

Chulalongkorn University

## Chula Digital Collections

---

Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)

---

2018

### ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนพยาธิหัวใจและแบคทีเรีย *Wolbachia* spp. ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิในเลือดของสุนัขที่เก็บจากกรุงเทพฯ และ ยริมณฑล

หทัยทิพย์ สัจจาวงศ์วาณิชย์  
คณะ แพทยศาสตร์

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd>

---

#### Recommended Citation

สัจจาวงศ์วาณิชย์, หทัยทิพย์, "ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนพยาธิหัวใจและแบคทีเรีย *Wolbachia* spp. ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิในเลือดของสุนัขที่เก็บจากกรุงเทพฯ และ ยริมณฑล" (2018). *Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)*. 3215.  
<https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/3215>

This Thesis is brought to you for free and open access by Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD) by an authorized administrator of Chula Digital Collections. For more information, please contact [ChulaDC@car.chula.ac.th](mailto:ChulaDC@car.chula.ac.th).

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนองพยาธิหัวใจและแบคทีเรีย *Wolbachia* spp. ที่อาศัยอยู่ใน  
หนองพยาธิในเลือดของสุนัขที่เก็บจากกรุงเทพและปริมณฑล



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2561  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUCLEOTIDE DIVERSITY OF *DIROFILARIA* SPP. AND *WOLBACHIA* SPP. BACTERIA IN THE  
PARASITES IN BLOOD OF DOMESTIC DOGS COLLECTED FROM BANGKOK  
METROPOLITAN



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

Common Course

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนพยาธิหัวใจและแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> spp. ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิในเลือดของสุนัขที่เก็บจากกรุงเทพและปริมณฑล
โดย	น.ส.หทัยทิพย์ สัจจาวงศ์วานิชย์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร. นายแพทย์กนก พงศ์วิวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์เผด็จ สิริยะเสถียร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ดร. นายแพทย์กนก พงศ์วิวัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์เผด็จ สิริยะเสถียร)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิวรรพรรณ สรรประเสริฐ)

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

หทัยทิพย์ สัจจาวงศ์วานิชย์ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนพยาธิหัวใจและแบคทีเรีย *Wolbachia* spp. ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิในเลือดของสุนัขที่เก็บจากกรุงเทพมหานครและปริมณฑล. ( NUCLEOTIDE DIVERSITY OF *DIROFILARIA* SPP. AND *WOLBACHIA* SPP. BACTERIA IN THE PARASITES IN BLOOD OF DOMESTIC DOGS COLLECTED FROM BANGKOK METROPOLITAN) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ดร. นพ.กนก พฤตวิทย์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. ดร. นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร

โรคหนอนพยาธิหัวใจสุนัข (Canine filariasis) มีสาเหตุจากหนอนพยาธิตัวกลมในกลุ่มฟิลาเรีย เช่น *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Bugia pahangi*, *B. malayi* และ *Acanthocheilonema reconditum* เป็นต้น ซึ่งหนอนพยาธิสามารถก่อโรคได้ทั้งในสุนัข แมวและสามารถติดต่อสู่คนได้ นอกจากนี้มีรายงานการพบแบคทีเรีย *Wolbachia* อาศัยอยู่ร่วมกันแบบ endosymbiosis ภายในหนอนพยาธิ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเจริญและการก่อโรคของหนอนพยาธิได้ อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับหนอนพยาธิในสุนัขและแบคทีเรีย *Wolbachia* ในประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการตรวจหาหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียและแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยในหนอนพยาธิจากตัวอย่างเลือดสุนัขที่สงสัยว่าเป็นโรคหนอนพยาธิหัวใจที่เก็บจากกรุงเทพมหานครและปริมณฑล จำนวน 57 ตัวอย่าง โดยอาศัยการตรวจทั้งทางจุลทรรศน์วิทยาและทางอณูชีววิทยา การตรวจหาตัวอ่อนหนอนพยาธิระยะไมโครฟิลาเรียด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาอาศัยเทคนิค PCR ที่ตำแหน่งยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* และตรวจหาแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ตำแหน่งยีน *FtsZ* ด้วยวิธี nested PCR โดยพบตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียที่ให้ผลบวกภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 16 ตัวอย่าง (28.07%) และจากการตรวจด้วย *COI*-PCR พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 50 ตัวอย่าง (87.72%) โดยสามารถระบุสายพันธุ์ *D. immitis* 33 ตัวอย่าง (57.89%), *B. pahangi* 13 ตัวอย่าง (22.81%) และ *B. malayi* 4 ตัวอย่าง (7.02%) การตรวจด้วย *ITS1*-PCR พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 41 ตัวอย่าง (71.93%) สามารถระบุสายพันธุ์ *D. immitis* 30 ตัวอย่าง (52.63%) และ *B. pahangi* 11 ตัวอย่าง (19.30%) แต่ไม่สามารถตรวจพบ *B. malayi* และสามารถตรวจพบแบคทีเรีย *Wolbachia* จำนวน 47 ตัวอย่าง (94.00%) เมื่อสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการพบว่าทุกตัวอย่างมีความใกล้เคียงกับ *Wolbachia* supergroup C ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ จากผลการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของหนอนพยาธิโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง *COI* และ *ITS1* สามารถจัดกลุ่มหนอนพยาธิแยกกันอย่างชัดเจนในแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังได้สาธิตการใช้เทคนิค PCR-RFLP ที่บริเวณ *ITS1* โดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AseI* ในการจำแนกระหว่างหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* และ *B. pahangi* โดยสรุปการศึกษานี้ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานของหนอนพยาธิหัวใจสุนัขและแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ตรวจพบในเลือดสุนัขที่เก็บจากกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ซึ่งองค์ความรู้นี้จะประโยชน์ต่อการควบคุมประชากรหนอนพยาธิหัวใจในสัตว์รังโรคต่อไปในอนาคตได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5974022230 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: D. immitis, Wolbachia bacteria, COI, ITS1, FtsZ, Phylogenetic tree

Hathaitip Satjawongvanit : NUCLEOTIDE DIVERSITY OF *DIROFILARIA* SPP. AND *WOLBACHIA* SPP. BACTERIA IN THE PARASITES IN BLOOD OF DOMESTIC DOGS COLLECTED FROM BANGKOK METROPOLITAN. Advisor: Kanok Preativatanyou, M.D., Ph.D. Co-advisor: Prof. PADET SIRIYASATIEN, M.D., Ph.D

Canine filariasis or canine heartworm disease is caused by several nematode species such as *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Brugia pahangi*, *B. malayi* and *Acanthocheilonema reconditum*. These filarial parasites can cause severe disease in dogs, cats and potentially transmit to humans. At present, several studies revealed that obligate bacterial endosymbionts, i.e. *Wolbachia*, play a crucial role in development and pathogenesis of filarial parasites. However, preliminary data regarding the dog filarial parasites and their related endosymbionts in Thailand need to be fulfilled. In this study, we aimed to demonstrate the presence of filarial nematodes and *Wolbachia* bacteria in the blood of domestic dogs collected from Bangkok Metropolitan, Thailand. A total of 57 blood samples from dogs with suspected dirofilariasis were collected to determine presence of microfilaria using both microscopic and molecular methods. Molecular detection for microfilaria was conducted PCR based on the partial sequence of *COI* and *ITS1* regions. Additionally, nested PCR specific to *FtsZ* gene was done to screen *Wolbachia* endosymbiotic bacteria in dog blood samples. Microfilariae were microscopically identified in 16 samples (28.07%). Contrastedly, 50 samples (87.72%) consisting of 33 (57.89%), 13 (22.81%) and 4 (7.02%) for *D. immitis*, *B. pahangi* and *B. malayi* respectively were positive for *COI*-PCR. Whereas *ITS1*-PCR showed that 41 samples (71.93%) consisting of 30 samples (52.63%) and 11 samples (19.30%) were identified as *D. immitis* and *B. pahangi* respectively but *B. malayi* was not detected. Also, *Wolbachia* DNA was demonstrated in 47 samples (94.00%) and phylogenetically classified into supergroup C clade. The nucleotide analyses of the partial *COI* and *ITS1* sequences showed that all filarial isolates cluster together in each species group. Moreover, *D. immitis* and *B. pahangi* can be differentiated using *Asel*-RFLP on *ITS1* region. In conclusion, this study provides informative data on filariasis associated with *Wolbachia* infection in domestic dogs in Bangkok Metropolitan and should be useful in the future for reservoirs and *Wolbachia*-based programs of filariasis control.

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature .....

Academic Year: 2018

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณา ความช่วยเหลือ แนะนำ และให้คำปรึกษาจากบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร.นพ. กนก พุฒิวัดัญญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ศ.ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมเป็นอย่างยิ่ง ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางการแก้ไขปัญหา ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.พญ.วิไล ชินธเนศ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วิไล อโนมะศิริ ผศ.ดร. วีรพรพรรณ สรรประเสริฐ และ ศ.พ.อ.ดร.นพ. มติรุท มุ่งถิ่น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์นี้ และกรุณาให้คำแนะนำ แนวคิด และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.น.สพ.สุนธยา เตียวศิริทรัพย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ผศ. ดร. น.สพ. ศิวะพงษ์ สังข์ประดิษฐ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งอนุเคราะห์ตัวอย่างสำหรับการทำวิจัยครั้งนี้ และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ที่ร่วมห้องปฏิบัติการหน่วยภูมิคุ้มกัน ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือและแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ในการทำวิจัยตลอดมา สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดาและมารดาที่ให้โอกาสและสนับสนุนทางการศึกษา ซึ่งคุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่ผู้ที่มีพระคุณทุกท่านที่มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จของงานวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนผู้ที่สามารถนำข้อมูลไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไปได้

หทัยทิพย์ สัจจาวงศ์วณิชย์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
1.2 คำถามของการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.5 กรอบแนวความคิดการวิจัย .....	4
1.6 คำสำคัญ.....	5
1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	7
2.1. หนองพยาธิหัวใจสุนัข.....	7
2.1.1 ลักษณะทั่วไป .....	7
2.1.2 ชีววิทยาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนองพยาธิหัวใจ <i>Dirofilaria</i> spp. ....	9
2.1.3 วงจรชีวิตของหนองพยาธิ.....	13
2.1.4 โรคหนองพยาธิหัวใจสุนัข (canine dirofilariasis).....	14
2.1.5 โรคไดโรฟิลาเรียในคน (human dirofilariasis).....	15



2.2 หนองพยาธิฟิลาเรียอื่น ๆ .....	17
2.2.1 หนองพยาธิ <i>Brugia</i> spp.....	17
2.2.1.1 ลักษณะทั่วไป .....	17
2.2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาหนองพยาธิ <i>B. pahangi</i> และ <i>B. malayi</i> .....	17
2.2.1.3 การก่อโรคของหนองพยาธิ <i>B. pahangi</i> และ <i>B. malayi</i> .....	19
2.3 แบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> .....	21
2.3.1 แบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ในกลุ่มสัตว์ขาข้อ (arthropods).....	22
2.3.2 แบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ในหนองพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย (filarial nematodes) .....	22
2.3.3 บทบาทของแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ต่อการรักษาโรค.....	25
2.4 การวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาของหนองพยาธิและแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> .....	27
2.4.1 การตรวจในหนองพยาธิ .....	28
2.4.2 การตรวจในแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> .....	29
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
3.1 รูปแบบการวิจัย .....	31
3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย .....	31
3.3 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	32
3.4 โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล .....	34
3.5 วิธีดำเนินการวิจัย .....	34
3.5.1 การเก็บตัวอย่าง .....	34
3.5.2 การวัดค่าดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณและประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอ .....	34
3.5.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	35
3.5.4 การเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่.....	35
3.5.4.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณ <i>ITS1</i> หนองพยาธิ .....	35
3.5.4.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณ <i>COI</i> .....	36

3.5.4.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณ <i>FtsZ</i> ของแบคทีเรีย .....	37
3.5.5 การตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis).....	39
3.5.6 การโคลนนิ่งเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	40
3.5.6.1 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (Ligation).....	40
3.5.6.2 การถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์ (Transformation).....	40
3.5.6.3 การคัดเลือกโคลนี <i>E. coli</i> ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม .....	41
3.5.7 การสกัดพลาสมิด.....	41
3.5.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Sequencing).....	42
3.5.9 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Analysis).....	42
3.5.10 การสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree).....	43
3.5.11 การขอขึ้นทะเบียนและการเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	43
3.5.12 การจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างหนองพยาธิด้วยเทคนิค PCR - Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).....	43
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	46
4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	46
4.2 ผลการจำแนกสายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	46
4.3 ผลการจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาของหนองพยาธิที่บริเวณ <i>COI</i> และ <i>ITS1</i> .....	48
4.3.1 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR.....	48
4.3.2 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยเทคนิค Colony PCR .....	50
4.3.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนองพยาธิ.....	52
4.3.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนองพยาธิกับฐานข้อมูล NCBI .....	54
4.3.5 ผลการขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนองพยาธิ .....	55
4.3.6 ผลการวิเคราะห์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายพันธุ์ .....	55

4.3.7 ผลการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของหนอนพยาธิ.....	59
4.4 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างหนอนพยาธิด้วยเทคนิค PCR-RFLP .....	63
4.5 ผลการวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาของแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิ.....	64
4.5.1 ผลการตรวจหาแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ Nested PCR .....	64
4.5.2 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยเทคนิค Colony PCR .....	64
4.5.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> .....	66
4.5.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> กับฐานข้อมูล NCBI... ..	66
4.5.5 ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย .....	67
4.5.6 ผลการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรีย .....	69
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	71
บรรณานุกรม.....	77
ภาคผนวก ก.....	90
ภาคผนวก ข.....	96
ประวัติผู้เขียน.....	110

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การกระจายของหนอนพยาธิสกุล <i>Dirofilaria</i> .....	8
ตารางที่ 2 การแพร่กระจายของแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย .....	24
ตารางที่ 3 ผลของการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic treatments) ในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย .....	26
ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนบริเวณ <i>ITS1</i> .....	35
ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอน PCR (thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนบริเวณ <i>ITS1</i> .....	36
ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>COI</i> .....	36
ตารางที่ 7 แสดงขั้นตอน PCR (thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>COI</i> .....	37
ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา Nested PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>FtsZ</i> .....	38
ตารางที่ 9 แสดงขั้นตอน Nested PCR (thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>FtsZ</i> .....	39
ตารางที่ 10 แสดงส่วนประกอบและสัดส่วนของสารที่ใช้ในขั้นตอน Ligation .....	40
ตารางที่ 11 แสดงรูปแบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ .....	43
ตารางที่ 12 การทำนายขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>VspI</i> .....	44
ตารางที่ 13 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>VspI</i> .....	44
ตารางที่ 14 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในแผ่นเจล 10% native-PAGE .....	45
ตารางที่ 15 ผลการตรวจจำแนกและระบุสายพันธุ์หนอนพยาธิด้วยวิธีจุลทรรศน์วิทยาและอนุชีววิทยาบนตำแหน่ง <i>COI</i> และ <i>ITS1</i> (n=57) .....	54
ตารางที่ 16 เปรียบเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>COI</i> ของหนอนพยาธิแต่ละสายพันธุ์ (แสดงผลบางส่วน) .....	57
ตารางที่ 17 เปรียบเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ <i>ITS1</i> ของหนอนพยาธิแต่ละสายพันธุ์ (แสดงผลบางส่วน) .....	58
ตารางที่ 18 ขนาดและจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>VspI</i> .....	63
ตารางที่ 19 ผลการตรวจพบแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ในหนอนพยาธิ .....	64

ตารางที่ 20 เปรูเซ็นความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *FtsZ* ของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ใน  
 หนองพญาธิ..... 68

ตารางที่ 21 ข้อมูลตัวอย่างหนองพญาธิที่ตำแหน่ง *COI* ที่พบในงานวิจัยนี้..... 102

ตารางที่ 22 ข้อมูลตัวอย่างหนองพญาธิที่ตำแหน่ง *ITS1* ที่พบในงานวิจัยนี้..... 104

ตารางที่ 23 ข้อมูลตัวอย่างหนองพญาธิที่พบแบคทีเรียที่ตำแหน่ง *FtsZ* ที่พบในงานวิจัยนี้..... 106

ตารางที่ 24 เปรูเซ็นความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *COI* ภายในสายพันธุ์และระหว่างสาย  
 พันธุ์ของหนองพญาธิ..... 108

ตารางที่ 25 เปรูเซ็นความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *ITS1* ภายในสายพันธุ์และระหว่างสาย  
 พันธุ์ของหนองพญาธิ..... 109



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การกระจายของโรคหนอนพยาธิหัวใจสุนัข (ดัดแปลงจาก Simón et al., 2009).....	7
รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างของตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรีย .....	9
รูปที่ 3 หนอนพยาธิระยะตัวอ่อน .....	10
รูปที่ 4 หนอนพยาธิระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย .....	11
รูปที่ 5 หนอนพยาธิระยะตัวเต็มวัยเพศผู้.....	12
รูปที่ 6 วงชีวิตของหนอนพยาธิ <i>D. immitis</i> .....	13
รูปที่ 7 โรคหนอนพยาธิหัวใจสุนัข .....	14
รูปที่ 8 แผนที่การกระจายของโรค human dirofilariasis (ดัดแปลงจาก Simón et al., 2012)....	15
รูปที่ 9 Human ocular dirofilariosis เกิดจากหนอนพยาธิ .....	16
รูปที่ 10 ตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิ <i>Brugia</i> spp.....	18
รูปที่ 11 อาการทางคลินิกของสุนัขที่ติดเชื้อหนอนพยาธิ <i>Brugia</i> spp. ....	20
รูปที่ 12 <i>Wolbachia</i> Supergroups phylogeny (A-K) ที่ตำแหน่ง 16S rDNA (Ros et al., 2009) .....	21
รูปที่ 13 แบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ที่พบในหนอนพยาธิตัวเต็มวัยเพศเมีย.....	23
รูปที่ 14 แผ่นฟิล์มเลือดที่พบตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิ .....	28
รูปที่ 15 แสดง Amplicons ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณ <i>FtsZ</i> ด้วย nested PCR .....	37
รูปที่ 16 การทำนายตัดตัวอย่างด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>VspI</i> ( <i>AseI</i> ) ด้วยโปรแกรม NEBcutter.....	45
รูปที่ 17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิที่พบในงานวิจัย .....	47
รูปที่ 18 แสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้นส่วนบริเวณ <i>COI</i> บน 1.5% Agarose gel electrophoresis.....	48

รูปที่ 19 แสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ pcr ของชิ้นส่วนบริเวณ <i>ITS1</i> บน 1.5% Agarose gel electrophoresis.....	49
รูปที่ 20 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB agar .....	50
รูปที่ 21 แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีชิ้นส่วนบริเวณ <i>COI</i> บน 1.5% Agarose gel electrophoresis.....	51
รูปที่ 22 แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีชิ้นส่วนบริเวณ <i>ITS1</i> บน 1.5% Agarose gel electrophoresis.....	51
รูปที่ 23 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปกราฟ sequence electropherogram .....	52
รูปที่ 24 ผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน <i>COI</i> ของหนอนพยาธิ (แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน) .....	53
รูปที่ 25 ผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน <i>ITS1</i> ของหนอนพยาธิ (แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน) .....	53
รูปที่ 26 แผนภูมิวิวัฒนาการที่ตำแหน่งยีน <i>COI</i> ของหนอนพยาธิในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของหนอนพยาธิสายพันธุ์ต่าง ๆ.....	61
รูปที่ 27 แผนภูมิวิวัฒนาการที่บริเวณ <i>ITS1</i> ของหนอนพยาธิในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของหนอนพยาธิสายพันธุ์ต่าง ๆ.....	62
รูปที่ 28 ผลการตรวจสอบการตัดผลผลิตภัณฑ์บริเวณ <i>ITS1</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>VspI</i> บนเจล 10% native-PAGE.....	63
รูปที่ 29 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ pcr ของชิ้นส่วนบริเวณ <i>FtsZ</i> บน 1.5% Agarose gel electrophoresis.....	65
รูปที่ 30 แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีชิ้นส่วนบริเวณ <i>FtsZ</i> บน 1.5% Agarose gel electrophoresis.....	65
รูปที่ 31 ผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน <i>FtsZ</i> ของแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> .....	66
รูปที่ 32 แผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิ <i>D. immitis</i> , <i>B.pahangi</i> และ <i>B. malayi</i> ที่พบจากการศึกษานี้ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> .....	70

รูปที่ 33 แผนที่ยีนของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM <sup>®</sup> - T easy.....	95
รูปที่ 34 ตัวอย่างที่พบตัวอ่อนระยะไมโครฟีลาเรียในงานวิจัยนี้ .....	96
รูปที่ 35 แสดง multiple sequence alignment ของตัวอย่างหนอนพยาธิ <i>D. immitis</i> ที่ตำแหน่ง COI .....	97
รูปที่ 36 แสดง multiple sequence alignment ของตัวอย่างหนอนพยาธิ <i>B. pahangi</i> และ <i>B. malayi</i> ที่ตำแหน่ง COI.....	99
รูปที่ 37 แสดง multiple sequence alignment ของตัวอย่างหนอนพยาธิ <i>D. immitis</i> ที่ตำแหน่ง ITS1 .....	100
รูปที่ 38 แสดง multiple sequence alignment ของตัวอย่างหนอนพยาธิ <i>B. pahangi</i> ที่ตำแหน่ง ITS1 .....	101





## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคหนอนพยาธิหัวใจสุนัข (Canine filariasis; dog heartworm disease) เป็นโรคที่เกิดในสุนัข โดยมียุงเป็นพาหะนำโรค เช่น ยุงรำคาญ (*Culex* spp.) ยุงลาย (*Aedes* spp.) ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) และ ยุงเสื่อ (*Mansoni* spp.) เป็นต้น โรคนี้สามารถพบในคนได้และจัดเป็นโรคอุบัติใหม่ที่สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonosis) (1) ซึ่งคนจัดเป็นโฮสต์ที่มีโอกาสได้รับเชื้อโดยบังเอิญ (accidental host) และยังมีรายงานการติดโรคหนอนพยาธิหัวใจได้ในโฮสต์ชนิดอื่น ๆ เช่น หม่าป่า สุนัขจิ้งจอก แรคคูน แพนด้าแดง หมี สิงโต เสือ ลิง ชะนี แมวน้ำ และ นาก เป็นต้น (2-5) โดยจะพบการแพร่กระจายของโรคนี้ได้ทั่วไปในเขตประเทศที่มีอากาศอบอุ่นและเขตร้อน (6) ซึ่งพบว่าหนอนพยาธิตัวกลมกลุ่มฟิลาเรียที่สามารถก่อโรค ได้แก่ *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Brugia malayi*, *B. pahangi*, *B. ceylonensis*, *B. patei*, *Cercopithifilaria grassii*, *Acanthocheilonema reconditum* และ *A. dracunculoides* เป็นต้น (7-9) สำหรับประเทศไทย มักพบหนอนพยาธิ ได้แก่ *D. immitis*, *D. repens*, *Brugia malayi*, *B. pahangi* และ *A. reconditum* เป็นต้น (6) และสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุหลักของการที่เกิดโรคในสุนัขคือหนอนพยาธิ *D. immitis* มีลักษณะลำตัวกลม รูปร่างเรียวยาว และยาว พบตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรีย (microfilaria) อยู่ในกระแสเลือดและพบหนอนพยาธิตัวเต็มวัยจะเข้าไปอาศัยอยู่ในระบบน้ำเหลือง ระบบหมุนเวียนโลหิตและเนื้อเยื่อของโฮสต์ โดยยุงจะกินเลือดของสุนัขที่มีตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียเข้าไปแล้วเกิดการเจริญจนเป็นตัวอ่อนในระยะที่สาม (L<sub>3</sub>; third-stage larva) ซึ่งเป็นระยะติดต่อ (infective stage) เมื่อยุงกัดสุนัขตัวอื่นก็จะปล่อยระยะติดต่อนี้เข้าสู่กระแสเลือดหลังจากนั้น จะเจริญเป็นระยะตัวเต็มวัยที่อาศัยและทำให้เกิดโรคที่หัวใจและปอดของสุนัข (cardiopulmonary dirofilariasis) นอกจากนี้หนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. repens* สามารถก่อโรคในสุนัขได้เช่นกัน แต่มักพบว่าหนอนพยาธิระยะตัวเต็มวัยจะอาศัยและทำให้เกิดโรคในเนื้อเยื่อที่ชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous dirofilariasis) และ บริเวณเยื่อบุตา (ocular dirofilariasis)

ในหนอนพยาธิหัวใจพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Wolbachia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม  $\alpha$ -proteobacteria โดยมีความสัมพันธ์ในการอาศัยอยู่ร่วมกันภายในเซลล์ของหนอนพยาธิแบบ endosymbiosis (10) และสามารถพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ในทุกๆระยะของวงจรชีวิตหนอนพยาธิ ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญในระยะต่าง ๆ ของหนอนพยาธิ การสืบพันธุ์ การดำรงชีวิต และการแลกเปลี่ยนสารที่สำคัญซึ่งกัน และกันในกระบวนการเมตาบอลิซึม เป็นต้น (4, 11) โดยแบคทีเรีย *Wolbachia* มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต ของหนอนพยาธิเป็นอย่างมากหากขาดแบคทีเรียนี้ไปหนอนพยาธิก็จะไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (12) จากความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้สามารถ

นำมาใช้เป็นประโยชน์ในการรักษาโรคหนองพยาธิหัวใจได้ ในปัจจุบันมีการใช้ ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) เช่น doxycycline และ tetracycline เพื่อลดจำนวนแบคทีเรียและส่งผลให้สามารถกำจัดหรือควบคุมประชากรของหนองพยาธิหัวใจภายในโฮสต์ได้ (13-16)

การตรวจจำแนกหนองพยาธิหัวใจที่นิยมใช้ในปัจจุบันจะอาศัย 2 วิธีหลัก คือการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological identification) และจำแนกโดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular identification) การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยามักจะศึกษาโดยการตรวจจำแนกระยะไมโครฟิลาเรียที่อยู่ในเลือดของสุนัขภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่การจำแนกลักษณะนี้อาจจะระบุชนิดของหนองพยาธิหัวใจ ได้ไม่ค่อยชัดเจนเพราะระยะไมโครฟิลาเรียของหนองพยาธิบางชนิดมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันมากจำเป็นต้องอาศัยความชำนาญจึงสามารถจำแนกได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ จึงได้นำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้เพื่อจำแนกและระบุสายพันธุ์ของหนองพยาธิรวมถึงแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในหนองพยาธิ โดยศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบในนิวเคลียส (nuclear DNA) เช่น Internal transcribed spacer, 18s ribosomal DNA, 28S หรือศึกษาที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA) เช่น Cytochrome c oxidase, Cytochrome b (*Cytb*) และ 12s ribosomal RNA เป็นต้น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวนี้เป็นตำแหน่งที่มีความจำเพาะสูง มีชุดยีนซ้ำกันจำนวนมากในแต่ละเซลล์ (high copy numbers) และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงระหว่างสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตจึงนิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้

การศึกษาวิจัยครั้งนี้อาศัยการตรวจจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และอาศัย เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุสายพันธุ์หนองพยาธิหัวใจและแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนองพยาธิ โดยตรวจหนองพยาธิที่ 2 ตำแหน่งคือ Internal transcribed spacer 1 (*ITS1*) และ Cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) อาศัยเทคนิค Conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) และตรวจหาแบคทีเรียที่ตำแหน่งยีน Filamenting temperature sensitive protein mutant Z (*FtsZ*) โดย nested PCR จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดของสุนัขที่เก็บจากกรุงเทพมหานครและปริมณฑล แล้วนำมาวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลทางอณูชีววิทยาในงานวิจัยอื่น ๆ ต่อไป

## 1.2 คำถามของการวิจัย

- 1.2.1 ตำแหน่ง *COI* และ *ITS1* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับนิวคลีโอไทด์ของหนอนพยาธิหัวใจสุนัขหรือไม่ และสามารถใช้ศึกษาวิวัฒนาการของหนอนพยาธิที่พบในสุนัขได้หรือไม่
- 1.2.2 สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิได้หรือไม่ และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง *FtsZ* หรือไม่

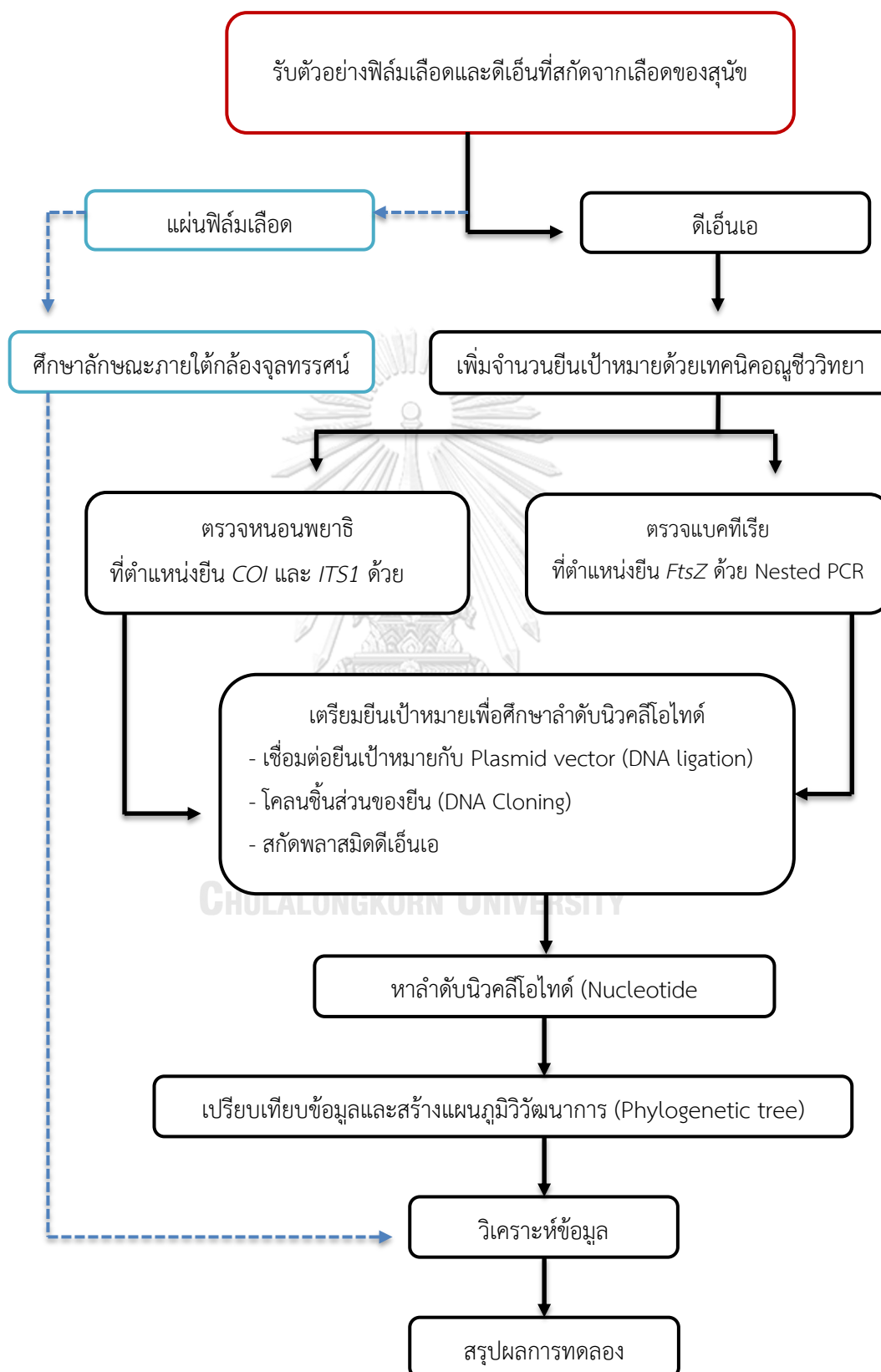
## 1.3 สมมติฐานของการวิจัย

- 1.3.1 สามารถจำแนกความหลากหลายของหนอนพยาธิหัวใจสุนัข โดยอาศัยความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง *COI* และ *ITS1* ได้
- 1.3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FtsZ* สามารถใช้ในการตรวจหาและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Wolbachia* spp. ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิได้

## 1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.4.1 เพื่อจำแนกสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนพยาธิหัวใจ ที่พบในเลือดสุนัขที่เก็บได้จากกรุงเทพมหานครและปริมณฑล
- 1.4.2 เพื่อตรวจหาและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิหัวใจสุนัข

## 1.5 กรอบแนวความคิดการวิจัย



## 1.6 คำสำคัญ

*Dirofilaria immitis*

*Wolbachia* bacteria

Internal transcribed spacer 1 (*ITS1*)

Cytochrome C oxidase subunit I gene (*COI*)

Filamenting temperature sensitive mutant Z gene (*FtsZ*)

Phylogenetic tree

## 1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

***Dirofilaria immitis*** หนองพยาธิที่เป็นสาเหตุหลักของโรหนองพยาธิหัวใจสุนัขพบว่าอาศัยอยู่ในหัวใจและปอดของสุนัข

***Wolbachia* bacteria** เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์ของหนองพยาธิซึ่งมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของหนองพยาธิ

**Cytochrome oxidase subunit I gene (*COI*)** เป็นตำแหน่งยีนที่พบใน mitochondrial DNA ทำหน้าที่สร้าง cytochrome c oxidase subunit I ซึ่งมีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ มีจำนวนชุดมากในแต่ละเซลล์ ง่ายต่อการเพิ่มจำนวน สามารถใช้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต

**Internal transcribed spacer 1 (*ITS1*)** เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบระหว่าง 18s และ 5.8s rRNA genes มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถใช้จำแนกชนิดและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

**Filamenting temperature sensitive mutant Z gene (*FtsZ*)** เป็นตำแหน่งยีนของแบคทีเรียทำหน้าที่สร้าง Filamenting temperature sensitive mutant Z มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแบ่งเซลล์และสร้างผนังเซลล์ มีจำนวนชุดของยีนมากในแต่ละเซลล์ ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนและใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ดี

**Phylogenetic tree** การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตโดยใช้ข้อมูลทางความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการ โดยสิ่งมีชีวิตที่มีต้นกำเนิดร่วมกันหรือมีความใกล้เคียงกันจะมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอและลำดับของกรดอะมิโนบนโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกัน

### 1.8 ประโยชน์ที่ได้รับ

- 1.8.1 สามารถอธิบายความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนพยาธิหัวใจ *Dirofilaria* spp. เพื่อการ จำแนกชนิดของหนอนพยาธิที่พบในสุนัขได้
- 1.8.2 สามารถอธิบายความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Wolbachia* spp. ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิเพื่อพัฒนาวิธีการควบคุมและรักษาต่อไปได้
- 1.8.3 สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลทางอณูชีววิทยาเกี่ยวกับหนอนพยาธิหัวใจและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิที่พบในประเทศไทยเพื่อเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยอื่นต่อไป



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1. หนอนพยาธิหัวใจสุนัข

##### 2.1.1 ลักษณะทั่วไป

หนอนพยาธิหัวใจสุนัข (*Dirofilaria* spp.) เป็นหนอนตัวกลมในพยาธิกลุ่มฟิลาเรียซึ่งจัดอยู่ใน

อาณาจักร (Kingdom): Animalia

ไฟลัม (Phylum): Nematoda

ชั้น (Class): Secernentea

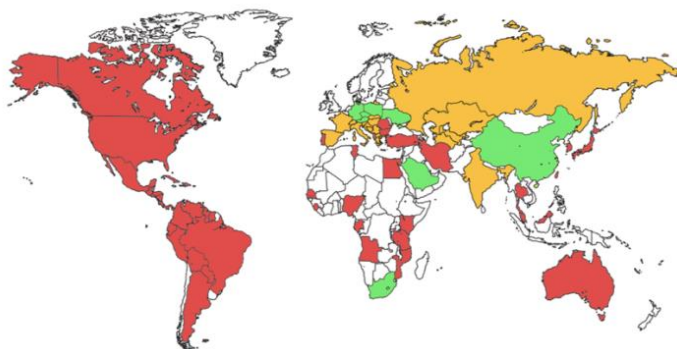
อันดับ (Order): Spirurida

วงศ์ (Family): Onchocercidae

วงศ์ย่อย (Subfamily): Dirofilariinae

สกุล (Genus): *Dirofilaria*

ปัจจุบันพบหนอนพยาธิสกุล *Dirofilaria* มากกว่า 30 ชนิดจากทั่วโลก ซึ่งแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อการเกิดโรคและอยู่ในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน โดยหนอนพยาธิที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่สามารถก่อโรคพยาธิหัวใจสุนัขโดยเข้าไปอาศัยอยู่ในระบบน้ำเหลือง ระบบหมุนเวียนโลหิตและเนื้อเยื่อของโฮสต์ได้ คือหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* และ *D. repens* โดยสายพันธุ์ *D. immitis* เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคหนอนพยาธิหัวใจ พบว่าพยาธิมักเข้าไปอยู่ที่หัวใจและปอด (cardiopulmonary dirofilariasis) โดยพบมากในทวีปอเมริกา ทวีปออสเตรเลีย ทวีปแอฟริกา ทวีปเอเชีย รวมถึงในประเทศไทย (รูปที่ 1) และหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. repens* สามารถก่อโรคได้ทั้งในสุนัขและแมว โดยมักพบที่ผิวหนัง (subcutaneous dirofilariasis) และที่เยื่อบุดวงตา (ocular dirofilariasis) จะพบมากในทวีปเอเชียโดยเฉพาะประเทศจีน ทวีปยุโรปและประเทศแอฟริกาใต้ (รูปที่ 1) นอกจากนี้สามารถพบการระบาดของโรคหนอนพยาธิหัวใจที่เกิดจากหนอนพยาธิทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ในบางประเทศ เช่น รัสเซีย อินเดีย อิตาลี และ ฝรั่งเศส เป็นต้น (10) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การกระจายของโรคหนอนพยาธิหัวใจสุนัข (ดัดแปลงจาก Simón et al., 2009)

ตารางที่ 1 การกระจายของหนอนพยาธิสกุล *Dirofilaria*

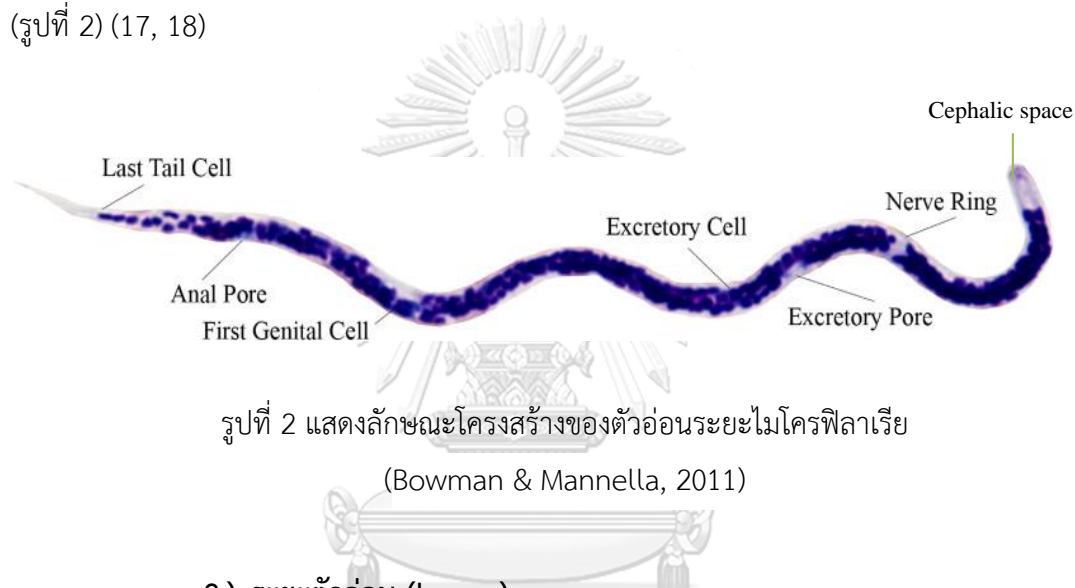
Subgenus and species	Host (families)	Geographical distribution
Subgenus <i>Dirofilaria</i>		
<i>D. ailure</i>	Procyonidae	China
<i>D. freitasi</i>	Bradypodidae	Brazil
<i>D. immitis</i>	Canidae, Felidae, Hominidae	Cosmopolitan
<i>D. lutrae</i>	Mustelidae	USA
<i>D. spectans</i>	Hominidae (single case), Mustelidae	Brazil
Subgenus <i>Nochtiella</i>		
<i>D. acutiuscula</i>	Canidae, Caviidae, Felidae, Tayassuidae	South America, USA
<i>D. bonnie</i>	Muridae	Java
<i>D. cancrivori</i>	Procyonidae	Guyana
<i>D. corynodes</i>	Cercopithecidae	Africa, Thailand
<i>D. genettae</i>	Felidae, Viverridae	Nigeria
<i>D. granulosa</i>	Felidae	Africa, Asia
<i>D. incrassata</i>	Bradypodidae, Procyonidae	Brazil, Central America
<i>D. linstowi</i>	Cercopithecidae	Sri Lanka
<i>D. macacae</i>	Cercopithecidae	Indochina
<i>D. macrodemos</i>	Bradypodidae	Guyana, Panama
<i>D. magnilarvata</i>	Cercopithecidae, Hominidae, Hylobatidae	Malaya
<i>D. minor</i>	Felidae	Vietnam
<i>D. pagumae</i>	Viverridae	Indochina
<i>D. panamensis</i>	Bradypodidae	Panama
<i>D. repens</i>	Canidae, Felidae, Hominidae, Viverridae	Europe, Asia, Africa
<i>D. sachsi</i>	Bovidae	East Africa
<i>D. striata</i>	Canidae, Felidae, Hominidae, Tayassuidae	Brazil, Venezuela, USA
<i>D. subdermata</i>	Erethizontidae	North America, South
<i>D. sudanensis</i>	Felidae, Hyaenidae	Africa
<i>D. tawila</i>	Cercopithecidae	Sudan
<i>D. tenuis</i>	Hominidae, Procyonidae	Africa
<i>D. ursi</i>	Felidae, Hominidae, Ursidae	North America
		Asia, North America



## 2.1.2 ชีวิตาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนพยาธิหัวใจ *Dirofilaria* spp.

### 1.) ระยะเวลาไมโครฟิลาเรีย (microfilaria)

ตัวอ่อนระยะแรกหรือระยะไมโครฟิลาเรีย (first stage larvae; microfilaria) ของหนอนพยาธิหัวใจ (รูปที่ 2) จะอาศัยอยู่ในกระแสเลือดของโฮสต์ มีลักษณะเรียวยาว ไม่มีปลอกหุ้มลำตัว (unsheathed) ขนาดตัวยาว 290-330 ไมโครเมตร ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว 5-7 ไมโครเมตร และทางมีลักษณะเหยียด (straight tail) โครงสร้างภายในจะมีช่องว่างที่ส่วนหัว (cephalic space) เมื่อย้อมสีจะเห็นนิวเคลียส (nucleus) ภายในจำนวนมากติดสีม่วงแต่ละนิวเคลียสอยู่ติดกันไม่สามารถนับจำนวนได้ แต่จะสามารถเห็นนิวเคลียสสุดท้าย (last tail cell) ได้ที่ปลายหาง (รูปที่ 2) (17, 18)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างของตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรีย

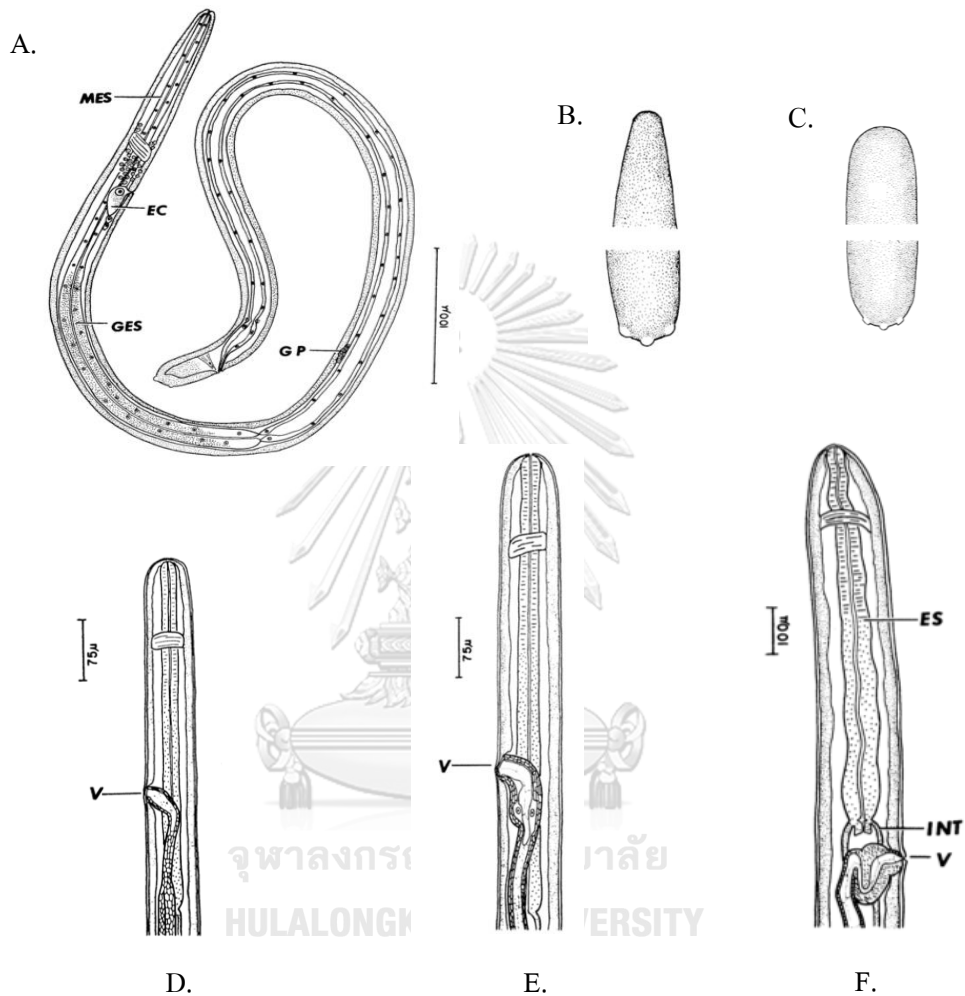
(Bowman & Mannella, 2011)

### 2.) ระยะตัวอ่อน (larvae)

เมื่อตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียเข้าไปในเอยแล้วเกิดการลอกคราบเป็นตัวอ่อนใน ระยะที่สอง ( $L_2$ ; second-stage larva) ที่มีขนาดตัวสั้นลงแต่ตัวจะอ้วนขึ้น (18) จากนั้นเกิดการลอกคราบต่อในครั้งที่สองเพื่อเป็นตัวอ่อนระยะที่สาม ( $L_3$ ; third-stage larva) เข้าไปเจริญต่อในโฮสต์

ตัวอ่อนระยะที่สามซึ่งเป็นระยะติดต่อ (Infective stage) (รูปที่ 3 A, B, C) มีขนาดตัวยาว 1.09-1.65 มิลลิเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว 0.024-0.029 มิลลิเมตร โดยที่ ด้าน anterior end หรือด้านหัวของระยะติดต่อจะเรียว (tapered anterior end) แต่ถ้าเป็นระยะสุดท้ายของ  $L_3$  (late third-stage larva) ที่ด้านหัวจะมีลักษณะมน (rounded anterior end) และที่ด้าน posterior end หรือด้านหลังของเพศผู้จะพบ caudal papillae ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของตัวอ่อนระยะนี้ โดยตัวอ่อนระยะ  $L_3$  จะมีการพัฒนาของโครงสร้างภายในที่สมบูรณ์มากขึ้น โดยเฉพาะระบบย่อยอาหาร (digestive system) มีผนังลำตัวหนาขึ้นและช่องว่างภายในลำตัว (lumen) ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (18) ในระยะนี้เริ่มมีการเจริญของระบบสืบพันธุ์ (reproductive system) ในบางส่วน ก่อนมีการลอกคราบครั้งที่สามเพื่อเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่สี่

ตัวอ่อนระยะที่สี่ (L<sub>4</sub>; fourth-stage larva) (รูปที่ 3 D, E, F) จะมีขนาดตัวยาวได้สูงสุดถึง 18 มิลลิเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัวได้มากที่สุดถึง 0.115 มิลลิเมตร ซึ่งทางด้านหัวมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยมีลักษณะที่เรียวยาวขึ้น (tapered anterior end) และมีการเจริญของระบบสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์มากขึ้นทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (18)



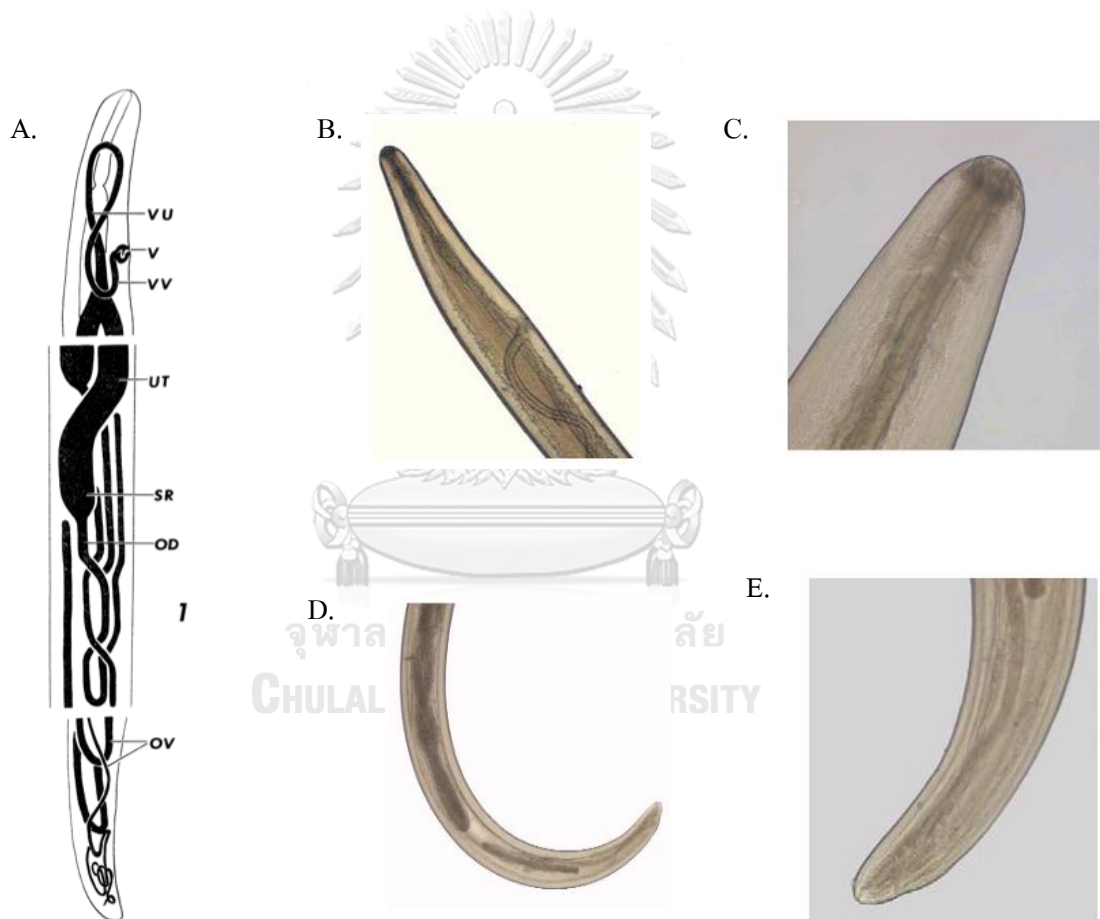
รูปที่ 3 หนอนพยาธิระยะตัวอ่อน

(Orihel., 1961) (A) ตัวอ่อนระยะที่สาม, (B) anterior และ posterior ends ในช่วงระยะติดตัวของตัวอ่อนระยะที่สาม, (C) anterior และ posterior ends ในช่วงระยะสุดท้ายของตัวอ่อน ระยะที่สาม, (D) ตัวอ่อนระยะที่สี่ที่มีการเจริญหลัง 30 วัน, (E) ตัวอ่อนระยะที่สี่ที่มีการเจริญหลัง 60 วัน, (F) ตัวอ่อนระยะที่สี่ที่มีการเจริญหลัง 90 วัน. (EC: excretory cell, ES: esophagus, GES: glandular esophagus, GP: genital primordium, INT: intestine, MES: muscular esophagus, V: vulva)

### 3.) ระยะตัวเต็มวัย (Adult)

ระยะตัวเต็มวัยหรือตัวแก่ ในระยะนี้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยมีรูปร่างลำตัวกลม เรียว และยาว อวัยวะภายในลำตัวและระบบสืบพันธุ์เจริญอย่างสมบูรณ์ โดยสามารถพบระยะตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในหัวใจและปอดของโฮสต์

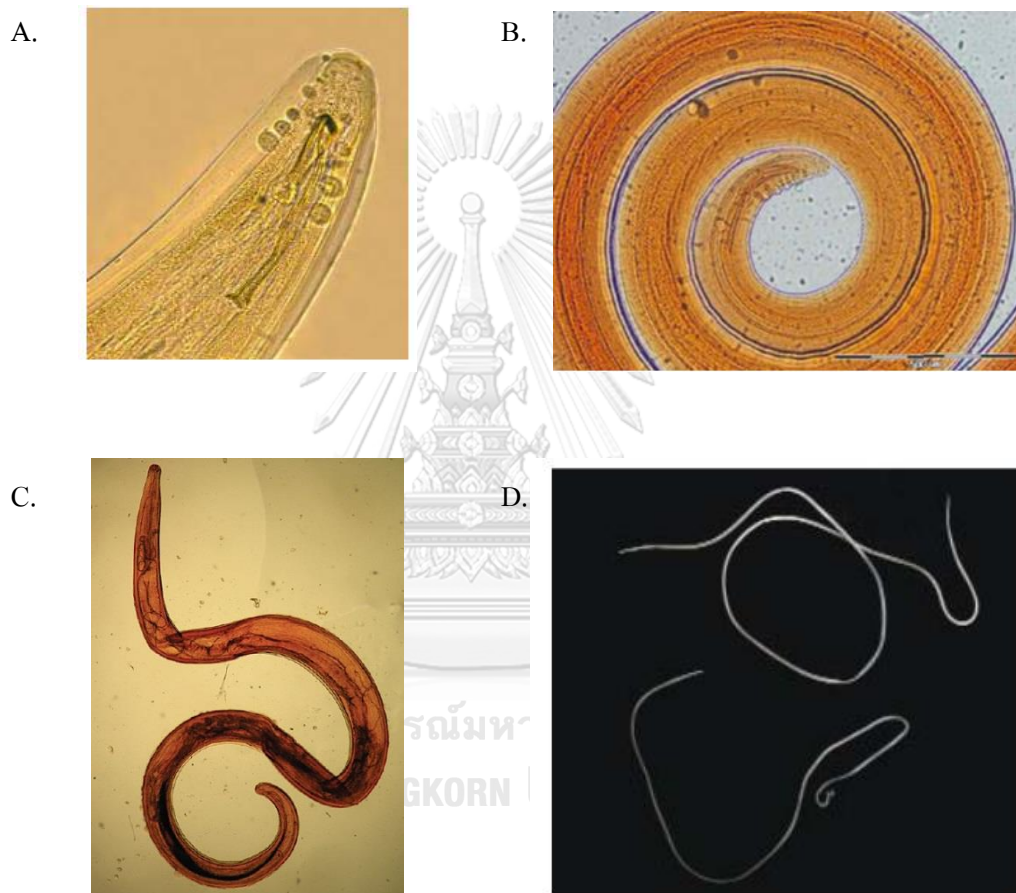
ระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย (adult female): มีขนาดตัวยาว 250-300 มิลลิเมตร มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว 1-1.3 มิลลิเมตร โดยเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้และมีปลายหางค่อนข้างเหยียดตรงกว่า (straight posterior end) และจะพบอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย เช่น vulva, vagina, uteri, oviducts และ ovaries มีการเจริญอย่างสมบูรณ์ (19, 20)



รูปที่ 4 หนองพยาธิระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย

(A) โครงสร้างภายใน (Orihel., 1961), (B) ด้าน cephalic end, (C) รูปขยายด้าน cephalic end, (D) ด้าน posterior end, (E) ด้าน anterior end (Genchi et al., 2007). (OD: oviduct, OV: ovary, SR: seminal receptacle, UT: uterus, V: vulva, VU: vagina uterine, VV: vagina vera)

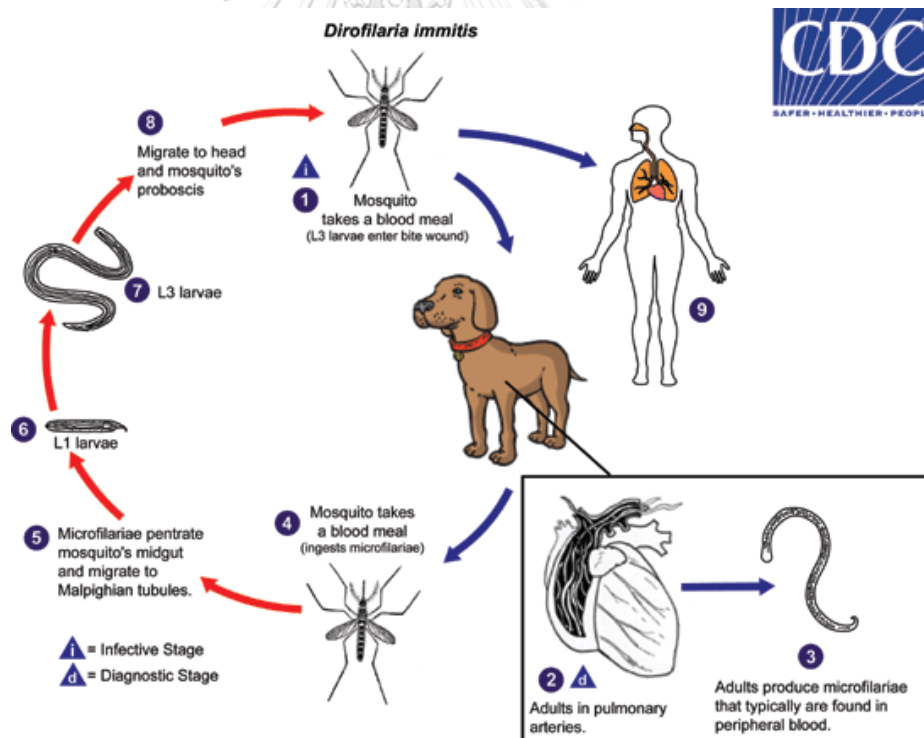
ระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ (adult male; AM) (รูปที่ 5) มีขนาดตัวยาว 120-200 มิลลิเมตร และมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว 0.7-0.9 มิลลิเมตร มีลักษณะเด่นที่ปลายหางจะค่อนข้างงอ (Spirally coiled posterior end) โครงสร้างในระบบสืบพันธุ์มีการเจริญอย่างสมบูรณ์ เช่น spicules, genital papillae , cloaca และ testis เป็นต้น (19, 20)



รูปที่ 5 หนองพยาธิระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ (Heidari *et al.*, 2015). (A) แสดง papillae ที่ด้าน caudal end, (B) ลักษณะปลายหาง (C) ลักษณะตัวเต็มวัยย้อมด้วยสี H&E (100X), (D) หนองพยาธิตัวเต็มวัยเพศเมีย (บน) และเพศผู้ (ล่าง)

### 2.1.3 วงจรชีวิตของหนอนพยาธิ

ระหว่างที่ยุงดูดกินเลือดก็จะปล่อยตัวอ่อนของหนอนพยาธิระยะที่สาม (ระยะติดต่อก) เข้าสู่เนื้อเยื่อที่ชั้นใต้ผิวหนังของสุนัข (definitive host) จากนั้นตัวอ่อนที่เข้าไปจะเกิดการลอกคราบจำนวน 2 ครั้ง แล้ว เจริญเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียโดยเข้าไปอยู่ในหัวใจและหลอดเลือดที่ไปยังปอด (pulmonary artery) ตัวเต็มวัยหนอนพยาธิหัวใจสามารถมีชีวิตอยู่ต่อได้อีกหลายปีและจะมีการสืบพันธุ์กัน โดยตัวเต็มวัย เพศเมียจะปล่อยตัวอ่อนระยะแรก (microfilaria) ออกมาอยู่ในกระแสเลือดของสุนัข เมื่อยุงดูดกินเลือดของ สุนัขที่มีเชื้อหนอนพยาธิหัวใจ ยุงก็จะได้รับตัวอ่อนระยะไมโครฟีลาเรียเข้าไป โดยตัวอ่อนระยะนี้จะใช้เวลา ประมาณ 24 ชั่วโมง เคลื่อนที่ไปยังกระเพาะของยุงแล้วผ่านไปยังส่วน malpighian tubules เพื่อลอกคราบ แล้วเจริญต่อเป็นตัวอ่อนระยะที่สอง (L<sub>2</sub>) ใช้เวลาประมาณ 8-10 วัน และเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่สาม (L<sub>3</sub>) ใช้เวลา 3 วัน จากนั้นจะเคลื่อนที่มาอยู่บริเวณปากของยุงและจะปล่อยระยะติดต่อนี้ออกมาระหว่างที่ดูดกิน เลือดของสุนัขหรือโฮสต์ตัวอื่นต่อไป โดยตัวอ่อนระยะนี้เมื่อเข้าไปอยู่ในโฮสต์ก็จะมีการลอกคราบเป็น ตัวอ่อนระยะที่สี่ (L<sub>4</sub>) และสามารถไปยังอวัยวะอื่น ๆ ของโฮสต์ได้ต่อไป (10, 20) (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 วงจรชีวิตของหนอนพยาธิ *D. immitis*

(CDC, 2012 : online)

### 2.1.4 โรคหนอนพยาธิหัวใจสุนัข (canine dirofilariasis)

โรคหนอนพยาธิหัวใจสุนัข (canine dirofilariasis) เป็นโรคประจำถิ่นอยู่ในหลายประเทศทั่วโลก เช่น คิวบา สหรัฐอเมริกา โบลิเวีย ยูเครน สเปน อียิปต์ อิหร่าน อินเดีย ไนจีเรีย ออสเตรเลีย และไทย เป็นต้น (10) โดยโรคหนอนพยาธิหัวใจสุนัขเกิดจากหนอนพยาธิ 2 สายพันธุ์เป็นส่วนใหญ่ คือ *D. immitis* และ *D. repens* หนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคในสุนัข (2) (รูปที่ 7A) เมื่อยุงพาหะที่มีตัวอ่อนของ หนอนพยาธิหัวใจกัดสุนัข ตัวอ่อนจะเข้าไปเจริญเป็นตัวเต็มวัยในอวัยวะต่าง ๆ โดยอาการของโรคเหล่านี้สามารถแบ่งได้ 4 ระดับ ดังนี้

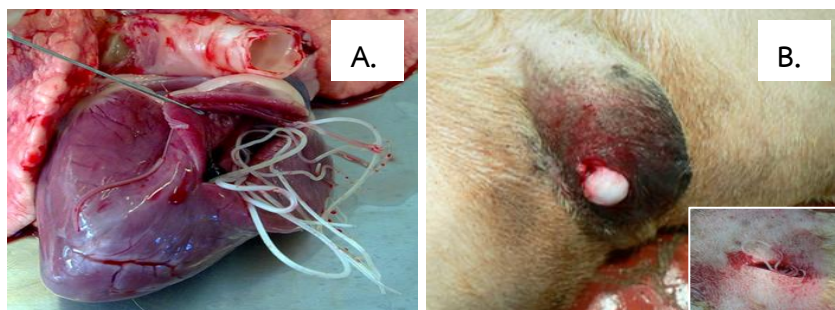
อาการระดับที่ 1 สุนัขจะยังไม่แสดงอาการแต่สามารถพบการปรากฏของระยะตัวเต็มวัยหนอนพยาธิ *D. immitis* ในห้องหัวใจหรือหลอดเลือดที่ไปปอด (cardiopulmonary dirofilariasis)

อาการระดับที่ 2 สุนัขเริ่มมีอาการเหนื่อย ป่วย มีความผิดปกติของหัวใจ มีความดันโลหิตในปอดสูงทำให้มีอาการไอแห้งและมีตับโตร่วมกับภาวะท้องมาน

อาการระดับที่ 3 สุนัขจะถ่ายปัสสาวะเป็นสีแดงเนื่องจากพยาธิตัวอ่อนและตัวเต็มวัยทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) อาจจะมีภาวะโลหิตจางร่วมด้วย

อาการระดับที่ 4 จะเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวส่วนใหญ่จะเกิดที่หัวใจห้องขวา (right-sided congestive heart failure) เนื่องจากมีหนอนพยาธิจำนวนมากเข้าไปอุดตันบริเวณหลอดเลือดดำใหญ่ในหัวใจ อาจส่งผลให้เกิดภาวะหัวใจวายและรุนแรงถึงเสียชีวิตได้

ส่วนหนอนพยาธิ *D. repens* จะทำให้เกิดโรค subcutaneous และ ocular dirofilariasis โดยโรค subcutaneous dirofilariasis จะพบหนอนพยาธิอยู่ที่เนื้อเยื่อชั้นใต้ผิวหนัง (รูปที่ 7B) บริเวณต่าง ๆ ในระยะแรกสุนัขจะมีตุ่มขึ้นตามตัว มีอาการคัน ผิวหนังอักเสบเหมือนเป็นโรคผิวหนังทั่วไป แต่ในระยะถัดมาสุนัขจะเริ่มมีไข้ อาเจียน ผอมแห้ง ซึม อาจจะมีหนองและมีภาวะของต่อมน้ำเหลืองโต (lymphadenomegaly) ร่วมด้วย ส่วนโรค ocular dirofilariasis จะพบพยาธิอยู่ที่เยื่อบุตาทำให้มีอาการคันและเนื้อเยื่อบุตาอักเสบ (2, 10)



รูปที่ 7 โรคหนอนพยาธิหัวใจสุนัข

(A) พยาธิตัวเต็มวัย *D. immitis* ในหัวใจของสุนัข (B) โรค subcutaneous dirofilariasis โดย *D. repens* เกิดหนองที่ผิวหนังบริเวณอัมตะของสุนัข (Simón et al., 2012)

### 2.1.5 โรคไดโรฟิลาเรียในคน (human dirofilariasis)

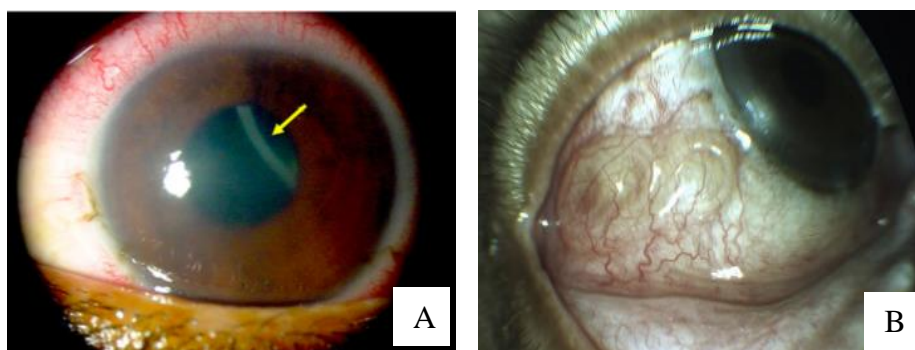
โรคหนอนพยาธิหัวใจชนิดนี้สามารถก่อโรคได้ ซึ่งคนจัดเป็นโฮสต์ที่มีโอกาสได้รับเชื้อโดยบังเอิญ (accidental host) จากการกัดของยุงพาหะที่ปล่อยตัวอ่อนระยะติดต่อเข้าไป แต่จะมีวงชีวิตที่ไม่สมบูรณ์เพราะไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้ โดยพบการกระจายของโรค human dirofilariasis ในหลายประเทศทั่วโลกทั้งในทวีปอเมริกา ยุโรป ออสเตรเลีย เอเชีย รวมถึงประเทศไทย (รูปที่ 8) ซึ่งในประเทศไทยมีการรายงานว่าเป็นพื้นที่ที่มีการติดเชื่อจากหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* มากกว่า หนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. repens* โดยหนอนพยาธิ *D. immitis* จะเข้าไปอาศัยอยู่ในปอดแล้วก่อโรค human pulmonary dirofilariasis ผู้ป่วยมักมีอาการแน่นหน้าอก ปวดกล้ามเนื้อ มีไข้ และรู้สึกไม่สบายตัว เมื่ออาการผ่านไประยะหนึ่งมีการสะสมของหนอนพยาธิเกิดการอุดตันของลิ้มเลือดในปอด (pulmonary embolism) เกิดก้อนเนื้อในปอด (pulmonary nodule) และอาจมีเลือดปนออกมากับอุจจาระของผู้ป่วยได้ (10, 21) โดยพบรายงานการเกิดโรค pulmonary dirofilariasis ในผู้ป่วยจำนวน 4 ราย ที่ประเทศจอร์เจียเมื่อปี ค.ศ. 1999 ซึ่งมีสาเหตุจากหนอนพยาธิ *D. immitis* โดยผู้ป่วยทั้ง 4 ราย มีลักษณะของอาการที่ใกล้เคียงกันคือพบก้อนเนื้อในปอดขนาด 1-2 เซนติเมตร ไม่มีหินปูนเกาะก้อนเนื้อ พบรอยโรคในปอดที่เกิดจากหนอนพยาธิและพบตัวหนอนพยาธิอยู่ในก้อนเนื้อนั้น (22) และในปี ค.ศ. 2001 มีรายงานการเกิดโรค hepatic dirofilariasis ครั้งแรกในผู้ป่วยที่ประเทศเกาหลี ซึ่งเป็นผู้ป่วยชายอายุ 39 ปี ที่สุขภาพดี ไม่เคยมีประวัติการติดเชื่อมาก่อนและไม่เคยเดินทางออกนอกประเทศ โดยตรวจพบก้อนเนื้อที่ตับ (hepatic nodule) พบถุงน้ำดีใต้เยื่อหุ้มตับ (hepatic subcapsular) และพบรอยโรคบริเวณที่หนอนพยาธิเข้าไปอาศัยอยู่ จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์รอยของโรคและตัดชิ้นเนื้อไปตรวจพบหนอนพยาธิ *D. immitis* ที่เป็นสาเหตุของโรคนี้ (23)



รูปที่ 8 แผนที่การกระจายของโรค human dirofilariasis (ดัดแปลงจาก Simón et al., 2012)

(สีแดง: เกิดจาก *D. immitis* เป็นหลัก, สีเทา: เกิดจาก *D. repens* เป็นหลัก)

หนอนพยาธิ *D. repens* สามารถก่อโรค subcutaneous dirofilariasis โดย หนอนพยาธิจะเข้าไปอยู่ที่เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังของผู้ป่วย เช่น ผิวหนังที่แขน ขา ใบหน้า ศีรษะ และ ผิวหนังหน้าท้อง เป็นต้น ทำให้เกิดตุ่ม ผื่นแพ้ (erythema) คัน (pruritus) และบวม (swelling) ตรง บริเวณที่หนอนพยาธิเข้าไปอยู่ นอกจากนี้ยังก่อโรค ocular dirofilariasis ผู้ป่วยจะมีอาการปวดบวม เบ้าตา ตาบวมแดง เนื้อเยื่อบุตาอักเสบ (bulbar conjunctiva) (10) ม่านตาอักเสบ (uveitis) แล้วอาจ ลูกกลมไประคายเคืองที่ชั้นตาขาว (episcleritis) มีภาวะต้อหิน (glaucoma) แทรกซ้อนและอาจรุนแรงถึงขั้นตาบอดได้ (20) ซึ่งมีการรายงานในประเทศอิหร่านเมื่อปี ค.ศ. 2008 ในผู้ป่วยหญิงอายุ 27 ปี เป็นโรค periocular dirofilariasis มีอาการตาซ้ายบวมและแดง นาน 10 วัน หลังจากนั้นเริ่มมีอาการระคายเคืองที่ชั้นตาขาวซึ่งผู้ป่วยรายนี้เคยมีประวัติตาบวมแดงและมีผื่นแพ้มาก่อน ในขั้นแรก วิเคราะห์ว่าเป็นเพียงเนื้อเยื่อบุตาอักเสบแต่หลังจากการตรวจอย่างละเอียดและผ่าตัดดวงตา พบ หนอนพยาธิ *D. immitis* บริเวณช่องหน้าของลูกตา (anterior chamber) ซึ่งโดยปกติหนอนพยาธิ ชนิดนี้จะเข้าไปอยู่และทำให้เกิดโรคที่หัวใจหรือปอดเป็นส่วนใหญ่ แต่ก็จะมีบางกรณีที่หนอนพยาธิ สามารถเข้าไปยังอวัยวะอื่น ๆ แล้วก่อให้เกิดโรคได้ (24) นอกจากนี้มีการรายงานในประเทศศรีลังกา เมื่อปี ค.ศ. 2017 พบผู้ป่วยซึ่งเป็นเด็กชายวัย 1 ปี 10 เดือน เป็นโรค subcutaneous dirofilariasis พบตุ่มที่บริเวณผิวหนังหน้าท้อง มีผื่นและมีรอยโรคที่บวมแดงอย่างเห็นได้ชัด หลังจากนั้นนำไปตรวจ วิเคราะห์อย่างละเอียด พบว่าเป็นรอยโรคที่เกิดจากหนอนพยาธิและมีหนอนพยาธิอยู่ในก้อนเนื้อ บริเวณนั้นจึงตัดชิ้นเนื้อไปตรวจทางด้านปรสิตวิทยาพบว่าเป็นหนอนพยาธิ *D. repens* ซึ่งเป็นสาเหตุ ของการเกิดโรคในครั้งนี้ (25) และจากการรายงานที่ประเทศอินเดียในปี ค.ศ. 2015 พบผู้ป่วยชาย อายุ 60 ปีป่วยเป็นโรค ocular dirofilariasis มีปัญหาด้านการมองเห็นตาพร่ามัว นาน 1 เดือน ปวด เบ้าตาและมีอาการตาแดงร่วมด้วย ซึ่งผู้ป่วยรายนี้ไม่เคยมีประวัติการบาดเจ็บหรือเป็นตาแดงมาก่อน เมื่อตรวจอย่างละเอียดพบหนอนพยาธิบริเวณช่องหน้าลูกตาจึงทำการผ่าตัดออก และนำไปวิเคราะห์ ผลพบว่าเป็นหนอนพยาธิ *D. repens* ที่ก่อโรคในผู้ป่วยรายนี้ (26)



รูปที่ 9 Human ocular dirofilariasis เกิดจากหนอนพยาธิ

(A) *D. immitis* (Dantas et al., 2013) (B) *D. repens* (Behl et al., 2017)



## 2.2 หนอนพยาธิฟิลาเรียอื่น ๆ

### 2.2.1 หนอนพยาธิ *Brugia* spp.

#### 2.2.1.1 ลักษณะทั่วไป

หนอนพยาธิ *Brugia* spp. เป็นหนอนตัวกลมในพยาธิกลุ่มฟิลาเรียซึ่งจัดอยู่ใน

อาณาจักร (Kingdom): Animalia

ไฟลัม (Phylum): Nematoda

ชั้น (Class): Secernentea

อันดับ (Order): Spirurida

วงศ์ (Family): Onchocercidae

วงศ์ย่อย (Subfamily): Onchocercinae

สกุล (Genus): *Brugia*

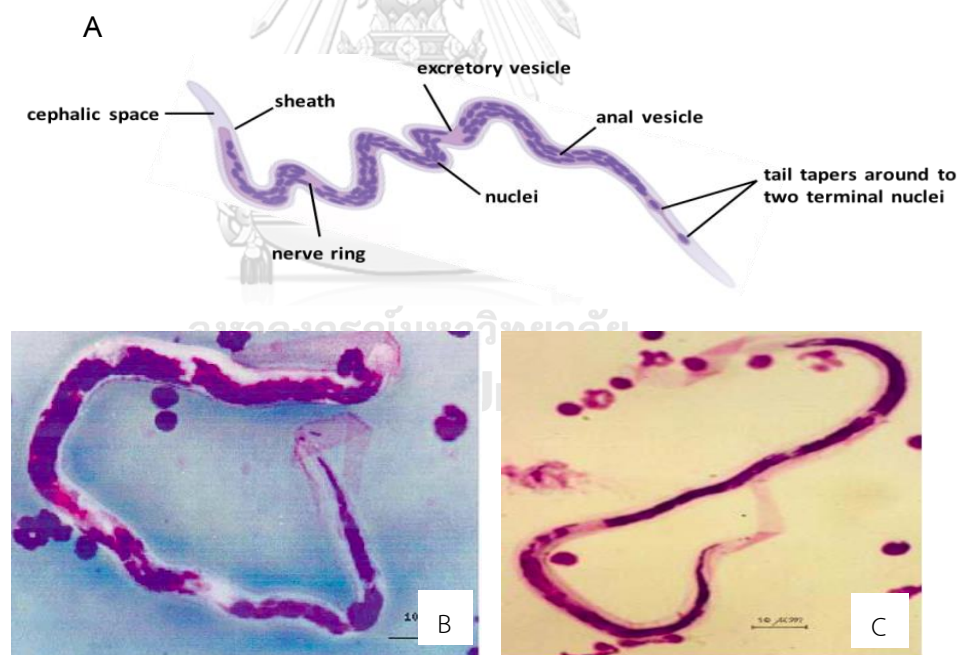
หนอนพยาธิ *Brugia* spp. เป็นหนอนพยาธิตัวกลมในกลุ่มฟิลาเรียซึ่งแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อการเกิดโรคและอยู่ในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่มักจะพบมากในเขตประเทศที่มีภูมิอากาศร้อนชื้น (tropics and subtropics) ได้แก่ เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย อินเดีย เคนยา ศรีลังกาและประเทศไทย เป็นต้น ซึ่งในประเทศไทยพบแหล่งระบาดของโรค (endemic area) ชุกชุมสูงในบางพื้นที่โดยเฉพาะทางภาคใต้และเขตชายแดนไทย-พม่า เป็นต้น ชนิดของหนอนพยาธิ *Brugia* ได้แก่ *B. pahangi*, *B. malayi*, *B. ceylonensis*, *B. patei* และ *B. tupaiae* เป็นหนอนพยาธิที่สามารถก่อโรคในสุนัข แมว และสัตว์อื่นอีกหลายชนิด (27, 28) นอกจากนี้มีหนอนพยาธิ *B. malayi* และ *B. timori* เป็นหนอนพยาธิที่สามารถก่อโรคในคนได้ โดยพบว่าหนอนพยาธิตัวเต็มวัยจะอาศัยอยู่ในต่อมน้ำเหลืองท่อน้ำเหลืองหรือทางเดินน้ำเหลืองในส่วนต่าง ๆ ซึ่งทำให้เกิดโรคทางระบบน้ำเหลือง (filariasis) และต่อมน้ำเหลืองโต

#### 2.2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาหนอนพยาธิ *B. pahangi* และ *B. malayi*

หนอนพยาธิ *B. pahangi* จะพบในสุนัขและแมวเป็นส่วนใหญ่ โดยคนจัดเป็นโฮสต์ที่มีโอกาสได้รับเชื้อโดยบังเอิญแต่จะไม่ก่อโรคในคน (nonpathogenic) (28) มีลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไป คือ ตัวเต็มวัยมีลักษณะตัวเรียว ยาว ตัวเต็มวัยเพศเมียมีขนาดตัวยาว 40 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว 100 ไมโครเมตร และมี Vulva เปิดออกทางด้านหน้าลำตัว (28-30) ส่วนตัวเต็มวัยเพศผู้มีขนาดประมาณ 12.6-17.3 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว 70-80 ไมโครเมตร ซึ่งจะมีขนาดตัวเล็กกว่าเพศเมียและมี spicule 2 อัน ที่มีขนาดไม่เท่ากัน (28-30) โดยจะพบตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ที่ต่อมน้ำเหลืองและท่อน้ำเหลือง เมื่อตัวเต็มวัยทั้งคู่ผสมพันธุ์กันตัวเต็มวัยเพศเมียจะปล่อยตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิออกมาอยู่ในกระแสเลือดโดยมีลักษณะสำคัญ คือ มีปลอกหุ้มลำตัว (sheath) มีขนาดความยาวต่อความกว้างเท่ากับ 2:1 (elongated cephalic) ที่ด้านหัวจะ

มนและเมื่อย้อมสีจะเห็นนิวเคลียสติดสีเข้มจำนวนมากตลอดความยาวของลำตัว ส่วนของปลอกหุ้มตัวจะติดสีเข้ม (granular sheath) และพบนิวเคลียสจำนวน 2 นิวเคลียสที่ปลายหาง (30, 31) (รูปที่ 10)

หนอนพยาธิ *B. malayi* เป็นหนอนพยาธิที่สำคัญในคนซึ่งสามารถก่อโรคเท้าช้าง (Lymphatic filariasis, elephantiasis) มีสุนัข แมว และค่าง เป็นต้น ที่เป็นสัตว์รังโรค (reservoir animals) (28) ตัวเต็มวัยมีลักษณะคล้ายเส้นด้าย ผนังลำตัวเรียบ ส่วนหัวค่อนข้างกลม มี papillae และปลายหางเรียวยาว ซึ่งตัวเต็มวัยเพศเมีย มีขนาดตัวยาว 43.4-55 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว 130-170 ไมโครเมตร ตัวเต็มวัยเพศผู้ มีขนาดตัวยาว 13.5-23.3 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว 70-80 ไมโครเมตร ที่ด้านปลายหางมี spicule 2 อัน ระยะเวลาไมโครฟิลาเรีย ลักษณะคล้ายกับหนอนพยาธิ *B. pahangi* แต่มีขนาดใหญ่กว่า เมื่อย้อมสีปลอกหุ้มตัวจะติดสีชมพู (30) และการปรากฏของระยะไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดมี 3 แบบ คือ Nocturnal periodic type (พบเฉพาะเวลากลางคืน) Diurnal periodic type (พบเฉพาะเวลากลางวัน) และ Nocturnal subperiodic type (พบเวลากลางคืนมากกว่ากลางวัน) ซึ่งมักจะพบการปรากฏลักษณะนี้ในสัตว์ที่เป็นรังโรค เช่น สุนัขและแมว (30, 32, 33) (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 ตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิ *Brugia* spp.

(A) โครงสร้างตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรีย (B) *B. malayi* (Chansiri et al., 2002) (C) *B. pahangi* (Liu, 2012)

### 2.1.2.3 การก่อโรคของหนอนพยาธิ *B. pahangi* และ *B. malayi*

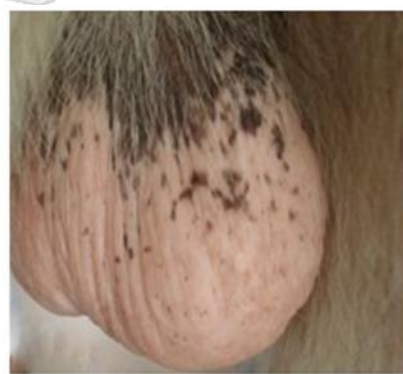
โรคที่เกิดจากหนอนพยาธิ *B. pahangi* และ *B. malayi* มักจะเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบน้ำเหลือง เช่น บริเวณต่อมน้ำเหลือง ท่อน้ำเหลืองและทางเดินน้ำเหลืองในส่วนต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในคนหรือสัตว์และสามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ (zoonotic) (13) โดยหนอนพยาธิ *B. pahangi* จะพบในแมวและสุนัขเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งคนจัดเป็นโฮสต์ที่มีโอกาสได้รับเชื้อโดยบังเอิญและมักจะไม่ก่อโรคในคน (nonpathogenic) (28) แต่มีรายงานการทดลองศึกษาพบว่าหนอนพยาธิชนิดนี้สามารถเจริญได้ในคน โดยทำการทดลองฉีดตัวอ่อนระยะที่สามของหนอนพยาธิ *B. pahangi* ซึ่งเป็นระยะติดต่อเข้าไปในอาสาสมัคร พบว่าต่อมน้ำเหลืองเกิดการขยายบวมโตเนื่องจากหลอดน้ำเหลืองเกิดการอักเสบ (lymphangitis) ที่บริเวณแขนและสามารถตรวจพบตัวอ่อนระยะไม่โครฟีลาเรียของหนอนพยาธิอยู่ภายในกระแสเลือดของอาสาสมัครรายนี้ (34) และมีรายงานการตรวจพบตัวอ่อนระยะไม่โครฟีลาเรียของหนอนพยาธิ *B. pahangi* ในกระแสเลือดของผู้ป่วยเด็กที่จังหวัดระยองซึ่งมีอาการต่อมน้ำเหลืองบริเวณขาหนีบโต (35) นอกจากนี้มีรายงานพบตัวอ่อนของหนอนพยาธิ *B. pahangi* ในแมว สามารถก่อการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองบริเวณขาพับ (popliteal lymph node) ภายหลังจากรับเชื้อและการติดตามผลต่อเนื่องพบว่าตัวอ่อนเคลื่อนที่ไปบริเวณท่อน้ำเหลืองส่วนหน้า (afferent lymph ducts) ทำให้เกิดการขยายใหญ่ที่บริเวณนี้แล้วส่งผลให้เกิดการบวม ท่อน้ำเหลืองอุดตันและก้อนเนื้อตาย (36) มีรายงานพบสุนัขที่มีการติดเชื้อหนอนพยาธิ *B. pahangi* เรื้อรังที่บริเวณขาซึ่งมีขนาดของต่อมน้ำเหลืองบริเวณขาหนีบขยายขนาดโตขึ้น (popliteal lymph node) ในสุนัขบางตัวต่อมน้ำเหลืองภายในช่องท้องโต (inguinal lymph node) ข้อขาบวม (limb oedema) และมีพังผืดที่ต่อมน้ำเหลือง (lymphatic fibrosis) ร่วมด้วย (37) และมีรายงานการศึกษาการระบาดของหนอนพยาธิ *B. pahangi* ในประเทศไทย พบได้ทั้งในแมวและสุนัข โดยพบตัวอ่อนระยะไม่โครฟีลาเรียของหนอนพยาธิ *B. pahangi* 2.01% (10/496) ในสุนัขจากเขตต่าง ๆ ของกรุงเทพมหานคร (38) และ 35.71% (5/14) ในสุนัขจากจังหวัดขอนแก่น (39) และมีรายงานพบตัวอ่อนระยะไม่โครฟีลาเรียของหนอนพยาธิ *B. pahangi* ในแมวที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี 7.6% (4/52) (40) และที่เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร คิดเป็น 25.30% การตรวจพบหนอนพยาธิทั้งในแมวและสุนัขในไทยที่กล่าวมาข้างต้นนี้ส่วนใหญ่การติดเชื้อ *B. pahangi* มักไม่ทำให้เกิดอาการทางคลินิก (asymptomatic) อาจพบเพียงต่อมน้ำเหลืองอักเสบ

หนอนพยาธิ *B. malayi* เป็นหนอนพยาธิซึ่งสามารถก่อโรคเท้าช้าง (elephantiasis) ได้ในคน ซึ่งมีแมวเป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญแต่ก็สามารถพบได้ในสัตว์อื่น ๆ เช่น สุนัขและค่าง เป็นต้น (28, 41, 42) ตัวเต็มวัยของหนอนพยาธิจะอาศัยอยู่ในระบบน้ำเหลืองส่งผลให้เกิดท่อน้ำเหลืองอักเสบ (lymphangitis) เกิดการระคายเคืองของทางเดินน้ำเหลืองทำให้มีการอุดตันต่อมน้ำเหลืองบวมโตและต่อมน้ำเหลืองอักเสบเฉียบพลัน (adenolymphangitis) โดยในประเทศไทย

มีรายงานพบการติดเชื้อหนอนพยาธิ *B. malayi* ในจังหวัดปัตตานี สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง และนราธิวาส ซึ่งมีสุนัขและแมวเป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญที่สามารถตรวจพบตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของสัตว์ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดได้ (27, 40, 43-50) แต่มักไม่พบการแสดงอาการทางคลินิก แต่ก็มีรายงานพบสุนัขที่มีการติดเชื้อหนอนพยาธิ *B. malayi* ที่ประเทศอินเดีย ซึ่งสุนัขมีอาการไข้ อาเจียน เยื่อบุตาอักเสบ (conjunctivitis) ข้อขาบวม (limb oedema) อัณฑะบวม (scrotal oedema) และหลอดน้ำเหลืองอักเสบ (lymphangitis) ที่บริเวณใบหู (รูปที่ 11) (42) นอกจากนี้มีกรณีที่ยังมีรายงานว่าพบโรค lymphatic filariasis เกิดจากการติดเชื้อ *B. pahangi* ในผู้ป่วยจำนวน 4 ราย ที่ประเทศมาเลเซีย ผู้ป่วยมีอาการปวดบวมที่ข้อเท้าเนื่องจากเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณนั้นอักเสบ (cellulitis) หลอดน้ำเหลืองอักเสบ (lymphangitis) และต่อมน้ำเหลืองบวมโต (lymphadenopathy) (51)



**A: Limb oedema**



**B: Scrotal oedema**



**C: Conjunctivitis**



**D: Lymphangitis**

รูปที่ 11 อาการทางคลินิกของสุนัขที่ติดเชื้อหนอนพยาธิ *Brugia* spp.

(Ambily et al., 2011)



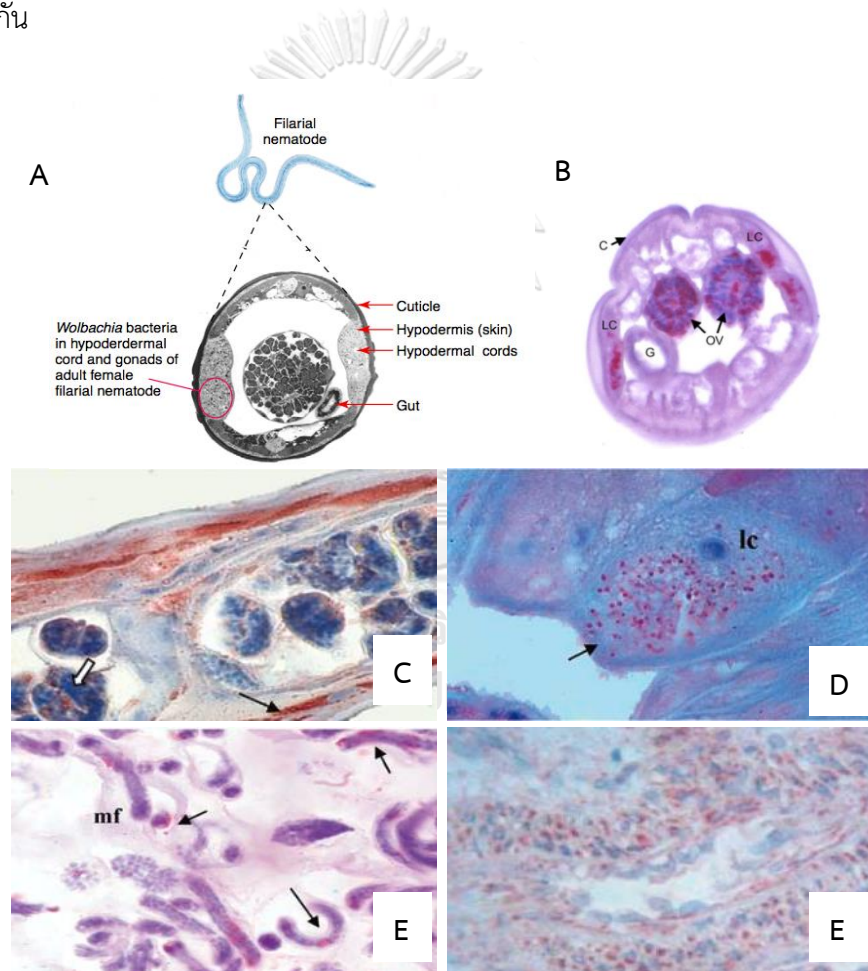
### 2.3.1 แบคทีเรีย *Wolbachia* ในกลุ่มสัตว์ขาข้อ (arthropods)

พบแบคทีเรียได้ภายในเซลล์ของกลุ่มสัตว์ขาข้อ (arthropods) เช่น ไอโซพอด แมลง ตัวไร เหา และยุงเป็นต้น โดยพบครั้งแรกใน ovaries และ testes ของยุงรำคาญ *Culex pipiens* ซึ่งแบคทีเรีย *Wolbachia* มีการถ่ายทอดจากแม่ (vertical transmission) ไปสู่ลูกทางไซโทพลาสซึมของไข่ (egg cytoplasm) และมีการพัฒนาต่อภายในเซลล์สืบพันธุ์ของโฮสต์ มีงานวิจัยศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระบบสืบพันธุ์ของแมลง ได้แก่ (1) Cytoplasmic incompatibility (CI) การสืบพันธุ์ระหว่างเพศเมียที่ไม่มีการติดเชื้อแบคทีเรียกับเพศผู้ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียจะส่งผลให้เกิดการตายของตัวอ่อนแมลง (embryonic motality) (63, 64) (2) ชักนำให้เกิด parthenogenesis ในแมลงที่มีการติดเชื้อ (64-66) (3) การเกิด male killing ทำให้อัตราส่วนของเพศเมียผิดเพี้ยนไป โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพันธุกรรมของเพศผู้ไปเป็นเพศเมีย (64, 67) ซึ่งผลการเปลี่ยนแปลงในระบบสืบพันธุ์เหล่านี้มีผลต่อการส่งผ่านของแบคทีเรีย *Wolbachia* ไปยังประชากรแมลง (60)

### 2.3.2 แบคทีเรีย *Wolbachia* ในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย (filarial nematodes)

หนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียที่พบแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้แก่ *Dirofilaria* spp., *Brugia* spp., *Onchocerca* spp., *Litomosoides* spp., *W. bancrofti*, *M. ozzardi* และ *D. gracile* เป็นต้น (ตารางที่ 2) โดยหนอนพยาธิหัวใจ *Dirofilaria* spp. พบแบคทีเรียใน Supergroup C และหนอนพยาธิ *Brugia* spp. พบแบคทีเรียใน supergroup D ซึ่งแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบนี้เป็น symbiosis bacteria ที่มีความสำคัญสำหรับการดำรงชีวิตของหนอนพยาธิหัวใจซึ่งถ้าขาดแบคทีเรียนี้ไปหนอนพยาธิก็ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (64, 68, 69) โดยในหนอนพยาธิหัวใจนั้นสามารถพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ในส่วนของ hypodermal cord (68) และภายในอวัยวะของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย เช่น ovaries, oocytes, oögonia และ embryos เป็นต้น (รูปที่ 13) (70-72) แต่ไม่พบในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ (73) เนื่องจากแบคทีเรีย *Wolbachia* มีการถ่ายทอดทางมารดา (vertical transmission) ไปสู่ลูกผ่านทางไซโทพลาสซึมของไข่ซึ่งจะไม่ผ่านทางสเปิร์ม (74, 75) สามารถพบแบคทีเรียนี้ได้ในทุกๆระยะของวงจรชีวิตหนอนพยาธิหัวใจ (10, 71) โดยจะมีจำนวนของแบคทีเรียในแต่ละระยะแตกต่างกันในระยะไมโครฟิลาเรีย ระยะตัวอ่อน L<sub>2</sub> และ L<sub>3</sub> ที่มีการเจริญพัฒนาในยุงจะมีจำนวนคงที่แต่จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะติดเชื้อ L<sub>3</sub> ระยะ L<sub>4</sub> และระยะตัวเต็มวัยซึ่งเป็นระยะที่มีการเจริญหลังการติดเชื้อภายในโฮสต์ (70) โดยแบคทีเรียชนิดนี้จะมีบทบาทสำคัญต่อหนอนพยาธิหัวใจ เช่น การเจริญในระยะต่าง ๆ (biological development) การดำรงชีวิตรอดภายในเซลล์ของโฮสต์ (survival) การสืบพันธุ์ (reproduction) รวมถึงการแลกเปลี่ยนสารระหว่างกัน (metabolite sharing) เป็นต้น โดยมีการศึกษาในระดับ Transcriptomic ทั้งในหนอนพยาธิหัวใจและแบคทีเรียซึ่งมีการแสดงออกของยีนในลักษณะที่ส่งเสริมซึ่งกันและกัน

(coordinated gene expression) โดยพบว่าแบคทีเรียมีการเพิ่มระดับการแสดงออกของกลุ่มยีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของหนอนพยาธิ เช่น riboflavin, heme, De novo nucleotide (purine & pyrimidine), T4SS และ lipid II เป็นต้น (76) แต่กลับพบระดับการแสดงออกของ กลุ่มยีนเหล่านี้ลดลงในหนอนพยาธิ ในลักษณะเดียวกันหนอนพยาธิก็จะมี การเพิ่มระดับการแสดงออกของกลุ่มยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างสารที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น folate, isoprenoid และกรดอะมิโนบางชนิด (10, 76) ไว้เช่นกัน และกลุ่มยีนเหล่านี้ก็กลับพบว่าการแสดงออกลดลงภายในแบคทีเรีย จากข้อมูลดังกล่าวนี้สามารถอธิบายได้ว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนี้อาจมีวิวัฒนาการร่วมกัน โดยการปรับระดับการแสดงออกของยีนให้สอดคล้องกันเพื่อให้สามารถอยู่ร่วมกันได้อย่างจำเพาะและเอื้อประโยชน์ต่อกัน



รูปที่ 13 แบคทีเรีย Wolbachia ที่พบในหนอนพยาธิตัวเต็มวัยเพศเมีย

(A) แบคทีเรียที่พบใน hypodermal cord (Fenn & Blaxter, 2004) (B) แบคทีเรียที่พบใน ovary และ lateral cord (สีแดง) (C) hypodermal cord ของ *B. malayi* (D) lateral cord ของ *D. immitis* เพศผู้ (OC) (E) microfilaria และ (F) ovaries ของ *D. immitis* (C: Cuticle , G: Gut, LC: Lateral cord, OV: ovary ) (Slatko et al., 2010)

ตารางที่ 2 การแพร่กระจายของแบคทีเรีย Wolbachia ในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย

Family	Subfamily	Genus	Presence	Absence	
Onchocercidae	Dirofilarinae	<i>Dirofilaria</i>	<i>D. immitis</i>	-	
			<i>D. repens</i>		
		<i>Loa</i>	-	<i>L. loa</i>	
			<i>Foleyella</i>	-	<i>F. furcata</i>
	Onchocercinae	<i>Brugia</i>	<i>B. malayi</i>	-	
			<i>B. pahangi</i>		
			<i>B. timori</i>		
		<i>Wuchereria</i>	<i>W. bancrofti</i>	-	
		<i>Litomosoides</i>	<i>L.</i>	<i>L. yutajensis</i>	
			<i>sigmodontis</i>		
<i>L.</i>					
<i>brasileiensis</i>					
<i>L. galizai</i>					
<i>L. hamletti</i>					
<i>Onchocerca</i>	<i>O. volvulus</i>		<i>O. flexuosa</i>		
	<i>O. ochengi</i>				
	<i>O. lienalis</i>				
	<i>O. gutturosa</i>				
	<i>O. gibsoni</i>				
	<i>O. lupi</i>				
	<i>O. cervicalis</i>				
	<i>Mansonella</i>	<i>M. ozzardi</i>	<i>M. perstans</i>		
	<i>Acanthocheilonema</i>	-	<i>A. viteae</i>		
			<i>A. reconditum</i>		
Setarinae	<i>Setaria</i>	-	<i>S. equine</i>		
			<i>S.</i>		
			<i>labiatopapillosa</i>		
			<i>S. tundra</i>		
Filariidae	Filarinae	<i>Filaria</i>	-	<i>F. martis</i>	



### 2.3.3 บทบาทของแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่อการรักษาโรค

จากความสัมพันธ์ระหว่างหนอนพยาธิกับแบคทีเรีย *Wolbachia* สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนา (drug development) และการเลือกใช้ยาเพื่อรักษาโรคหนอนพยาธิหัวใจและควบคุมประชากรของหนอนพยาธิในโฮสต์ โดยการให้ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ซึ่งจะส่งผลต่อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิกลุ่มนี้โดยตรง เช่น ยาปฏิชีวนะ doxycycline, tetracycline, oxytetracycline และ rifampicin เป็นต้น ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้จะมีผลต่อการลดจำนวนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิ ลดการเจริญพัฒนาของตัวอ่อน ยับยั้งการเจริญลอกคราบของตัวอ่อนระยะ L3 เป็น L4 และมีผลทางอ้อมสามารถช่วยกำจัดประชากรของหนอนพยาธิในโฮสต์ได้ (14, 15, 77) แต่ยาจะให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกันในหนอนพยาธิแต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 3) โดยมีการศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะ doxycycline และ tetracycline ในสุนัขที่ป่วยเป็นโรคหนอนพยาธิหัวใจ พบว่าการให้ยาชนิดนี้มีผลต่อการลดจำนวนตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของสุนัขลดจำนวนของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิ ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของตัวอ่อนระยะต่าง ๆ และมีส่วนทำให้พยาธิตัวเต็มวัยเพศเมียเป็นหมัน รวมถึงทำให้พยาธิสภาพของอวัยวะต่าง ๆ ในสัตว์ที่ติดเชื้อลดลงได้ (78) มีการรักษาโดยใช้ยา tetracycline พบว่าสามารถยับยั้งการพัฒนาของตัวอ่อน กำจัดตัวอ่อนระยะติดต่อ L3 และหยุดการเจริญพัฒนาในตัวเต็มวัยของหนอนพยาธิ *D. immitis* (79), *B. pahangi* (80) และ *L. sigmodontis* ที่ติดเชื้อในสัตว์ฟันแทะได้ (81) ในแมวที่ติดเชื้อ *O. ochengi* ซึ่งก่อโรค nodule-dwelling รักษาโดยให้ยากลุ่ม oxytetracycline สามารถกำจัดหนอนพยาธิตัวเต็มวัยได้ จากการใช้ยาปฏิชีวนะนี้ในการรักษาได้นั้น เนื่องจากยา มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของแบคทีเรียและลดจำนวนแบคทีเรียที่สำคัญในหนอนพยาธิลงได้ (64) นอกจากนี้มีหนอนพยาธิฟิลาเรียบางสายพันธุ์ไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะเหล่านี้รักษาได้ เนื่องจากไม่พบหลักฐานการปรากฏของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อยู่ในหนอนพยาธิ เช่น *L. loa* หนอนพยาธิก่อโรคในคน *A. viteae* ในกลุ่มสัตว์ฟันแทะ *A. recondium* ในสัตว์กินเนื้อ (carnivore) *L. yutajensis* ในค้างคาว *F. furcate* ในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (53, 82) และ *O. flexuosa* ในกวาง (83) เป็นต้น

จากการเลือกให้ยาปฏิชีวนะดังกล่าวในสัตว์ที่มีการติดเชื้อหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียนั้นมีผลต่อการเลือกให้ยากลุ่มนี้เพื่อป้องกันและควบคุมการติดเชื้อหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียที่มีโอกาสนำโรคสู่คนเช่นกัน โดยมีการทดลองให้ยา doxycycline ในผู้ป่วยโรค Onchocerciasis เพื่อกำจัดแบคทีเรียในหนอนพยาธิ *O. volvulus* ซึ่งสามารถกำจัดหนอนพยาธิตัวเต็มวัย ยับยั้งการพัฒนาของตัวอ่อน การสืบพันธุ์และการมีชีวิตรอดของหนอนพยาธิได้ในคน (84-86) การรักษาในผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (lymphatic filariasis) โดยใช้ยา doxycycline สามารถลดจำนวนแบคทีเรียในหนอนพยาธิได้ถึง 95 % ซึ่งมีผลต่อการกำจัดตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียได้ (87) ดังนั้นปัจจุบันในทางการสัตวแพทย์และ

ทางการแพทย์จึงได้มีการนำยาปฏิชีวนะมาใช้ในการรักษาโรค รวมทั้งให้ยาปฏิชีวนะ doxycycline ร่วมกับยา ivermectin เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดหนอนพยาธิหัวใจได้ดียิ่งขึ้น (88)

ตารางที่ 3 ผลของการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic treatments) ในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย

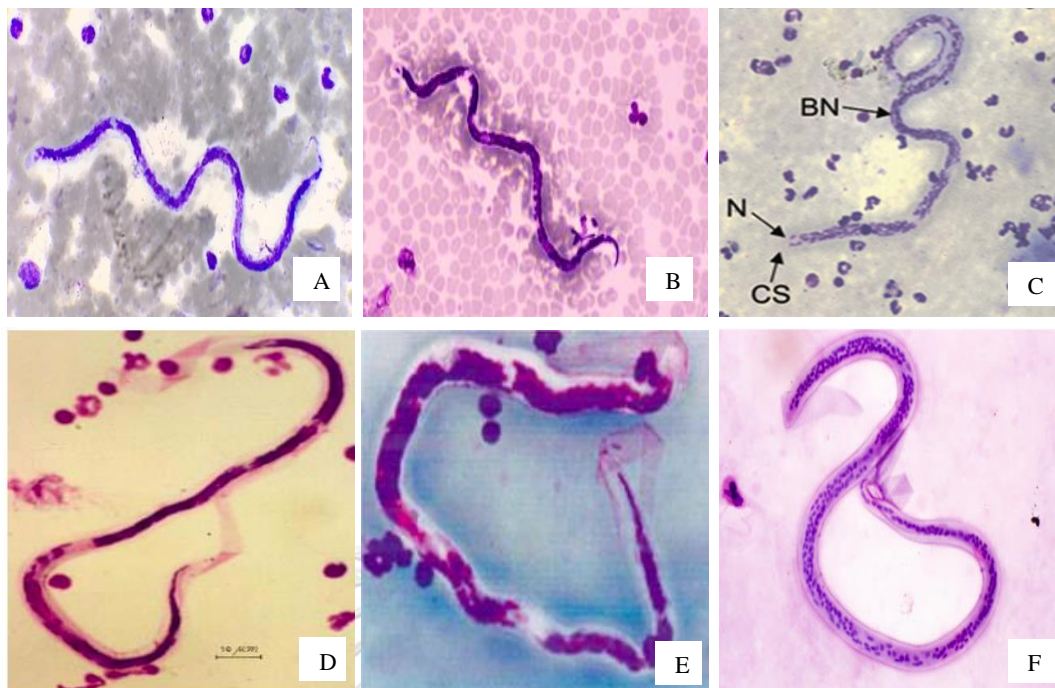
Drug	Specises	Stages	Animal models	Result	Reference
Doxycycline	<i>D. immitis</i>	microfilaria	canine	reduced microfilaraemia	(Rossi et al., 2010)
		adults	canine	Inhinit embryogenesis	(Bandi et al., 1999)
	<i>L. sigmodontis</i>	adults	BALB/c mice	Decrease <i>Wolbachai</i> levels in worms, Worm growth retardation, infertility	(Volkman et al., 2003)
			human	reduced microfilaraemia	(Debrah et al., 2006)
	<i>O. volvulus</i>	adults	human	Inhinit embryogenesis, reduced adult worm	(Hoerauf et al., 2000)
Tetracycline	<i>D. immitis</i>	adults	canine	Inhinit embryogenesis	(Genchi et al., 1998)
	<i>B. pahangi</i>	Pre-adult	Jirds	Decrease microfilaria levels, inhibit embryogenesis	(Bandi et al., 1999)
		Infective larvae	Jirds Mosquito	Prophylaxis Inhinition of growth and development	(Bosshardt et al., 1993) (Sucharit et al., 1978)
	<i>B. malayi</i>	microfilaria	Mastomys mice	Decrease microfilaria levels, macrofilaricidal effect, infertility	(Bajpai et al., 2005)
			Pre-adult	BALB/c mice	Worm growth retardation, infertility
		adults	Jirds	Decrease microfilaria levels	(Hoerauf et al., 1999)
Oxytetracycline	<i>D. immitis</i>	adults	canine	Inhinit embryogenesis	(Genchi et al., 1998)
	<i>B. pahangi</i>	adults	Jirds	reduction in adult recovery, Inhinit embryogenesis	(Townson et al., 2000)
			CBA mice	Microfilaricidal effect, Partial macrofilaricidal effect	(Townson et al., 2000)
		adults	feline	macrofilaricidal effect	(Townson et al., 2000)
			Bovine	Microfilaricidal effect	(Langworthy et al., 2000)
		adults	feline	Microfilaricidal effect	(Townson et al., 2000)
<i>O. ochengi</i>	adults	feline	Inhinit embryogenesis	(Bandi et al., 2001)	

ตารางที่ 3 ผลของการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic treatments) ในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย (ต่อ)

Drug	Specises	Stages	Animal models	Result	Reference
Rifampicin	<i>O. lienalis</i>	microfilaria	Jirds	Microfilaricidal effect	(Townson et al., 2000)
	<i>L. sigmodontis</i>	adults	BALB/c mice	Decrease <i>Wolbachai</i> levels in worms, Worm growth retardation, infertility	(Townson et al., 2000)
	<i>B. pahangi</i>	adults	Jirds	reduction in adult recovery, Inhibit embryogenesis	(Townson et al., 2000)
Chloramphenico	<i>O. lienalis</i>	microfilaria	Jirds	macrofilaricidal effect	(Townson et al., 2000)
	<i>B. pahangi</i>	adults	Jirds	No effect	(Townson et al., 2000)
	<i>L. sigmodontis</i>	adults	BALB/c mice	No effect	(Hoerauf et al., 2000)
Penicillin G	<i>L. sigmodontis</i>	adults	BALB/c mice	No effect	(Hoerauf et al., 1999)
Erythromycin	<i>L. sigmodontis</i>	adults	BALB/c mice	No effect	(Hoerauf et al., 1999)

#### 2.4 การวิเคราะห์ทางอนุชีววิทยาของหนอนพยาธิและแบคทีเรีย *Wolbachia*

การตรวจวินิจฉัยหนอนพยาธิหัวใจในขั้นเบื้องต้นมักเริ่มจากการตรวจหาระยะไมโครฟิลาเรียที่อยู่ในเลือดของสุนัขโดยการทำฟิล์มเลือด (blood smear) และย้อมสี Giemsa เพื่อดูจำนวนและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถศึกษาลักษณะรูปร่าง วัดขนาดความกว้าง ความยาว cephalic space, nerve ring, excretory และ vesicle ตลอดจนลักษณะนิวเคลียสของไมโครฟิลาเรียเพื่อจำแนกตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิ (รูปที่ 14) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีพื้นฐานที่ทำได้ง่าย สะดวก ให้ผลเร็ว ใช้ต้นทุนต่ำ แต่การทำแผ่นฟิล์มเลือดอาจจะระบุได้เพียงว่าเป็นตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียในสกุล *Dirofilaria* spp. หรือ *Brugia* spp. เป็นต้น แต่ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ของหนอนพยาธิได้อย่างชัดเจน จึงนำเทคนิคทางอนุชีววิทยาเข้ามาเพื่อศึกษาจำแนกสายพันธุ์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนอนพยาธิ รวมถึงตรวจหาแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิ โดยการนำดีเอ็นเอมาใช้เป็นเครื่องหมาย (DNA marker) ซึ่งสามารถศึกษาได้ทั้งตำแหน่งยีนบนดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA) และตำแหน่งยีนบนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA)



รูปที่ 14 แผ่นฟิล์มเลือดที่พบตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิ

(A, B, C) *Dirofilaria* spp. (Reschke, 2018; Al-Abd et al., 2015) (D, E) *Brugia* spp. (Lui, 2012; Chansiri et al., 2002) และ (F) *Wuchereria bancrofti* (Pritt, 2010: online)

#### 2.4.1 การตรวจในหนอนพยาธิ

ตำแหน่งยีนบนดีเอ็นเอในนิวเคลียส (Nuclear gene) เช่น *ITS1*, *ITS2*, *18s rRNA* และ *28S* เป็นต้น ยีนในกลุ่มนี้จะมีจำนวนซ้ำสูงระหว่างสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต มีชุดยีนซ้ำจำนวนมาก (high copy number) และเรียงซ้ำอยู่ในทิศทางเดียวกันตลอด (tandem repeat) มีบริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณ (amplify) มีความหลากหลายของพันธุกรรมสูงจึงนิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยมีการศึกษาหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียจากแมวในไทย เมื่อปี ค.ศ. 2006 อาศัยวิธี PCR-RFLP ศึกษาบนตำแหน่ง *ITS1* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ase I* โดยที่ ตำแหน่งนี้สามารถจำแนกหนอนพยาธิได้ 4 ชนิด คือ *B. pahangi*, *B. malayi*, *D. immitis* และ *D. repens* (89) มีรายงานการศึกษาในประเทศอิตาลี เมื่อปี ค.ศ. 2012 อาศัยตำแหน่ง *ITS2* เพื่อตรวจหาหนอนพยาธิจากเลือดของสุนัขที่เป็นโรคพยาธิหัวใจโดยอาศัยเทคนิค Duplex real-time PCR สามารถจำแนกสายพันธุ์ของหนอนพยาธิได้เป็น *D. immitis* และ *D. repens* (90) นอกจากนี้มีการตรวจหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียจากคนไข้และเลือดของสุนัขในประเทศฮ่องกงด้วยตำแหน่ง *ITS1* ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลได้เป็นหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D.*

*immitis* และ *D. repens* (91) จากการศึกษาโดยอาศัยตำแหน่งยีนบนดีเอ็นเอในนิวเคลียสเพื่อตรวจหาหนอนพยาธิหัวใจนั้นสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์จำแนกสายพันธุ์ของหนอนพยาธิได้ดี

ตำแหน่งยีนบนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA) เช่น *COI*, *COII*, *COIII*, *12s rDNA* และ *Cytochrome b* เป็นต้น พบว่ายีนส่วนนี้มีคุณสมบัติการถ่ายทอดพันธุกรรมผ่านทางมารดา (maternal inheritance) ซึ่งเป็นข้อดีสำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและการใช้ยีนในไมโทคอนเดรียเพื่อเป็นเครื่องหมาย (DNA marker) มีชุดยีนซ้ำจำนวนมากในแต่ละเซลล์ (high copy number) มีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ (mutation rate) จากความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนในไมโทคอนเดรียเหมาะต่อการนำมาศึกษาในสิ่งมีชีวิตได้ดีเช่นกัน ซึ่งมีการศึกษาในประเทศอิตาลีเมื่อปี ค.ศ. 2012 โดยตรวจหาหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียจากตัวอย่างเลือดของสุนัขและแมวด้วยวิธี nested PCR และ Real-time PCR บนตำแหน่งยีน *COI* ผลการวิเคราะห์จากยีนในตำแหน่งนี้สามารถจำแนกได้เป็นหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* (92) และ ในปีเดียวกันนี้มีการตรวจสอบสุนัขที่เป็นโรคหนอนพยาธิหัวใจด้วยวิธี Duplex real-time PCR ซึ่งสามารถจำแนกสายพันธุ์ของหนอนพยาธิ *D. immitis* และ *D. repens* ได้โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งยีน *COI* (90) มีรายงานการตรวจหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp. ในคนไข้ที่ประเทศยูเครนเมื่อปี ค.ศ. 2015 โดยพบหนอนพยาธิที่เนื้อเยื่อชั้นใต้ผิวหนังและที่บริเวณดวงตา แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *12s rRNA* ซึ่งสามารถระบุชนิดของหนอนพยาธิได้เป็น *D. immitis* และ *D. repens* จากการศึกษาจัดเป็นข้อมูลระบาดวิทยาทางโรค dirofilariasis ซึ่งสามารถติดต่อสู่คนได้ (93) นอกจากนี้มีการศึกษาที่สหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 2017 ตรวจหาระยะไมโครฟิลาเรียในสุนัขที่สงสัยว่าเป็นโรคหนอนพยาธิหัวใจซึ่งพบระยะไมโครฟิลาเรียในเลือด น้ำในช่องท้อง และปัสสาวะของสุนัข แล้วนำตัวอย่างเหล่านั้นมาตรวจยืนยันผลด้วยวิธี Multiplex PCR อาศัยตำแหน่งยีน *COI* ผลการวิเคราะห์พบว่าระยะไมโครฟิลาเรียของทุกตัวอย่าง คือ หนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* (94) ในการศึกษาหนอนพยาธิด้วยตำแหน่งยีนในไมโทคอนเดรียส่วนใหญ่มักนิยมใช้ยีน *COI* ซึ่งสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ได้อย่างแม่นยำและใช้ศึกษาจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนพยาธิได้ดี

#### 2.4.2 การตรวจในแบคทีเรีย *Wolbachia*

การศึกษาจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่อาศัยในหนอนพยาธิ นิยมตรวจด้วยยีน *16S rDNA*, *dnaA*, *groEL*, *gltA*, *FtsZ* และ *wsp* เป็นต้น โดยยีน *FtsZ* (filamenting temperature sensitive mutant Z) เป็นยีนที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยแผนภูมิต้นกำเนิด (phylogenetic tree) โดยยีนดังกล่าวสร้างโปรตีน *FtsZ* ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแบ่งเซลล์ (cell division) มี Z ring เป็นโครงสร้างวงแหวนที่ช่วยควบคุมเวลาและตำแหน่งของการแบ่งเซลล์ ช่วยกระตุ้นการสร้างผนังเซลล์

ของแบคทีเรีย เป็นยีนที่มีชุดยีนซ้ำกันจำนวนมาก (high copy number) ง่ายต่อการเพิ่มจำนวน พบว่ามีการแสดงออกในทุกระยะของวงจรชีวิตหนอนพยาธิ โดยเฉพาะตัวอ่อนระยะที่สี่ (L4) และตัวเต็มวัยเพศเมีย (10, 76, 95) สามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการจำแนกแบคทีเรียได้ดี รวมถึงมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์และใช้ตรวจได้ง่าย (96) โดยมีการศึกษาในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียและแบคทีเรีย *Wolbachia* จากตัวอย่างเลือดแมวอาศัยวิธี nested PCR และ Real-time PCR บนตำแหน่งยีน *FtsZ* พบว่ายีนตำแหน่งนี้สามารถจำแนกแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิ *D. immitis* ได้ (92) มีการตรวจหาหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp. ในสุนัขจรจัดที่ประเทศตุรกี รวมถึงตรวจหาแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยอาศัยวิธี PCR ที่ตำแหน่งยีน *wsp* ซึ่งยีนตำแหน่งนี้ก็สามารถจำแนกแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิได้ (89) นอกจากนี้มีการจำแนกแบคทีเรีย *Wolbachia* ของหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียในวงศ์ย่อย Dirofilarinae: *D. immitis* และ *D. repens* และหนอนพยาธิในวงศ์ย่อย Onchocercinae: *A. viteae*, *B. malayi*, *B. pahangi*, *L. sigmodontis*, *O. gutturosa*, *O. gibsoni*, *O. ochengi* และ *W. bancrofti* บนตำแหน่งยีน *FtsZ* ซึ่งตรวจพบแบคทีเรียที่อยู่ในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียนี้ได้ทุกสายพันธุ์ยกเว้น *A. viteae* และสามารถจำแนกแบคทีเรียของหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียเป็น supergroup C และ D ได้ (68)

จากข้อมูลดังกล่าวทำให้สนใจศึกษาหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียเป็นสาเหตุของโรคหนอนพยาธิ หัวใจในสุนัขและตรวจหาแบคทีเรีย *Wolbachia* spp. ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิกลุ่มนี้ ซึ่งจำแนกโดยอาศัยเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาในการตรวจหนอนพยาธิจะศึกษา 2 ตำแหน่ง คือ Internal transcribed spacer 1 (*ITS1*) และ Cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) และการตรวจแบคทีเรียศึกษาที่ตำแหน่งยีน Filamenting temperature sensitive mutant Z (*FtsZ*) และวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยแผนภูมิวิวัฒนาการ เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในงานวิจัยอื่น ๆ ต่อไป

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study) โดยได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมในสัตว์ทดลองและอนุมัติโดยคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของคณะแพทยศาสตร์จากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่รับรอง 015/2561

#### 3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย

รับตัวอย่างแผ่นฟิล์มเลือดและตัวอย่างเลือดที่สกัดเป็นดีเอ็นเอสำเร็จรูปแล้ว จากโครงการก่อนหน้าของ ศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร (เลขที่โครงการวิจัย 006/2558) ซึ่งเป็นการใช้ตัวอย่างต่อเนื่องสกัดจากเลือดสุนัขเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลที่สงสัยว่าเป็นโรคหนอนพยาธิหัวใจซึ่งเข้ามตรวจที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

##### 3.2.1 การคำนวณขนาดของประชากร

การคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อศึกษาหนอนพยาธิหัวใจ *Dirofilaria* spp. ในเลือดของสุนัขรวมถึงแบคทีเรียที่อยู่ในหนอนพยาธิ ซึ่งจะอาศัยข้อมูลจากงานวิจัยก่อนหน้าของ Turba *et al* (2012) (92) ที่ศึกษาเกี่ยวกับหนอนพยาธิหัวใจและแบคทีเรียมาเป็นข้อมูลเปรียบเทียบซึ่งมีค่าเท่ากับ 9 % โดยขนาดตัวอย่างที่ต้องการศึกษาครั้งนี้คำนวณได้จากสูตรดังนี้

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

$$n = \frac{(1.96^2) \times (0.09) \times (0.91)}{(0.1^2)}$$

$$n = 31.46$$

โดยการศึกษาครั้งนี้ได้รับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดสุนัขที่สงสัยว่าโรคหนอนพยาธิหัวใจจำนวน 57 ตัวอย่าง สามารถใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาความหลากหลายของหนอนพยาธิหัวใจสุนัขในเขตกรุงเทพและปริมณฑล

โดย  $n$  = ขนาดตัวอย่าง

$\alpha$  = 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 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

#### 3.3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 1.) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) รุ่น Master Cycler PROS บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
- 2.) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) รุ่น Venti บริษัท GenPlus® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ Incubator shaker รุ่น Innova®43 บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
- 4.) เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5430 R บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
- 5.) เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5417 R บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
- 6.) เครื่องเขย่าผสมสาร Vortex รุ่น FINEVORTEX (FinePCR) ประเทศเกาหลี
- 7.) เครื่อง Dry bath Incubator บริษัท Cleaver Scientific® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 8.) เครื่อง gel electrophoresis รุ่น Biorad sub-cell® RT บริษัท Bio-Rad® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 9.) เครื่องรันเจล PAGE รุ่น MiniProtein 3 cell บริษัท Bio-Rad® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 10.) เครื่องถ่ายรูป gel documentation รุ่น Gel Doc™ XR บริษัท Bio-Rad® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 11.) เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม spectrophotometer รุ่น Nanodrop 2000c บริษัท Thermo scientific® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 12.) เครื่อง Autoclave (ตู้นิ่งฆ่าเชื้อ) รุ่น HIRAYAMA HA-3D ประเทศญี่ปุ่น
- 13.) เครื่อง Autoclave (ตู้นิ่งฆ่าเชื้อ) รุ่น HVE-50 ประเทศญี่ปุ่น
- 14.) เครื่องไมโครเวฟ, รุ่น LG บริษัท LG ประเทศจีน
- 15.) ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C รุ่น LG บริษัท LG® ประเทศไทย
- 16.) ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 °C รุ่น Whirlpool บริษัท Sanyo® ประเทศไทย
- 17.) ตู้เย็นอุณหภูมิ -80 °C รุ่น Forma 900 series บริษัท Thermo scientific® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 18.) เครื่องซั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น Sartorius ประเทศเยอรมนี
- 19.) ตู้ปรับอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย บริษัท Memmert
- 20.) ตู้สำหรับเตรียมสาร PCR (PCR cabinet) รุ่น PCR-01 ประเทศไทย



### 3.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 1.) หลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 ml บริษัท ExtraGene,Inc®
- 2.) หลอด PCR ขนาด 0.2 ml บริษัท ExtraGene,Inc®
- 3.) หลอด centrifuge ขนาด 15 และ 50 ml
- 4.) ปิเปตทิป ขนาด 0.1-10, 200 และ 1000 µl
- 5.) ขวดแก้วสำหรับเตรียมสารเคมี ขนาด 100, 500 และ 1000 ml
- 6.) จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 7.) Loop เขี่ยเชื้อ และ spreader
- 8.) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 9.) หลอดหยด (dropper)
- 10.) ปากคีบ (forceps)
- 11.) ถังมือยาง
- 12.) กล้องโคมสำหรับใส่น้ำแข็ง
- 13.) นาฬิกาจับเวลา
- 14.) กระดาษทิชชูสำหรับทำความสะอาด
- 15.) กรรไกร
- 16.) พาราฟิล์ม (parafilm)

### 3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- 1.) ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Invisorb® Spin Plasmid Mini Two บริษัท STRASTEC Molecular GmbH ประเทศเยอรมนี)
- 2.) ชุดโคลนสำหรับ PCR product บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.) ชุดสารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 4.) สารเคมีสำหรับเตรียม gel electrophoresis
- 5.) สารเคมีสำหรับเตรียม 10% native polyacrylamide gel electrophoresis
- 6.) สารเคมีสำหรับเตรียม competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ DH5α)
- 7.) สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-bertani (LB medium)
- 8.) สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร SOB และ SOC medium
- 9.) Ethanol ความเข้มข้น 70% และ 95%

หมายเหตุ: รายละเอียดและวิธีการเตรียมสารเคมีแสดงในภาคผนวก

### 3.4 โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล

3.4.1 โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.2.6 เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และสามารถวิเคราะห์ความเหมือนและความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยแสดงค่าเป็น sequence identity matrix

3.4.2 โปรแกรม Molecular Evolution Genetic Analysis Version 10 (MEGAX) เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต

3.4.3 โปรแกรม Nucleotide blast (BLASTN) เป็นโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบกับฐานข้อมูล NCBI (GenBank)

3.4.4 โปรแกรม Bankit เป็นโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้สำหรับส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อขอเลขทะเบียน (accession number) เพื่อเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

### 3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.5.1 การเก็บตัวอย่าง

รับตัวอย่างแผ่นฟิล์มเลือดและตัวอย่างเลือดที่สกัดเป็นดีเอ็นเอสำเร็จรูปแล้ว จากโครงการก่อนหน้าของ ศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร (เลขที่โครงการวิจัย 006/2558) ซึ่งเป็นการใช้ตัวอย่างต่อเนื่องสกัดจากเลือดสุนัขเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ที่สงสัยว่าเป็นโรคหนอง พยาธิหัวใจซึ่งเข้ามาตรวจที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 3.5.2 การวัดค่าดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณและประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่ได้รับมาไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (nanodrop 1000 spectrophotometer; thermo scientific, USA) โดยเครื่องจะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (ความยาวคลื่นที่ดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด) และความยาวคลื่น 280 nm แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหา ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ จากสูตร ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $A_{260} \times 50 \times \text{dilution faction}$  ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ที่วัดได้จะนำมาประมวลผลโดยเทียบกับค่าความยาวคลื่น 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีอัตราส่วน ( $A_{260}/A_{280}$ ) อยู่ในช่วง 1.8-2.0 หากค่าที่วัดได้ต่ำกว่าช่วงดังกล่าวดีเอ็นเอที่สกัดได้อาจจะมีโปรตีนและฟีนอลปะปนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอ แต่ถ้าค่าที่วัดได้มากกว่า 2.00 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของ RNA อยู่

### 3.5.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาตัวอย่างอนุกรมวิธานไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) จากตัวอย่างแผ่นฟิล์มเลือดที่ย้อมสียิมซ่า (Giemsa stain) ได้รับมาจำนวน 57 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับคู่มือการจำแนกหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย (97-99)

### 3.5.4 การเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

#### 3.5.4.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณ *ITS1* หนอนพยาธิ

ขั้นตอนการคัดลอกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณ *ITS1* แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนี้ให้มากพอสำหรับขั้นตอนต่อไป โดยอาศัยการทำงานร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ *ITS1* ออกแบบ โดย Nuchprayoon และคณะ (2005) (100) คือ ITS1-F: 5'-GGTGAACCTGCGGAAGGATC-3', ITS1-R: 5'-GCGAATTGCAGACGCATTGAG-3' โดยใช้สารละลายในสัดส่วนที่พอเหมาะ (ตารางที่ 4) และทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *ITS1* ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 5) เมื่อเสร็จเรียบร้อยทุกขั้นตอนจึงเก็บผลผลิต PCR ไว้ที่ 2-8°C จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนบริเวณ *ITS1*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร) $\mu$ l)
10X PCR buffer	2.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5
2 mM dNTP	2.5
10 $\mu$ M forward primer	0.4
10 $\mu$ M reverse primer	0.4
Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ l)	0.2
DNA template	5.0
ddH <sub>2</sub> O	11.5
รวม	25.0

ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอน PCR (thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนบริเวณ *ITS1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)
Initial denaturation	94	5 นาที	1
PCR step			
- Denaturation	94	30 วินาที	} 35
- Annealing	58	30 วินาที	
- Extension	72	45 วินาที	
Final extension	72	10 วินาที	1

#### 3.5.4.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณ *COI*

ขั้นตอนการคัดลอกและเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณยีน *COI* เป็นยีนในไมโทคอนเดรียของหนอนพยาธิให้มีจำนวนมากพอร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อช่วงยีน *COI* ซึ่งออกแบบโดย Casiraghi และคณะ (2001) (101) คือ *COI-int-F*: 5'-TGATTGGTGGTTTTGGTA-3', *COI-int-R*: 5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3' โดยใช้สารละลายในสัดส่วนที่พอเหมาะ (ตารางที่ 6) แล้วเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 7) เมื่อเสร็จเรียบร้อยทุกขั้นตอนจึงเก็บ PCR product ไว้ที่ 2-8°C จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *COI*

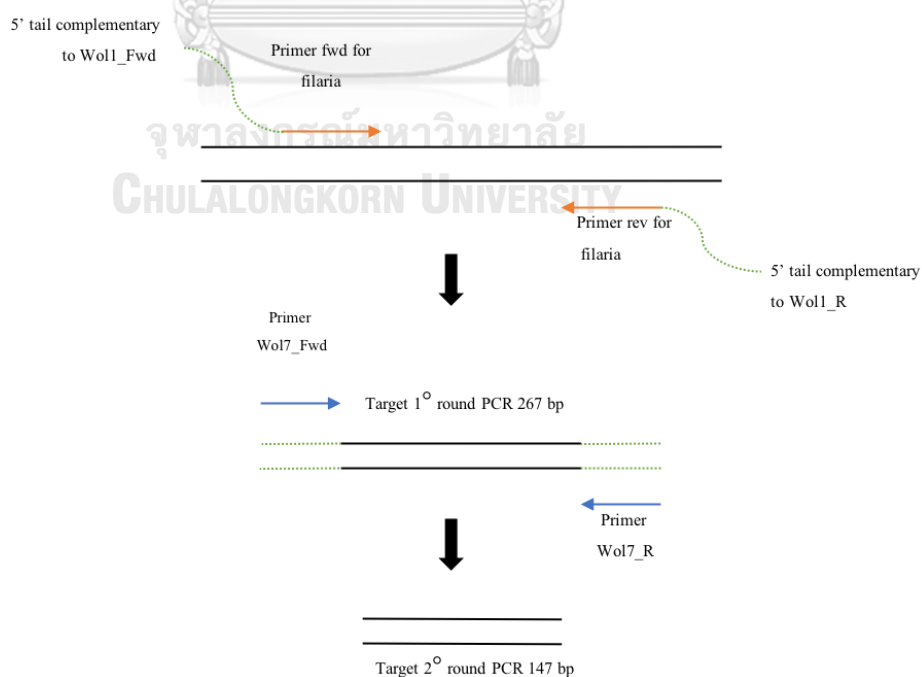
ส่วนประกอบ	ปริมาตร) $\mu$ l)
10X PCR buffer	2.0
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.2
2 mM dNTP	1.6
1 $\mu$ M forward primer	2.0
1 $\mu$ M reverse primer	2.0
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ $\mu$ l)	0.2
DNA template	2.0
ddH <sub>2</sub> O	9.0
รวม	20.0

ตารางที่ 7 แสดงขั้นตอน PCR (thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนจำนวนยีน *COI*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ(cycle)
Initial denaturation	94	3 นาที	1
PCR step			} 40
- Denaturation	94	45 วินาที	
- Annealing	52	45 วินาที	
- Extension	72	90 วินาที	
Final extension	72	7 นาที	1

### 3.5.4.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณ *FtsZ* ของแบคทีเรีย

การตรวจหาแบคทีเรีย *Wolbachia* จะใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดของสุนัขแล้วทำการคัดลอกชิ้นส่วน ดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณ *FtsZ* ด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณนี้ ไพรเมอร์คู่ที่ 1 (first round) ; Wol1-fwd: 5'-CCTGTACTATATCCAAGAATTACTG-3', Wol1-R: 5'-ACTATCCTTTATATGTTCCATAATTTTC-3' และไพรเมอร์คู่ที่ 2 (second round); Wol7-fwd: 5'-GGTGAAATGCTGTGAATAAC-3', Wol7-R: 5'-AGCACCGAGCCCTTTAG-3' (92)



รูปที่ 15 แสดง Amplicons ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณ *FtsZ* ด้วย nested PCR

แล้วทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ *FtsZ* โดยเติมสารละลายที่มีองค์ประกอบกับสัดส่วนที่เหมาะสม (ตารางที่ 8) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 9) ด้วยวิธี Nested PCR เมื่อเสร็จในรอบแรก (first round) จะนำ PCR product ที่ได้ไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนต่อในรอบที่ 2 (second round) ต่อไป เมื่อเสร็จเรียบร้อยทุกขั้นตอนจึงเก็บ PCR product ที่ได้ไว้ที่ 2-8°C จนกว่าจะนำมาใช้ครั้งต่อไป

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา Nested PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *FtsZ*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร $\mu\text{l}$
10X PCR buffer	2.5
25 mM $\text{MgCl}_2$	1.5
2 mM dNTP	2.0
300 nM forward primer	0.75
300 nM reverse primer	0.75
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ $\mu\text{l}$ )	0.2
DNA template	2.0
ddH <sub>2</sub> O	15.3
รวม	25.0

ตารางที่ 9 แสดงขั้นตอน Nested PCR (thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *FtsZ*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)
รอบที่ 1 (first round)			
Initial denaturation	95	4 นาที	1
PCR step			} 40
- Denaturation	94	30 วินาที	
- Annealing	51	30 วินาที	
- Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	1
รอบที่ 2 (second round)			
Initial denaturation	95	4 นาที	1
PCR step			} 40
- Denaturation	94	30 วินาที	
- Annealing	57	30 วินาที	
- Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	1

### 3.5.5 การตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

ตรวจสอบและวิเคราะห์ผลของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยให้ดีเอ็นเอที่ต้องการจะตรวจสอบเคลื่อนที่คู่กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) ในแผ่นเจล (1.5% Agarose gel) ภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 Volts นาน 30-40 นาที จากนั้นนำเจลที่ได้มาย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide นาน 5 นาที แล้วล้างออกโดยแช่น้ำนานประมาณ 20 นาที แล้วนำมาตรวจสอบผลเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Gel Doc EQ system; Bio-Rad, CA) จะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงและเทียบขนาดกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อบอกขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ได้

### 3.5.6 การโคลนนิ่งเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 3.5.6.1 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (Ligation)

เมื่อเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจได้แล้ว (*ITS1*, *COI*, *FtsZ*) จะนำ PCR product ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์โดยใช้ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega<sup>®</sup>, USA) ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 10 เมื่อนำสารละลายผสมด้วยกันทั้งหมดแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง หรือเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ประมาณ 16-18 ชั่วโมงได้

ตารางที่ 10 แสดงส่วนประกอบและสัดส่วนของสารที่ใช้ในขั้นตอน Ligation

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
2x Rapid ligation buffer	2.5
pGEM <sup>®</sup> -T Easy (50 ng/μl)	0.5
T <sub>4</sub> DNA ligase (U/μl)	0.5
PCR product (50ng/μl)	1.5
<b>รวม</b>	<b>5</b>

#### 3.5.6.2 การถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์ (Transformation)

การนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์เริ่มจากการละลาย Competent cells (*Escherichia coli*; DH5α) โดยแช่ในน้ำแข็งเมื่อเซลล์ละลายจึงดูดแบ่งใส่หลอดที่มีพลาสมิดสายผสมที่เตรียมไว้หลอดละ 35 μl แล้ว บ่มไว้ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้า Competent cells ด้วยกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 50 วินาที แล้วแช่ลงในน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที เติม SOC medium จนมีปริมาตรครบ 1000 μl แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 170 rpm อุณหภูมิ 37°C นาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ปริมาตร 40 μl และ Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG) ปริมาตร 40 μl มา spread ลงบน LB agar ที่ผสมยา Ampicillin 100 μg/ml ให้ทั่วจนแห้งแล้วนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C รอไว้จนครบเวลาจะนำเซลล์ที่ได้มา spread บน LB agar ที่ได้เตรียมไว้จนทั่วแล้วนำไปเข้าตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้โคโลนีเจริญเติบโต



### 3.5.6.3 การคัดเลือกโคโลนี *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม

จากคุณสมบัติของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy จะมียีนที่ต้านต่อยาแอมพิซิลลิน (ampicillin) ดังนั้น เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดนี้สามารถเจริญได้บนอาหาร LB agar ที่มียาแอมพิซิลลิน จึงสามารถคัดเลือกเซลล์ *E. coli* ที่เจริญแล้วได้รับพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์ที่อาจปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ และคุณสมบัติของพลาสมิดนี้จะมีบริเวณ *LacZ* gene ซึ่งทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ที่ย่อยสาร X-gal แล้วให้โคโลนีมีสีฟ้า โดยใช้คุณสมบัตินี้มาคัดเลือกเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ศึกษาได้ โดยเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนของยีน ที่เรากำลังศึกษา (*ITS1*, *COI*, *FtsZ*) สามารถแทรกเข้าไปในส่วนของยีน *LacZ* ทำให้ส่วนของยีน *LacZ* แยกออกจากกันจึงไม่สามารถทำงานและย่อย X-gal ได้ ทำให้โคโลนีของเซลล์ *E. coli* เจริญเป็นสีขาว ในทางตรงข้าม เซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่ไม่มีชิ้นส่วนของยีนที่ศึกษา ยีน *LacZ* จะยังคงทำงานและย่อย X-gal ทำให้โคโลนีเจริญเป็นสีฟ้าจึงสามารถคัดเลือกโคโลนีของเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมได้ จากนั้นเลือกโคโลนีสีขาวมาทำการยืนยันผลโคลนด้วย PCR (*ITS1*, *COI*) และ Nested PCR (*FtsZ*) โดยใช้ สภาวะที่เหมาะสมที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่จะลดสัดส่วนของสารละลายที่ใช้เหลือปริมาณ 15  $\mu$ l โดยสุ่มเลือกโคโลนีที่มีสีขาวจำนวน 5-10 โคโลนี/เพลต มาตรวจจอบและทำ Subculture โคโลนีดังกล่าวไว้บน LB agar สำหรับเป็นเพลตต้นแบบ (master plate) แล้วนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5-6 ชั่วโมง จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ในขั้นตอนนี้มาตรวจจอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส หากตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด ตามต้องการจะเขี่ยโคโลนีจากเพลตต้นแบบมาเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่ปริมาตร 6-8 mL และเติมยาแอมพิซิลลิน 100  $\mu$ g/mL ปริมาตร 8  $\mu$ l แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 170 rpm. อุณหภูมิ 37 °C นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สำหรับนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นต่อไป

### 3.5.7 การสกัดพลาสมิด

การสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดทดสอบ Invisorb<sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Two (invitek GmbH, Germany) เริ่มจากการปั่นตกเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 7,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วเติมสาร Solution A ปริมาตร 250  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex เติมน้ำ Solution B ปริมาตร 250  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันด้วยการดูดขึ้นลง 3-4 ครั้ง เติมน้ำ Solution C ปริมาตร 250  $\mu$ l แล้วผสมให้เข้ากันเบา ๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที จะได้ส่วนใสแล้วเทลงในชุดตัวกรอง (Spin column) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วน ใสที่ตกลงกันหลอดทิ้ง เติมน้ำ Wash

buffer ปริมาตร 750  $\mu\text{L}$  เพื่อล้างตะกอนเซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 2 นาที เทส่วนใสทิ้งและปั่นแห้งชุดตัวกรองที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 4 นาที จากนั้นย้าย ชุดตัวกรองใสในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 mL แล้วเติมสารละลาย Elution solution หรือน้ำกลั่นสะอาดบริสุทธิ์ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm นาน 1 นาที จะได้สารละลายที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอออกมา จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดปริมาณและประเมินคุณภาพของพลาสมิดก่อนส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

### 3.5.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Sequencing)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในงานวิจัยนี้ ใช้บริการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริษัท AITbiotech ประเทศสิงคโปร์ โดยมีบริษัท Prima Scientific CO., LTD ประเทศไทย เป็นบริษัทกลางในการจัดส่ง และบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี มีบริษัท NP chemical supply CO., LTD ประเทศไทย เป็นบริษัทกลางในการจัดส่ง ซึ่งจัดส่งอย่างน้อย 3 โคลนต่อหนึ่งตัวอย่าง เพื่อยืนยันความแม่นยำของลำดับนิวคลีโอไทด์และแต่ละตัวอย่างต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเออย่างน้อย คือ 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

### 3.5.9 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Analysis)

นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างซึ่งแสดงค่าในรูปกราฟ Sequence electropherogram มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.2.6 โดยเลือกตัดเฉพาะบริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนที่ศึกษา (*ITS1*, *COI*, *FtsZ*) ออกจากส่วนพลาสมิดเวกเตอร์ แล้วบันทึกในรูปแบบ Fasta format สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

#### 3.5.9.1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนบริเวณ *ITS1*, *COI* และ *FtsZ* มาเปรียบเทียบค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Nucleotide blast (BLASTN) เทียบกับฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยผลการเปรียบเทียบความเหมือนจะถูกวิเคราะห์และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Percentage identities)

#### 3.5.9.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายพันธุ์

หลังการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลแล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดมา Align โดยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.2.6 เพื่อเปรียบเทียบและประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายพันธุ์ได้ จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการต่อไป

### 3.5.10 การสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนองพยาธิและแบคทีเรีย โดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม Molecular Evolution Genetic Analysis Version 10 (MEGA X) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI*, *ITS1* และ *FtsZ* โดยใช้ Maximum Likelihood method มาคำนวณหารูปแบบจำลองที่ดีที่สุด (ตารางที่ 11) และตรวจสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติโดยใช้ Bootstrap test จำนวน 1000 รอบ

ตารางที่ 11 แสดงรูปแบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ

Gene	Model
<i>COI</i>	Tamura-Nei model (TN93+G)
<i>ITS1</i>	Tamura 3-parameter model (T92+G)
<i>FtsZ</i>	Kimura 2-parameter model (K2)

การศึกษาด้วยยีนตำแหน่ง *COI*, *ITS1* และ *FtsZ* ดังกล่าวด้วยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (reference sequence) จากฐานข้อมูล Genbank มาเปรียบเทียบ เพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของหนองพยาธิที่พบในสุนัขและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในหนองพยาธิ

### 3.5.11 การขอขึ้นทะเบียนและการเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง *ITS1* และ *COI* ของหนองพยาธิทุกตัวอย่างที่ได้จะนำไปขึ้นขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Accession number) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ BankIt เพื่อเผยแพร่และเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวลงในฐานข้อมูล NCBI (Genbank)

### 3.5.12 การจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างหนองพยาธิด้วยเทคนิค PCR - Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

#### 3.5.12.1 การทำนายเอนไซม์ตัดจำเพาะและรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้

เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่เหมาะสมสำหรับใช้จำแนกชนิดของหนองพยาธิที่พบในงานวิจัยนี้ จะพิจารณาจากขนาดและจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายหลังจากการถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยที่ขนาดและจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละสายพันธุ์ควรมีความแตกต่างกันเพียงพอต่อการจำแนกแต่ละสายพันธุ์ออกจากกัน จากการทำนายเลือก

เอนไซม์ตัดจำเพาะจะวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม NEBcutter version 2.0 ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทำนายได้คือ *VspI* restriction enzyme (ตารางที่ 12 และ รูปที่ 16)

### 3.5.12.2 การตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* (*AseI*)

ขั้นตอนการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ *ITS1* ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR ของตัวอย่าง หนอนพยาธิด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทำนายได้จากโปรแกรม NEBcutter V2.0 คือ เอนไซม์ *AseI* ซึ่งผลการทำนายเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ได้ตรงกับงานวิจัยของ Nuchprayoon และคณะ (2006) [40] ก่อนหน้านี้ โดยใช้ สารละลายในสัดส่วนที่พอเหมาะ (ตารางที่ 12) ต่อปฏิกิริยาที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์ PCR จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AseI* และสิ้นสุดการทำงานของเอนไซม์ (inactive enzyme) ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 20 นาที ก่อนนำผลผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis ในแผ่นเจล 10% native-PAGE ในสัดส่วนของสารละลายที่พอเหมาะ (ตารางที่ 13) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 60 Volts นาน 90 นาที จากนั้นย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide ก่อนนำมาตรวจสอบผลเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ตารางที่ 12 การทำนายขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *VspI*

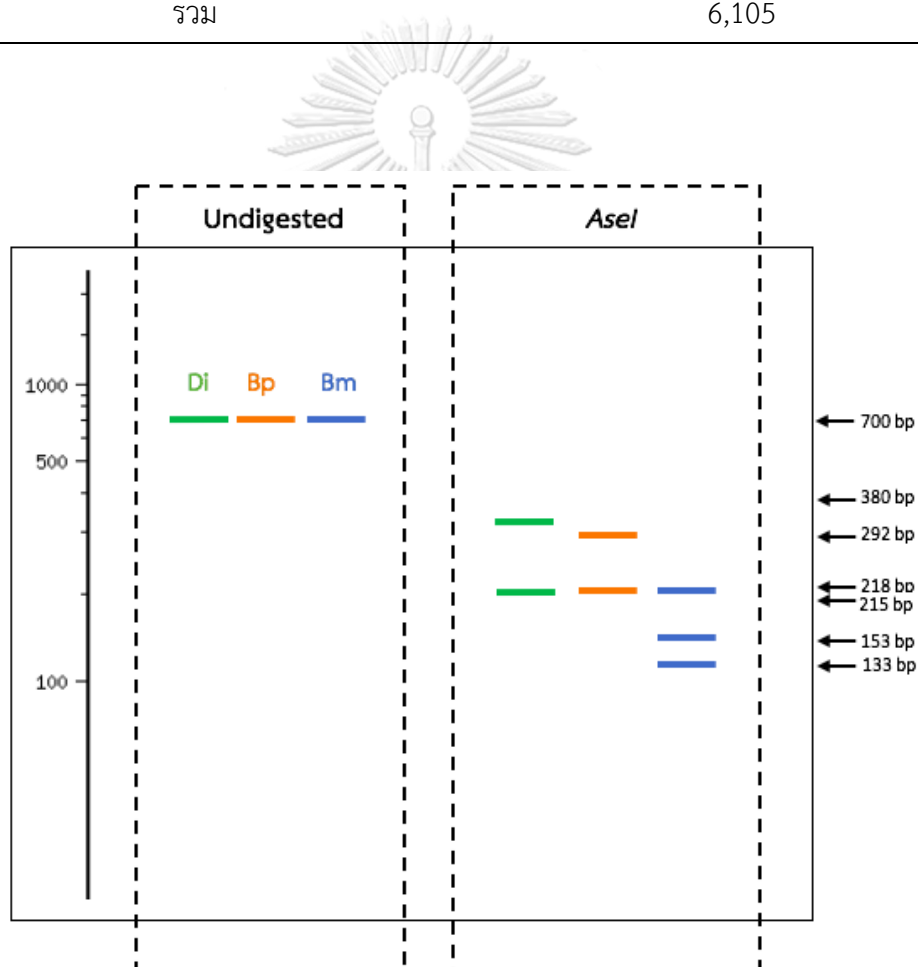
สายพันธุ์ของพยาธิ	ขนาด (bp) และจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>VspI</i>
<i>D. immitis</i> (Di)	380, 215
<i>B. pahangi</i> (Bp)	292, 218
<i>B. malayi</i> (Bm)	218, 153, 133

ตารางที่ 13 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
PCR product	5.0
ddH <sub>2</sub> O	3.5
10X Buffer O	1.0
<i>AseI</i> enzyme (5U/μl)	0.5
รวม	10

ตารางที่ 14 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในแผ่นเจล 10% native-PAGE

ส่วนประกอบ	ปริมาตร) $\mu$ l(
ddH <sub>2</sub> O	2,800
30% acrylamide	2,000
5X TBE	1,200
10% ammonium persulfate	100
TEMED	5
รวม	6,105



รูปที่ 16 การทำนายตัดตัวอย่างด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* (*AseI*) ด้วยโปรแกรม NEBcutter

## บทที่ 4

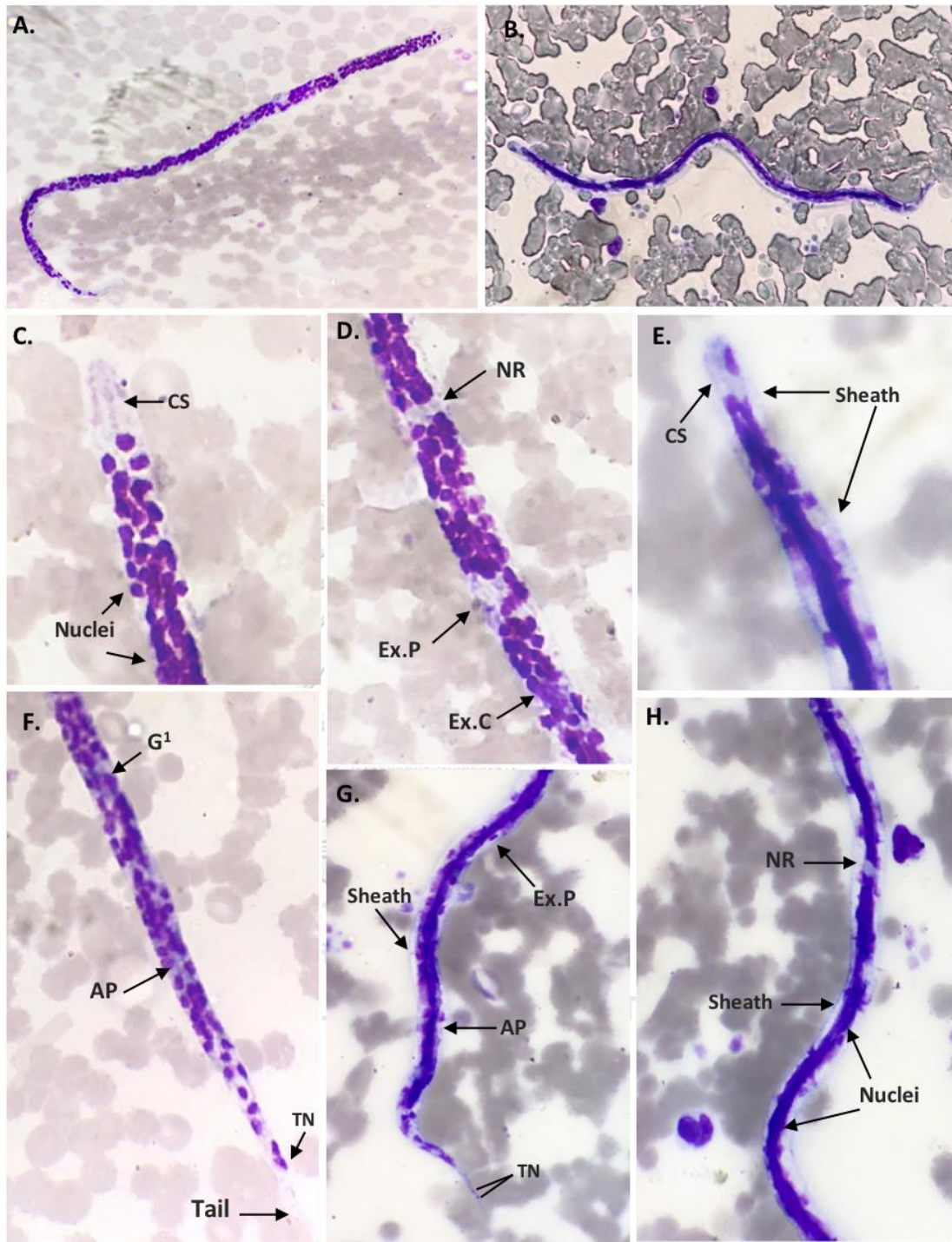
### ผลการทดลอง

#### 4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้รับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดของสุนัขที่อยู่ในเขตกรุงเทพและปริมณฑล ซึ่งเป็นสุนัขที่สงสัยว่าเป็นโรคหนอนพยาธิหัวใจที่เข้ามาตรวจสุขภาพในโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวนตัวอย่างที่ได้รับทั้งหมด 57 ตัวอย่าง โดยกำหนดรหัสตัวอย่างเป็น D01 ถึง D57

#### 4.2 ผลการจำแนกสายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) จากตัวอย่างแผ่นฟิล์มเลือดที่ย้อมสียิมซ่า (Giemsa stain) ซึ่งได้รับมาจำนวนทั้งหมด 57 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่ให้ผลบวก จำนวน 16 ตัวอย่าง คิดเป็น 28.07% (ตารางที่ 15) ซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะไมโครฟีลาเรียของหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp. จำนวน 11 ตัวอย่าง คือ D11, D12, D13, D17, D18, D30, D31, D35, D41, D43 และ D46 และตรวจพบตัวอ่อนระยะไมโครฟีลาเรียของหนอนพยาธิ *Brugia* spp. จำนวน 5 ตัวอย่าง คือ D16, D19, D24, D26 และ D40 โดยหนอนพยาธิทั้งสองสกุลที่พบมีลักษณะที่แตกต่างกันซึ่งตัวอ่อนระยะไมโครฟีลาเรียของหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp. มีลักษณะตัวเรียวยาว ไม่มีปลอกหุ้มตัว (unsheathed) มีช่องว่างที่ส่วนหัว (cephalic space) นิวเคลียสติดสีม่วงอยู่ติดกันไม่สามารถนับจำนวนได้ มี Nerve ring, Excretory pore, Anal pore หรือบางตัวอย่างอาจจะเห็น First genital cell ทางมีลักษณะเหยียดตรง (straight tail) และมีนิวเคลียสสุดท้ายที่หาง (terminal nucleus) (รูปที่ 17) ตัวอ่อนระยะไมโครฟีลาเรียของหนอนพยาธิ *Brugia* sp. มีปลอกหุ้มตัว (sheath) จะย้อมติดสีอ่อน ช่องว่างที่ส่วนหัวมีขนาดความยาวต่อความกว้างเป็น 2:1 (elongated cephalic space) นิวเคลียสติดสีเข้มจำนวนมาก พบ Nerve ring, Anal vesicle, Excretory vesicle และพบ นิวเคลียสสุดท้ายที่ปลายหางจำนวน 2 นิวเคลียส (รูปที่ 17)

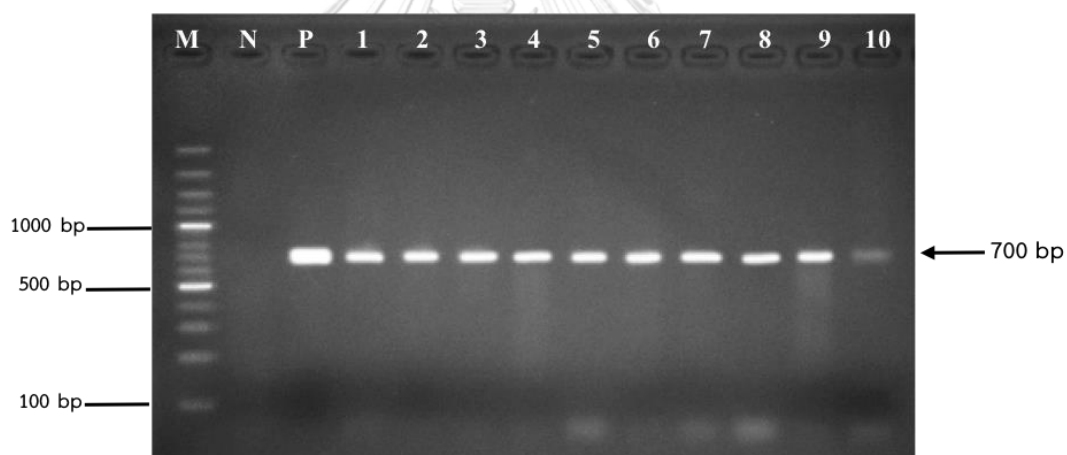


รูปที่ 17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตัวอ่อนระยะไมโครฟีลาเรียของหนอนพยาธิที่พบในงานวิจัย *Dirofilaria* spp. (A, C, D, F) และ หนอนพยาธิ *Brugia* spp. (B, E, H, G) CS; Cephalic space, NR; Nerve ring, Ex.P; Excretory pore, Ex.C; Excretory cell, G<sub>1</sub>; First genital cell, AP; Anal pore, TN; Terminal nucleus.

### 4.3 ผลการจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาของหนอนพยาธิที่บริเวณ *COI* และ *ITS1*

#### 4.3.1 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR

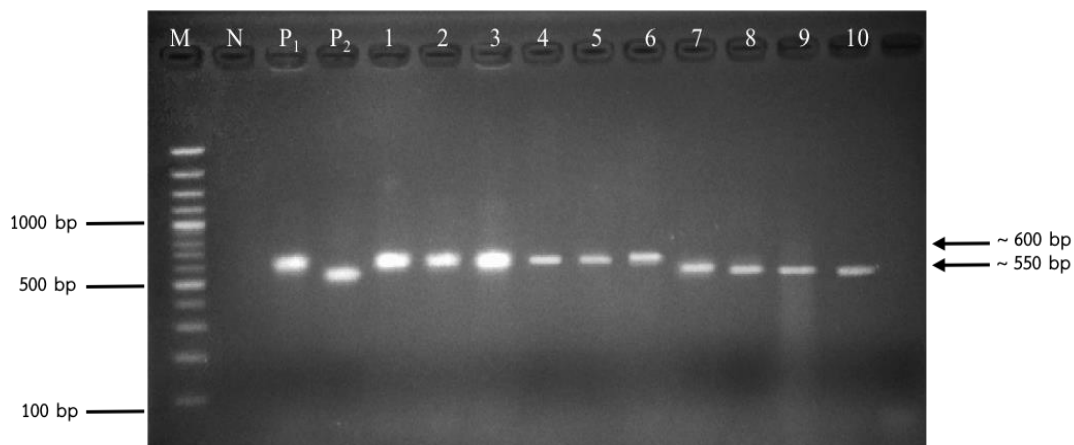
การศึกษาจำแนกหนอนพยาธิทั้งหมดจำนวน 57 ตัวอย่าง จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดสุนัขที่เก็บได้จากเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล นำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนที่ตำแหน่งยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อหนอนพยาธิภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แล้วตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยให้ดีเอ็นเอที่สนใจเคลื่อนที่คู่ไปกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp บนเจล 1.5% Agarose gel electrophoresis ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide ก่อนนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากตำแหน่งยีน *COI* พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของหนอนพยาธิทุกตัวอย่างมีขนาดประมาณ 700 bp จำนวน 50 ตัวอย่าง (รูปที่ 18) และบริเวณ *ITS1* ปรากฏแถบดีเอ็นเอของหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp. มีขนาดประมาณ 600 bp จำนวน 30 ตัวอย่าง และแถบดีเอ็นเอของหนอนพยาธิ *Brugia* spp. มีขนาดประมาณ 550 bp จำนวน 11 ตัวอย่าง (รูปที่ 19)



รูปที่ 18 แสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้นส่วนบริเวณ *COI* บน 1.5% Agarose gel electrophoresis

Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, Lane N คือตัวควบคุมผลลบ (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ), Lane P คือ ตัวควบคุมผลบวก, Lane 1-10 คือผลิตภัณฑ์ pcr ของตัวอย่างเลือดสุนัขที่มีหนอนพยาธิ



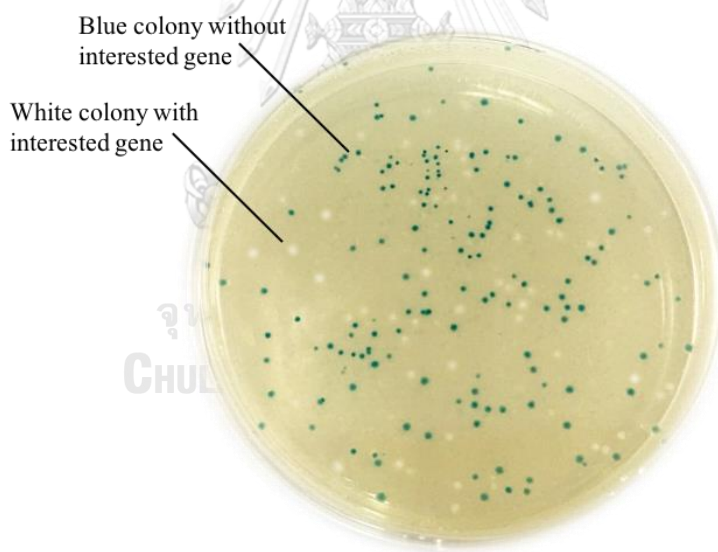


รูปที่ 19 แสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ pcr ของชิ้นส่วนบริเวณ *ITS1* บน 1.5% Agarose gel electrophoresis

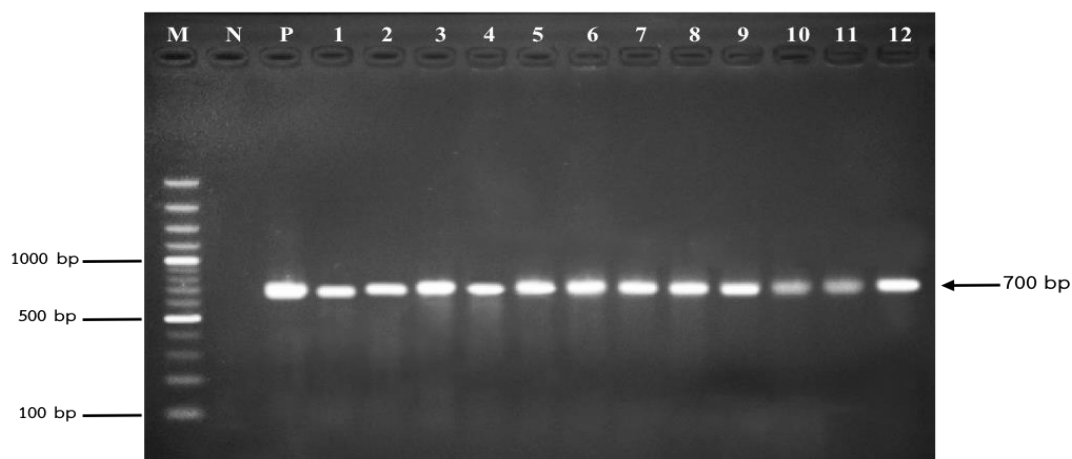
Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, Lane N คือตัวควบคุมผลลบ (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ), Lane P<sub>1</sub> คือตัวควบคุมผลบวกของหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp., Lane P<sub>2</sub> คือตัวควบคุมผลบวกของหนอนพยาธิ *Brugia* spp., Lane 1-6 คือผลิตภัณฑ์ pcr ของตัวอย่างเลือดสุนัขที่มีหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp., Lane 7-10 คือผลิตภัณฑ์ pcr ของตัวอย่างเลือดสุนัขที่มีหนอนพยาธิ *Brugia* spp.

#### 4.3.2 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยเทคนิค Colony PCR

จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ให้ผลบวกจากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนที่ตำแหน่งยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* นำมาเชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy ที่มีลักษณะบริเวณส่วนปลายเป็นเบส T (Thymine) จะสามารถเชื่อมต่อแล้วเกิดเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมได้ จากนั้นทำการถ่ายโอนเข้าสู่ Competent cells (*E. coli*; DH5 $\alpha$ ) กระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) แล้วนำไปเลี้ยงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจะเกิดเป็นโคโลนีที่มีสีฟ้าและสีขาว (รูปที่ 20) เลือกโคโลนีสีขาวซึ่งมีชิ้นส่วนของตำแหน่งยีนที่เราสนใจแทรกอยู่มาทดสอบโคลนอีกครั้งด้วยเทคนิค Colony PCR แล้วตรวจสอบด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis ก่อนนำไปตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งผลการปรากฏแถบดีเอ็นเอของโคลนที่ตำแหน่งยีน *COI* มีขนาดประมาณ 700 bp (รูปที่ 21) และที่บริเวณ *ITS1* มีขนาดประมาณ 600 bp และ 550 bp ของหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp. และ *Brugia* spp. ตามลำดับ (รูปที่ 22) เมื่อเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

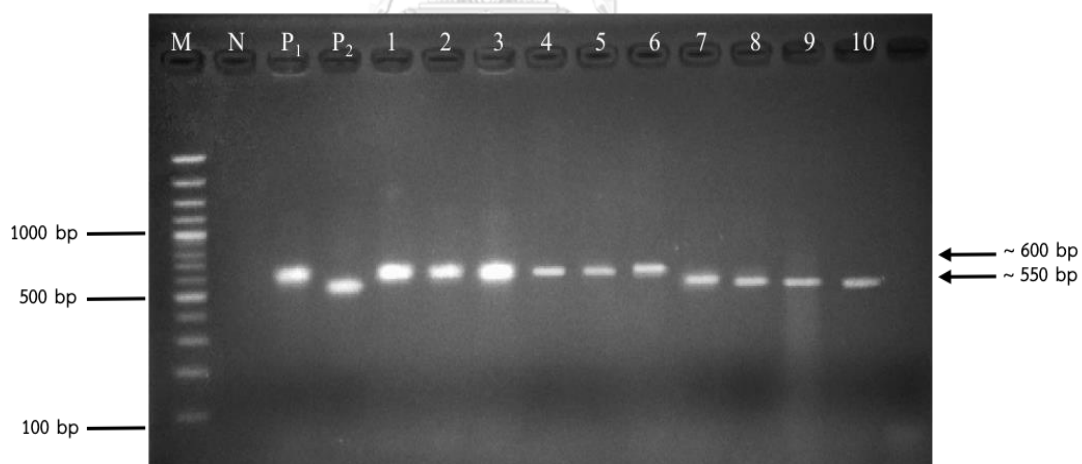


รูปที่ 20 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB agar



รูปที่ 21 แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีชิ้นส่วนบริเวณ *COI* บน 1.5% Agarose gel electrophoresis

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, Lane N คือ ตัวควบคุมผลลบ (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ), Lane P คือ ตัวควบคุมผลบวก, Lane 1-10 คือ ตัวอย่างที่มี พลาสมิดสายผสมของ หนอนพยาธิ



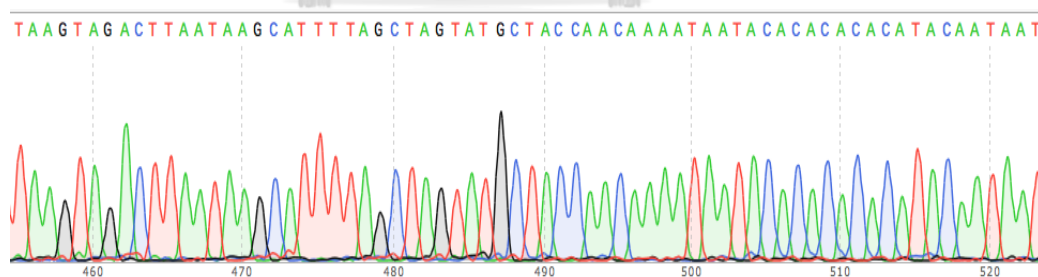
รูปที่ 22 แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีชิ้นส่วนบริเวณ *ITS1* บน 1.5% Agarose gel electrophoresis

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, Lane N คือ ตัวควบคุมผลลบ (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ), Lane P<sub>1</sub> คือ ตัวควบคุมผลบวกของหนอนพยาธิ *Dirofilaria*, Lane P<sub>2</sub> คือ ตัวควบคุมผลบวกของหนอนพยาธิ *Brugia*, Lane 1-5 คือ ตัวอย่างที่มีพลาสมิดสายผสมของหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp., Lane 6-10 คือ ตัวอย่างที่มีพลาสมิดสายผสมของหนอนพยาธิ *Brugia* spp.

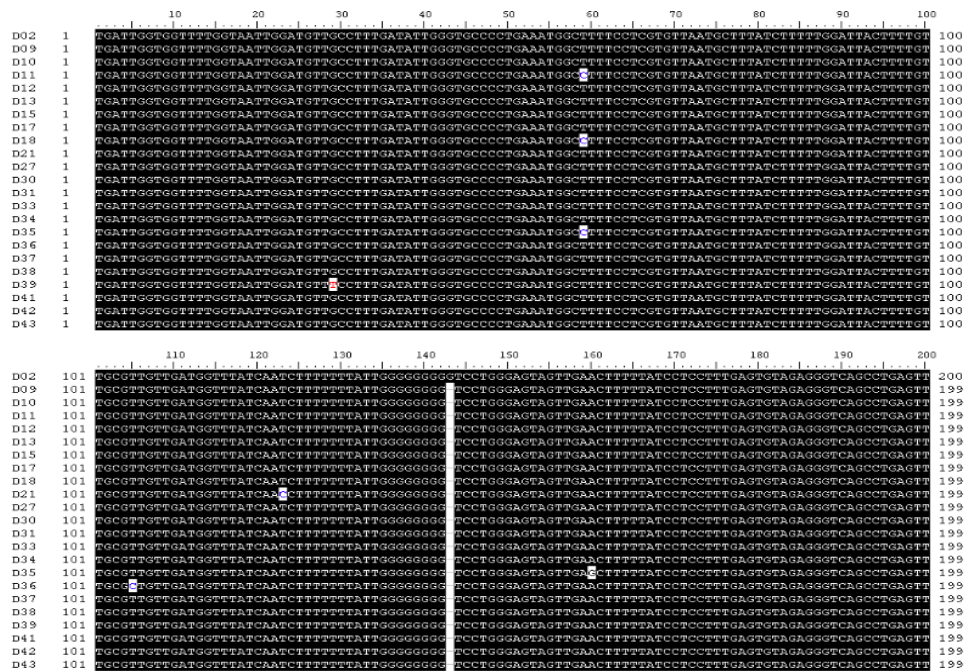
### 4.3.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนอนพยาธิ

จากการตรวจสอบพลาสมิดสายผสมทั้งบริเวณตำแหน่งยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* แล้วเลือก โคลินีมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและวัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม ก่อนส่งตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี หลังจากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Sequencing) จะแสดงผลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปกราฟ sequence electropherogram (รูปที่ 23) จากนั้นวิเคราะห์เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.2.6 ตัดบริเวณที่เป็นส่วนของพลาสมิดเวกเตอร์ด้านหัวและท้ายออก พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *COI* ของหนอนพยาธิที่ตัดแต่งแล้วมีขนาด 689 bp ทุกตัวอย่าง และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *ITS1* ที่ตัดแต่งแล้วของหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp. มีขนาด 580-600 bp และหนอนพยาธิ *Brugia* spp. มีขนาด 500-515 bp

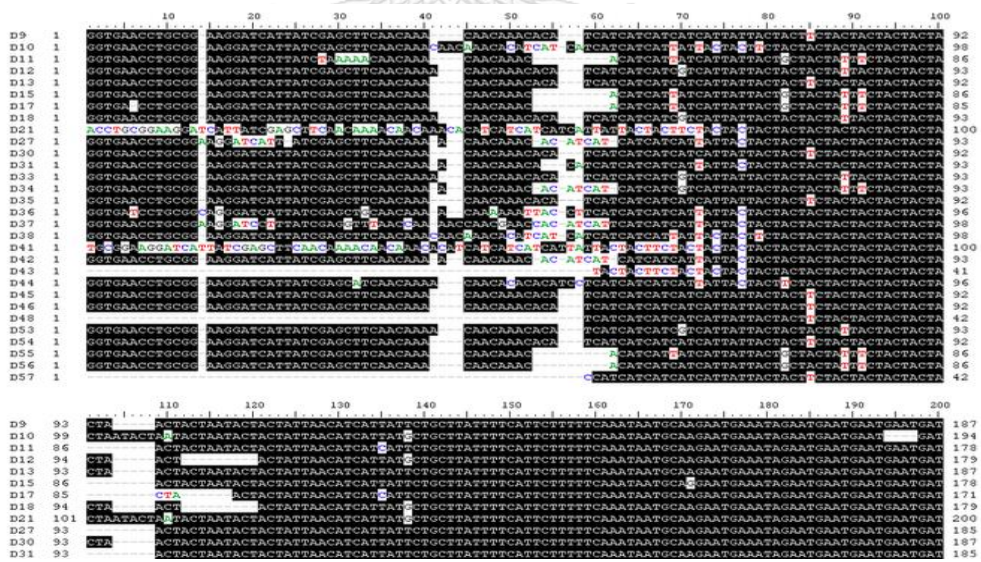
จากนั้นนำทุกตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยทำ multiple sequence alignment ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน *COI* ของหนอนพยาธิในแต่ละตัวอย่าง (รูปที่ 24) พบว่ามีความแปรผัน (variation) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในตัวอย่างน้อยกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ *ITS1* ของหนอนพยาธิ (รูปที่ 25) (แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในภาคผนวก ข)



รูปที่ 23 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปกราฟ sequence electropherogram



รูปที่ 24 ผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน COI ของหนอนพวยอิ (แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน)



รูปที่ 25 ผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน ITS1 ของหนอนพวยอิ (แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน)

#### 4.3.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนอนพยาธิกับฐานข้อมูล NCBI

ลำดับนิวคลีโอไทด์หนอนพยาธิที่ตัดแต่งเรียบร้อยแล้วนำมาเปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* ของหนอนพยาธิทั้งหมดบนฐานข้อมูลอ้างอิง NCBI ผลการเปรียบเทียบจะแสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity)

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *COI* ของหนอนพยาธิจำนวน 50 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้เป็น 3 สายพันธุ์ คือหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis*, *B. pahangi* และ *B. malayi* โดยระบุได้เป็นหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* จำนวน 33 ตัวอย่าง มีความเหมือนกับหนอนพยาธิ *D. immitis* จากประเทศจีน (Accession no. EU159111.1) ด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่าง 99-100% พบหนอนพยาธิ *B. pahangi* จำนวน 13 ตัวอย่าง เหมือนกับหนอนพยาธิ *B. pahangi* จากประเทศญี่ปุ่น (Accession no. AP017680.1) ด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่าง 98-99% และพบหนอนพยาธิ *B. malayi* จำนวน 4 ตัวอย่าง เหมือนกับ *B. malayi* จากประเทศสหรัฐอเมริกา (Accession no. AF538716.1) ด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99%

ส่วนผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ *ITS1* ของหนอนพยาธิจำนวน 41 ตัวอย่าง จำแนกได้ 2 สายพันธุ์ คือ หนอนพยาธิ *D. immitis* และ *B. pahangi* โดยหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* จำนวน 30 ตัวอย่าง ซึ่งจะมีความเหมือนกับหนอนพยาธิ *D. immitis* Accession no. AB973230.1 และ Accession no. AB973231.1 จากประเทศญี่ปุ่นด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่าง 97-99% และ 96-99% ตามลำดับ ส่วนหนอนพยาธิ *B. pahangi* จำนวน 11 ตัวอย่าง ในแต่ละตัวอย่างมีความเหมือนกับหนอนพยาธิ *B. pahangi* Accession no. EU373628.1, EU373633.1, EU373645.1, EU373646.1, EU373635.1 และ AY621470.1 ที่อยู่ในประเทศไทยด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99% (แสดงค่าของแต่ละตัวอย่างในภาคผนวก ข)

ตารางที่ 15 ผลการตรวจจำแนกและระบุสายพันธุ์หนอนพยาธิด้วยวิธีจุลทรรศน์วิทยาและอณูชีววิทยาบนตำแหน่ง *COI* และ *ITS1* (n=57)

Species	Microscopic examination (%)	Molecular detection (%)	
		<i>COI</i>	<i>ITS1</i>
<i>Dirofilaria</i> spp.	11(19.30%)		
<i>Brugia</i> spp.	5 (8.77%)		
<i>D. immitis</i>		33 (57.89%)	30 (52.63%)
<i>B. pahangi</i>		13 (22.81%)	11 (19.30%)
<i>B. malayi</i>		4 (7.02%)	0
<b>Total</b>	<b>16 (28.07%)</b>	<b>50 (87.72%)</b>	<b>41 (71.93%)</b>

#### 4.3.5 ผลการขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนอนพยาธิ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* ของหนอนพยาธิที่ได้หลังจากการเปรียบเทียบผลความเหมือนกับฐานข้อมูลแล้ว ทำการยื่นขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ BankIt เพื่อเพิ่มข้อมูลและเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* ของหนอนพยาธิเข้าไปในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยผลการยื่นขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่างทั้งหมดของยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* คือ MK250707-MK250760 และ MK250761-MK250805 ตามลำดับ

#### 4.3.6 ผลการวิเคราะห์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายพันธุ์

วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ (intraspecific variation) และระหว่างสายพันธุ์ (interspecific variation) โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* ของหนอนพยาธิทั้งหมดที่ตรวจพบจากงานวิจัยนี้ โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.2.6 เลือกโหมด sequence identity matrix

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน *COI* ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์เดียวกันเมื่อแยกตามสายพันธุ์ของหนอนพยาธิ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความต่างภายในหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* มีค่าระหว่าง 0-1.1% (เฉลี่ย 0.38%) ส่วนเปอร์เซ็นต์ความต่างภายในหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* และ *B. malayi* มีค่าระหว่าง 0-1.8% (เฉลี่ย 0.38%) และ 0-1.4% (เฉลี่ย 0.47%) ตามลำดับ ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *COI* ของหนอนพยาธิแทบจะไม่มีค่าความแตกต่างภายในสายพันธุ์ ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ของหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* เปรียบเทียบกับ *B. pahangi* และ *B. malayi* มีค่าเปอร์เซ็นต์ความต่างระหว่าง 14.7-15.4% (เฉลี่ย 14.82%) และ 14.4-15.3% (เฉลี่ย 14.79%) ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์ความต่างระหว่างหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* กับ *B. malayi* มีค่าเท่ากับ 9.2-10.8% (เฉลี่ย 9.91%) จากผลการเปรียบเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *COI* ระหว่างสายพันธุ์ของหนอนพยาธิค่อนข้างไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 16) (แสดงค่าทั้งหมดในภาคผนวก ข)

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *ITS1* พบว่าผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* มีค่าระหว่าง 0-16.7% (เฉลี่ย 8.08%) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้ค่อนข้างมีความแตกต่างกันสูงภายในสายพันธุ์ แต่เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* มีค่าเปอร์เซ็นต์ความต่างเพียง 0-3.7% (เฉลี่ย 1.5%) ถือว่าไม่มีความแตกต่างภายในสายพันธุ์นี้ ส่วนผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* กับ *B. pahangi* มีค่าเท่ากับ 33.9-42.3% (เฉลี่ย 38.67%) จากผลการคำนวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *ITS1* ระหว่างหนอนพยาธิทั้งสองสายพันธุ์นี้มีความแตกต่างกันสูง (ตารางที่ 17) (แสดงค่าทั้งหมดในภาคผนวก ข)





ตารางที่ 16 เปรียบเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของหนอนพยาธิแต่ละสายพันธุ์ (แสดงผลบางส่วน)

Code	D02	D09	D10	D11	D12	D13	D15	D17	D18	D30	D01	D03	D04	D05	D16	D20	D24	D26	D28	D06	D14	D50	
D02	-																						
D09	0.5	-																					
D10	0.6	0.2	-																				
D11	0.6	0.2	0.3	-																			
D12	0.5	0	0.2	0.2	-																		
D13	0.5	0	0.2	0.2	0	-																	
D15	0.6	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	-																
D17	0.8	0.3	0.5	0.5	0.3	0.3	0.5	-															
D18	0.6	0.2	0.3	0	0.2	0.2	0.3	0.5	-														
D30	0.5	0	0.2	0.2	0	0	0.2	0.3	0.2	-													
D01	15.3	15	15.1	15.1	15	15	15.1	15.3	15.1	15	-												
D03	15.3	15	15.1	15.1	15	15	15.1	15.3	15.1	15	0	-											
D04	15	14.7	14.9	14.9	14.7	14.7	14.9	15	14.9	14.7	1.6	1.6	-										
D05	15.3	15	15.1	15.1	15	15	15.1	15.3	15.1	15	0	1.6	-										
D16	15	14.7	14.9	14.9	14.7	14.7	14.9	15	14.9	14.7	1.4	1.4	0.3	1.4	-								
D20	15.1	14.9	15	15	14.9	14.9	15	15.1	15	14.9	1.8	1.8	0.2	1.8	0.5	-							
D24	15.1	14.9	15	15	14.9	14.9	15	15.1	15	14.9	1.8	1.8	0.2	1.8	0.5	0	-						
D26	15.1	14.9	15	15	14.9	14.9	15	15.1	15	14.9	1.8	1.8	0.2	1.8	0.5	0	-						
D28	15.3	15	15.1	15.1	15	15	15.1	15.3	15.1	15	0	0	1.6	0	1.4	1.8	1.8	-					
D06	15.3	14.9	15	15	14.9	14.9	15	15	14.9	14.6	9.8	10.6	9.8	10.4	10.8	10.8	10.8	9.8	-				
D14	14.8	14.4	14.6	14.6	14.4	14.4	14.6	14.6	14.6	14.4	9.2	10.1	9.2	9.8	10.2	10.2	10.2	9.2	0.6	-			
D50	15	14.6	14.7	14.7	14.6	14.6	14.7	14.7	14.6	14.6	9.3	10.2	9.3	9.9	10.4	10.4	10.4	9.3	1.1	0.5	-		

[D2, D9-13, D15, D17-18, D30] คือหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis*

[D1, D3-5, D16, D20, D24, D26, D28] คือหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi*

[D06, D14, D50] คือหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. malayi*

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของหนอนพยาธิแต่ละสายพันธุ์ (แสดงผลบางส่วน)

Code	D9	D10	D11	D12	D13	D15	D17	D18	D21	D27	D30	D1	D3	D4	D5	D16	D20	D24	D26	D49	D51	D52
D9	-																					
D10	6.5	-																				
D11	9.9	10.8	-																			
D12	2.6	7.6	10.4	-																		
D13	0.9	6.7	9.7	3.1	-																	
D15	6.1	10.3	7.5	6.6	5.9	-																
D17	5.9	10.2	7.5	4.8	6.1	4.6	-															
D18	2.6	7.6	10.4	0	3.1	6.6	4.8	-														
D21	12.4	15.7	17.6	13.5	12.2	15	14.9	13.5	-													
D27	7.1	7.9	9.9	8.6	6.9	9	9.9	8.6	15.1	-												
D30	0.2	6.3	9.7	2.4	0.7	5.9	5.7	2.4	12.2	6.9	-											
D1	38.9	39.5	39.7	38.4	38.7	39.5	37.9	38.4	41.7	38.6	38.7	-										
D3	39.4	40	40.3	38.9	39.2	40	38.4	38.9	42.2	39.1	39.2	1.2	-									
D4	38.9	39.5	39.8	38.4	38.7	39.6	37.9	38.4	41.7	38.6	38.7	1.2	2	-								
D5	39	39.8	40.1	38.5	38.9	39.7	38.1	38.5	41.9	38.9	38.9	1.8	2.2	2.6	-							
D16	38.7	39.3	39.6	38.2	38.5	39.4	37.7	38.2	41.6	38.4	38.5	1.2	1.6	0.8	2.2	-						
D20	38.8	39.4	39.7	38.3	38.6	39.5	37.8	38.3	41.6	38.5	38.6	1	1.8	0.2	2.4	0.6	-					
D24	39.5	40	40.4	39	39.3	40.2	38.5	39	42.3	39.2	39.3	1.2	2	1.6	1.4	2	1.4	-				
D26	38.9	39.5	39.7	38.4	38.7	39.5	37.9	38.4	41.7	38.6	38.7	1.4	1.8	1	2.4	0.2	0.8	2.2	-			
D49	39	39.6	39.9	38.5	38.9	39.7	38.1	38.5	41.9	38.7	38.9	1.6	0.8	1.2	2.6	0.8	1	2.4	1	-		
D51	39.2	39.8	40.1	38.7	39	39.9	38.2	38.7	42	38.9	39	1.8	2.6	0.6	3.2	1.4	0.8	2.2	1.6	1.8	-	
D52	38.8	39.4	39.7	38.3	38.6	39.5	37.8	38.3	41.6	38.5	38.6	1	1.8	0.2	2.4	0.6	0	1.4	0.8	1	0.8	-

[D9-15, D17-18, D21, D27, D30] คือหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis*

[D1, D3-5, D16, D20, D24, D26, D49, D51-52] คือหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi*

#### 4.3.7 ผลการสร้างแผนภูมิตวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของหนอนพยาธิ

การสร้างแผนภูมิตวิวัฒนาการอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* ของตัวอย่างหนอนพยาธิ โดยใช้โปรแกรม MEGA X ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) กำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Tamura-Nei model (TN93+G) สำหรับตำแหน่งยีน *COI* และแบบ Tamura 3-parameter model (T92+G) สำหรับบริเวณ *ITS1* และทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิตวิวัฒนาการด้วย bootstrap test จำนวน 1000 รอบ ทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนอนพยาธิที่ตรวจพบจากงานนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (reference sequence) ของหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

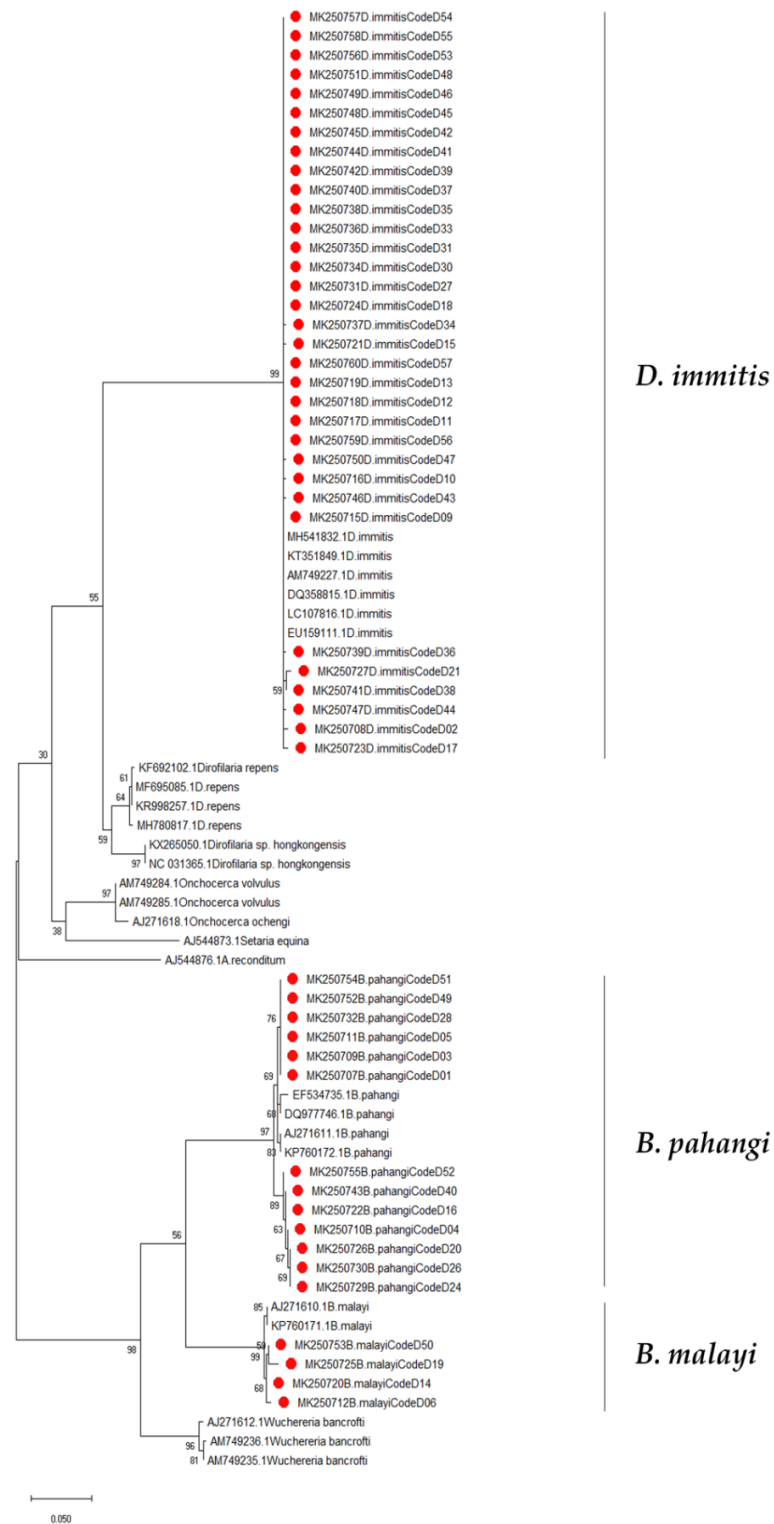
ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงสำหรับตำแหน่งยีน *COI* ได้แก่ *D. immitis* (acc no. EU159111.1, LC107816.1, DQ358815.1, AM749227.1, KT351849.1, MH541832.1), *D. repens* (acc no. KR998257.1, MF695085.1, MH780817.1, KF692102.1), *B. pahangi* (acc no. AJ271611.1, DQ977746.1, EF534735.1, KP760172.1), *B. malayi* (acc no. KP760171.1, AJ271610.1), *Onchocerca volvulus* (acc no. AM749285.1, AM749284.1), *O. ochengi* (acc no. AJ271618.1), *W. bancrofti* (acc no. AJ271612.1, AM749235.1, AM749236.1), *D. hongkongensis* (acc no. NC031365.1, KX265050.1), *A. reconditum* (acc no. AJ544876.1) และ *Setaria equina* (acc no. AJ544873.1)

ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงสำหรับบริเวณ *ITS1* ได้แก่ *D. immitis* (acc no. KY863453.1, EU087700.1, AF217800.2), *D. repens* (acc no. AY621480.1, AY621479.1, AY621481.1), *B. pahangi* (acc no. EU373635.1, EU373628.1, EU373652.1, EU373629.1, AY621469.1, EU419349.1), *B. malayi* (acc no. EU373619.1, EU373624.1, EU37365.1, AY621468.1, EU419345.1, EU419346.1), *O. fasciata* (acc no. JQ316671.1), *O. volvulus* (acc no. AF228571.1, AF228565.1, EU272179.1) และ *W. bancrofti* (acc no. AY621473.1, AY621478.1)

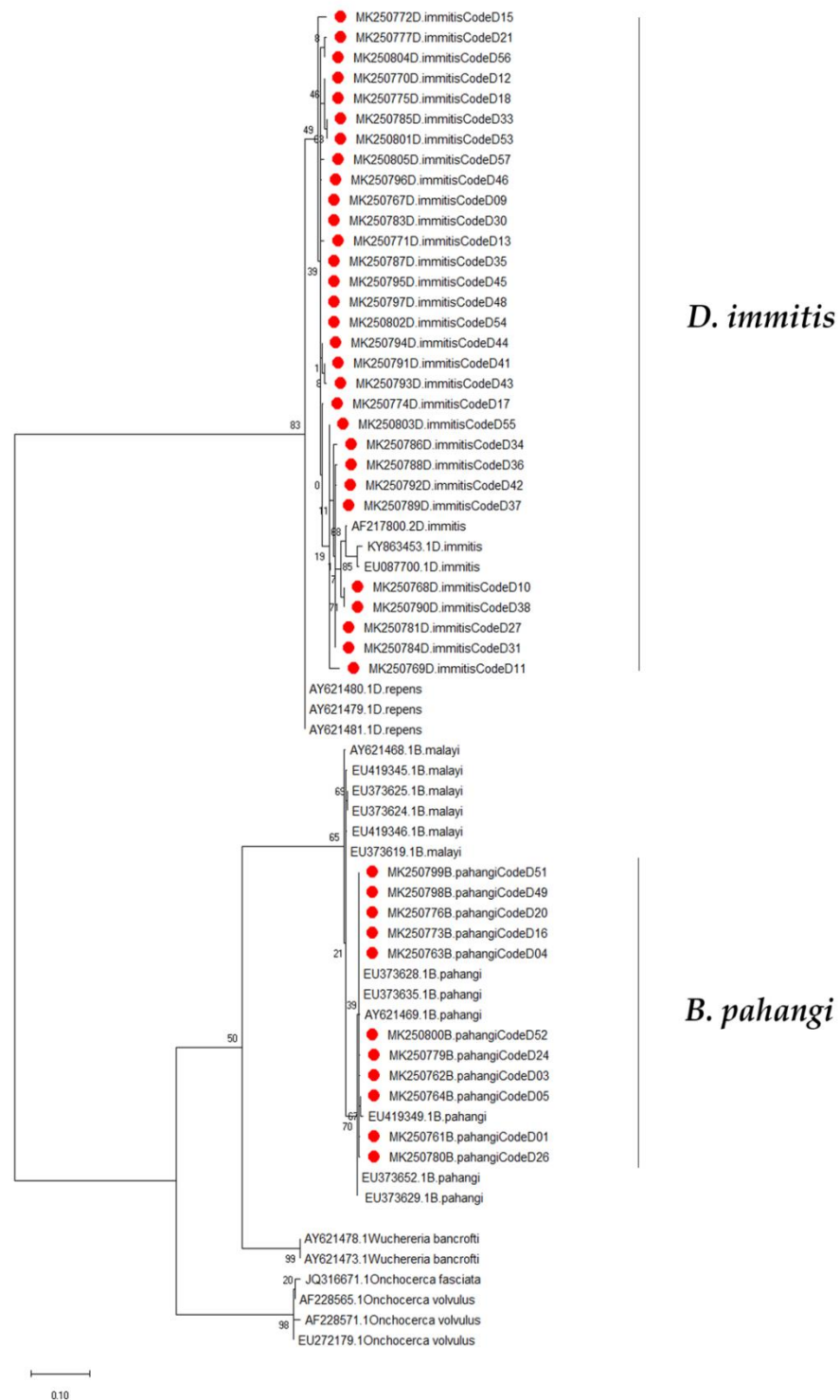
ผลการวิเคราะห์ทางแผนภูมิตวิวัฒนาการของหนอนพยาธิที่ตำแหน่งยีน *COI* (รูปที่ 26) จำนวน 51 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงตำแหน่งยีน *COI* ของหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างหนอนพยาธิได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 หนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* จำนวน 33 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมดมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* ที่รายงานจากประเทศฮังการี (Accession no. MH541832.1) ประเทศอิหร่าน (Accession no. KT351849.1) ประเทศอิตาลี (Accession no. AM749227.1) ประเทศอิตาลี (Accession no. DQ358815.1) ประเทศสเปน (Accession no. LC107816.1) และประเทศจีน (Accession no. EU159111.1) ด้วยค่า bootstrap 99% และกลุ่มที่

2 ประกอบด้วยหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* กับ *B. malayi* โดยหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* จำนวน 13 ตัวอย่าง จัดอยู่ด้วยกันแต่มีการแยกกิ่งย่อยภายในหนอนพยาธิกลุ่มนี้ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* ที่รายงานจากประเทศมาเลเซีย (Accession no. DQ977746.1, EF534735.1) ประเทศฝรั่งเศส (Accession no. KP760172.1) และประเทศอิตาลี (Accession no. AJ271611.1) และหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. malayi* จำนวน 4 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับหนอนพยาธิ *B. malayi* ที่รายงานจากประเทศอิตาลี (Accession no. AJ271610.1) และประเทศฝรั่งเศส (Accession no. KP760171.1) ด้วยค่า bootstrap 97% หนอนพยาธิในกลุ่มที่ 2 ทั้งสองสายพันธุ์นี้จัดอยู่ในสกุลเดียวกันมีความใกล้เคียงกันมากทางลำดับวิวัฒนาการแต่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน ด้วยค่า bootstrap 56%

ส่วนจากแผนภูมิวิวัฒนาการของหนอนพยาธิที่บริเวณ *ITS1* (รูปที่ 27) จำนวน 41 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงบริเวณ *ITS1* ของหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ สามารถแยกหนอนพยาธิได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 หนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* จำนวน 30 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างในกลุ่มนี้มีการแตกกิ่งย่อยค่อนข้างมากแต่ยังจัดอยู่ภายในกลุ่มเดียวกัน มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับหนอนพยาธิ *D. immitis D. immitis* ที่รายงานจากประเทศไต้หวัน (Accession no. AF217800.2) ประเทศอิหร่าน (Accession no. KY863453.1) และประเทศอินเดีย (Accession no. EU087700.1) ด้วยค่า bootstrap 83% และกลุ่มที่ 2 คือ หนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* จำนวน 11 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับหนอนพยาธิ *B. pahangi* ที่รายงานจากประเทศไทย (Accession no. EU373652.1, EU373628.1, EU373629.1, EU373635.1, EU373650.1, Accession no. AY621469.1) ด้วยค่า bootstrap 70% และตัวอย่างในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับหนอนพยาธิ *B. malayi* ด้วยค่า bootstrap 65% จากผลการแยกตัวอย่างหนอนพยาธิตามแผนภูมิวิวัฒนาการทั้งที่ตำแหน่งยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* มีความสอดคล้องเป็นไปในทิศทางเดียวกัน



รูปที่ 26 แผนภูมิวิวัฒนาการที่ตำแหน่งยีน *COI* ของหนอนพยาธิในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของหนอนพยาธิสายพันธุ์ต่าง ๆ (วงกลมสีแดงแทนตัวอย่างหนอนพยาธิที่พบจากการศึกษานี้)



รูปที่ 27 แผนภูมิวิวัฒนาการที่บริเวณ ITS1 ของหนอนพยาธิในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของหนอนพยาธิสายพันธุ์ต่าง ๆ (วงกลมสีแดงแทนตัวอย่างหนอนพยาธิที่พบจากการศึกษานี้)

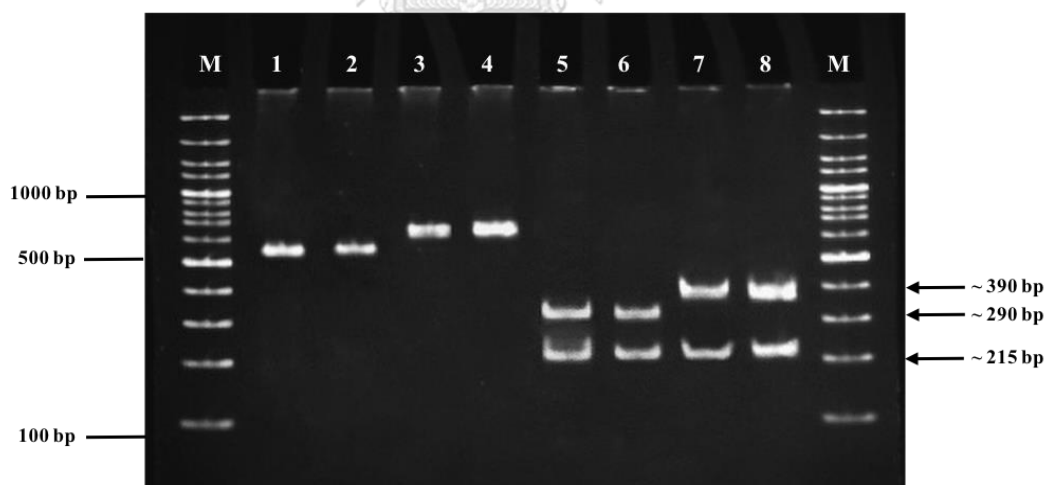
#### 4.4 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างหนอนพยาธิด้วยเทคนิค PCR-RFLP

งานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค PCR-RFLP ที่บริเวณ *ITS1* ในการจำแนกระหว่างหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* และ *B. pahangi* โดยทำนายเอนไซม์ตัดจำเพาะบริเวณ *ITS1* ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายของหนอนพยาธิที่พบในงานวิจัยนี้ ด้วยโปรแกรม NEBcutter v2.0 พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมคือ *VspI*

ผลการตัดตัวอย่างด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* สามารถแยกตัวอย่างของหนอนพยาธิทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน คือหนอนพยาธิ *D. immitis* ตัดได้จำนวน 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 390 bp และ 218 bp และตัวอย่างหนอนพยาธิ *B. pahangi* ได้จำนวน 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 292 bp และ 215 bp (ตารางที่ 18) จากการตรวจสอบด้วย 10% native-PAGE (รูปที่ 28)

ตารางที่ 18 ขนาดและจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *VspI*

Species	Size (bp)	
	undigested	digested
<i>D. immitis</i>	600	390, 218
<i>B. pahangi</i>	550	290, 215



รูปที่ 28 ผลการตรวจสอบการตัดผลผลิตภัณฑ์บริเวณ *ITS1* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* บนเจล 10% native-PAGE

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, Lane 1-2 คือ ผลิตภัณฑ์ pcr ของหนอนพยาธิ *Brugia* spp. ที่ยังไม่ตัดด้วยเอนไซม์, Lane 3-4 คือ ผลิตภัณฑ์ pcr ของหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp. ที่ยังไม่ตัดด้วยเอนไซม์ Lane 5-6 คือ ผลิตภัณฑ์ pcr ของหนอนพยาธิ *B. pahangi* หลังตัดด้วยเอนไซม์, Lane 7-8 คือ ผลิตภัณฑ์ pcr ของหนอนพยาธิ *D. immitis* ที่หลังตัดด้วยเอนไซม์ *VspI*

#### 4.5 ผลการวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิ

##### 4.5.1 ผลการตรวจหาแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ Nested PCR

ตัวอย่างดีเอ็นเอของหนอนพยาธิที่สกัดจากเลือดของสุนัขทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกจากการตรวจหนอนพยาธิและระบุได้เป็นหนอนพยาธิ *D. immitis* 33 ตัวอย่าง หนอนพยาธิ *B. pahangi* จำนวน 13 ตัวอย่าง และ *B. malayi* จำนวน 4 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิ โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนตำแหน่งยีน *FtsZ* ร่วมกับไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แล้วตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis ปรากฏแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียมีขนาดประมาณ 150 bp (รูปที่ 29) ตรวจพบดีเอ็นเอแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ให้ผลบวกกับ PCR จำนวน 47 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่ระบุเป็นหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* จำนวน 33 ตัวอย่าง หนอนพยาธิ *B. pahangi* จำนวน 11 ตัวอย่าง และหนอนพยาธิ *B. malayi* จำนวน 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 19)

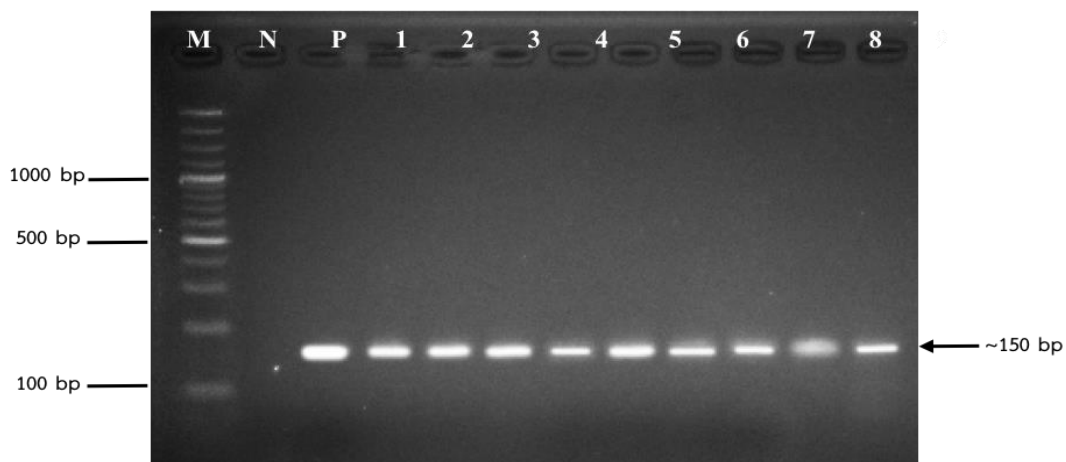
ตารางที่ 19 ผลการตรวจพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ในหนอนพยาธิ

Species	No. of filarial positive	Positive of <i>Wolbachia</i> in each filarial species (%)
<i>D. immitis</i>	33	33 (100.00%)
<i>B. pahangi</i>	13	11 (84.62%)
<i>B. malayi</i>	4	3 (75.00%)
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>47 (94.00%)</b>

##### 4.5.2 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยเทคนิค Colony PCR

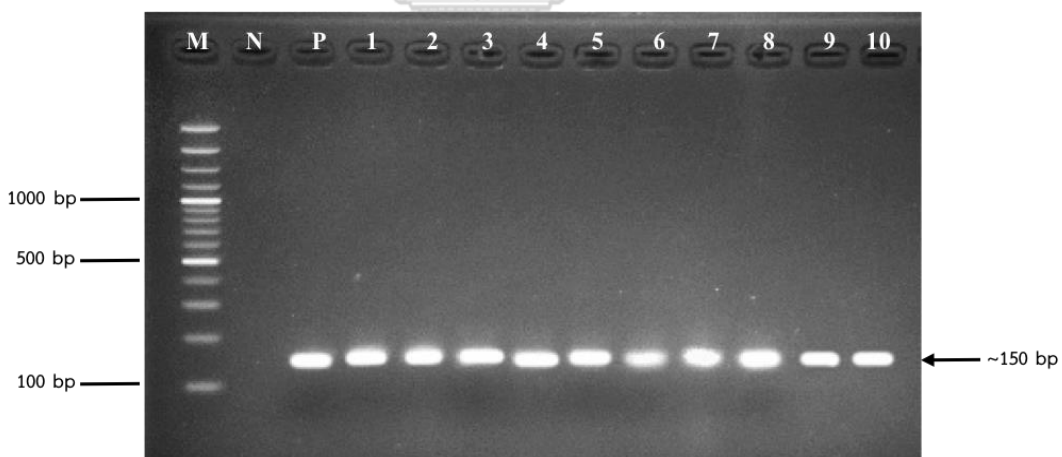
ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ให้ผลบวกจากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนที่ตำแหน่งยีน *FtsZ* นำมาเชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy เกิดเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมได้ จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่ Competent cells (*E. coli*; DH5 $\alpha$ ) กระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) นำไปเลี้ยงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจะเกิดเป็นโคโลนีสีฟ้าและสีขาว สุ่มเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งอาจจะมีชิ้นส่วนของตำแหน่งยีน *FtsZ* แทรกอยู่ มาทดสอบโคลนอีกครั้งด้วยเทคนิค Colony PCR แล้วตรวจสอบด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่มีขนาดประมาณ 150 bp (รูปที่ 30) หลังจากการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีชิ้นส่วนของตำแหน่งยีน *FtsZ* แล้วจะสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและวัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอก่อนส่งตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์





รูปที่ 29 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ pcr ของชิ้นส่วนบริเวณ *FtsZ* บน 1.5% Agarose gel electrophoresis

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, Lane N คือ ตัวควบคุมผลลบ (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ), Lane P คือ ตัวควบคุมผลบวก และ Lane 1-8 คือ ผลิตภัณฑ์ pcr ของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในหนองพยาธิ



รูปที่ 30 แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีชิ้นส่วนบริเวณ *FtsZ* บน 1.5% Agarose gel electrophoresis

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, Lane N คือ ตัวควบคุมผลลบ (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ), Lane P คือ ตัวควบคุมผลบวก และ Lane 1-10 คือ ตัวอย่างที่มีพลาสมิดสายผสมของแบคทีเรีย *Wolbachia*

### 4.5.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย Wolbachia

จากการตรวจสอบและวิเคราะห์ที่ตัดแต่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *FtsZ* ของแบคทีเรีย พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* มีขนาด 147 bp ทุกตัวอย่าง จากนั้นวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างโดยทำ multiple sequence alignment พบว่าผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิทั้ง 3 สายพันธุ์ แทบจะไม่มีมีความแตกต่างกัน (รูปที่ 31)



รูปที่ 31 ผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน *FtsZ* ของแบคทีเรีย *Wolbachia*

### 4.5.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบคทีเรีย Wolbachia กับฐานข้อมูล NCBI

ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน *FtsZ* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ตัดแต่งเรียบร้อยแล้วนำมาเปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดบนฐานข้อมูลอ้างอิง NCBI (GenBank) ซึ่งผลการเปรียบเทียบจะแสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity)

จากตัวอย่างหนอนพยาธิจำนวน 47 ตัวอย่าง (หนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* จำนวน 33 ตัวอย่าง *B. pahangi* จำนวน 11 ตัวอย่างและ *B. malayi* จำนวน 3 ตัวอย่าง) ที่ตรวจพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งทุกตัวอย่างมีความเหมือนกับ *Wolbachia* endosymbiont ของหนอนพยาธิ *D. immitis* จากประเทศอิตาลี (Accession no. AJ495000.1) ด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่าง 99-100%

#### 4.5.5 ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย

การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบภายในสายพันธุ์ (intraspecific variation) และระหว่างสายพันธุ์ (interspecific variation) ของหนอนพยาธิ จะอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน *FtsZ* ของตัวอย่างแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบจากงานวิจัยนี้ โดยนำมาเปรียบเทียบกับโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor เลือกโหมด sequence identity matrix

ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ภายในสายพันธุ์ของหนอนพยาธิ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความต่างของแบคทีเรียที่พบภายในหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* มีค่าเท่ากับ 0-5.5% (เฉลี่ย 0.38%) ส่วนเปอร์เซ็นต์ความต่างของแบคทีเรียที่พบภายในหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* และ *B. malayi* มีค่าเท่ากับ 0-1.4% (เฉลี่ย 0.38%) และ 0-0.7% (เฉลี่ย 0.47%) ตามลำดับ ซึ่งผลจากการเปรียบเทียบความต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธินี้ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ระหว่างหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* เปรียบเทียบกับหนอนพยาธิ *B. pahangi* และ *B. malayi* มีค่าเปอร์เซ็นต์ความต่างเท่ากับ 0-3.5% (เฉลี่ย 0.38%) และ 0-3.5% (เฉลี่ย 0.42%) ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ความต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ระหว่างหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* กับ *B. malayi* มีค่าเท่ากับ 0-1.4% (เฉลี่ย 0.42%) ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบความต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ระหว่างหนอนพยาธิทั้งสามสายพันธุ์นี้ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ FtsZ ของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในหนองผายาธิ

Code	D02	D09	D10	D11	D12	D13	D15	D17	D18	D21	D27	D30	D01	D03	D04	D05	D20	D24	D26	D28	D40	D49	D51	D06	D14	D50
D02	-																									
D09	0	-																								
D10	0	0	-																							
D11	0	0	0	-																						
D12	0	0	0	0	-																					
D13	0	0	0	0	0	-																				
D15	0	0	0	0	0	0	-																			
D17	0	0	0	0	0	0	0	-																		
D18	0	0	0	0	0	0	0	0	-																	
D21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-																
D27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-															
D30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-														
D01	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	-													
D03	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.4	-													
D04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	-											
D05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0	-										
D20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0	0	-									
D24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0	0	0	-								
D26	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.4	1.4	0.7	0.7	0.7	0.7	-								
D28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0	0	0	0.7	-							
D40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0	0	0	0	0.7	0	-					
D49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0	0	0	0	0.7	0	0	-				
D51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0	0	0	0	0.7	0	0	0	-			
D06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	-		
D14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	-	
D50	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.4	1.4	0.7	0.7	0.7	1.4	1.4	0.7	0.7	1.4	0.7	0.7	0.7	0.7	-

[D2, D9-13, D15, D17-18, D21, D27, D30] คือหนองผายาธิสายพันธุ์ *D. immitis*

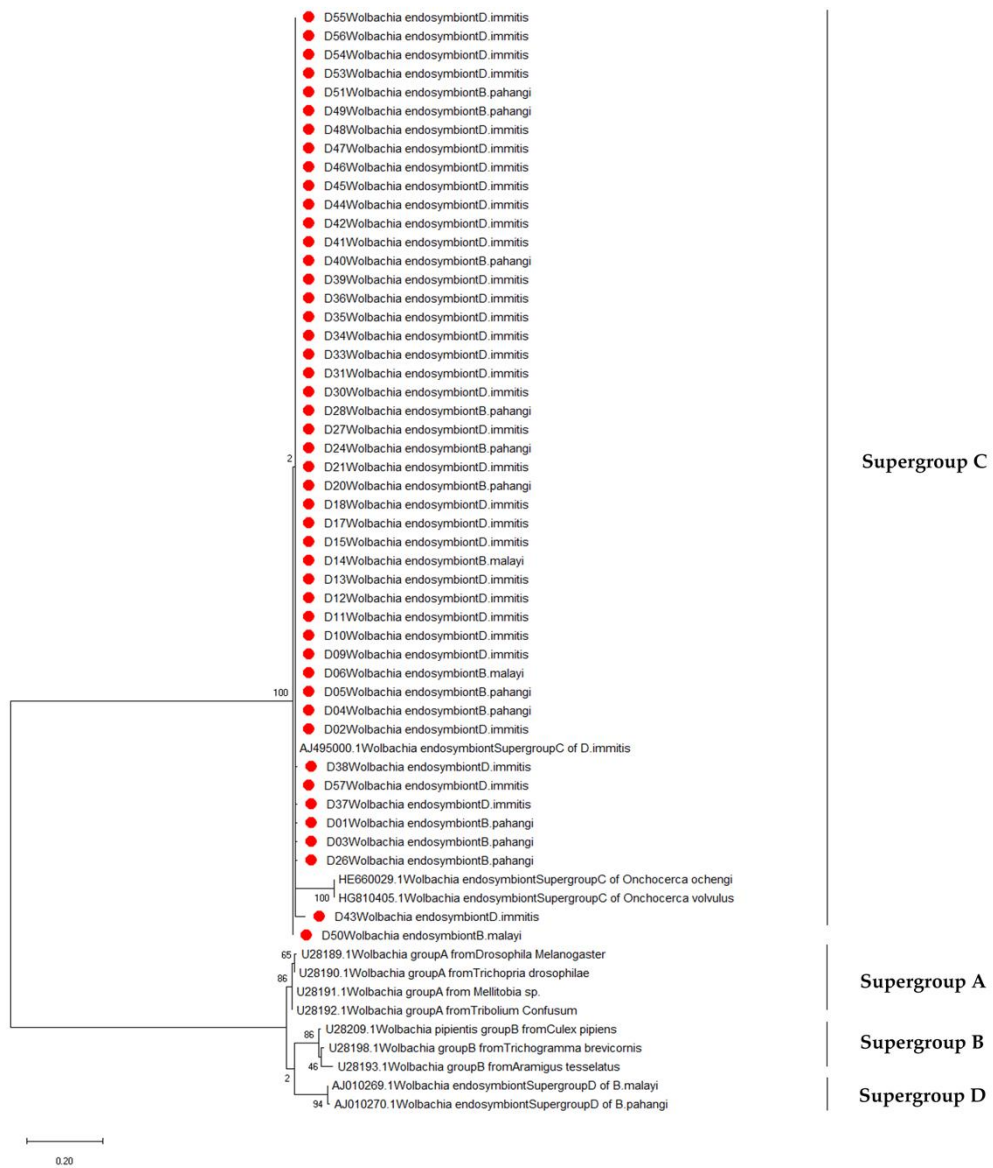
[D1, D3-5, D20, D24, D26, D28, D40, D49, D51] คือหนองผายาธิสายพันธุ์ *B. pahangi*

[D06, D14, D50] คือหนองผายาธิสายพันธุ์ *B. malayi*

#### 4.5.6 ผลการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรีย

การสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก DNA ของตัวอย่าง หนอนพยาธิที่ตรวจพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ตำแหน่งยีน *FtsZ* ของตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม MEGA X ด้วยวิธี Maximum likelihood และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Kimura 2-parameter model (K2) ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการด้วย bootstrap test จำนวน 1000 รอบ และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงที่ตำแหน่งยีน *FtsZ* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งพบอยู่ในสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่จัดอยู่ในแต่ละ supergroup คือ supergroup A ได้แก่ *Tribolium confusum* (acc no. U28192.1), *Mellitobia* spp. (acc no. U28191.1), *Drosophila melanogaster* (acc no. U28189.1) และ *Trichopria drosophilae* (acc no. U28190.1) supergroup B ได้แก่ *Culex pipiens* (acc no. U28209.1), *Trichogramma brevicornis* (acc no. U28198.1) และ *Aramigus tessellatus* (acc no. U28193.1) supergroup C ได้แก่ *D. immitis* (acc no. AJ495000.1), *O. ochengi* (acc no. HE660029.1) และ *O. volvulus* (acc no. HG810405.1) และ supergroup D ได้แก่ *B. malayi* (acc no. AJ010269.1) และ *B. pahangi* (acc no. AJ010270.1)

ผลการวิเคราะห์จากแผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Wolbachia* จำนวน 47 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบในหนอนพยาธิ *D. immitis*, *B. pahangi* และ *B. malayi* (รูปที่ 32) เปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของแบคทีเรียที่พบในโฮสต์ในแต่ละ supergroup พบว่าตัวอย่างแบคทีเรีย *Wolbachia* ของหนอนพยาธิทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ตรวจพบจากงานวิจัยนี้ ถูกจัดรวมเป็นกลุ่มในกิ่งเดียวกันทั้งหมดและจัดอยู่ใน supergroup C ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกับแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิ *D. immitis* ที่รายงานจากประเทศอิตาลี (Accession no. AJ495000.1) และแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิ *Onchocerca ochengi* (Accession no. HE660029.1) และ *O. volvulus* (Accession no. HG810405.1) ที่รายงานจากสหราชอาณาจักร ด้วยค่า bootstrap 100%



รูปที่ 32 แผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิ *D. immitis*, *B.pahangi* และ *B. malayi* ที่พบจากการศึกษานี้ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของแบคทีเรีย *Wolbachia*

## บทที่ 5

### สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

โรคหนองพยาธิหัวใจสุนัขมีสาเหตุเกิดจากหนองพยาธิตัวกลมกลุ่มฟิลาเรียที่ก่อโรคในสุนัขเป็นหลักโดยมียุงเป็นพาหะนำโรค ซึ่งโรคนี้อย่างเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่พบได้บ่อยในประเทศเขตร้อนและเขตร้อนทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยซึ่งสามารถพบการแพร่กระจายของโรคหนองพยาธิหัวใจสุนัขได้ทั่วทุกภูมิภาค แต่จะมีอัตราความชุกสูงในเขตพื้นที่ทางภาคใต้เนื่องจากสภาพทางภูมิศาสตร์ที่เอื้อต่อการแพร่กระจายของโรค นอกจากนี้ในบางพื้นที่สุนัขที่เป็นโรคอาจไม่ได้รับการรักษาหรือรักษาอย่างไม่ถูกต้องจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่เอื้อต่อการแพร่กระจายของโรคจากสัตว์สู่สัตว์และจากสัตว์สู่คน

การตรวจพบและระบุสายพันธุ์หนองพยาธิได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมีความจำเป็นและสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการควบคุมการแพร่กระจายของโรค โดยทั่วไปแล้วการตรวจหาและระบุสายพันธุ์หนองพยาธิหัวใจในสุนัขจะนิยมตรวจจากตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียที่พบได้ในเลือดสุนัข โดยอาศัยเทคนิคทางจุลทรรศน์วิทยา (9, 102-104) วิธีการตรวจเบื้องต้นสามารถทำได้โดยการทำแผ่นฟิล์มเลือดและย้อมสี Giemsa หรือ Hematoxylin-Eosin (105, 106) จากนั้นทำการตรวจหาตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แม้ว่าการตรวจหาทางจุลทรรศน์วิทยาจะสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ความไวในการตรวจต่ำโดยเฉพาะกรณีที่เกิดด้วยอย่างมีจำนวนตัวอ่อนหนองพยาธิน้อยมาก ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ในระดับสกุลได้ถ้าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนองพยาธิเสียหายหรือไม่สมบูรณ์ โดยวิธีนี้อาจระบุได้ถึงระดับสกุลของหนองพยาธิแต่ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ของหนองพยาธิที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันออกจากกันได้อย่างชัดเจน เช่น *D. immitis*, *D. repens* และ *D. reconditum* หรือ *B. malayi* และ *B. pahangi* และจำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์สูงทางห้องปฏิบัติการทำการตรวจหา (100) ดังนั้นการระบุหรือยืนยันสายพันธุ์ของหนองพยาธิที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน จึงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลในระดับอนุชีววิทยาซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งยีนที่อยู่ในนิวเคลียสหรือไมโทคอนเดรีย โดยข้อมูลทางพันธุกรรมดังกล่าวจะมีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจ จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาและระบุหรือยืนยันสายพันธุ์หนองพยาธิได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนองพยาธิสามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิภายในสายพันธุ์เดียวกันหรือต่างสายพันธุ์ (intraspecific and interspecific variation) ซึ่งสามารถนำมาอธิบายลำดับวิวัฒนาการได้เป็นอย่างดี

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจหาและจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนหนองพยาธิระยะไมโครฟิลาเรียโดยการย้อมสี Giemsa และตรวจหาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบตัวอ่อนหนองพยาธิระยะไมโครฟิลาเรียใน 16 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 57 ตัวอย่าง คิดเป็น

28.07% โดยตัวอ่อนที่พบมีลักษณะที่แตกต่างกันสามารถจำแนกได้เป็น 2 สกุล คือ *Dirofilaria* spp. และ *Brugia* spp. โดยตัวอ่อนของหนอนพยาธิ *Dirofilaria* spp. ไม่มีปลอกหุ้มตัว (unsheath), มีช่องว่างที่ส่วนหัว (cephalic space) และพบนิวเคลียสสุดท้ายที่หางจำนวน 1 นิวเคลียส ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Brugia* spp. พบว่ามีปลอกหุ้มตัว (sheath) ช่องว่างที่ส่วนหัวมีขนาดความยาวต่อความกว้างเป็น 2:1 (elongated cephalic space) และพบนิวเคลียสสุดท้ายที่ปลายหางจำนวน 2 นิวเคลียส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาก่อนหน้านี้ (40, 49, 107) ในงานวิจัยครั้งนี้ได้เพิ่มวิธีการตรวจหาตัวอ่อนหนอนพยาธิระยะไมโครฟิลาเรีย โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อศึกษาอัตราการตรวจพบเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจทางจุลทรรศน์วิทยาพร้อมทั้งระบุและยืนยันสายพันธุ์ในระดับสปีชีส์และศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการของหนอนพยาธิ รวมถึงการตรวจแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิแต่ละสายพันธุ์ด้วย

จากการตรวจหาตัวอ่อนหนอนพยาธิระยะไมโครฟิลาเรียจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดสุนัขที่เก็บจากเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล จำนวน 57 ตัวอย่าง โดยอาศัยวิธี PCR ซึ่งใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งยีน *COI* และตำแหน่ง *ITS1* พบว่า PCR บนตำแหน่งยีน *COI* ให้ผลบวกใน 50 ตัวอย่าง และ PCR บนบริเวณ *ITS1* ให้ผลบวกใน 41 ตัวอย่าง และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งยีน *COI* ที่ตรวจพบได้ไปทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank สามารถระบุชนิดหนอนพยาธิได้ 3 สายพันธุ์ คือ *D. immitis* (57.89%), *B. pahangi* (22.81%) และ *B. malayi* (7.02%) ส่วนที่ตำแหน่ง *ITS1* สามารถระบุชนิดหนอนพยาธิได้เพียง 2 สายพันธุ์ คือ *D. immitis* (52.63%) และ *B. pahangi* (19.30%)

เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการตรวจทางจุลทรรศน์วิทยา พบว่าวิธีทางอณูชีววิทยาให้ผลบวกที่มากกว่าอย่างชัดเจน และในงานวิจัยนี้พบว่าตัวอย่างเลือดสุนัขที่ให้ผลบวกเมื่อทำ PCR ที่ตำแหน่งยีน *COI* มีจำนวนมากกว่าที่ตำแหน่ง *ITS1* ซึ่งสามารถอธิบายได้จาก high copy numbers ของ mitochondrial *COI* gene ที่มีจำนวนมากกว่า *ITS1* และสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Oh *et al.* (2017) ที่สาธิตให้เห็นว่า PCR ที่ตำแหน่งยีน *COI* มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจหาตัวอ่อนหนอนพยาธิระยะไมโครฟิลาเรียสายพันธุ์ *D. immitis* โดยอาศัยดีเอ็นเอตั้งต้น (template) ขึ้นต่ำเพียง 50 copies สำหรับเพิ่มจำนวนในปฏิกิริยา PCR (108)

นอกจากนี้ผลงานวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าหนอนพยาธิ *D. immitis* มีอัตราความชุกในสุนัขมากกว่าหนอนพยาธิสายพันธุ์อื่นซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ที่ประเทศจีน (109), เกาหลี (110), อิหร่าน (111), โปรตุเกส (112), ฮังการี (113) รวมถึงประเทศไทย (50, 114-116) ที่พบจำนวนการติดเชื้อของหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* มากที่สุดในสุนัข นอกจากนี้ในประเทศไทยยังมีรายงานการตรวจพบหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* และ *B. malayi* ทั้งในสุนัข (44, 117) และแมว (49, 50, 116) แต่ส่วนใหญ่พบอัตราความชุกสูงในเขตพื้นที่ทางภาคใต้โดยเฉพาะ



จังหวัดนราธิวาส สตูลและระนอง (50, 114, 116) ซึ่งเป็นแหล่งระบาดของโรค Filariasis เป็นที่น่าสนใจว่างานวิจัยในครั้งนี้อาจสามารถตรวจพบตัวอ่อนหนอนพยาธิระยะไมโครฟิลาเรียทั้ง *B. pahangi* และ *B. malayi* ในตัวอย่างเลือดสุนัขที่เก็บจากพื้นที่กรุงเทพมหานครและปริมณฑล ดังนั้นอาจมีโอกาสเป็นไปได้ว่าสุนัขในเขตพื้นที่นี้จะมีความสามารถเป็นสัตว์รังโรคหรือกักเก็บตัวอ่อนของหนอนพยาธิทั้งสองสายพันธุ์นี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมด้านอัตราความชุกของหนอนพยาธิสองสายพันธุ์นี้ในสุนัขจากหลากหลายพื้นที่ เพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ว่าสุนัขสามารถเป็นสัตว์รังโรคหลักของหนอนพยาธิ *B. pahangi* และ *B. malayi* ได้หรือไม่ สำหรับพัฒนาแผนการควบคุมโรคที่เกิดจากหนอนพยาธิสองสายพันธุ์นี้ต่อไปในอนาคต

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนพยาธิที่พบในงานวิจัยนี้ที่ตำแหน่ง COI และบริเวณ ITS1 พบว่าผลการเปรียบเทียบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง COI ของหนอนพยาธิภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecific variation) ทั้ง 3 สายพันธุ์ (*D. immitis*, *B. pahangi* และ *B. malayi*) มีเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์เดียวกันเฉลี่ยระหว่าง 0.38-0.47% ซึ่งน้อยกว่าอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างต่างสายพันธุ์ (interspecific variation) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 9.91-14.82% โดยผลดังกล่าวสามารถอธิบายได้จากการที่ mitochondrial DNA โดยปกติจะมีการถ่ายทอดผ่านทางเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเท่านั้น (maternal inheritance) และโดยทั่วไปไม่พบกระบวนการ recombination นอกจากนี้พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ (mutation rate) ของ COI ต่ำกว่ายีนอื่น ๆ ที่พบบนไมโทคอนเดรีย ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง COI จึงมีความเหมือนกันสูงเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างประชากรของหนอนพยาธิภายในสายพันธุ์เดียวกัน (108) สำหรับเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ ITS1 ของหนอนพยาธิ *D. immitis* และ *B. pahangi* ภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ของหนอนพยาธิ มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 1.5-8.08% และ 38.67% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง COI (91)

เมื่อทำการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการของหนอนพยาธิที่พบในงานวิจัยนี้ โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งยีน COI และบริเวณ ITS1 พบว่าบนตำแหน่งยีน COI (รูปที่ 26) มีการเข้ากลุ่มกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนอนพยาธิสายพันธุ์เดียวกัน โดยหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมดกับ *D. immitis* ที่รายงานจากประเทศฮังการี (Accession no. MH541832.1) (118) ประเทศอิหร่าน (Accession no. KT351849.1) (119) ประเทศอิตาลี (Accession no. AM749227.1) (120) ประเทศอิตาลี (Accession no. DQ358815.1) (121) ประเทศสเปน (Accession no. LC107816.1) (122) และประเทศจีน (Accession no. EU159111.1) (123) ส่วนหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *B. pahangi* ที่รายงานจากประเทศมาเลเซีย (Accession no. DQ977746.1, EF534735.1) (124) ประเทศ

ฝรั่งเศส (Accession no. KP760172.1) (125) และประเทศอิตาลี (Accession no. AJ271611.1 (101) และหนอนพยาธิ *B. malayi* ที่พบในงานวิจัยนี้มีความคล้ายคลึงกับ *B. malayi* ที่รายงานจากประเทศอิตาลี (Accession no. AJ271610.1) (101) และประเทศฝรั่งเศส (Accession no. KP760171.1) (125) โดยหนอนพยาธิ *Brugia* ทั้งสองสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยนี้ มีความใกล้เคียงกันมากทางลำดับวิวัฒนาการแต่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน และบนตำแหน่ง *ITS1* (รูปที่ 27) หนอนพยาธิ *D. immitis* ที่พบในงานวิจัยนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *D. immitis* ที่รายงานจากประเทศไต้หวัน (Accession no. AF217800.2) (126) ประเทศอิหร่าน (Accession no. KY863453.1) (127) และประเทศอินเดีย (Accession no. EU087700.1) (128) ส่วนหนอนพยาธิ *B. pahangi* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *B. pahangi* ที่รายงานจากประเทศไทย (Accession no. EU373652.1, EU373628.1, EU373629.1, EU373635.1, EU373650.1) (129), (Accession no. AY621469.1) (100) จากผลการวิเคราะห์ตามแผนภูมิวิวัฒนาการทั้งที่ตำแหน่งยีน *COI* และบริเวณ *ITS1* ของงานวิจัยนี้มีความสอดคล้องเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ศึกษาลำดับวิวัฒนาการและจำแนกหนอนพยาธิที่ตำแหน่งยีน *COI* (101), *12S rDNA* (123), *12S rRNA* (130) และ *ITS1* (91)

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้สาธิตการใช้เทคนิค PCR-RFLP ที่บริเวณ *ITS1* โดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* ในการจำแนกระหว่างหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* และ *B. pahangi* พบว่าสามารถใช้แยกความแตกต่างของหนอนพยาธิสายพันธุ์ *D. immitis* (390, 218 bp) ออกจากหนอนพยาธิสายพันธุ์ *B. pahangi* (290, 215 bp) ได้ด้วยชิ้นของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 28) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nuchprayoon *et al.* (2006) ก่อนหน้านี้ที่สาธิตการใช้เอนไซม์จำเพาะ *AselI* ที่บริเวณ *ITS1* เพื่อจำแนกหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียที่พบในตัวอย่างเลือดแมวที่เก็บได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี (40) แม้ว่าที่ตำแหน่งยีน *COI* จะเป็นตำแหน่งที่สามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์และแผนภูมิวิวัฒนาการบนตำแหน่งดังกล่าวสามารถแยกกลุ่มสายพันธุ์ของหนอนพยาธิออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่สำหรับเทคนิค PCR-RFLP ที่ตำแหน่งยีน *COI* ไม่สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์หนอนพยาธิที่พบในงานวิจัยนี้ได้ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์อาจปรากฏในตำแหน่งที่ไม่ใช่ตำแหน่งตัดจำเพาะ (restriction site) หรือไม่ทำให้เกิดตำแหน่งตัดจำเพาะที่แตกต่างกัน แต่โดยภาพรวมแล้วมีหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พยายามพัฒนาเทคนิค PCR-RFLP บนตำแหน่งที่หลากหลายเช่น *ITS1*, *ITS2* (47), *SLX* (49) และ *GSHPx* (131) ในการช่วยตรวจจำแนกสายพันธุ์หนอนพยาธิเบื้องต้นเนื่องจากรวดเร็วและใช้ระยะเวลาไม่มากในการตรวจสอบผล

นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจหาแบคทีเรีย *Wolbachia* ในตัวอย่างเลือดสุนัขด้วยวิธี PCR ที่ตำแหน่งยีน *FtsZ* พบว่ามีจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกถึง 47 ตัวอย่างซึ่งคิดเป็น 94.00% และพบใน

หนอนพยาธิทั้งสามสายพันธุ์ และยังให้ผลบวกสูงกว่าอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ รายงานตรวจพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยวิธี PCR บนตำแหน่งยีนอื่น (89, 92, 96) อาจอธิบายได้ ว่าตำแหน่งยีน *FtsZ* ที่ใช้ในการตรวจหาเป็นตำแหน่งยีนที่มีชุดยีนซ้ำกันจำนวนมาก (high copy numbers) จึงทำให้มีความไวสูง ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR (95, 96) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกในงานวิจัยนี้มาวิเคราะห์แผนภูมิ วิวัฒนาการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ในฐานข้อมูล GenBank (รูปที่ 32) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิ *D. immitis*, *B. pahangi* และ *B. malayi* ในงานวิจัยนี้มีความคล้ายคลึงกันสูงมากและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ *Wolbachia* supergroup C ในฐานข้อมูล GenBank ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ในหนอนพยาธิ *D. immitis* ที่รายงานจากประเทศอิตาลี (Accession no. AJ495000.1) (101) หนอนพยาธิ *Onchocerca ochengi* (Accession no. HE660029.1) และ *O. volvulus* (Accession no. HG810405.1) ที่รายงานจากสหราชอาณาจักร (132) แต่จากงานวิจัยก่อนหน้านี้โดย Bandi *et al.* (1998) และ Taloy *et al.* (2005) พบว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในหนอนพยาธิ *B. pahangi* กับ *B. malayi* ถูกจัดอยู่ใน supergroup D (53, 70) และแยกจาก supergroup C อย่าง ชัดเจนในแผนภูมิวิวัฒนาการ และมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่อธิบายว่าสามารถพบแบคทีเรีย *Wolbachia* แตกต่างกันกว่า 37 สายพันธุ์ อยู่ภายใน tsetse fly และพบว่ามีหลากหลายมากที่สุดในช่วง *Culex pipiens* ซึ่งความหลากหลายของแบคทีเรียที่อยู่ภายในโฮสต์ชนิดเดียวกันเกิดจากการ recombination และเกิดการกลายพันธุ์ (matation) ทำให้เกิดการกระจายของแบคทีเรียสายพันธุ์ ใหม่ได้ (133) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่หนอนพยาธิสายพันธุ์เดียวกันที่พบในแต่ละพื้นที่ของโลกอาจ มีแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามความยาวของตำแหน่งยีน *FtsZ* ที่เลือกใช้ศึกษา ในครั้งนี้มีความยาวเพียง 147 bp ซึ่งอาจจะไม่เพียงพอที่จะสรุปความแตกต่างทางพันธุกรรมของ แบคทีเรีย *Wolbachia* ในหนอนพยาธิสายพันธุ์เดียวกัน

จากการรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างหนอนพยาธิกลุ่มฟีลาเรียกับแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ร่วมกันภายในหนอนพยาธิเป็นแบบพึ่งพากัน (endosymbiosis) (10) แบคทีเรียนี้มี บทบาทความสำคัญต่อการเจริญพัฒนาในระยะต่าง ๆ การสืบพันธุ์ การแลกเปลี่ยนสารที่จำเป็นต่อ การดำรงชีวิตของหนอนพยาธิ รวมถึงมีผลต่อการรักษาหากใช้ยาปฏิชีวนะต่อแบคทีเรียชนิดนี้เพื่อ กำจัดและควบคุมประชากรหนอนพยาธิภายในโฮสต์ (72, 134) และสามารถพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ในทุกๆระยะในวงจรชีวิตของหนอนพยาธิโดยจำนวนแบคทีเรียในระยะตัวอ่อนไมโครฟี ลารียะจะคงที่ แต่จะเพิ่มมากขึ้นในตัวอ่อนระยะที่ 3 (ระยะติดเชื้อ) ไปจนถึงระยะตัวเต็มวัย (52, 70) จากงานวิจัยนี้สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ภายในตัวอย่างเลือดสุนัขที่มีการติดเชื้อ หนอนพยาธิทั้งสามสายพันธุ์และลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งยีน *FtsZ* ของแบคทีเรียในตัวอย่าง

ทั้งหมดมีความคล้ายคลึงกันสูงมาก จึงทำให้สามารถอนุมานได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นเป้าหมายสำคัญในการศึกษา Pharmacogenomics เพื่อพัฒนายาปฏิชีวนะสำหรับใช้ในการรักษาโรคหนองพยาธิหัวใจสุนัขที่เกิดจากการติดเชื้อของหนองพยาธิหลากหลายสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น



## บรรณานุกรม

1. Chandy A, Thakur AS, Singh MP, Manigauha A. A review of neglected tropical diseases: filariasis. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2011;4(7):581-6.
2. Cancrini G, Kramer L. Insect vectors of *Dirofilaria* spp. Heartworm infection in humans and animals: Ediciones Universidad de Salamanca, España; 2001. 63-82 p.
3. McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L. Heartworm disease in animals and humans. *Advances in parasitology*. 2008;66:193-285.
4. Babero B. Further Studies on Helminths of the Opossum, *Didelphis virginiana*, with a Description of a New Species from This Host. *The Journal of parasitology*. 1960;46(4):455-63.
5. Magi M, Calderini P, Gabrielli S, Dell'Omodarme M, Macchioni F, Prati MC, et al. *Vulpes vulpes*: A possible wild reservoir for zoonotic filariae. *Vector-Borne Zoonot*. 2008;8(2):249-52.
6. Simon F, Morchon R, Gonzalez-Miguel J, Marcos-Atxutegi C, Siles-Lucas M. What is new about animal and human dirofilariasis?. *Trends Parasitol*. 2009;25(9):404-9.
7. Irwin PJ. Companion animal parasitology: a clinical perspective. *International journal for parasitology*. 2002;32(5):581-93.
8. Kelly JD. *Current Veterinary Therapy VII*. Philadelphia. Pa, USA: W.B. Saunders 1979. p. 326-35.
9. Rishniw M, Barr SC, Simpson KW, Frongillo MF, Franz M, Alpizar JLD. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary parasitology*. 2006;135(3-4):303-14.
10. Simon F, Siles-Lucas M, Morchon R, Gonzalez-Miguel J, Mellado I, Carreton E, et al. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(3):507-44.
11. Landmann F, Foster JM, Michalski ML, Slatko BE, Sullivan W. Co-evolution between an Endosymbiont and Its Nematode Host: *Wolbachia* Asymmetric Posterior Localization and AP Polarity Establishment. *Plos Neglect Trop D*. 2014;8(8).
12. Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, Ivanova N, et al. The

Wolbachia genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *Plos Biol.* 2005;3(4):599-614.

13. Casiraghi M, McCall JW, Simoncini L, Kramer LH, Sacchi L, Genchi C, et al. Tetracycline treatment and sex-ratio distortion: a role for Wolbachia in the moulting of filarial nematodes? *International journal for parasitology.* 2002;32(12):1457-68.

14. Bazzocchi C, Mortarino M, Grandi G, Kramer LH, Genchi C, Bandi C, et al. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *International journal for parasitology.* 2008;38(12):1401-10.

15. Grandi G, Quintavalla C, Mavropoulou A, Genchi M, Gnudi G, Bertoni G, et al. A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*). *Veterinary parasitology.* 2010;169(3-4):347-51.

16. McCall JW, Kramer L, Genchi C, Guerrero J, Dzimianski MT, Mansour A, et al. Effects of doxycycline on heartworm embryogenesis, transmission, circulating microfilaria, and adult worms in microfilaremic dogs. *Veterinary parasitology.* 2014;206(1-2):5-13.

17. Bowman DD, Mannella C. Macrocytic Lactones and *Dirofilaria immitis* Microfilariae. *Top Companion Anim M.* 2011;26(4):160-72.

18. Orihel TC. Morphology of the larval stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. *The Journal of parasitology.* 1961;47:251-62.

19. Boreham P. *Dirofilaria immitis*. CRC press. 2017 Dec;22.

20. Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. *MAPPE PARASSITOLOGICHE.* 2007 28:1-185.

21. deCampos JRM, Barbas CSV, Filomeno LTB, Fernandez A, Minamoto H, Barbas JV, et al. Human pulmonary dirofilariasis - Analysis of 24 cases from Sao Paulo, Brazil. *Chest.* 1997;112(3):729-33.

22. Echeverri A, Long RF, Check W, Burnett CM. Pulmonary dirofilariasis. *Ann Thorac Surg.* 1999;67(1):201-2.

23. Kim MK, Kim CH, Yeom BW, Park SH, Choi SY, Choi JS. The first human case of hepatic dirofilariasis. *Journal of Korean medical science.* 2002;17(5):686-90.

24. Jamshidi A, Jamshidi M, Mobedi I, Khosroara M. Periocular dirofilariasis in a young woman: a case report. *The Korean journal of parasitology*. 2008;46(4):265-7.
25. Gunathilaka N, Siriwardana S, Wijesooriya L, Gunaratne G, Perera N. Subcutaneous dirofilariasis caused by *Dirofilaria (Nochtiella) repens* in Sri Lanka: A potential risk of transmitting human dirofilariasis. *SAGE open medical case reports*. 2017;5:1-4. Pubmed Central PMCID: 5406200.
26. Das D, Das K, Islam S, Bhattacharjee K, Bhattacharjee H, Das SM, et al. A rare case of anterior chamber dirofilariasis. *Oman journal of ophthalmology*. 2015;8(1):50-3.
27. Orihel TC. *Brugia tupaiae* sp. n. (Nematoda: Filarioidea) in Tree Shrews (*Tupaia glis*) from Malaysia. *The Journal of parasitology*. 1996:162-5.
28. Kaikuntod M, Thongkorn K, Tiwananthagorn S, Boonyapakorn C. Filarial worms in dogs in Southeast Asia. *Veterinary Integrative Sciences*. 2018 16(2):1-7.
29. Schacher JF. Developmental stages of *Brugia pahangi* in the final host. *The Journal of parasitology*. 1962;48:693-706.
30. Liu D. *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens*. USA: CRC press; 2012
31. Suguri S. Ultrastructure of the microfilaria of *Brugia pahangi* (Buckley and Edeson, 1956) Buckley, 1958. *Acta medica Okayama*. 1977;31(5):295-318.
32. Kim HK, Seo BS. [Studies on filariasis in Korea: On the morphology and development of larvae of *Brugia malayi* in *Aedes togoi*]. Kisaengch'unghak chapchi *The Korean journal of parasitology*. 1968;6(1):1-13.
33. Denham DA, McGreevy PB. Brugian filariasis: epidemiological and experimental studies. *Advances in parasitology*. 1977;15:243-309.
34. Edeson JF, Wilson T, Wharton RH, Laing AB. Experimental transmission of *Brugia malayi* and *B. pahangi* to man. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1960;54:229-34.
35. Iamsa-ard W, Waewwab P, Pukdeeprayoon S, Wiriyalongkorn W, Songklin P, Thamcharoen T, et al. An Outbreak Investigation of Autochthonous Lymphatic Filariasis in Wangchan District, Rayong, Thailand. *Weekly Epidemiological Surveillance Report*. 2015;46:385-92.
36. Rogers R, Denham DA. Studies with *Brugia pahangi* 7. Changes in lymphatics of injected cats. *Journal of helminthology*. 1974;48(3):213-9.

37. Snowden KF, Hammerberg B. The lymphatic pathology of chronic *Brugia pahangi* infection in the dog. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;83(5):670-8.
38. Nithiuthai S, Chungpivat S. lymphatic filaria (*Brugia pahangi*) in dogs. *J Thai Vet Pract.* 1992;4:123-33.
39. Thanchomnang T, Intapan PM, Tantrawatpan C, Lulitanond V, Chungpivat S, Taweethavonsawt P, et al. Rapid Detection and Identification of *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Dirofilaria immitis* in Mosquito Vectors and Blood Samples by High Resolution Melting Real-Time PCR. *Korean Journal of Parasitology.* 2013;51(6):645-50.
40. Nuchprayoon S, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S, Suvannadabba S, Poovorawan Y. Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS1. *Veterinary parasitology.* 2006;140(3-4):366-72.
41. Anderson R, Beveridge I. *Nematode Parasites of Vertebrates, Their Development and Transmission* 1994. 129-31 p.
42. Ambily VR, Pillai UN, Arun R, Pramod S, Jayakumar KM. Detection of human filarial parasite *Brugia malayi* in dogs by histochemical staining and molecular techniques. *Veterinary parasitology.* 2011;181(2-4):210-4.
43. Siripong S. *BEDNET USE TO PREVENT ELEPHANTITIS OF PEOPLE IN TAKBAI DISTRICT NARATHIWAT PROVINCE: (Doctoral dissertation, Master thesis, Faculty of Public Health, Burapha University. (In Thai); 2552.*
44. Chungpivat S, Taweethavonsawt P. The differentiation of microfilariae in dogs and cats using Giemsa's staining and the detection of acid phosphatase activity. *J Thai Vet Pract.* 2008;20:47-55.
45. Chantud N. Public perception affecting awareness and selfcare behavior towards the prevention of lymphatic filariasis: a case study of tambon Lubokbusa, Yi-ngo district, Narathiwat province: Thammasat Univerisy; 2003.
46. Kobasa T, Thammapalo S, Suvannadabba S, Armesombun A, Loymak S, Leemingsawat S, et al. Identification of *Brugia malayi*-like microfilariae in naturally-infected cats from Narathiwat Province, Southern Thailand. *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology.* 2004;27(1):21-5.
47. Nuchprayoon S, Sangprakarn S, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S,



- Poovorawan Y. Differentiation of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* by PCR-RFLP of ITS1 and ITS2. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2003;34 Suppl 2:67-73.
48. Pakpitcharoen A, Phasook S, Khawsak P, Khuchareontaworn S, Chansiri K. Genetic diversity of filaria in cat reservoirs. *Journal of Medicine and Health Science*. 2006;13:147-55.
49. Chansiri K, Tejangkura T, Kwaosak P, Sarataphan N, Phantana S, Sukhumsirichart W. PCR based method for identification of zoonotic *Brugia malayi* microfilariae in domestic cats. *Molecular and cellular probes*. 2002;16(2):129-35.
50. Kanjanopas K, Choochote W, Jitpakdi A, Suvannadabba S, Loymak S, Chungpivat S, et al. *Brugia malayi* in a naturally infected cat from Narathiwat Province, southern Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2001;32(3):585-7.
51. Tan LH, Fong MY, Mahmud R, Muslim A, Lau YL, Kamarulzaman A. Zoonotic *Brugia pahangi* filariasis in a suburbia of Kuala Lumpur City, Malaysia. *Parasitol Int*. 2011;60(1):111-3.
52. Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Di Sacco B, Damiani G, Genchi C. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Molecular and biochemical parasitology*. 1995;74(2):223-7.
53. Bandi C, Anderson TJC, Genchi C, Blaxter ML. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *P Roy Soc B-Biol Sci*. 1998;265(1413):2407-13.
54. Bordenstein S, Rosengaus RB. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in isoptera. *Curr Microbiol*. 2005;51(6):393-8.
55. Ros V, Fleming V, Feil E, Breeuwer J. How Diverse Is the Genus *Wolbachia*? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New *Wolbachia* Supergroup Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae). *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 2009;75(4):1036-43.
56. Zhou WG, Rousset F, O'Neill S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *P Roy Soc B-Biol Sci*. 1998;265(1395):509-15.
57. Glowska E, Dragun-Damian A, Dabert M, Gerth M. New *Wolbachia* supergroups

- detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). *Infection Genetics and Evolution*. 2015;30:140-6.
58. Konecka E, Olszanowski Z, Koczura R. Wolbachia of phylogenetic supergroup E identified in oribatid mite *Gustavia microcephala* (Acari: Oribatida). *Mol Phylogenet Evol*. 2019;135:230-5.
59. Wang GH, Jia LY, Xiao JH, Huang DW. Discovery of a new Wolbachia supergroup in cave spider species and the lateral transfer of phage WO among distant hosts. *Infection Genetics and Evolution*. 2016;41:1-7.
60. Werren JH. Biology of Wolbachia. *Annual review of entomology*. 1997;42:587-609.
61. Bing XL, Xia WQ, Gui JD, Yan GH, Wang XW, Liu SS. Diversity and evolution of the Wolbachia endosymbionts of *Bemisia* (Hemiptera: Aleyrodidae) whiteflies. *Ecology and evolution*. 2014;4(13):2714-37.
62. Wang Z, Su XM, Wen J, Jiang LY, Qiao GX. Widespread infection and diverse infection patterns of Wolbachia in Chinese aphids. *Insect science*. 2014;21(3):313-25.
63. Sinkins SP. Wolbachia and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2004;34(7):723-9.
64. Bandi C, Trees AJ, Brattig NW. Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Veterinary parasitology*. 2001;98(1-3):215-38.
65. Huigens ME, de Almeida RP, Boons PA, Luck RF, Stouthamer R. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing Wolbachia in *Trichogramma* wasps. *Proceedings Biological sciences*. 2004;271(1538):509-15.
66. Stouthamer R, Breeuwer JA, Luck RF, Werren JH. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*. 1993;361(6407):66-8.
67. Moreau J, Rigaud T. Variable male potential rate of reproduction: high male mating capacity as an adaptation to parasite-induced excess of females? *P Roy Soc B-Biol Sci*. 2003;270(1523):1535-40.
68. Fenn K, Blaxter M. Are filarial nematode Wolbachia obligate mutualist symbionts? *Trends Ecol Evol*. 2004;19(4):163-6.
69. Fenn K, Blaxter M. Wolbachia genomes: revealing the biology of parasitism and

mutualism. *Trends Parasitol.* 2006;22(2):60-5.

70. Taylor MJ, Bandi C, Hoerauf A. Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv Parasit.* 2005;60:245-84.

71. Morchon R, Ferreira AC, Martin-Pacho JR, Montoya A, Mortarino M, Genchi C, et al. Specific IgG antibody response against antigens of *Dirofilaria immitis* and its Wolbachia endosymbiont bacterium in cats with natural and experimental infections. *Veterinary parasitology.* 2004;125(3-4):313-21.

72. Slatko BE, Taylor MJ, Foster JM. The Wolbachia endosymbiont as an anti-filarial nematode target. *Symbiosis.* 2010;51(1):55-65.

73. Kozek WJ. What is new in the Wolbachia/*Dirofilaria* interaction? *Veterinary parasitology.* 2005;133(2-3):127-32.

74. Kozek WJ. Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. *The Journal of parasitology.* 1977;63(6):992-1000.

75. Kozek WJ, Marroquin HF. Intracytoplasmic bacteria in *Onchocerca volvulus*. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1977;26(4):663-78.

76. Luck AN, Evans CC, Riggs MD, Foster JM, Moorhead AR, Slatko BE, et al. Concurrent transcriptional profiling of *Dirofilaria immitis* and its Wolbachia endosymbiont throughout the nematode life cycle reveals coordinated gene expression. *BMC genomics.* 2014;15:1-18.

77. Smith HL, Rajan TV. Tetracycline inhibits development of the infective-stage larvae of filarial nematodes in vitro. *Experimental parasitology.* 2000;95(4):265-70.

78. Rossi MID, Paiva J, Bendas A, Mendes-de-Almeida F, Knackfuss F, Miranda M, et al. Effects of doxycycline on the endosymbiont Wolbachia in *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856)-Naturally infected dogs. *Veterinary parasitology.* 2010;174(1-2):119-23.

79. Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L, Sacchi L. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts Wolbachia. *International journal for parasitology.* 1999;29(2):357-64.

80. Bosshardt SC, Mccall JW, Coleman SU, Jones KL, Petit TA, Klei TR. Prophylactic Activity of Tetracycline against *Brugia-Pahangi* Infection in Jirds (*Meriones-Unguiculatus*). *Journal of Parasitology.* 1993;79(5):775-7.

81. Hoerauf A, Nissen-Pahle K, Schmetz C, Henkle-Duhrsen K, Blaxter ML, Buttner DW, et al. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest*. 1999;103(1):11-7.
82. Casiraghi M, Bain O, Guerrero R, Martin C, Pocacqua V, Gardner SL, et al. Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. *International journal for parasitology*. 2004;34(2):191-203.
83. Plengebonig A, Kromer M, Buttner DW. Light and Electron-Microscopy Studies on *Onchocerca-Jakutensis* and *O-Flexuosa* of Red Deer Show Different Host-Parasite Interactions. *Parasitol Res*. 1995;81(1):66-73.
84. Hoerauf A, Mand S, Adjei O, Fleischer B, Buttner DW. Depletion of *wolbachia* endobacteria in *Onchocerca volvulus* by doxycycline and microfilaridermia after ivermectin treatment. *Lancet*. 2001;357(9266):1415-6.
85. Hoerauf A, Mand S, Volkmann L, Buttner M, Marfo-Debrekeyei Y, Taylor M, et al. Doxycycline in the treatment of human onchocerciasis: kinetics of *Wolbachia* endobacteria reduction and of inhibition of embryogenesis in female *Onchocerca* worms. *Microbes Infect*. 2003;5(4):261-73.
86. Hoerauf A, Volkmann L, Hamelmann C, Adjei O, Autenrieth IB, Fleischer B, et al. Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemotherapy in filariasis. *Lancet*. 2000;355(9211):1242-3.
87. Debrah AY, Mand S, Specht S, Marfo-Debrekeyei Y, Batsa L, Pfarr K, et al. Doxycycline reduces plasma VEGF-c/sVEGFR-3 and improves pathology in lymphatic filariasis. *PLoS pathogens*. 2006;2(9):829-43.
88. Menozzi A, Bertini S, Turin L, Serventi P, Kramer L, Bazzocchi C. Doxycycline levels and anti-*Wolbachia* antibodies in sera from dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* and treated with a combination of ivermectin/doxycycline. *Veterinary parasitology*. 2015;209(3-4):281-4.
89. Simsek S, Ciftci AT. Serological and Molecular Detection of *Dirofilaria* Species in Stray Dogs and Investigation of *Wolbachia* DNA by PCR in Turkey. *Journal of arthropod-borne diseases*. 2016;10(4):445-53.
90. Latrofa MS, Dantas-Torres F, Annoscia G, Genchi M, Traversa D, Otranto D. A

duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. *Veterinary parasitology*. 2012;185(2-4):181-5.

91. To KKW, Wong SSY, Poon RWS, Trendell-Smith NJ, Ngan AHY, Lam JWK, et al. A Novel *Dirofilaria* Species Causing Human and Canine Infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol*. 2012;50(11):3534-41.

92. Turba ME, Zambon E, Zannoni A, Russo S, Gentilini F. Detection of *Wolbachia* DNA in Blood for Diagnosing Filaria-Associated Syndromes in Cats. *J Clin Microbiol*. 2012;50(8):2624-30.

93. Rossi A, Peix A, Pavlikovskaya T, Sagach O, Nikolaenko S, Chizh N, et al. Genetic diversity of *Dirofilaria* spp. isolated from subcutaneous and ocular lesions of human patients in Ukraine. *Acta Trop*. 2015;142:1-4.

94. Monobe MM, da Silva RC, Araujo Junior JP, Takahira RK. Microfilaruria by *Dirofilaria immitis* in a dog: a rare clinical pathological finding. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*. 2017;41(3):805-8.

95. Li ZR, Garner AL, Gloeckner C, Janda KD, Carlow CK. Targeting the *Wolbachia* Cell Division Protein FtsZ as a New Approach for Antifilarial Therapy. *Plos Neglect Trop D*. 2011;5(11):1-14.

96. Bazzocchi C, Jamnongluk W, O'Neill SL, Anderson TJC, Genchi C, Bandi C. wsp gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodes. *Curr Microbiol*. 2000;41(2):96-100.

97. Nelson GS. The identification of Infective Filarial Larvae in Mosquitoes: with a Note on the Species Found in Wild Mosquitoes on the Kenya Coast. *J Helminthol*. 1959;33:233-56.

98. Orihel TC, Ash LR, Ramachandran CP, Ottesen EA. Bench Aids for the diagnosis of filarial infections.: World Health Organization; 1997.

99. Yen PKF, Zaman V, Mak JW. Identification of some common infective filarial larvae in Malaysia. *J Helminthol*. 1982;56:69-80.

100. Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y, Scott AL. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *American Journal of Tropical*

Medicine and Hygiene. 2005;73(5):895-900.

101. Casiraghi M, Anderson TJC, Bandi C, Bazzocchi C, Genchi C. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of Wolbachia endosymbionts. *Parasitology*. 2001;122:93-103.

102. Casiraghi M, Bazzocchi C, Mortarino M, Ottina E, Genchi C. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Veterinary parasitology*. 2006;141(3-4):368-72.

103. Hoch H, Strickland K. Canine and feline dirofilariasis: Life cycle, pathophysiology, and diagnosis. *Compendium*. 2008;30(3):133-+.

104. Magnis J, Lorentz S, Guardone L, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, et al. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites & vectors*. 2013;6:1-5.

105. Ricciardi A, Ndao M. Diagnosis of Parasitic Infections: What's Going On? *J Biomol Screen*. 2015;20(1):6-21.

106. Rosenblatt JE. Laboratory Diagnosis of Infections Due to Blood and Tissue Parasites. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(7):1103-8.

107. Ciocan R, DĂRĂBUȘ G, Igna V. Morphometric Study of Microfilariae of *Dirofilaria* spp. on Dogs. *Bull UASVM Vet Med*. 2010;67:45-9.

108. Oh IY, Kim KT, Sung HJ. Molecular Detection of *Dirofilaria immitis* Specific Gene from Infected Dog Blood Sample Using Polymerase Chain Reaction. *Iran J Parasitol*. 2017;12(3):433-40.

109. Wang S, Zhang NA, Zhang ZC, Wang D, Yao ZJ, Zhang HZ, et al. Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Henan province, central China. *Parasite*. 2016;23.

110. Byeon KH, Kim BJ, Kim SM, Yu HS, Jeong HJ, Ock MS. A serological survey of *Dirofilaria immitis* infection in pet dogs of Busan, Korea, and effects of chemoprophylaxis. *The Korean journal of parasitology*. 2007;45(1):27-32.

111. Khedri J, Radfar MH, Borji H, Azizzadeh M, Akhtardanesh B. Canine Heartworm in Southeastern of Iran with Review of disease distribution. *Iran J Parasitol*. 2014;9(4):560-7.

112. Alho AM, Landum M, Ferreira C, Meireles J, Goncalves L, de Carvalho LM, et al. Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *Veterinary*

parasitology. 2014;206(1-2):99-105.

113. Bacsadi A, Papp A, Szeredi L, Toth G, Nemes C, Imre V, et al. Retrospective study on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs in Hungary. *Veterinary parasitology*. 2016;220:83-6.

114. Kamyngkird K, Junsiri W, Chimnoi W, Kengradomkij C, Saengow S, Sangchuto K, et al. Prevalence and risk factors associated with *Dirofilaria immitis* infection in dogs and cats in Songkhla and Satun provinces, Thailand. *Agriculture and Natural Resources*. 2017;51:299-302.

115. Tiawsirisup S, Thanapaisarnkit T, Varatorn E, Apichonpongsa T, Bumpenkiattikun N, Rattanapuchpong S, et al. Canine Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection and Immunoglobulin G Antibodies Against *Wolbachia* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*) in Stray Dogs in Bangkok, Thailand. *Thai J Vet Med*. 2010;40(2):165-70.

116. Wongkamchai S, Nochote H, Foongladda S, Dekumyoy P, Thammapalo S, Boitano JJ, et al. A high resolution melting real time PCR for mapping of filaria infection in domestic cats living in brugia filariosis-endemic areas. *Veterinary parasitology*. 2014;201(1-2):120-7.

117. Thanchomnang T, Intapan PM, Chungpivat S, Lulitanond V, Maleewong W. Differential detection of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* by real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and its evaluation for diagnosis of *B. pahangi*-infected dogs. *Parasitol Res*. 2010;106(3):621-5.

118. Kurucz K, Kiss V, Zana B, Jakab F, Kemenesi G. Filarial nematode (order: Spirurida) surveillance in urban habitats, in the city of Pécs (Hungary). *Parasitol Res*. 2018;117(10):3355-60.

119. Heidari Z, Kia EB, Arzamani K, Sharifdini M, Mobedi I, Zarei Z, et al. Morphological and molecular identification of *Dirofilaria immitis* from Jackal (*Canis aureus*) in North Khorasan, northeast Iran. *J Vector Dis*. 2015;52(4):329-33.

120. Ferri E, Barbuto M, Bain O, Galimberti A, Uni S, Guerrero R, et al. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Front Zool*. 2009;6:1-12.

121. Pascucci I, Fico R, D'Angelo AR, Serini S, Camma C. First notification in Italy of cardiopulmonary filariosis (heartworm disease) in a wolf (*Canis lupus*). *Veterinaria*

italiana. 2007;43(4):843-50, 51-58.

122. Bravo-Barriga D, Parreira R, Almeida APG, Calado M, Blanco-Ciudad J, Serrano-Aguilera FJ, et al. *Culex pipiens* as a potential vector for transmission of *Dirofilaria immitis* and other unclassified Filarioidea in Southwest Spain. *Veterinary parasitology*. 2016;223:173-80.

123. Huang HS, Wang T, Yang GY, Zhang ZH, Wang CD, Yang Z, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Dirofilaria immitis* of China based on COI and 12S rDNA genes. *Veterinary parasitology*. 2009;160(1-2):175-9.

124. Muslim A, Fong MY, Mahmud R, Lau YL, Sivanandam S. *Armigeres subalbatus* incriminated as a vector of zoonotic *Brugia pahangi* filariasis in suburban Kuala Lumpur, Peninsular Malaysia. *Parasites & vectors*. 2013;6.

125. Lefoulon E, Bain O, Bourret J, Junker K, Guerrero R, Canizales I, et al. Shaking the Tree: Multi-locus Sequence Typing Usurps Current Onchocercid (Filarial Nematode) Phylogeny. *Plos Neglect Trop D*. 2015;9(11):1-19.

126. Mar PH, Yang IC, Chang GN, Fei ACY. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). *Veterinary parasitology*. 2002;106(3):243-52.

127. Solgi R, Mohebbi M, Sadjjadi SM, Dinparast Djadid N. Vector competence of *Anopheles stephensi* biological from mysorensis 2017.

128. Megat Abd Rani PA, Irwin PJ, Gatne M, Coleman GT, McInnes LM, Traub RJ. A survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. *Parasites & vectors*. 2010;3:30-41.

129. Areekit S, Singhapphan P, Khuchareontaworn S, Kanjanavas P, Sriyaphai T, Pakpitchareon A, et al. Intraspecies variation of *Brugia* spp. in cat reservoirs using complete ITS sequences. *Parasitol Res*. 2009;104(6):1465-9.

130. Morales-Hojas R. Molecular systematics of filarial parasites, with an emphasis on groups of medical and veterinary importance, and its relevance for epidemiology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2009;9(5):748-59.

131. Thanomsab BW, Chansiri K, Sarataphan N, Phantana S. Differential diagnosis of



human lymphatic filariasis using PCR-RFLP. Molecular and cellular probes. 2000;14(1):41-6.

132. Darby AC, Armstrong SD, Bah GS, Kaur G, Hughes MA, Kay SM, et al. Analysis of gene expression from the Wolbachia genome of a filarial nematode supports both metabolic and defensive roles within the symbiosis. Genome Res. 2012;22(12):2467-77.

133. Hoffmann AA, Ross PA, Rasic G. Wolbachia strains for disease control: ecological and evolutionary considerations. Evolutionary applications. 2015;8(8):751-68.

134. Pfarr KM, Hoerauf AM. Antibiotics which target the Wolbachia endosymbionts of filarial parasites: A new strategy for control of filariasis and amelioration of pathology. Mini-Rev Med Chem. 2006;6(2):203-10.



ภาคผนวก ก  
การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. ชุดสารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR

10X PCR buffer

2 mM dNTP

25 mM MgCl<sub>2</sub>

Taq DNA polymerase (5U/μl)

2. ชุดโคลนสำหรับผลิตภัณฑ์ pcr (DNA ligation)

2x Rapid ligation buffer

pGEM<sup>®</sup>-T Easy

T<sub>4</sub> DNA ligase

3. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Invisorb<sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Two, ประเทศเยอรมนี)

Solution A

Solution B

Solution C

Wash solution Elution solution

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-bertani (LB agar) ปริมาตร 1 L

Bacto-tryptone 10.0 g.

Yeast extracts 5.0 g.

1M NaCl 10.0 g.

Agar 10.0 g.

**วิธีเตรียม** ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 L แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 7.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที เมื่อครบเวลาดังให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมยาแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 mg/μl ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันและเทลงจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

\*\*\* สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดเหลว (LB broth) เตรียมด้วยวิธีเดียวกัน แต่ไม่เติม Agar และเมื่อต้องการใช้ค่อยเติมยาแอมพิซิลลินลงไป

#### 5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย SOB ปริมาตร 100 ml และ SOC solution

2% Tryptone	2.0	g.
5% Yeast extracts	0.5	g.
1M NaCl	1	ml
2M Mg <sup>2+</sup> stock	1	ml
1M KCl	0.25	ml

**วิธีเตรียม SOB** ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 ml แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 7.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที เมื่อครบเวลาตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

**วิธีเตรียม SOC** เตรียมจากการเติมสารละลาย 2 M glucose ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ในอัตราส่วน 100 µl/ml แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

#### 6. การเตรียมสารละลาย 1M KCl ปริมาตร 20 ml

KCl (potassium chloride)	1.491	g.
--------------------------	-------	----

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

#### 7. การเตรียมสารละลาย 2M Mg<sup>2+</sup> stock ปริมาตร 20 ml

MgCl <sub>2</sub>	4.066	g.
MgSO <sub>4</sub>	4.9296	g.

**วิธีเตรียม** ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 ml จากนั้นกรองด้วย microfilter ขนาด 0.22 µm แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

### 8. การเตรียมสารละลาย 2M glucose ปริมาตร 10 ml

Glucose (D-glucose) 3.6 g.

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml จากนั้นกรองด้วย microfilter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

### 9. การเตรียมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) 100 mg/ $\mu\text{l}$ (stock solution)

Ampicillin 1 g.

**วิธีเตรียม** ละลายยาในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml จากนั้นกรองด้วย microfilter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

### 10. การเตรียมสารละลาย 10X TAE buffer ปริมาตร 1 L

Tris base 48.44 g.

Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 3.7 g.

Glacial acetic acid 11.4 ml

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมี Tris base และ Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O ด้วยน้ำกลั่นก่อน จากนั้นเติม Glacial acetic acid ตามลงไป แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที แล้วเก็บไว้ที่ อุณหภูมิห้อง

\*\*\* เมื่อต้องการใช้ TAE buffer ต้องปรับความเข้มข้นลงเป็น 1X buffer โดยทำการเจือจางความเข้มข้นจาก 10X buffer ปริมาตร 100 ml ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 900 ml ก่อนนำไปใช้

### 11. สารเคมีสำหรับเตรียม native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

#### 11.1 การเตรียม 10% ammonium persulfate ปริมาตร 1 ml

Ammonium persulfate 0.1 g

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 ml

### 11.2 การเตรียมสารละลาย 5X TBE buffer ปริมาตร 1 L (stock solution)

Tris base	27.0	g.
Boric acid	13.75	g.
0.5 M EDTA (pH 8.0)	10	ml

**วิธีเตรียม 0.5 M EDTA (stock solution)** โดยชั่ง EDTA 9.306 g. ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml ปรับค่า pH เท่ากับ 8.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ก่อนนำมาเตรียมสารละลาย 5X TBE

**วิธีเตรียม 5X TBE** ละลายสารเคมี Tris base และ Boric acid ด้วยน้ำกลั่นก่อน จากนั้นเติม 0.5 M EDTA แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 L

### 11.3 การเตรียม 30% Acrylamide ปริมาตร 50 ml

Acrylamide	15.0	g.
------------	------	----

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 50 ml จากนั้นกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองก่อนเก็บในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

### 12. การเตรียมสารละลาย 20 mg/ml X-gal (stock solution)

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside)	0.2	g.
--	-----	----

**วิธีเตรียม** ละลาย X-gal ในสารละลาย dimethylformamide (DMF) ปริมาตร 10 ml จากนั้น แบ่งใส่หลอด microcentrifuge ห่อด้วยฟลอยด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

### 13. การเตรียมสารละลาย 1M IPTG (stock solution)

IPTG (Isopropyl $\beta$ -D-1 thiogalactopyranoside)	2.38	g
---	------	---

**วิธีเตรียม** ละลาย IPTG ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml กรองด้วย microfilter ขนาด 0.22  $\mu$ m แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

#### 14. การเตรียมสารละลาย TB buffer 100 ml เพื่อใช้ในขั้นตอนเตรียม competent cell

10 mM HEPES	0.2383 g.
15 mM CaCl <sub>2</sub>	0.1665 g.
250 mM KCl	1.8637 g.
55 mM MnCl <sub>2</sub>	1.088 g.

**วิธีเตรียม** ละลายส่วนผสม HEPES, CaCl<sub>2</sub> และ KCl ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 80 ml ปรับ pH เป็น 7.0 ก่อน ค่อยเติม MnCl<sub>2</sub> และเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 ml แบ่งใส่หลอดปริมาตร 50 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

#### 15. การเตรียม competent cell เพื่อใช้ในขั้นตอน DNA cloning

15.1 นำ stock แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่เก็บใน glycerol มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดแข็งและบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16-18 ชั่วโมง

15.2 เลือก single colony มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด SOC ปริมาตร 4 ml แล้วนำไปบ่มบนเครื่อง เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 170 rpm อุณหภูมิ 37 °C นาน 16-18 ชั่วโมง (starter)

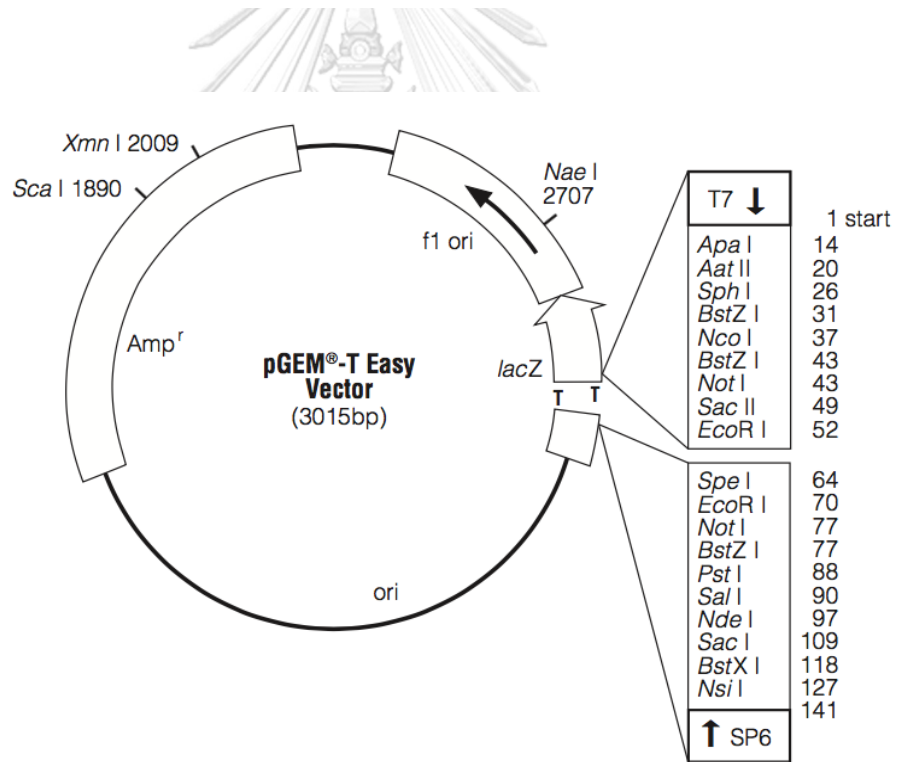
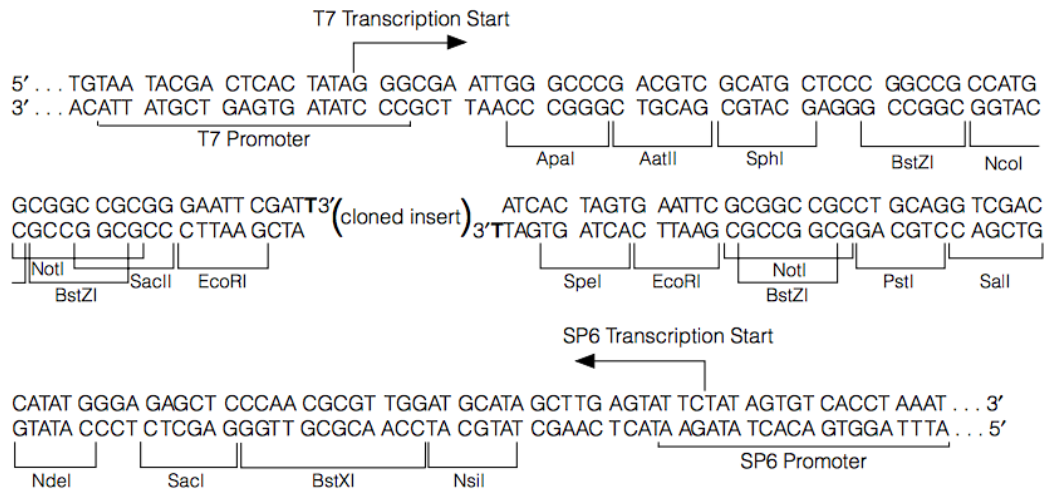
15.3 นำ starter ปริมาตร 500  $\mu$ l เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC ปริมาตร 100 ml ใน Erlenmeyer flask ปริมาตร 500 ml นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 170 rpm อุณหภูมิ 17°C นาน 7-12 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่า OD ให้ได้ค่าในช่วง 0.4-0.6

15.4 เมื่อได้ค่า OD ตามที่ต้องการ แบ่งใส่หลอดปริมาตร 50 ml จำนวน 2 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 4,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 8 นาที แล้วนำหลอดเชื้อมาแช่ในน้ำแข็งทันทีและเทส่วนใส (supernatant) ออกอย่างรวดเร็ว

15.5 เติมสารละลาย TB buffer ปริมาตร 16 ml ผสมลงไปเบา ๆ และรวดเร็วเพื่อให้เซลล์กระจายตัว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 8 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง

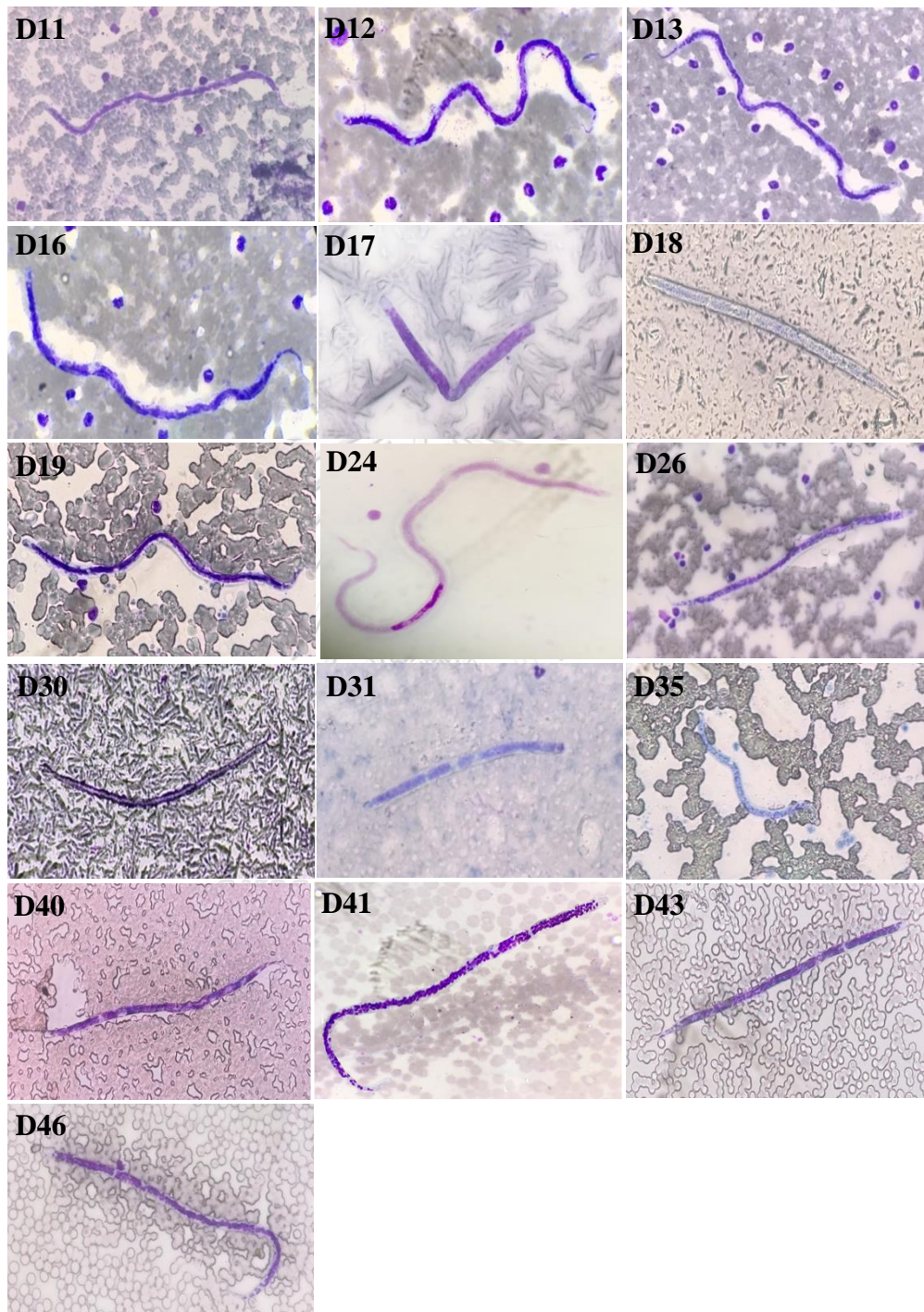
15.6 เติมสารละลาย TB buffer ปริมาตร 4 ml อีกครั้งและเติมสารละลาย DMSO ปริมาตร 280  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วแบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 200  $\mu$ l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

## 16. pGEM<sup>®</sup> - T easy Vector System I, Promega<sup>®</sup>



รูปที่ 33 แผนที่ยีนของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup> - T easy

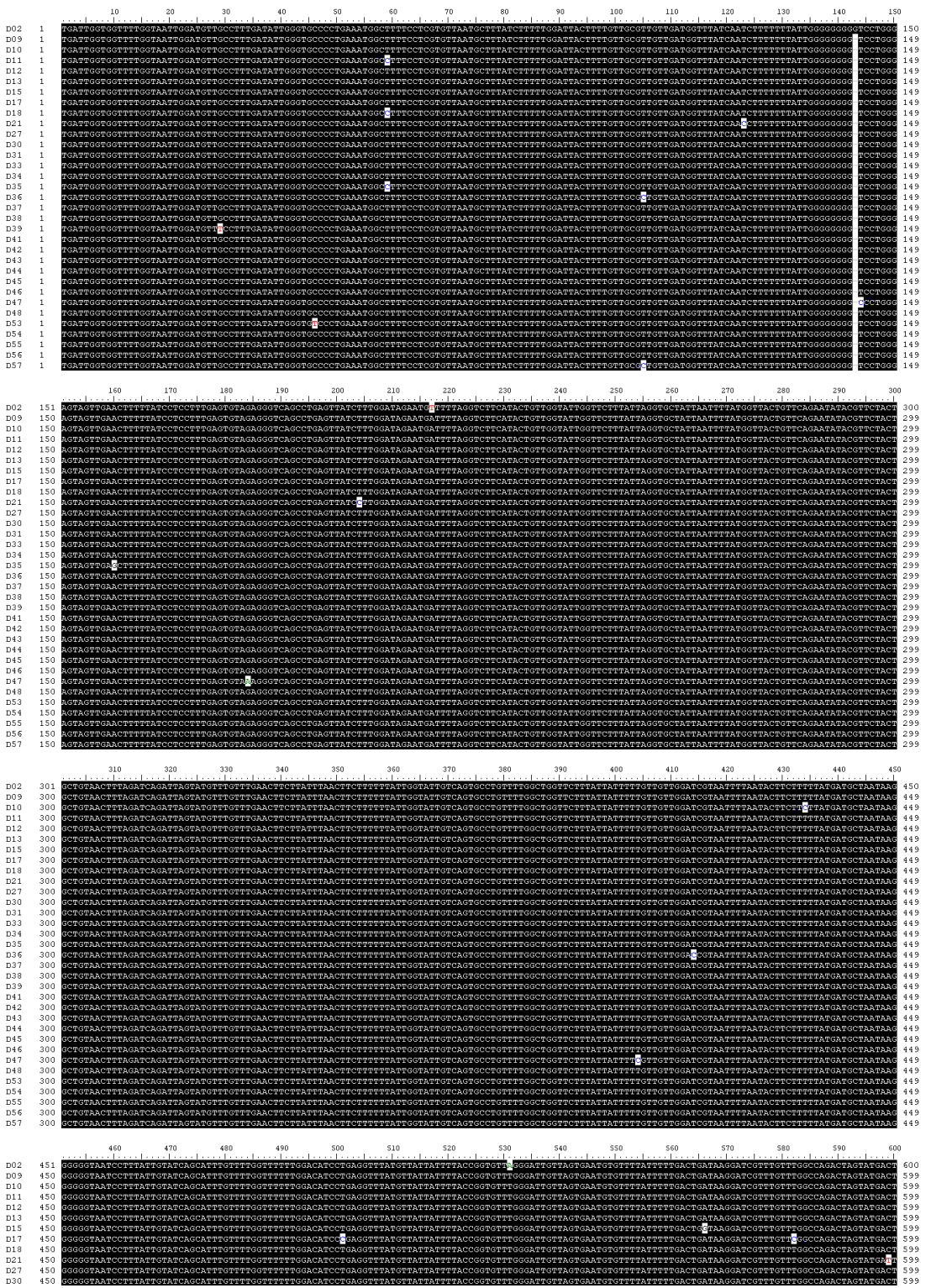
## ภาคผนวก ข



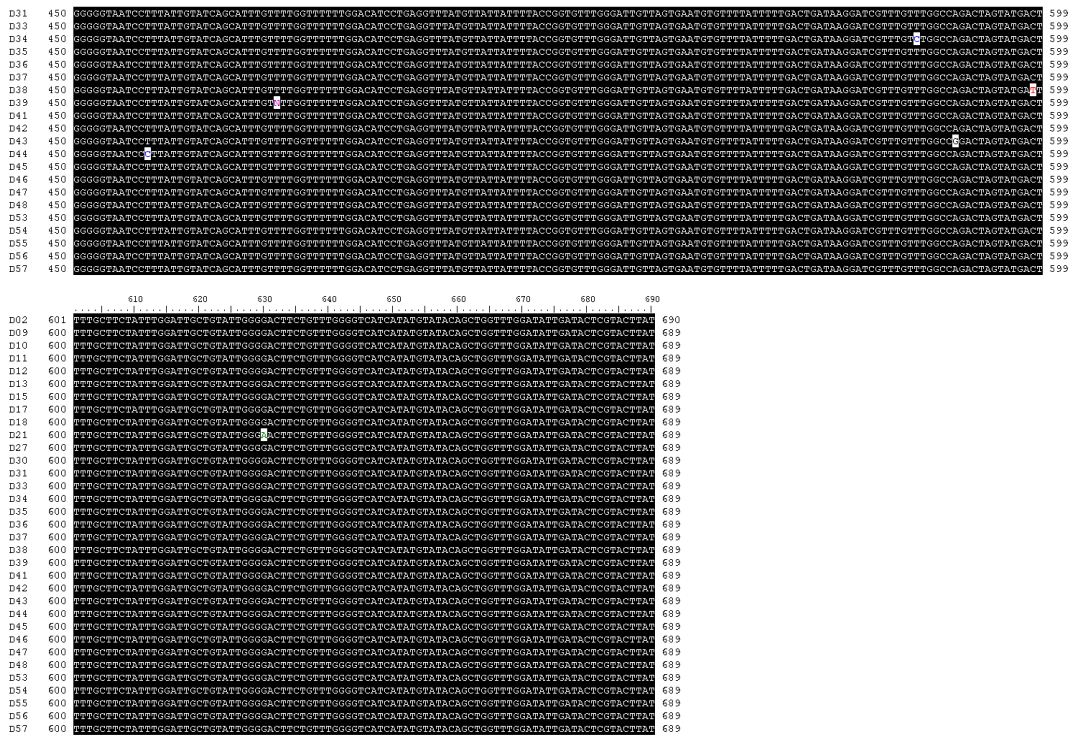
รูปที่ 34 ตัวอย่างที่พบตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียในงานวิจัยนี้

*Dirofilaria* spp. (D11, D12, D13, D17, D18, D30, D31, D35, D41, D43, D46) และหนอนพยาธิ *Brugia* spp. (D16, D24, D26, D19, D40)



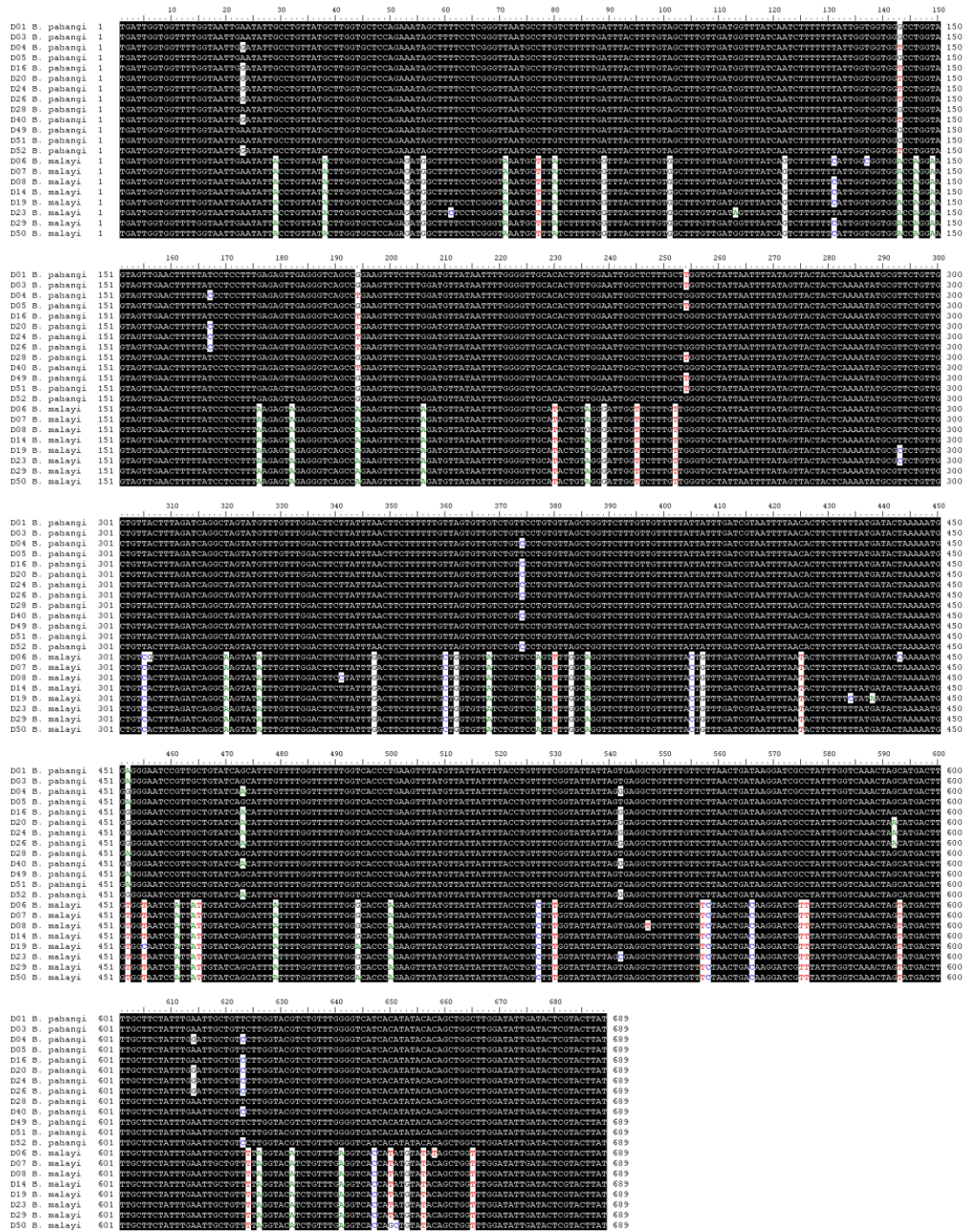


รูปที่ 35 แสดง multiple sequence alignment ของตัวอย่างหนอนพยาธิ *D. immitis* ที่ตำแหน่ง COI

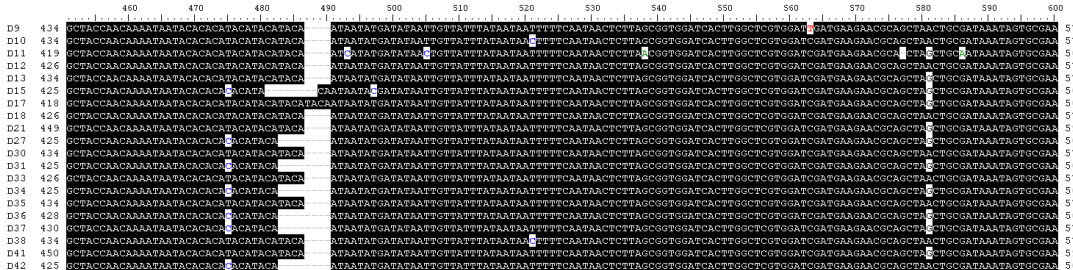
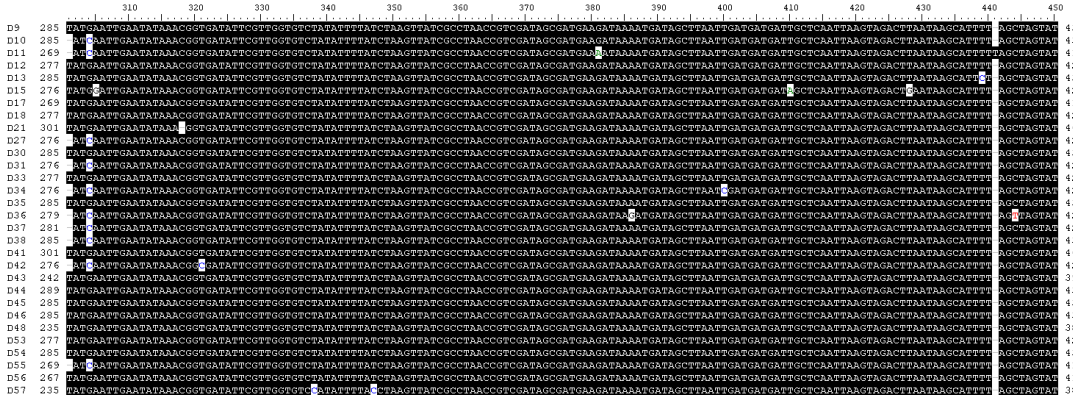
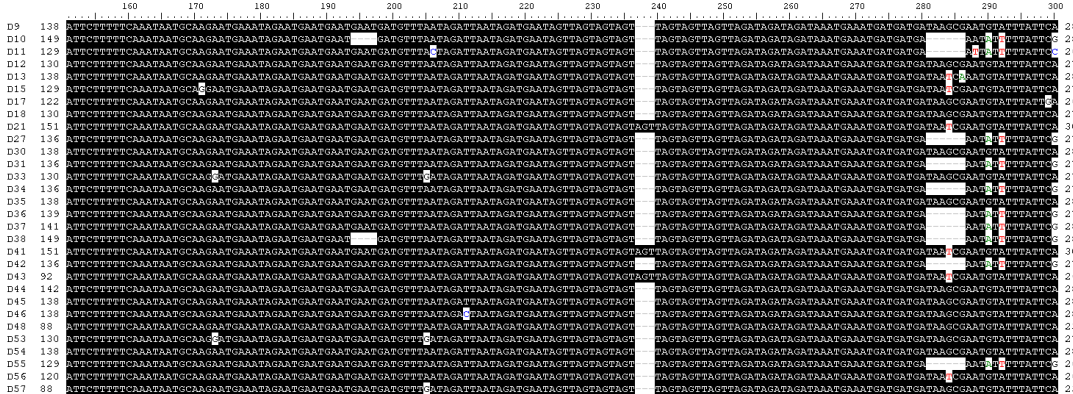
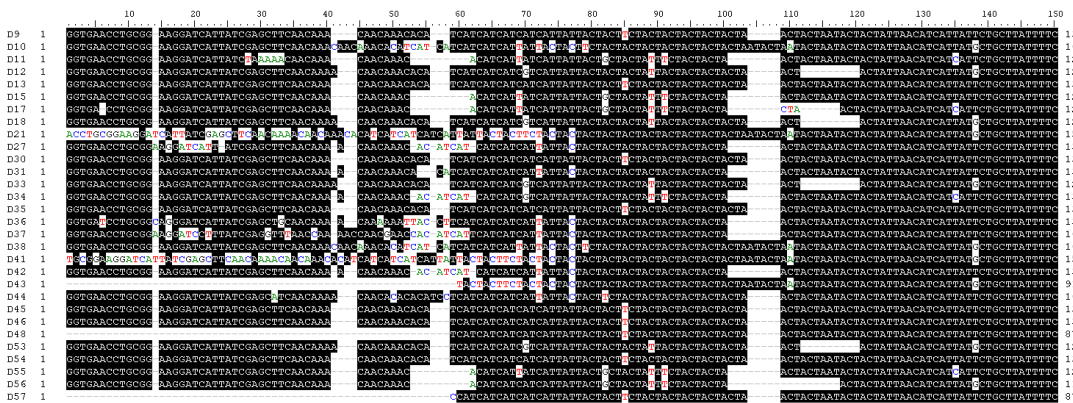


รูปที่ 35 แสดง multiple sequence alignment ของตัวอย่างหนอนพยาธิ *D. immitis* ที่ตำแหน่ง COI (ต่อ)

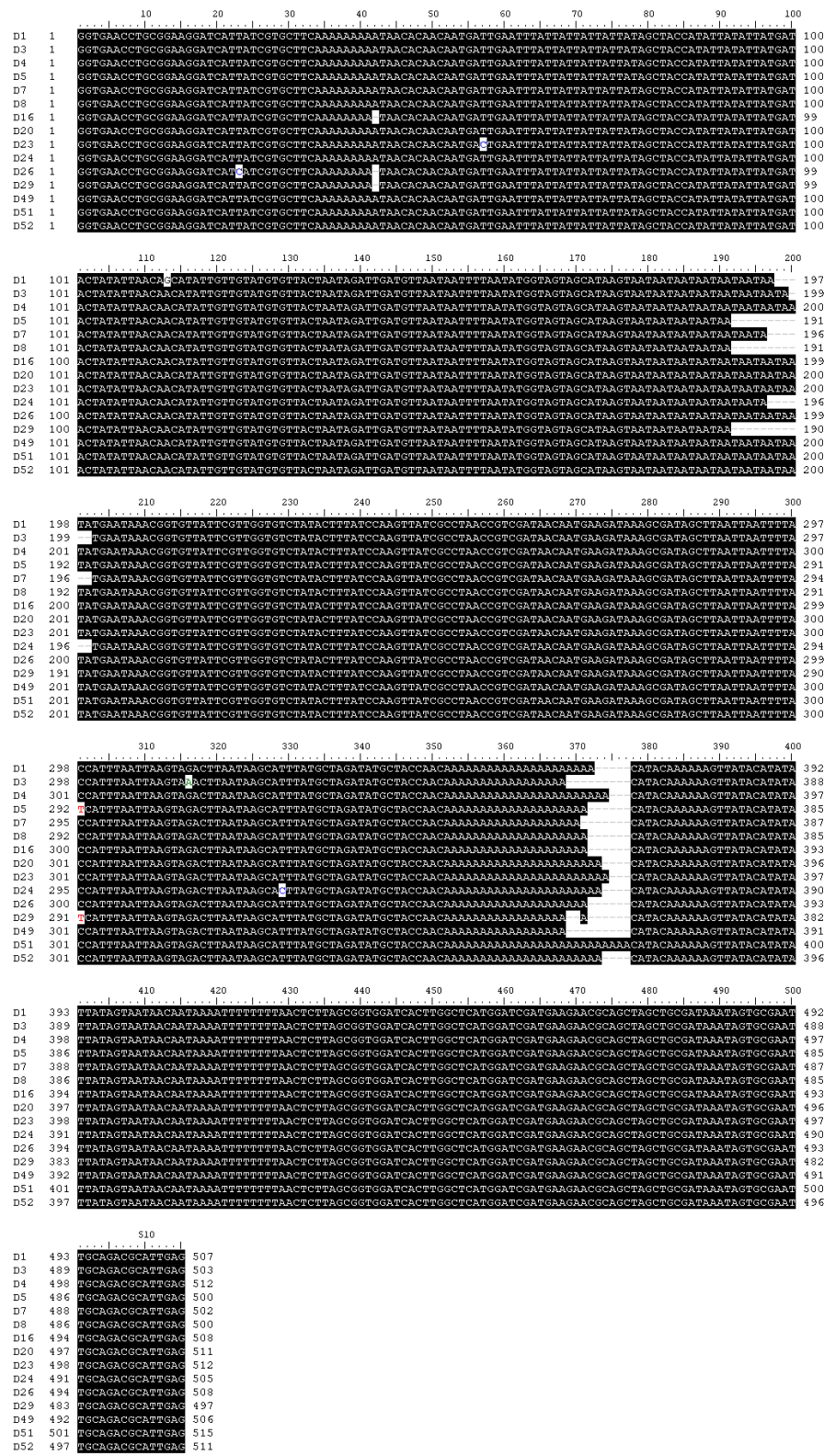




รูปที่ 36 แสดง multiple sequence alignment ของตัวอย่างหนอนพยาธิ *B. pahangi* และ *B. malayi* ที่ตำแหน่ง COI



รูปที่ 37 แสดง multiple sequence alignment ของตัวอย่างหนอนพยาธิ *D. immitis* ที่ตำแหน่ง ITS1



รูปที่ 38 แสดง multiple sequence alignment ของตัวอย่างหนอนพยาธิ *B. pahangi* ที่ตำแหน่ง ITS1

ตารางที่ 21 ข้อมูลตัวอย่างหนอนพยาธิที่ตำแหน่ง COI ที่พบในงานวิจัยนี้

Code	Species	Accession No.	ฐานข้อมูลอ้างอิง GenBank	
			% Identity	Accession No.
D01	<i>Brugia pahangi</i>	MK250707	98%	AP017680.1
D02	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250708	99%	EU159111.1
D03	<i>Brugia pahangi</i>	MK250709	98%	AP017680.1
D04	<i>Brugia pahangi</i>	MK250710	99%	AP017680.1
D05	<i>Brugia pahangi</i>	MK250711	98%	AP017680.1
D06	-	-	-	-
D07	-	-	-	-
D08	<i>Brugia malayi</i>	MK250714	99%	AF538716.1
D09	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250715	100%	EU159111.1
D10	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250716	99%	EU159111.1
D11	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250717	99%	EU159111.1
D12	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250718	100%	EU159111.1
D13	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250719	100%	EU159111.1
D14	<i>Brugia malayi</i>	MK250720	99%	AF538716.1
D15	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250721	99%	EU159111.1
D16	<i>Brugia pahangi</i>	MK250722	98%	AP017680.1
D17	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250723	99%	EU159111.1
D18	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250724	99%	EU159111.1
D19	<i>Brugia malayi</i>	MK250725	99%	AF538716.1
D20	<i>Brugia pahangi</i>	MK250726	98%	AP017680.1
D21	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250727	99%	EU159111.1
D22	-	-	-	-
D23	-	-	-	-
D24	<i>Brugia pahangi</i>	MK250729	98%	AP017680.1
D25	-	-	-	-
D26	<i>Brugia pahangi</i>	MK250730	98%	AP017680.1

D27	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250731	100%	EU159111.1
D28	<i>Brugia pahangi</i>	MK250732	98%	AP017680.1
D29	-	-	-	-
D30	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250734	100%	EU159111.1
D31	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250735	100%	EU159111.1
D33	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250736	100%	EU159111.1
D34	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250737	99%	EU159111.1
D35	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250738	99%	EU159111.1
D36	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250730	99%	EU159111.1
D37	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250740	100%	EU159111.1
D38	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250741	99%	EU159111.1
D39	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250742	99%	EU159111.1
D40	<i>Brugia pahangi</i>	MK250743	98%	AP017680.1
D41	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250744	100%	EU159111.1
D42	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250745	100%	EU159111.1
D43	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250746	99%	EU159111.1
D44	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250747	99%	EU159111.1
D45	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250748	100%	EU159111.1
D46	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250749	100%	EU159111.1
D47	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250750	99%	EU159111.1
D48	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250751	100%	EU159111.1
D49	<i>Brugia pahangi</i>	MK250752	98%	AP017680.1
D50	<i>Brugia malayi</i>	MK250753	99%	AF538716.1
D51	<i>Brugia pahangi</i>	MK250754	98%	AP017680.1
D52	<i>Brugia pahangi</i>	MK250755	98%	AP017680.1
D53	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250756	99%	EU159111.1
D54	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250757	100%	EU159111.1
D55	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250758	99%	EU159111.1
D56	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250759	100%	EU159111.1
D57	<i>Dirofilaria immitis</i>	MK250760	99%	EU159111.1

ตารางที่ 22 ข้อมูลตัวอย่างหนอนพยาธิที่ตำแหน่ง ITS1 ที่พบในงานวิจัยนี้

Code	Species	Size (bp)	Accession No.	ฐานข้อมูลอ้างอิง GenBank	
				% Identity	Accession No.
D01	<i>Brugia pahangi</i>	507	MK250761	99%	EU373628.1
D03	<i>Brugia pahangi</i>	503	MK250762	99%	EU373628.1
D04	<i>Brugia pahangi</i>	512	MK250763	99%	EU373633.1
D05	<i>Brugia pahangi</i>	500	MK250764	99%	EU373645.1
D08	<i>Brugia pahangi</i>	500	MK250766	99%	EU373640.1
D09	<i>Dirofilaria immitis</i>	595	MK250767	95%	AF217800.2
D10	<i>Dirofilaria immitis</i>	595	MK250768	99%	AF217800.2
D11	<i>Dirofilaria immitis</i>	580	MK250769	92%	AF217800.2
D12	<i>Dirofilaria immitis</i>	587	MK250770	97%	AB973230.1
D13	<i>Dirofilaria immitis</i>	595	MK250771	95%	AF217800.2
D14	-	-	-	-	-
D15	<i>Dirofilaria immitis</i>	582	MK250772	99%	AB973231.1
D16	<i>Brugia pahangi</i>	508	MK250773	99%	EU373635.1
D17	<i>Dirofilaria immitis</i>	583	MK250774	99%	AB973230.1
D18	<i>Dirofilaria immitis</i>	587	MK250775	97%	AB973230.1
D19	-	-	-	-	-
D20	<i>Brugia pahangi</i>	511	MK250776	99%	EU373635.1
D21	<i>Dirofilaria immitis</i>	615	MK250777	95%	AF217800.2
D22	-	-	-	-	-
D23	-	-	-	-	-
D24	<i>Brugia pahangi</i>	505	MK250779	99%	EU373646.1
D25	-	-	-	-	-
D26	<i>Brugia pahangi</i>	508	MK250780	99%	EU373635.1
D27	<i>Dirofilaria immitis</i>	582	MK250781	96%	AF217800.2
D28	-	-	-	-	-



D29	-	-	-	-	-
D30	<i>Dirofilaria immitis</i>	595	MK250783	95%	AF217800.2
D31	<i>Dirofilaria immitis</i>	582	MK250784	96%	AF217800.2
D32	-	-	-	-	-
D33	<i>Dirofilaria immitis</i>	587	MK250785	97%	AB973230.1
D34	<i>Dirofilaria immitis</i>	583	MK250786	95%	AF217800.2
D35	<i>Dirofilaria immitis</i>	595	MK250787	95%	AF217800.2
D36	<i>Dirofilaria immitis</i>	585	MK250788	94%	AF217800.2
D37	<i>Dirofilaria immitis</i>	587	MK250789	94%	AF217800.2
D38	<i>Dirofilaria immitis</i>	595	MK250790	99%	AF217800.2
D39	-	-	-	-	-
D40	-	-	-	-	-
D41	<i>Dirofilaria immitis</i>	619	MK250791	95%	AF217800.2
D42	<i>Dirofilaria immitis</i>	582	MK250792	95%	AF217800.2
D43	<i>Dirofilaria immitis</i>	522	MK250793	96%	AF217800.2
D44	<i>Dirofilaria immitis</i>	693	MK250794	94%	AF217800.2
D45	<i>Dirofilaria immitis</i>	595	MK250795	95%	AF217800.2
D46	<i>Dirofilaria immitis</i>	595	MK250796	95%	AF217800.2
D47	-	-	-	-	-
D48	<i>Dirofilaria immitis</i>	583	MK250797	96%	AB973231.1
D49	<i>Brugia pahangi</i>	506	MK250798	99%	AY621470.1
D50	-	-	-	-	-
D51	<i>Brugia pahangi</i>	515	MK250799	99%	EU373633.1
D52	<i>Brugia pahangi</i>	511	MK250800	99%	EU373635.1
D53	<i>Dirofilaria immitis</i>	567	MK250801	97%	AB973230.1
D54	<i>Dirofilaria immitis</i>	595	MK250802	95%	AF217800.2
D55	<i>Dirofilaria immitis</i>	583	MK250803	94%	AF217800.2
D56	<i>Dirofilaria immitis</i>	577	MK250804	98%	AB973230.1
D57	<i>Dirofilaria immitis</i>	545	MK250805	94%	AF217800.2

ตารางที่ 23 ข้อมูลตัวอย่างหนอนพยาธิที่พบแบคทีเรียที่ตำแหน่ง *FtsZ* ที่พบในงานวิจัยนี้

Code	Host	Bacteria	ฐานข้อมูลอ้างอิง GenBank	
			% Identity	Accession No.
D01	<i>Brugia pahangi</i>	<i>wolbachia</i>	99%	AJ495000.1
D02	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D03	<i>Brugia pahangi</i>	<i>wolbachia</i>	99%	AJ495000.1
D04	<i>Brugia pahangi</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D05	<i>Brugia pahangi</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D08	<i>Brugia malayi</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D09	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D10	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D11	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D12	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D13	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D14	<i>Brugia malayi</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D15	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D16	<i>Brugia pahangi</i>	-	-	-
D17	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D18	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D19	<i>Brugia malayi</i>	-	-	-
D20	<i>Brugia pahangi</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D21	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D24	<i>Brugia pahangi</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D26	<i>Brugia pahangi</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D27	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D28	<i>Brugia pahangi</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D30	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1
D31	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>wolbachia</i>	100%	AJ495000.1

D33	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D34	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D35	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D36	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D37	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	99%	AJ495000.1
D38	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	97%	AJ495000.1
D39	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D40	<i>Brugia pahangi</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D41	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D42	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D43	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D44	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D45	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D46	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D47	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D48	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D49	<i>Brugia pahangi</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D50	<i>Brugia malayi</i>	wolbachia	99%	AJ495000.1
D51	<i>Brugia pahangi</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D52	<i>Brugia pahangi</i>	-	-	-
D53	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D54	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D55	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D56	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	100%	AJ495000.1
D57	<i>Dirofilaria immitis</i>	wolbachia	99%	AJ495000.1

ตารางที่ 24 เปอร์เซ็นความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COI ภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ของหมอนพาลีรี

Code	D02	D09	D10	D11	D12	D13	D15	D17	D18	D21	D27	D30	D31	D33	D34	D35	D36	D37	D38	D39	D41	D42	D43	D44	D45	D46	D47	D48	D49	D51	D52	D53	D54	D55	D56	D57	D61	D62	D63	D64	D65	D66	D67	D68	D69	D71	D72	D73	D74	D75	D76	D77	D78	D79	D81	D82	D83	D84	D85	D86	D87	D88	D89	D91	D92	D93	D94	D95	D96	D97	D98	D99	D101	D102	D103	D104	D105	D106	D107	D108	D109	D111	D112	D113	D114	D115	D116	D117	D118	D119	D121	D122	D123	D124	D125	D126	D127	D128	D129	D131	D132	D133	D134	D135	D136	D137	D138	D139	D141	D142	D143	D144	D145	D146	D147	D148	D149	D151	D152	D153	D154	D155	D156	D157	D158	D159	D161	D162	D163	D164	D165	D166	D167	D168	D169	D171	D172	D173	D174	D175	D176	D177	D178	D179	D181	D182	D183	D184	D185	D186	D187	D188	D189	D191	D192	D193	D194	D195	D196	D197	D198	D199	D201	D202	D203	D204	D205	D206	D207	D208	D209	D211	D212	D213	D214	D215	D216	D217	D218	D219	D221	D222	D223	D224	D225	D226	D227	D228	D229	D231	D232	D233	D234	D235	D236	D237	D238	D239	D241	D242	D243	D244	D245	D246	D247	D248	D249	D251	D252	D253	D254	D255	D256	D257	D258	D259	D261	D262	D263	D264	D265	D266	D267	D268	D269	D271	D272	D273	D274	D275	D276	D277	D278	D279	D281	D282	D283	D284	D285	D286	D287	D288	D289	D291	D292	D293	D294	D295	D296	D297	D298	D299	D301	D302	D303	D304	D305	D306	D307	D308	D309	D311	D312	D313	D314	D315	D316	D317	D318	D319	D321	D322	D323	D324	D325	D326	D327	D328	D329	D331	D332	D333	D334	D335	D336	D337	D338	D339	D341	D342	D343	D344	D345	D346	D347	D348	D349	D351	D352	D353	D354	D355	D356	D357	D358	D359	D361	D362	D363	D364	D365	D366	D367	D368	D369	D371	D372	D373	D374	D375	D376	D377	D378	D379	D381	D382	D383	D384	D385	D386	D387	D388	D389	D391	D392	D393	D394	D395	D396	D397	D398	D399	D401	D402	D403	D404	D405	D406	D407	D408	D409	D411	D412	D413	D414	D415	D416	D417	D418	D419	D421	D422	D423	D424	D425	D426	D427	D428	D429	D431	D432	D433	D434	D435	D436	D437	D438	D439	D441	D442	D443	D444	D445	D446	D447	D448	D449	D451	D452	D453	D454	D455	D456	D457	D458	D459	D461	D462	D463	D464	D465	D466	D467	D468	D469	D471	D472	D473	D474	D475	D476	D477	D478	D479	D481	D482	D483	D484	D485	D486	D487	D488	D489	D491	D492	D493	D494	D495	D496	D497	D498	D499	D501	D502	D503	D504	D505	D506	D507	D508	D509	D511	D512	D513	D514	D515	D516	D517	D518	D519	D521	D522	D523	D524	D525	D526	D527	D528	D529	D531	D532	D533	D534	D535	D536	D537	D538	D539	D541	D542	D543	D544	D545	D546	D547	D548	D549	D551	D552	D553	D554	D555	D556	D557	D558	D559	D561	D562	D563	D564	D565	D566	D567	D568	D569	D571	D572	D573	D574	D575	D576	D577	D578	D579	D581	D582	D583	D584	D585	D586	D587	D588	D589	D591	D592	D593	D594	D595	D596	D597	D598	D599	D601	D602	D603	D604	D605	D606	D607	D608	D609	D611	D612	D613	D614	D615	D616	D617	D618	D619	D621	D622	D623	D624	D625	D626	D627	D628	D629	D631	D632	D633	D634	D635	D636	D637	D638	D639	D641	D642	D643	D644	D645	D646	D647	D648	D649	D651	D652	D653	D654	D655	D656	D657	D658	D659	D661	D662	D663	D664	D665	D666	D667	D668	D669	D671	D672	D673	D674	D675	D676	D677	D678	D679	D681	D682	D683	D684	D685	D686	D687	D688	D689	D691	D692	D693	D694	D695	D696	D697	D698	D699	D701	D702	D703	D704	D705	D706	D707	D708	D709	D711	D712	D713	D714	D715	D716	D717	D718	D719	D721	D722	D723	D724	D725	D726	D727	D728	D729	D731	D732	D733	D734	D735	D736	D737	D738	D739	D741	D742	D743	D744	D745	D746	D747	D748	D749	D751	D752	D753	D754	D755	D756	D757	D758	D759	D761	D762	D763	D764	D765	D766	D767	D768	D769	D771	D772	D773	D774	D775	D776	D777	D778	D779	D781	D782	D783	D784	D785	D786	D787	D788	D789	D791	D792	D793	D794	D795	D796	D797	D798	D799	D801	D802	D803	D804	D805	D806	D807	D808	D809	D811	D812	D813	D814	D815	D816	D817	D818	D819	D821	D822	D823	D824	D825	D826	D827	D828	D829	D831	D832	D833	D834	D835	D836	D837	D838	D839	D841	D842	D843	D844	D845	D846	D847	D848	D849	D851	D852	D853	D854	D855	D856	D857	D858	D859	D861	D862	D863	D864	D865	D866	D867	D868	D869	D871	D872	D873	D874	D875	D876	D877	D878	D879	D881	D882	D883	D884	D885	D886	D887	D888	D889	D891	D892	D893	D894	D895	D896	D897	D898	D899	D901	D902	D903	D904	D905	D906	D907	D908	D909	D911	D912	D913	D914	D915	D916	D917	D918	D919	D921	D922	D923	D924	D925	D926	D927	D928	D929	D931	D932	D933	D934	D935	D936	D937	D938	D939	D941	D942	D943	D944	D945	D946	D947	D948	D949	D951	D952	D953	D954	D955	D956	D957	D958	D959	D961	D962	D963	D964	D965	D966	D967	D968	D969	D971	D972	D973	D974	D975	D976	D977	D978	D979	D981	D982	D983	D984	D985	D986	D987	D988	D989	D991	D992	D993	D994	D995	D996	D997	D998	D999	D1001	D1002	D1003	D1004	D1005	D1006	D1007	D1008	D1009	D1011	D1012	D1013	D1014	D1015	D1016	D1017	D1018	D1019	D1021	D1022	D1023	D1024	D1025	D1026	D1027	D1028	D1029	D1031	D1032	D1033	D1034	D1035	D1036	D1037	D1038	D1039	D1041	D1042	D1043	D1044	D1045	D1046	D1047	D1048	D1049	D1051	D1052	D1053	D1054	D1055	D1056	D1057	D1058	D1059	D1061	D1062	D1063	D1064	D1065	D1066	D1067	D1068	D1069	D1071	D1072	D1073	D1074	D1075	D1076	D1077	D1078	D1079	D1081	D1082	D1083	D1084	D1085	D1086	D1087	D1088	D1089	D1091	D1092	D1093	D1094	D1095	D1096	D1097	D1098	D1099	D1101	D1102	D1103	D1104	D1105	D1106	D1107	D1108	D1109	D1111	D1112	D1113	D1114	D1115	D1116	D1117	D1118	D1119	D1121	D1122	D1123	D1124	D1125	D1126	D1127	D1128	D1129	D1131	D1132	D1133	D1134	D1135	D1136	D1137	D1138	D1139	D1141	D1142	D1143	D1144	D1145	D1146	D1147	D1148	D1149	D1151	D1152	D1153	D1154	D1155	D1156	D1157	D1158	D1159	D1161	D1162	D1163	D1164	D1165	D1166	D1167	D1168	D1169	D1171	D1172	D1173	D1174	D1175	D1176	D1177	D1178	D1179	D1181	D1182	D1183	D1184	D1185	D1186	D1187	D1188	D1189	D1191	D1192	D1193	D1194	D1195	D1196	D1197	D1198	D1199	D1201	D1202	D1203	D1204	D1205	D1206	D1207	D1208	D1209	D1211	D1212	D1213	D1214	D1215	D1216	D1217	D1218	D1219	D1221	D1222	D1223	D1224	D1225	D1226	D1227	D1228	D1229	D1231	D1232	D1233	D1234	D1235	D1236	D1237	D1238	D1239	D1241	D1242	D1243	D1244	D1245	D1246	D1247	D1248	D1249	D1251	D1252	D1253	D1254	D1255	D1256	D1257	D1258	D1259	D1261	D1262	D1263	D1264	D1265	D1266	D1267	D1268	D1269	D1271	D1272	D1273	D1274	D1275	D1276	D1277	D1278	D1279	D1281	D1282	D1283	D1284	D1285	D1286	D1287	D1288	D1289	D1291	D1292	D1293	D1294	D1295	D1296	D1297	D1298	D1299	D1301	D1302	D1303	D1304	D1305	D1306	D1307	D1308	D1309	D1311	D1312	D1313	D1314	D1315	D1316	D1317	D1318	D1319	D1321	D1322	D1323	D1324	D1325	D1326	D1327	D1328	D1329	D1331	D1332	D1333	D1334	D1335	D1336	D1337	D1338	D1339	D1341	D1342	D1343	D1344	D1345	D1346	D1347	D1348	D1349	D1351	D1352	D1353	D1354	D1355	D1356	D1357	D1358	D1359	D1361	D1362	D1363	D1364	D1365	D1366	D1367	D1368	D1369	D1371	D1372	D1373	D1374	D1375	D1376	D1377	D1378	D1379	D1381	D1382	D1383	D1384	D1385	D1386	D1387	D1388	D1389	D1391	D1392	D1393	D1394	D1395	D1396	D1397	D1398	D1399	D1401	D1402	D1403	D1404	D1405	D1406	D1407	D1408	D1409	D1411	D1412	D1413	D1414	D1415	D1416	D1417	D1418	D1419	D1421	D1422	D1423	D1424	D1425	D1426	D1427	D1428	D1429	D1431	D1432	D1433	D1434	D1435	D1436	D1437	D1438	D1439	D1441	D1442	D1443	D1444	D1445	D1446	D1447	D1448	D1449	D1451	D1452	D1453	D1454	D1455	D1456	D1457	D1458	D1459	D1461	D1462	D1463	D1464	D1465	D1466	D1467	D1468	D1469	D1471	D1472	D1473	D1474	D1475	D1476	D1477	D1478	D1479	D1481	D1482	D1483	D1484	D1485	D1486	D1487	D1488
------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	หทัยทิพย์ สัจจาวงศ์วานิชย์
วัน เดือน ปี เกิด	10 กันยายน 2536
สถานที่เกิด	กระบี่
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต ชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	46/10 หมู่ 3 ตำบลเขาใหญ่ อำเภออ่าวลึก ถนนเพชรเกษม จังหวัดกระบี่



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY