และเมื่อทำการ วิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการของรึ้นฝอยทรายเป็นบนตำแหน่งของ ยีน *COI* ในงานวิจัยนี้ พบว่า มีการเข้า

กลุ่มกันของริ้นฝอยทรายสายพันธุ์เดียวกัน โดย *Se. khawi* และ *Se. indica* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Se. khawi* (Accession No. LC136894) และ *Se. indica* (Accession No. LC136895) ที่พบในจังหวัดลำปางของประเทศไทย (65) ส่วน *Se. anodontis*, *Ph. asperulus*, *Ph. betisi* และ *Ph. teshi* ไม่พบข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank

การตรวจหาเชื้อลิชมาเนีย (*ITS1* gene) และเชื้อทริพาโนโซม (*SSU rRNA* gene) จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากริ้นฝอยทราย จำนวน 500 ตัวอย่าง ด้วยวิธี PCR พบว่า ยีน *ITS1* ให้ผลบวก 2 ตัวอย่าง และ ยีน *SSU rRNA* ให้ผลบวก 19 ตัวอย่าง และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งของยีน *ITS1* ที่ตรวจพบไปทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank สามารถระบุชนิดของเชื้อลิชมาเนียได้ 1 สายพันธุ์ คือ *Leishmania martiniquensis* (Accession No. JQ001751) ที่พบในริ้นฝอยทราย *Se. khawi* จากจังหวัดสงขลามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ เชื้อ *L. martiniquensis* ที่มีรายงานในผู้ป่วยลิชมาเนียชาวไทย ในจังหวัดสงขลา และจังหวัดตรัง ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ *Leishmania enriettii* complex และในกลุ่มนี้ยังมีเชื้อลิชมาเนียที่พบในผู้ป่วยชาวไทยที่สำคัญ อีกหนึ่งชนิด คือ *L. siamensis* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อลิชมาเนียที่พบในประเทศไทยทั้งสองชนิด มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Chusri et al. (2012) และ Leelayoova et al. (2017) ส่วนที่ตำแหน่งของยีน *SSU rRNA* สามารถระบุชนิดของเชื้อทริพาโนโซมได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Trypanosoma* sp. (78.95%) ที่พบในริ้นฝอยทราย 5 สายพันธุ์ (*Se. khawi*, *Se. anodontis*, *Ph. asperulus*, *Ph. betisi* และ *Se. indica*) ที่พบในจังหวัด สงขลา พัทลุง และชุมพร ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Trypanosoma* sp. ที่มีรายงานจากประเทศปากีสถาน (Accession No. MH989559) (22) และ *Trypanosoma noyesi* (21.05%) ที่พบในริ้นฝอยทราย 3 สายพันธุ์ (*Se. anodontis*, *Ph. asperulus* และ *Ph. teshi*) ที่พบใน จังหวัด เชียงราย และ ชุมพร ที่มีความใกล้เคียงกับ *Trypanosoma noyesi* ที่พบในสัตว์ป่าในประเทศออสเตรเลีย (Accession No. KX008320) และยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *T. cruzi* clade ที่เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ (72) และในงานวิจัยนี้ยังพบ Co-infection ระหว่างเชื้อ *L. martiniquensis* และ *Trypanosoma* sp. ในริ้นฝอยทราย *Se. khawi* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ferreira et al. (2015) ที่มีการตรวจพบ Co-infection ของเชื้อที่อยู่ในวงศ์ Trypanosomatidae ในริ้นฝอยทรายในประเทศบราซิล ซึ่งแสดงให้เห็นว่านอกจากริ้นฝอยจะเป็นพาหะของโรคลิชมาเนียแล้ว ยังพบ Trypanosomatid protozoa สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และสัตว์แพทย์ในริ้นฝอยทรายด้วย (19) ซึ่ง *Trypanosoma* spp. ทั้งสองสายพันธุ์

(*Trypanosoma* sp. และ *T. noyesi*) ที่พบในงานวิจัยนี้ มีความแตกต่างจาก Unknown *Trypanosoma* spp. ในรีนฝอยทราย *Ph. stantoni* (2.22%) ที่ตรวจพบในงานวิจัยของ Phumee et al. (2017) ซึ่งเป็นการตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในรีนฝอยทรายครั้งแรกในประเทศไทย (35) และที่งานวิจัยนี้ไม่พบ Unknown *Trypanosoma* spp. สายพันธุ์เดียวกับที่พบในงานวิจัยก่อนหน้า อาจเป็นเพราะในงานวิจัยนี้มีการตรวจพบตัวอย่างของรีนฝอยทราย *Ph. stantoni* ที่เป็นพาหะของ Unknown *Trypanosoma* spp. ในงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้ปริมาณน้อย ซึ่งคิดเป็น 3.26% ของรีนฝอยทรายเพศเมียที่พบในงานวิจัยนี้ทั้งหมด และการตรวจพบเชื้อลิซมาเนียและทริพพาโนโซมในงานวิจัยนี้ ยังแสดงให้เห็นว่า ไม่พบเชื้อลิซมาเนียและทริพพาโนโซมในรีนฝอยทรายเพศผู้

นอกจากนี้ความชุกของเชื้อลิซมาเนีย และทริพพาโนโซมที่พบในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรคลิซมาเนีย คือจังหวัดสงขลา พบความชุกของเชื้อลิซมาเนีย 1.1% และเชื้อทริพพาโนโซม 2.8% จังหวัดพัทลุง พบความชุกของเชื้อลิซมาเนีย 0% และเชื้อทริพพาโนโซม 1.5% และในจังหวัดเชียงราย พบความชุกของเชื้อลิซมาเนีย 0% และเชื้อทริพพาโนโซม 1.6% และความชุกของเชื้อลิซมาเนีย และทริพพาโนโซมที่พบในพื้นที่ที่ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคลิซมาเนีย คือจังหวัดชุมพร พบความชุกของเชื้อลิซมาเนีย 0% และเชื้อทริพพาโนโซม 8.9% ซึ่งจะเห็นได้ว่า ความชุกของเชื้อลิซมาเนียที่พบในจังหวัดสงขลา ให้ผลบวกที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยก่อนหน้า ที่มีการตรวจหาเชื้อลิซมาเนียในรีนฝอยทรายของประเทศไทย (62) และการตรวจหาเชื้อทริพพาโนโซมในรีนฝอยทรายในจังหวัดสงขลา พัทลุง และเชียงราย ให้ผลบวกที่ใกล้เคียงกับการตรวจหาเชื้อทริพพาโนโซมในรีนฝอยทรายที่รายงานในงานวิจัยก่อนหน้า แต่ในจังหวัดชุมพร ให้ผลบวกที่สูงกว่าอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าที่มีรายงานการตรวจพบเชื้อทริพพาโนโซมในรีนฝอยทราย (35)

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงอัตราความชุกของเชื้อลิซมาเนียและทริพพาโนโซมในรีนฝอยทรายในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาด และไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคลิซมาเนีย ตลอดจนทราบถึงข้อมูลความหลากหลายของสายพันธุ์ของรีนฝอยทรายที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อลิซมาเนียและทริพพาโนโซมในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทย ซึ่งเป็นข้อมูลใหม่ที่ทำให้เข้าใจระบอบวิทยาของเชื้อลิซมาเนียและทริพพาโนโซมในรีนฝอยทรายได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งข้อมูลดังกล่าวทั้งหมดในงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการป้องกันและควบคุมโรคติดเชื้อลิซมาเนียและทริพพาโนโซมที่อาศัยรีนฝอยทรายเป็นแมลงพาหะในอนาคตต่อไป

บรรณานุกรม

1. เผด็จ สิริยะเสถียร. โรคไลชมาเนียและรีนฝอยทรายแมลงพาหะในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1 ed. กรุงเทพฯ: บริษัทหนังสือดีวัน จำกัด; 2559 เมษายน 2559. 108 p.
2. Theerayudh Sukmee, Suchada Juntasiriyakorn, Kobkarn Kanjanophas. สถานการณ์โรคไลชมาเนียในประเทศไทย (Situation of Leishmaniasis in Thailand). Weekly Epidemiological Surveillance Report. 2011;42(17):260-4.
3. Sukmee T, Siripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y, et al. A suspected new species of Leishmania, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. Int J Parasitol. 2008;38(6):617-22.
4. Thisyakorn U, Jongwutiwes S, Vanichsetakul P, Lertsapcharoen P. Visceral leishmaniasis: the first indigenous case report in Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93(1):23-4.
5. เมฆยน ชีวะเสรีชล. การสอบสวนโรคไลชมาเนียชนิดผิวหนัง อำเภอขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช เดือนธันวาคม 2556. Weekly Epidemiological Surveillance Report. 2557;45(22):337-44.
6. Chusri S, Hortiwakul T, Silpapojakul K, Siriyasatien P. Consecutive cutaneous and visceral leishmaniasis manifestations involving a novel Leishmania species in two HIV patients in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2012;87(1):76-80.
7. Osatakul S, Mungthin M, Siripattanapipong S, Hitakarun A, Kositnitikul R, Naaglor T, et al. Case Report: Recurrences of Visceral Leishmaniasis Caused by Leishmania siamensis after Treatment with Amphotericin B in a Seronegative Child. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2014;90(1):40-2.
8. Bualert L, Charungkiattikul W, Thongsuksai P, Mungthin M, Siripattanapipong S, Khositnithikul R, et al. Case Report: Autochthonous Disseminated Dermal and Visceral Leishmaniasis in an AIDS Patient, Southern Thailand, Caused by Leishmania siamensis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2012;86(5):821-4.
9. Phume A, Kraivichian K, Chusri S, Noppakun N, Vibhagool A, Sanprasert V, et al. Short Report: Detection of Leishmania siamensis DNA in Saliva by Polymerase Chain Reaction. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2013;89(5):899-905.
10. Chiewchanvit S, Tovanabutra N, Jariyapan N, Bates MD, Mahanupab P,

Chuamanochan M, et al. Chronic generalized fibrotic skin lesions from disseminated leishmaniasis caused by *Leishmania martiniquensis* in two patients from northern Thailand infected with HIV. *British Journal of Dermatology*. 2015;173(3):663-70.

11. Kongkaew W, Siriarayaporn P, Leelayoova S, Supparatpinyo K, Areechokchai D, Duang-ngern P, et al. Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2007;38(1):8-12.

12. Pothirat T, Tantiworawit A, Chaiwarith R, Jariyapan N, Wannasan A, Siriyasatien P, et al. First Isolation of *Leishmania* from Northern Thailand: Case Report, Identification as *Leishmania martiniquensis* and Phylogenetic Position within the *Leishmania enriettii* Complex. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(12).

13. Sumruayphol S, Chittsamart B, Polseela R, Sriwichai P, Samung Y, Apiwathnasorn C, et al. Wing geometry of *Phlebotomus stantoni* and *Sergentomyia hodgsoni* from different geographical locations in Thailand. *C R Biol*. 2017;340(1):37-46.

14. Modi GB. Care and maintenance of phlebotomine sandfly colonies. 1997:21-30.

15. ธีระยศ กอบอาษา, สุทธิ ทองขาว, เรวดี แก้วขาว. การศึกษาศักยภาพของริ้นฝอยทรายและหนูในพื้นที่มีผู้ป่วยประเทศไทยต่อการติดเชื้อลิซมาเนีย.

16. prevention Cfdca. Parasites - Leishmaniasis

Centers for disease control and prevention; 2018 [updated July 26, 2018. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>

17. Claborn DM. The biology and control of leishmaniasis vectors. *J Glob Infect Dis*. 2010;2(2):127-34.

18. Dostalova A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*. 2012;5:276.

19. Ferreira Tde S, Minuzzi-Souza TT, Andrade AJ, Coelho TO, Rocha Dde A, Obara MT, et al. Molecular detection of *Trypanosoma* sp. and *Blastocrithidia* sp.

(*Trypanosomatidae*) in phlebotomine sand flies (*Psychodidae*) in the Federal District of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):776-9.

20. Nzelu CO, Kato H, Pupilampu N, Desewu K, Odoom S, Wilson MD, et al. First detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* species in *Sergentomyia* sand flies (*Diptera: Psychodidae*) from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Ghana.

PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(2):e2630.

21. Naiff RD, Barrett TV, Freitas RA. Isolation of *Trypanosoma freitasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from *Psychodopygus clautrei* (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84(2):273-5.
22. Kato H, Uezato H, Sato H, Bhutto AM, Soomro FR, Baloch JH, et al. Natural infection of the sand fly *Phlebotomus kazeruni* by *Trypanosoma* species in Pakistan. Parasit Vectors. 2010;3:10.
23. Zapata S, Mejia L, Le Pont F, Leon R, Pesson B, Ravel C, et al. A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. Parasit Vectors. 2012;5:144.
24. Kraeva N, Butenko A, Hlavacova J, Kostygov A, Myskova J, Grybchuk D, et al. *Leptomonas seymouri*: Adaptations to the Dixenous Life Cycle Analyzed by Genome Sequencing, Transcriptome Profiling and Co-infection with *Leishmania donovani*. PLoS Pathog. 2015;11(8):e1005127.
25. Warburg A. Entomopathogens of phlebotomine sand flies: laboratory experiments and natural infections. J Invertebr Pathol. 1991;58(2):189-202.
26. สรรเพชญ เบญจวงศ์กุลชัย. Leishmaniasis: ศูนย์ผลิตและพัฒนาสื่อคอมพิวเตอร์เพื่อการศึกษา (C.A.I.) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; [Available from: <http://cai.md.chula.ac.th/chulapatho/chulapatho/lecturenote/infection/parasite/leishmaniasis.html>]
27. Jittapalapong S, Pinyopanuwat, N, Inpankaew, T, Sangvaranond, A, Phasuk, C, Chimnoi, W, . . . Arunvipas P. Prevalence of *Trypanosoma evansi* Infection Causing Abortion in Dairy Cows in Central Thailand. Kasetsart J (Nat Sci). 2009;43(5):53-7.
28. Lohr KF, Pholpark S, Siriwan P, Leesirikul N, Srikitjakarn L, Staak C. *Trypanosoma evansi* infection in buffaloes in North-East Thailand. II. Abortions. Trop Anim Health Prod. 1986;18(2):103-8.
29. Pholpark S, Pholpark M, Polsar C, Charoenchai A, Paengpassa Y, Kashiwazaki Y. Influence of *Trypanosoma evansi* infection on milk yield of dairy cattle in northeast Thailand. Prev Vet Med. 1999;42(1):39-44.
30. Desquesnes M, Holzmuller P, Lai DH, Dargantes A, Lun ZR, Jittapalapong S. *Trypanosoma evansi* and *surra*: a review and perspectives on origin, history, distribution,

taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *Biomed Res Int.* 2013;2013:194176.

31. Jittapalapong S, Inpankaew T, Sarataphan N, Herbreteau V, Hugot JP, Morand S, et al. Molecular detection of divergent trypanosomes among rodents of Thailand. *Infect Genet Evol.* 2008;8(4):445-9.

32. Sarataphan N, Vongpakorn M, Nuansrichay B, Autarkool N, Keowkarnkah T, Rodtian P, et al. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (Herpetosoma) infection in a sick infant from Thailand. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 8):1118-21.

33. Rodtian P, Nisawattananun P, Liampongsaputti T, Wannawoharn W, Nuangmek A. Human trypanosomiasis caused by *trypanosoma lewisi* in an infant lived in Lampang, Thailand. *Thai J Pediatr.* 2006;Jan-Mar 45(1):68-72.

34. Sai Tin Sim VW. Emerging human trypanosomiasis in Southeast Asia: a coming new threat? *Journal of Nature and Science.* 2015;1(1):e29.

35. Phumee A, Tawatsin A, Thavara U, Pengsakul T, Thammapalo S, Depaquit J, et al. Detection of an Unknown *Trypanosoma* DNA in a *Phlebotomus stantoni* (Diptera: Psychodidae) Collected From Southern Thailand and Records of New Sand Flies With Reinstatement of *Sergentomyia hivernus* Raynal & Gaschen, 1935 (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* 2017;54(2):429-34.

36. Depaquit J. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review and perspectives. *Infection Genetics and Evolution.* 2014;28:744-56.

37. อุซาวดี ถาวรระ, พงษ์รารวรรณ ศิริโสภกา, อภิวิภู รัชชสิน, ยุทธนา ภูทรัพย์. ไร้น (Midges) แมลงตัวจิ๋วแต่กัดเจ็บ: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.; 2559.

38. Rebelo JM, Rodrigues BL, Bandeira MD, Moraes JL, Fonteles RS, Pereira SR. Detection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in the Brazilian Amazonia. *J Vector Ecol.* 2016;41(2):303-8.

39. Ritland CE, Ritland K, Straus NA. Variation in the Ribosomal Internal Transcribed Spacers (Its1 and Its2) among 8 Taxa of the *Mimulus-Guttatus* Species Complex. *Molecular Biology and Evolution.* 1993;10(6):1273-88.

40. Spanakos G, Piperaki ET, Menounos PG, Tegos N, Flemetakis A, Vakalis NC. Detection and species identification of old world *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and*

Hygiene. 2008;102(1):46-53.

41. Polseela R, Jaturas N, Thanwisai A, Sing KW, Wilson JJ. Towards monitoring the sandflies (Diptera: Psychodidae) of Thailand: DNA barcoding the sandflies of Wihan Cave, Uttaradit. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 2016;27(5):3795-801.
42. Rajinder S. Mann PEK, and Jerry F. Butler. A Sand Fly, *Lutzomyia shannoni* Dyar (Insecta: Diptera: Psychodidae: Phlebotomine). University of Florida. 2014.
43. Ferro C, Cardenas E, Corredor D, Morales A, Munstermann LE. Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93(2):195-9.
44. Coin P. Insect antenna forms: Iowa State University Entomology; 2007 [Available from: <https://bugguide.net/node/view/110081/bgpape>
45. Porcel BM, Denoed F, Opperdoes F, Noel B, Madoui MA, Hammarton TC, et al. The streamlined genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants. *PLoS Genet.* 2014;10(2):e1004007.
46. Garin YJ, Sulahian A, Meneceur P, Pralong F, Prina E, Gangneux J, et al. Experimental pathogenicity of a presumed monoxenous trypanosomatid isolated from humans in a murine model. *J Eukaryot Microbiol.* 2001;48(2):170-6.
47. Maharom P, Siripattanapipong S, Mungthin M, Naaglor T, Sukkawe R, Pudkorn R, et al. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2008;39(6):988-90.
48. Suankratay C, Suwanpimolkul G, Wilde H, Siriyasatien P. Autochthonous visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus (HIV)-infected patient: the first in thailand and review of the literature. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(1):4-8.
49. Kattipathanapong P, Akaraphanth R, Krudsood S, Riganti M, Viriyavejakul P. The first reported case of autochthonous cutaneous leishmaniasis in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2012;43(1):17-20.
50. Jariyapan N, Daroontum T, Jaiwong K, Chanmol W, Intakhan N, Sor-Suwan S, et al. *Leishmania* (*Mundinia*) *orientalis* n. sp. (Trypanosomatidae), a parasite from Thailand responsible for localised cutaneous leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):351.
51. Suprsrisunjai C, Kootiratrakarn T, Puangpet P, Bunnag T, Chaowalit P, Wessagowit V. Disseminated Autochthonous Dermal Leishmaniasis Caused by *Leishmania siamensis*

- (PCM2 Trang) in a Patient from Central Thailand Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(5):1160-3.
52. d'Avila-Levy CM, Boucinha C, Kostygov A, Santos HL, Morelli KA, Grybchuk-leremenko A, et al. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(8):956-65.
53. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์. ปรสตีวิทยา. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2555. 247 p.
54. Apiwathnasorn C, Sucharit, S., Rongsriyam, Y., Leemingsawat, S., Kerdpibule, V., Deesin, T., Surathin, K., Vutikes, S., & Punavuthi, N. (1989). A brief survey of phlebotomine sandflies in Thailand. . A brief survey of phlebotomine sandflies in Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health.* 1989;20(3):429-32.
55. Barbosa AF, Oliveira, S. M., Bertho, A. L., Franco, A. M., Rangel, E. F. Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(8):851-6.
56. Truc P, Buscher P, Cuny G, Gonzatti MI, Jannin J, Joshi P, et al. Atypical human infections by animal trypanosomes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(9):e2256.
57. Desquesnes M, Yangtara S, Kunphukhieo P, Jittapalapong S, Herder S. Zoonotic trypanosomes in South East Asia: Attempts to control *Trypanosoma lewisi* using human and animal trypanocidal drugs. *Infect Genet Evol.* 2016;44:514-21.
58. Lewis D. The phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Oriental Region 1978 1978.
59. Bruce F. Eldridge JDE. *MEDICAL ENTOMOLOGY A Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods.* The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
60. Randrianambinintsoa FJ, Leger N, Robert V, Depaquit J. Paraphyly of the subgenus *Sintonius* (Diptera, Psychodidae, *Sergentomyia*): status of the Malagasy species. Creation of a new subgenus and description of a new species. *PLoS One.* 2014;9(6):e98065.
61. Depaquit J, Leger N, Randrianambinintsoa FJ. Paraphyly of the subgenus

Anaplebotomus and creation of Madaplebotomus subg. nov. (Phlebotominae: Phlebotomus). *Med Vet Entomol.* 2015;29(2):159-70.

62. Kanjanopas K, Siripattanapipong S, Ninsaeng U, Hitakarun A, Jitkaew S, Kaewtaphaya P, et al. *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *gemmea*, a potential vector of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. *BMC Infect Dis.* 2013;13:333.

63. Bounamous A, Boudabous R, Jouet D, Augot D, Ferte H, Babba H, et al. Mitochondrial DNA Differentiation Between Two Closely Related Species, *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *chabaudi* and *Phlebotomus*

(*Paraphlebotomus*) *riouxi* (Diptera: Psychodidae), Based on Direct Sequencing and Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment

Length Polymorphism. *ANNALS OF THE ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA.* 2009;102:347-53.

64. Hajibabaei M, Singer GA, Hickey DA. Benchmarking DNA barcodes: An assessment using available primate sequences. *Genome.* 2006;49(7):851-4.

65. Tiwananthagorn S, Kato H, Yeewa R, Muengpan A, Polseela R, Leelayoova S. Comparison of LAMP and PCR for molecular mass screening of sand flies for *Leishmania martiniquensis* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(2):100-7.

66. Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PD. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(4):968-71.

67. Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *Int J Parasitol.* 1999;29(2):331-9.

68. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-9.

69. Leelayoova S, Siripattanapipong S, Manomat J, Piyaraj P, Tan-Ariya P, Bualert L, et al. Leishmaniasis in Thailand: A Review of Causative Agents and Situations. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(3):534-42.

70. Taweesak Sriwongphun Kc, Surakait Pornchaikittikul, Priwan Peangpis, Wannapa Suwonkerd. Species composition of sandfly in Leishmaniasis affected foci in Chiang Rai Province Northern Thailand. *Disease Control Journal.* 2017;43(3).

71. Depaquit J, Hadj-Henni L, Bounamous A, Strutz S, Boussaa S, Morillas-Marquez F, et al. Mitochondrial DNA Intraspecific Variability in *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* 2015;52(5):819-28.
72. Botero A, Cooper C, Thompson CK, Clode PL, Rose K, Thompson RC. Morphological and Phylogenetic Description of *Trypanosoma noyesi* sp. nov.: An Australian Wildlife Trypanosome within the *T. cruzi* Clade. *Protist.* 2016;167(5):425-39.



ภาคผนวก ก.
การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อสำเร็จรูป (Invisorb® Spin Tissue Mini Kit, ประเทศเยอรมนี)

Lysis buffer G
Binding buffer A
Proteinase K
Wash buffer
Elution buffer

2. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Invisorb® Spin Plasmid Mini Two, ประเทศเยอรมนี)

Solution A
Solution B
Solution C
Wash solution
Elution solution

3. ชุดโคลนสำหรับ PCR product (DNA ligation)

2X Rapid ligation buffer
pGEM® - T easy vector
T4 DNA ligase
Deionized water

4. ชุดสารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

10X Taq buffer
25 mM MgCl₂
2.5 mM dNTPs
Taq DNA polymerase

5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-bertani (LB agar) ปริมาตร 1,000 ml

Bacto-tryptone	10 g
Yeast extracts	5 g
1M NaCl	10 g
Agar	15 g

วิธีเตรียม ชั่งสารทั้งหมดและใส่ลงในขวดแก้วขนาด 1,000 ml สำหรับเตรียมสาร (ยกเว้น Agar จะใส่ทีหลัง) จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรใกล้เคียงตามที่ต้องการและทำการเขย่าให้สารละลายทั้งหมด เมื่อสารในขวดละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด ปรับ pH ให้ได้ค่าเท่ากับ 7.0 จากนั้นเติม Agar ที่ชั่งไว้ และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1,000 ml แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Auto clave ที่อุณหภูมิ 121°C เมื่อนึ่งเสร็จให้นำมาวางที่อุณหภูมิห้องรอให้อุณหภูมิลดลงต่ำกว่า 60°C จากนั้นเติมยา ampicillin (ความเข้มข้น 100 mg/ μ l) ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงจานสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อให้มีความหนาพอประมาณและทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เมื่อเทเสร็จวางที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็งตัวดี นำไปอบในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้งดี จากนั้นพันจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Parafilm และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เพื่อรอนำไปใช้งาน

ส่วนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว (LB broth) สามารถเตรียมได้โดยใช้ขั้นตอนเดียวกัน แต่ไม่ต้องเติม Agar และหลังจากนำไปนึ่งฆ่าเชื้อให้อุณหภูมิลดลงแล้วนำเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ได้ทันที เมื่อนำไปใช้งานให้เติมยา ampicillin ภายหลัง

6. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย SOB ปริมาตร 100 ml

0.5% Yeast extracts	0.5 g
2% Bacto-tryptone	2 g
1M NaCl	1,000 μ l
1M KCl	250 μ l
2M Mg ²⁺ stock	1,000 μ l

วิธีเตรียม ชั่งและตวงสารทั้งหมดลงในขวดแก้วปริมาตร 100 ml เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.0 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Auto clave จากนั้นเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

7. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC ปริมาตร 10 ml

SOB	10 ml
2M Glucose	100 μ l

วิธีเตรียม ตวงสารละลายทั้งหมด ลงในหลอดพลาสติกขนาด 15 ml และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

8. การเตรียมสารละลาย NaCl ปริมาตร 20 ml

1M NaCl 1.1688 g

วิธีเตรียม ชั่งสารใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 50 ml และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ครบปริมาตร 20 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการกรองโดยใช้ Sterilized filter แล้วเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

9. การเตรียมสารละลาย 1M KCl ปริมาตร 20 ml

1M KCl 1.491 g

วิธีเตรียม ชั่งสารใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 50 ml และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ครบปริมาตร 20 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการกรองโดยใช้ Sterilized filter แล้วเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

10. การเตรียมสารละลาย 2M Mg²⁺ stock ปริมาตร 20 ml

Mg²⁺ = MgSO₄ + MgCl₂

1M MgSO₄ 4.930 g

1M MgCl₂ 4.066 g

วิธีเตรียม ชั่งสารใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 50 ml และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ครบปริมาตร 20 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการกรองโดยใช้ Sterilized filter แล้วเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

11. การเตรียมสารละลาย 2M Glucose ปริมาตร 10 ml

Glucose (D - glucose) 3.6 g

วิธีเตรียม ชั่งกลูโคสใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 15 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 10 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และกรองด้วย Sterilized filter แล้วเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

12. การเตรียมยา Ampicillin ความเข้มข้น 100 mg/μl

Ampicillin 1 g

วิธีเตรียม ทำการเตรียมภายในตู้ Fume Hood ปลอดภัย โดยละลายยาในขวดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้เข็มฉีดยา เมื่อยาละลายดีแล้วให้เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 10 ml แล้วผสมให้เข้ากันอีกครั้ง จากนั้นกรองด้วย Sterilized filter แล้วแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ห่อด้วยฟลอยด์และเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20°C

13. การเตรียมสารละลาย 10X TAE buffer ปริมาตร 1,000 ml

Tris base	48.4 g
EDTA	3.7 g
Glacial acetic acid	11.4 ml

วิธีเตรียม ชั่งสาร Tris base และ EDTA ใส่ในขวดแก้ว ขนาด 1,000 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม Glacial acetic acid ทำภายในตู้ Fume Hood และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาใช้งานจะทำการเจือจางเป็น 1X TAE buffer โดยนำสารละลาย 10X TAE buffer ปริมาตร 100 ml เจือจางในน้ำกลั่นปริมาตร 900 ml ในขวดแก้ว

14. การเตรียมสารละลาย X-gal ความเข้มข้น 20 mg/ml

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside	0.2 g
Dimethylformamide (DMF)	10 ml

วิธีเตรียม ชั่ง X-gal ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 15 ml ละลายด้วย DMF ให้ครบปริมาตร 10 ml และแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ห่อด้วยฟลอยด์ แล้วเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20°C

15. การเตรียมสารละลาย 1M IPTG

Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside	2.38 g
--	--------

วิธีเตรียม ชั่งสารใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 15 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับให้ได้ปริมาตร 10 ml จากนั้นกรองด้วย Sterilized filter แล้วแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ห่อด้วยฟลอยด์และเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20°C

16. การเตรียมสารละลาย TB (Transformation Buffer) ปริมาตร 100 ml

10mM HEPES	0.2383 g
15mM CaCl ₂	0.1665 g
250mM KCl	1.8637 g
55mM MnCl ₂	1.0880 g

วิธีเตรียม ชั่งสารทั้งหมดใส่ในขวดแก้ว ขนาด 100 ml (ยกเว้น MnCl₂ จะเติมทีหลัง) ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปปรับ pH ให้ได้ค่าเท่ากับ 6.7 แล้วจึงใส่ MnCl₂ ที่ชั่งไว้ เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 100 ml จากนั้นทำการเขย่าให้สารละลายผสมกันดี และทำการกรองแบ่งใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 50 ml โดยใช้ Sterilized filter เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4°C

17. การเตรียม Competent cell จากแบคทีเรีย *E. coli*

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

LB agar plate (ไม่ใส่ยา Ampicillin)

SOC

TB solution

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

วิธีเตรียม

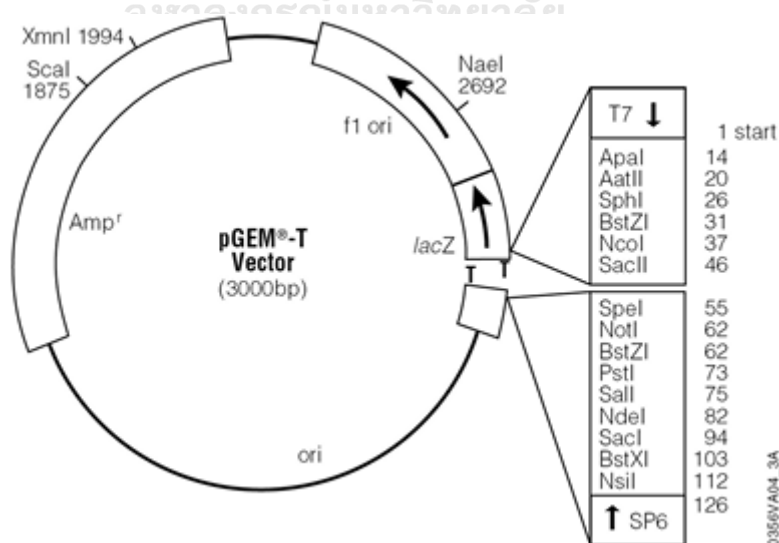
- นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ไม่ใส่ยา Ampicillin เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ ป่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- ทำการเลี้ยงเซลล์ starter โดยเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 1 โคโลนี ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงใน SOC ปริมาตร 4 ml โดยเลี้ยงในหลอดขนาด 15 ml นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องเขย่า โดยเขย่าด้วยความเร็ว 170 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- เตรียมขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 ml ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการแบ่งเซลล์ starter ปริมาตร 500 μ l มาเลี้ยงใน SOC ปริมาตร 100 ml นำไปป่มที่อุณหภูมิ 17°C ในเครื่องเขย่า โดยเขย่าด้วยความเร็ว 170 rpm เป็น

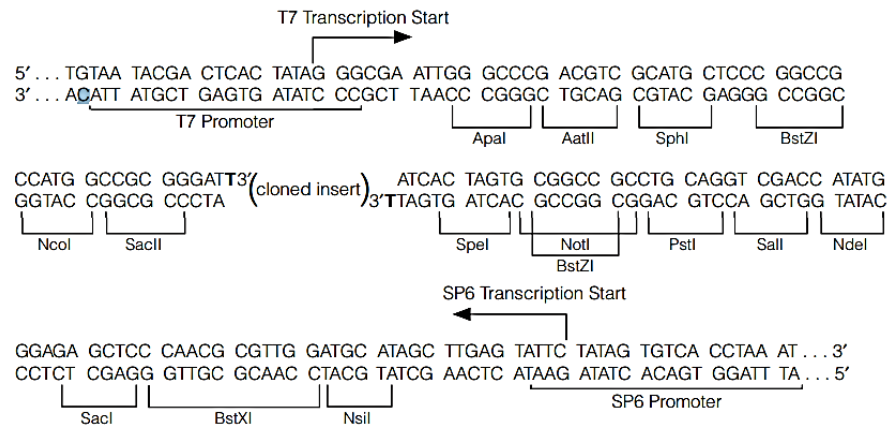
เวลา 6-12 ชั่วโมง คอยสังเกตความขุ่น หากอาหารเลี้ยงเชื้อยังใสสามารถปรับความเร็วในการเขย่าเป็น 180-200 rpm และปรับอุณหภูมิเป็น 18-19°C ได้

4. วัดค่า Optical Density (OD) ให้ได้ค่าประมาณ 0.4-0.6 ซึ่งจะใช้เวลาในการบ่มประมาณ 1-2 วัน
5. เมื่อได้ค่า OD ที่ต้องการ ให้นำเซลล์มาเทแบ่งใส่หลอดพลาสติก ขนาด 50 ml จำนวน 2 หลอด แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 8 นาที เมื่อครบเวลาให้นำออกวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งด้วยความเร็วเก็บตะกอนของเซลล์ไว้
6. เติมสารละลาย TB ปริมาตร 16 ml ลงในหลอดที่มีตะกอนเซลล์และผสมกันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ อย่างรวดเร็วเพื่อให้เซลล์กระจายตัว จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 8 นาที เมื่อครบเวลาให้เทสารละลายทิ้ง
7. เติมสารละลาย TB ปริมาตร 4 ml และผสมกันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ อย่างรวดเร็วเพื่อให้เซลล์กระจายตัว
8. เติมสารละลาย DMSO ปริมาตร 280 μ l ใช้ปิเปตคนเบา ๆ แล้วแบ่งเซลล์ที่ได้ใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 200 μ l เก็บรักษาที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -80°C

หมายเหตุ: ขั้นตอนที่ 5 – 8 ต้องเตรียมบนน้ำแข็งตลอดเวลา ทำอย่างเบามือและรวดเร็ว

18. pGEM[®]- T easy Vector System I, Promega[®]



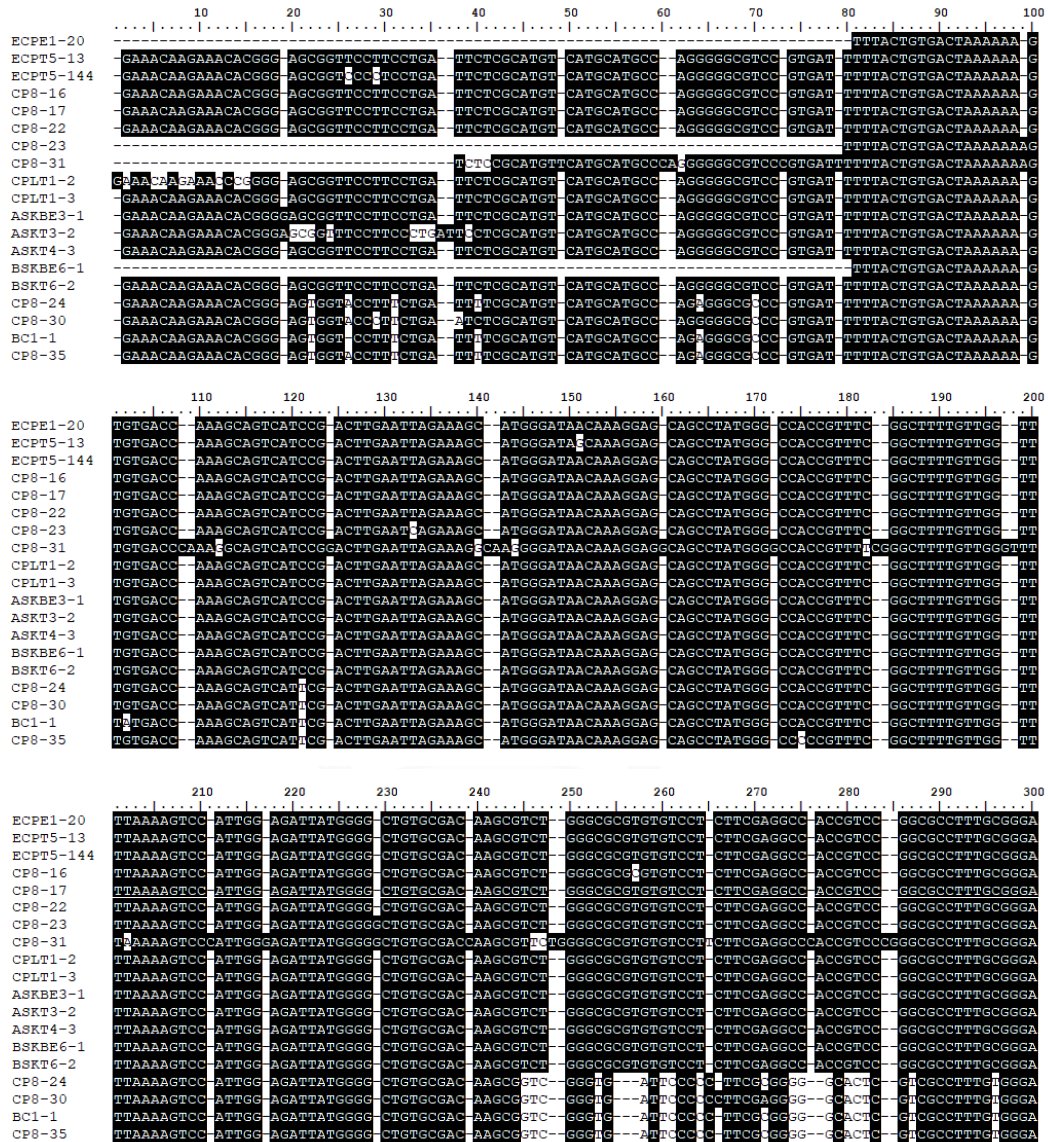


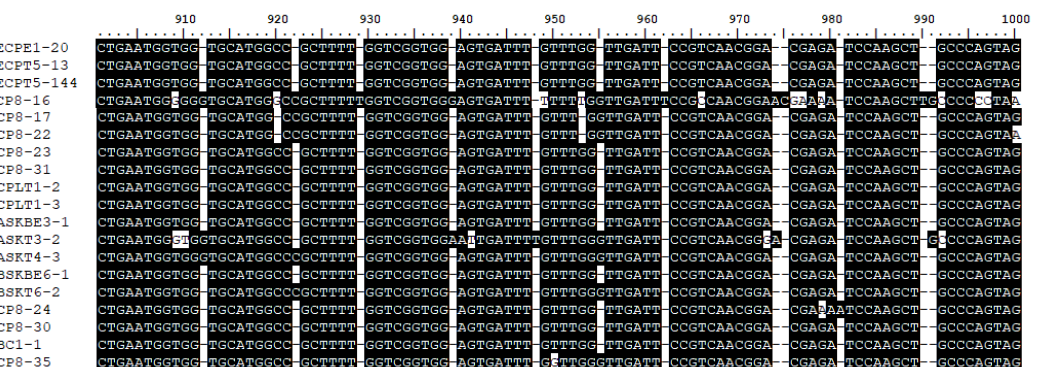
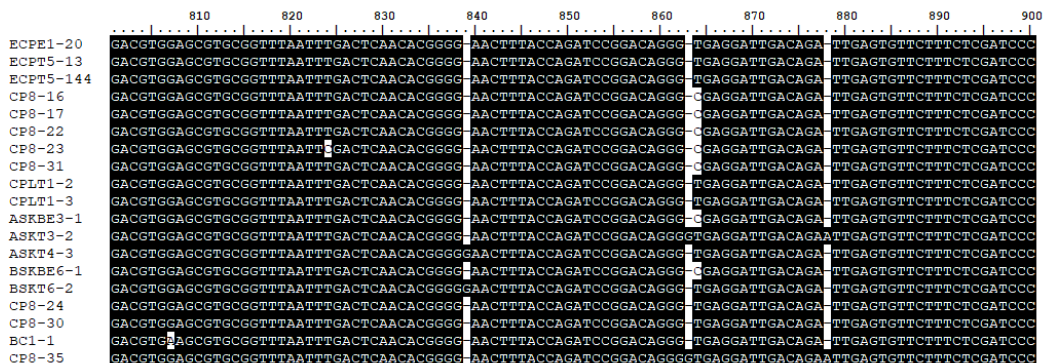
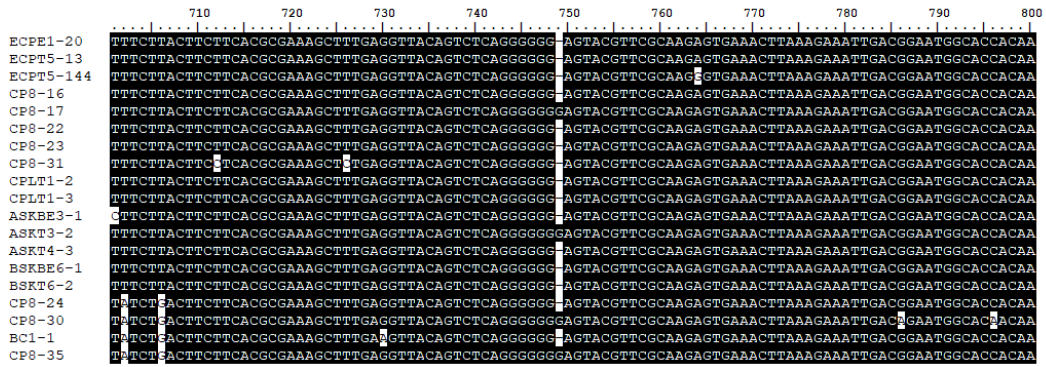
รูปที่ 22 แผนที่ยีนของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM[®]- T easy



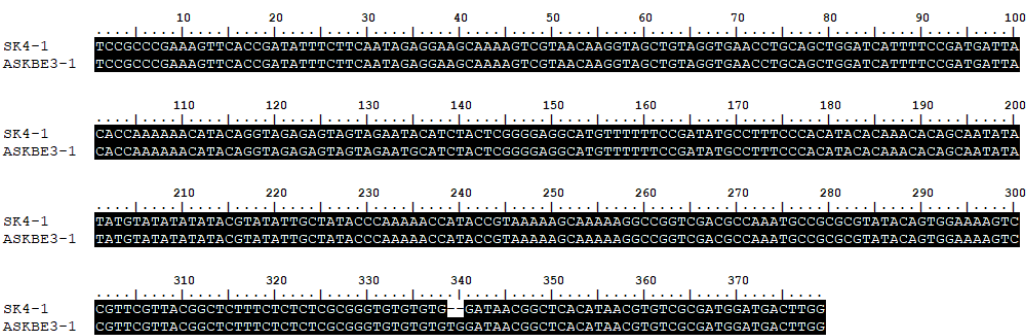
ภาคผนวก ข.

รูปที่ 23 แสดง multiple sequence alignment ของ *Trypanosoma* spp.

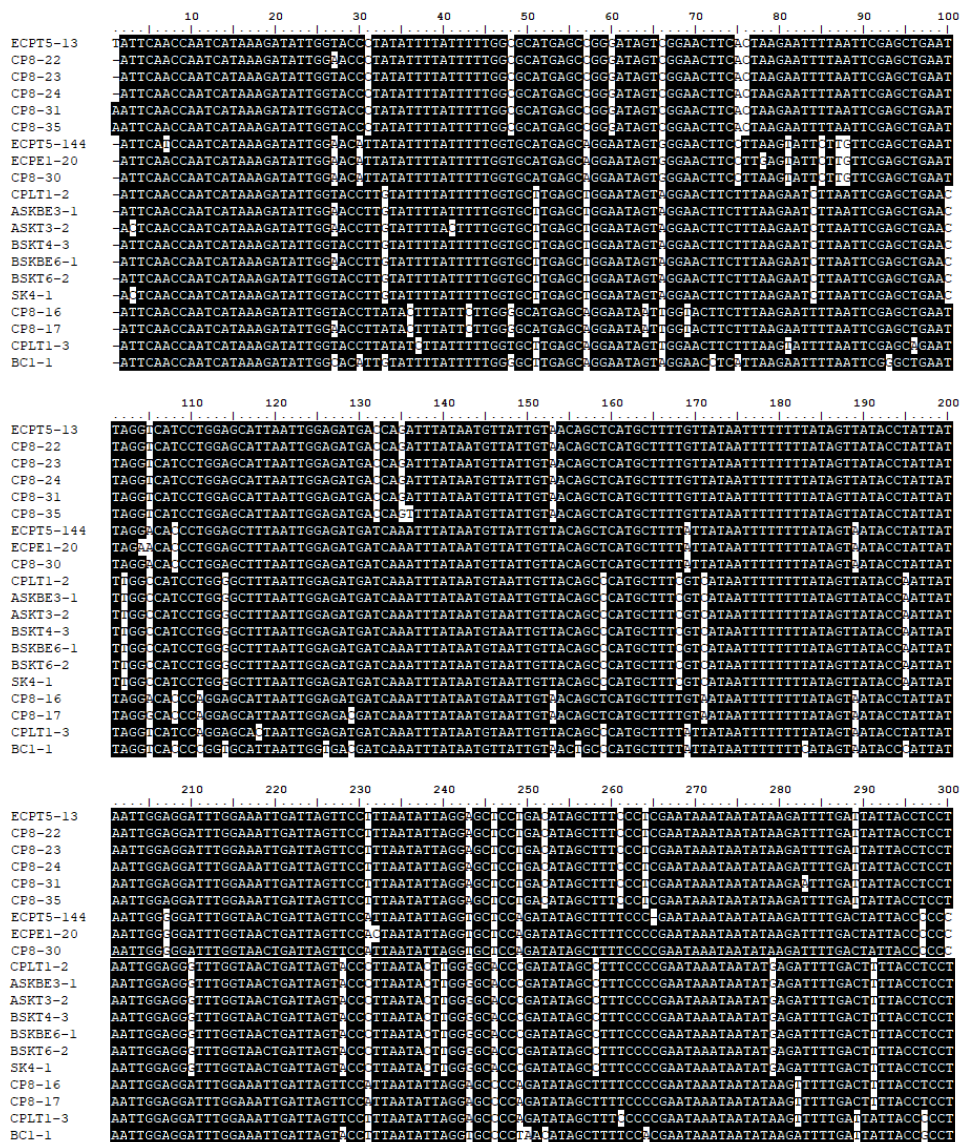




รูปที่ 24 แสดง multiple sequence alignment ของ Leishmania spp.



รูปที่ 25 แสดง multiple sequence alignment ของ รีนฝอยทราย



ตารางที่ 26 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรึ้นฝอยทรายจังหวัดเชียงราย

รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอยทราย	รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอยทราย	รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอยทราย
BC1-1	<i>Ph. teshi</i>	CC1-9	<i>Se. sylvatica</i>	DC1-2	<i>Se. sylvatica</i>
BC1-2	<i>Ph. mascomai</i>	CC2-1	<i>Se. anodontis</i>	DC1-3	<i>Se. sylvatica</i>
BC1-3	<i>Ph. mascomai</i>	CC2-2	<i>Se. anodontis</i>	DC1-4	<i>Ph. mascomai</i>
BC2-1	<i>Ph. teshi</i>	CC2-3	<i>Se. anodontis</i>	DC2-1	<i>Se. sylvatica</i>
BC2-2	<i>Ph. stantoni</i>	CC2-4	<i>Se. anodontis</i>	DC2-2	<i>Se. anodontis</i>
BC2-3	<i>Ph. teshi</i>	CC2-5	<i>Se. sylvatica</i>	DC2-3	<i>Se. anodontis</i>
BC2-4	<i>Ph. teshi</i>	CC2-6	<i>Ph. teshi</i>	DC2-4	<i>Se. anodontis</i>
BC2-5	<i>Ph. mascomai</i>	CC2-7	<i>Se. anodontis</i>	DC2-5	<i>Se. anodontis</i>
BC2-6	<i>Ph. stantoni</i>	CC2-8	<i>Ph. stantoni</i>	DC2-6	<i>Se. sylvatica</i>
BC2-7	<i>S. anodontis</i>	CC2-9	NA	DC2-7	<i>Se. sylvatica</i>
BC2-8	<i>Ph. stantoni</i>	CC2-10	NA	DC2-8	<i>Ph. teshi</i>
BC2-9	<i>Ph. stantoni</i>	CC2-11	NA	DC2-9	<i>Se. anodontis</i>
BC3-1	<i>Ph. stantoni</i>	CC2-12	<i>Se. anodontis</i>	DC2-10	<i>Se. anodontis</i>
CC1-1	<i>Se. sylvatica</i>	CC2-13	<i>Se. anodontis</i>	DC2-11	<i>Se. anodontis</i>
CC1-2	<i>Se. anodontis</i>	CC3-1	<i>Se. anodontis</i>	DC2-12	<i>Se. anodontis</i>
CC1-3	<i>Se. sylvatica</i>	CC3-2	<i>Se. sylvatica</i>	DC3-1	<i>Ph. teshi</i>
CC1-4	<i>Se. anodontis</i>	CC3-3	NA	DC3-2	<i>Se. barraudi</i>
CC1-5	<i>Se. anodontis</i>	CC4-1	NA	DC3-3	<i>Se. sylvatica</i>
CC1-6	<i>Se. sylvatica</i>	C4-1	<i>S. khawi</i>	DC4-1	<i>Se. sylvatica</i>
CC1-7	<i>Se. sylvatica</i>	DC1-1	<i>Se. sylvatica</i>	C4-2	<i>Se. indica</i>
CC1-8	<i>Ph. stantoni</i>				

ตารางที่ 27 แสดงลักษณะทางสีฐานวิทยาของรึนฝอยทรายจ้งหวัดสงขลา

รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึนฝอยทราย	รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึนฝอยทราย	รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึนฝอยทราย
SK1M	NA	SK41M	NA	SK81M	NA
SK2M	NA	SK42M	NA	SK82M	NA
SK3M	NA	SK43M	NA	SK83M	NA
SK4M	NA	SK44M	NA	SK84M	NA
SK5M	NA	SK45M	NA	SK85M	NA
SK6M	NA	SK46M	NA	SK86M	NA
SK7M	NA	SK47M	NA	SK87M	NA
SK8M	NA	SK48M	NA	SK88M	NA
SK9M	NA	SK49M	NA	SK89M	NA
SK10M	NA	SK50M	NA	SK90M	NA
SK11M	NA	SK51M	NA	SK91M	NA
SK12M	NA	SK52M	NA	SK92M	NA
SK13M	NA	SK53M	NA	SK93M	NA
SK14M	NA	SK54M	NA	SK94M	NA
SK15M	NA	SK55M	NA	SK95M	NA
SK16M	NA	SK56M	NA	SK96M	NA
SK17M	NA	SK57M	NA	SK97M	NA
SK18M	NA	SK58M	NA	SK98M	NA
SK19M	NA	SK59M	NA	SK99M	NA
SK20M	NA	SK60M	NA	SK100M	NA
SK21M	NA	SK61M	NA	SK101M	NA
SK22M	NA	SK62M	NA	SK102M	NA
SK23M	NA	SK63M	NA	SK103M	NA
SK24M	NA	SK64M	NA	SK104M	NA
SK25M	NA	SK65M	NA	SK105M	NA
SK26M	NA	SK66M	NA	SK106M	NA
SK27M	NA	SK67M	NA	SK107M	NA
SK28M	NA	SK68M	NA	SK108M	NA
SK29M	NA	SK69M	NA	SK109M	NA
SK30M	NA	SK70M	NA	SK110M	NA
SK31M	NA	SK71M	NA	SK111M	NA
SK32M	NA	SK72M	NA	SK112M	NA
SK33M	NA	SK73M	NA	SK113M	NA
SK34M	NA	SK74M	NA	SK114M	NA
SK35M	NA	SK75M	NA	SK115M	NA
SK36M	NA	SK76M	NA	SK116M	NA
SK37M	NA	SK77M	NA	SK117M	NA
SK38M	NA	SK78M	NA	SK118M	NA
SK39M	NA	SK79M	NA	SK119M	NA
SK40M	NA	SK80M	NA	SK120M	NA

รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอยทราย	รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอยทราย	รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอยทราย
SK121M	NA	SK141M	NA	BSKT6-5	<i>Se. khawi</i>
SK122M	NA	SK142M	NA	BSFT6-6	<i>Se. khawi</i>
SK123M	NA	SK1F	<i>Se. anodontis</i>	BSKT6-7	<i>Se. khawi</i>
SK124M	NA	SK2F	<i>Se. khawi</i>	CSKB4-1	<i>Se. barraudi</i>
SK125M	NA	SK3F	<i>Se. khawi</i>	ASKT1-1	<i>Ph. stantoni</i>
SK126M	NA	SK4F	<i>Se. khawi</i>	ASKT2-1	<i>Se. khawi</i>
SK127M	NA	SK5F	<i>Se. khawi</i>	ASKT2-2	NA
SK128M	NA	SK6F	<i>Se. anodontis</i>	ASKT2-3	<i>Se. khawi</i>
SK129M	NA	SK7F	<i>Se. anodontis</i>	ASKBE3-1	<i>Se. khawi</i>
SK130M	NA	SK8F	<i>Se. anodontis</i>	ASKT3-2	<i>Se. khawi</i>
SK131M	NA	SK9F	<i>Se. khawi</i>	BSKT4-1	<i>Ph. stantoni</i>
SK132M	NA	SK10F	<i>Se. khawi</i>	BSKT4-2	<i>Se. khawi</i>
SK133M	NA	SK11F	<i>Se. barraudi</i>	BSKT4-3	<i>Se. khawi</i>
SK134M	NA	SK12F	<i>Se. khawi</i>	BSKT4-4	<i>Se. khawi</i>
SK135M	NA	SK13F	<i>Se. khawi</i>	BSKT4-5	<i>Se. khawi</i>
SK136M	NA	SK14F	<i>Se. khawi</i>	BSKBE6-1	<i>Se. khawi</i>
SK137M	NA	SK15F	<i>Se. khawi</i>	BSKT6-2	<i>Se. khawi</i>
SK138M	NA	SK16F	<i>Se. khawi</i>	BSKT6-3	<i>Se. khawi</i>
SK139M	NA	ASKT5-1	<i>Se. khawi</i>	BSKBE6-4	<i>Se. khawi</i>
SK140M	NA	ASKT6-1	<i>Se. khawi</i>	SK4-1	<i>Se. khawi</i>

ตารางที่ 28 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรึ้นฝอยทรายจังหวัดพัทลุง

รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอยทราย	รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอยทราย	รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอยทราย
PL1M	NA	PL41M	NA	DPLTMG42	<i>Se. khawi</i>
PL2M	NA	PL42M	NA	DPLTMG43	NA
PL3M	NA	PL43M	NA	DPLTMG44	<i>Se. khawi</i>
PL4M	NA	PL44M	NA	DPLTMG45	<i>Se. khawi</i>
PL5M	NA	PL45M	NA	DPLTMG46	<i>Se. khawi</i>
PL6M	NA	PL46M	NA	DPLTMG47	<i>Se. khawi</i>
PL7M	NA	PL47M	NA	DPLTMG48	NA
PL8M	NA	PL48M	NA	DPLTMG49	<i>Se. khawi</i>
PL9M	NA	PL49M	NA	DPLTMG50	<i>Se. khawi</i>
PL10M	NA	PL50M	NA	DPLTMG51	<i>Se. khawi</i>
PL11M	NA	PL51M	NA	DPLTMG52	<i>Se. khawi</i>
PL12M	NA	PL52M	NA	CPLT1-1	<i>Se. khawi</i>
PL13M	NA	PL53M	NA	CPLT1-2	<i>Se. khawi</i>
PL14M	NA	PL54M	NA	CPLT1-3	<i>Se. indica</i>
PL15M	NA	PL55M	NA	CPLT1-4	<i>Se. khawi</i>
PL16M	NA	PL56M	NA	CPLT5-1	<i>Se. barraudi</i>

PL17M	NA	PL57M	NA	CPLT5-2	<i>Se. khawi</i>
PL18M	NA	PL58M	NA	CPLT5-3	<i>Se. khawi</i>
PL19M	NA	PL59M	NA	CPLT5-4	<i>Se. khawi</i>
PL20M	NA	PL60M	NA	CPLT5-5	<i>Se. khawi</i>
PL21M	NA	PL61M	NA	CPLT5-6	<i>Se. khawi</i>
PL22M	NA	PL62M	NA	CPLT5-7	<i>Se. khawi</i>
PL23M	NA	PL63M	NA	CPLT5-8	<i>Se. khawi</i>
PL24M	NA	PL64M	NA	DPLEBTT1	<i>Ph. betisi</i>
PL25M	NA	PL65M	NA	DPLTTT2	<i>Se. khawi</i>
PL26M	NA	PL66M	NA	DPLTTT3	<i>Se. khawi</i>
PL27M	NA	PL67M	NA	DPLTTT4	<i>Se. khawi</i>
PL28M	NA	PL68M	NA	DPLTTT5	<i>Se. khawi</i>
PL29M	NA	PL69M	NA	DPLTTT6	<i>Se. khawi</i>
PL30M	NA	PL70M	NA	DPLTTT7	<i>Se. khawi</i>
PL31M	NA	DPLEMG1	<i>Ph. kiangsuensis</i>	DPLTTT8	<i>Ph. kiangsuensis</i>
PL32M	NA	DPLEMG2	<i>Se. khawi</i>	DPLTTT9	<i>Se. khawi</i>
PL33M	NA	DPLBMG3	<i>Se. khawi</i>	DPLTTT10	<i>Se. khawi</i>
PL34M	NA	DPLTMG33	<i>Se. khawi</i>	DPLTTP1	<i>Se. khawi</i>
PL35M	NA	DPLTMG35	<i>Se. khawi</i>	DPLTTP2	<i>Ph. kiangsuensis</i>
PL36M	NA	DPLTMG36	<i>Se. khawi</i>	DPLTTP3	<i>Se. khawi</i>
PL37M	NA	DPLTMG37	<i>Se. khawi</i>	DPLTTL1	<i>Ph. kiangsuensis</i>
PL38M	NA	DPLTMG38	<i>Se. khawi</i>	DPLTTL2	<i>Se. khawi</i>
PL39M	NA	DPLTMG40	<i>Se. khawi</i>	DPLTTL3	<i>Ph. betisi</i>
PL40M	NA	DPLTMG41	<i>Se. khawi</i>	DPLTTL4	<i>Ph. Kiangsuensis</i>
DPLTTL5	<i>Se. barraudi</i>	DPLTTL10	<i>Se. khawi</i>	DPLTTL15	<i>Se. khawi</i>
DPLTTL6	<i>Se. barraudi</i>	DPLTTL11	<i>Se. khawi</i>	DPLTTL16	<i>Se. khawi</i>
DPLTTL7	<i>Se. khawi</i>	DPLTTL12	<i>Ph. kiangsuensis</i>	DPLTTL17	<i>Se. khawi</i>
DPLTTL8	<i>Se. khawi</i>	DPLTTL13	<i>Se. indica</i>	DPLTTL18	<i>Se. khawi</i>
DPLTTL9	<i>Ph. betisi</i>	DPLTTL14	<i>Se. khawi</i>	PL4-1	<i>Se. khawi</i>
CPLT1-5	<i>Se. khawi</i>				

ตารางที่ 29 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรึ้นฝอยทรายจังหวัดชุมพร

รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอย ทราย	รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอย ทราย	รหัสตัวอย่าง	ชนิดของรึ้นฝอย ทราย
ECPT1-1	<i>Se. anodontis</i>	ECPT5-2	<i>Se. anodontis</i>	CP8-3	<i>Ph. asperulus</i>
ECPT1-2	NA	ECPT5-3	<i>Ph. asperulus</i>	CP8-4	<i>Ph. betisi</i>
ECPT1-3	<i>Ph. major major</i>	ECPT5-4	<i>Se. anodontis</i>	CP8-5	<i>Ph. betisi</i>
ECPT1-4	<i>Se. anodontis</i>	ECPT5-5	<i>Se. anodontis</i>	CP8-6	<i>Ph. asperulus</i>
ECPT1-5	<i>Ph. betisi</i>	ECPT5-6	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-7	<i>Se. anodontis</i>
ECPT1-6	<i>Ph. betisi</i>	ECPT5-7	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-8	<i>Se. anodontis</i>
ECPT1-7	<i>Se. anodontis</i>	ECPT5-8	<i>Se. anodontis</i>	CP8-9	<i>Ph. betisi</i>
ECPT1-8	<i>Se. sylvatica</i>	ECPT5-9	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-10	<i>Ph. betisi</i>
ECPT1-9	<i>Se. anodontis</i>	ECPT5-10	<i>Se. anodontis</i>	CP8-11	<i>Se. anodontis</i>
ECPT1-10	<i>Ph. betisi</i>	ECPT5-11	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-12	<i>Ph. betisi</i>
ECPT1-11	<i>Se. anodontis</i>	ECPT5-12	<i>Ph. betisi</i>	CP8-13	<i>Ph. betisi</i>
ECPT1-12	<i>Ph. betisi</i>	ECPT5-13	<i>Se. anodontis</i>	CP8-14	<i>Se. anodontis</i>
ECPT1-13	<i>Ph. betisi</i>	ECPT5-14	<i>Se. anodontis</i>	CP8-15	<i>Ph. betisi</i>
ECPE1-15	<i>Se. anodontis</i>	ECPT5-15	<i>Se. anodontis</i>	CP8-16	<i>Ph. betisi</i>
ECPE1-16	<i>Ph. betisi</i>	ECPT5-144	<i>Ph. asperulus</i>	CP8-17	<i>Ph. betisi</i>
ECPE1-17	<i>Se. anodontis</i>	ECPE5-145	<i>Se. anodontis</i>	CP8-18	<i>Ph. betisi</i>
ECPE1-18	<i>Ph. asperulus</i>	ECPT6-1	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-19	<i>Ph. betisi</i>
ECPBE1-19	<i>Ph. asperulus</i>	ECPT6-2	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-20	<i>Ph. asperulus</i>
ECPE1-20	<i>Ph. asperulus</i>	ECPT6-3	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-21	<i>Ph. betisi</i>
ECPT2-1	<i>Ph. betisi</i>	ECPT6-4	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-22	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-2	<i>Ph. betisi</i>	ECPT6-5	<i>Ph. betisi</i>	CP8-23	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-3	<i>Se. anodontis</i>	ECPT6-6	<i>Ph. asperulus</i>	CP8-24	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-4	<i>Ph. betisi</i>	ECPT6-7	<i>Ph. asperulus</i>	CP8-25	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-5	<i>Ph. betisi</i>	ECPT6-8	<i>Se. anodontis</i>	CP8-26	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-6	<i>Ph. betisi</i>	ECPT6-9	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-27	<i>Ph. betisi</i>
ECPT2-7	<i>Ph. betisi</i>	ECPT6-10	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-28	<i>Ph. mascomai</i>
ECPT2-8	<i>Ph. betisi</i>	ECPT6-11	<i>Ph. betisi</i>	CP8-29	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-9	<i>Ph. betisi</i>	ECPT6-12	<i>Ph. betisi</i>	CP8-30	<i>Ph. asperulus</i>
ECPT2-10	<i>Ph. betisi</i>	ECPT6-13	<i>Se. anodontis</i>	CP8-31	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-11	NA	ECPT6-14	<i>Se. anodontis</i>	CP8-32	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-12	<i>Ph. betisi</i>	ECPT6-15	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-33	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-13	<i>Se. anodontis</i>	ECPT6-16	NA	CP8-34	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-14	<i>Ph. major major</i>	ECPBE6-171	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-35	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-15	<i>Ph. betisi</i>	ECPBE6-172	<i>Se. anodontis</i>	CP8-36	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-16	<i>Ph. asperulus</i>	ECPE6-173	<i>Se. anodontis</i>	CP8-37	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-17	<i>Se. anodontis</i>	ECPE6-174	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-38	<i>Se. anodontis</i>
ECPT2-18	NA	ECPE6-175	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-39	<i>Ph. betisi</i>
ECPBE2-19	<i>Ph. asperulus</i>	ECPE6-176	<i>Se. anodontis</i>	CP8-40	<i>Se. anodontis</i>
ECPT3-1	<i>Ph. asperulus</i>	CP8-1	<i>Ph. kiangsuensis</i>	CP8-41	<i>Se. anodontis</i>
ECPT5-1	<i>Ph. betisi</i>	CP8-2	<i>Se. anodontis</i>	CP8-42	<i>Ph. betisi</i>
CP8-43	<i>Ph. betisi</i>	CP8-44	<i>Se. anodontis</i>	CP8-45	<i>Se. anodontis</i>

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวพิมพ์พิลาส ศรีสุธน
วัน เดือน ปี เกิด	9 มิถุนายน 2535
สถานที่เกิด	ชุมพร
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	186/11 ม.9 ต.ตากแดด อ.เมือง จ.ชุมพร 86000



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY