เอกสารผลงานวิชาการ

เรื่อง

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทราย โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อการเฝ้าระวังเชื้อในแมลงพาหะในช่วงปี พ.ศ. 2559 - 2562

โดย

นางพัชริดา บุญเดช

ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ ตำแหน่งเลขที่ 3277

กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทราย โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อการเฝ้าระวังเชื้อในแมลงพาหะในช่วงปี พ.ศ. 2559 - 2562

บทคัดย่อ

โรคลิชมาเนียเป็นโรคติดเชื้อในแมลงที่อุบัติใหม่ในประเทศไทย มีการรายงานการเกิดโรคอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2503 มีริ้นฝอยทรายซึ่งเป็นแมลงพาหะนำโรค การติดต่อเกิดจากคนถูกริ้นฝอยทรายเพศเมียที่มีเชื้อลิชมาเนียกัด อาการแสดงของโรคลิชมาเนียขึ้นกับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ คือ Cutaneous Leishmaniasis (CL) มีแผลตามผิวหนัง Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL) มีแผลที่ผิวหนังบริเวณที่มีเยื่อเมือก เช่น จมูก ปาก เป็นต้น และ Visceral Leishmaniasis (VL) หรืออีกชื่อหนึ่งว่า Kala azar เป็นการติดเชื้อในอวัยวะภายในร่างกาย เช่น ไขกระดูก ม้าม ต่อมน้ำเหลือง และตับ หากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาอาจทำให้เกิดอาการรุนแรงและมีโอกาสเสียชีวิตได้

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนีย ในตัวอย่างริ้นฝอยทรายที่เก็บจากพื้นที่ทั่วประเทศที่พบผู้ป่วย ในระหว่างปี พ.ศ 2559-2562 รวม 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย พะเยา อุบลราชธานี อำนาจเจริญ ศรีสะเกษ และสุราษฎร์ธานี การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนีย ทำโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ในตัวอย่างแบบรวมตัวอย่าง (pool) ซึ่งรวมตัวอย่างส่วนอกของริ้นฝอยทรายเพศเมียชนิดเดียวกัน ที่เก็บในสถานที่ วัน และเวลาเดียวกัน จำนวน 3-5 ตัวอย่าง/pool

ผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างริ้นฝอยทรายมีความหลากหลายถึง 29 ชนิด จำแนกได้ 2 สกุล ได้แก่ *Phlebotomus Sergentomyia* และตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ คิดเป็นร้อยละ 36.50 57.59 และ 5.91 ตามลำดับ (n=474) ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทรายจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Phlebotomus asperulus* ร้อยละ 7.7 (n=13) และ *Sergentomyia hodgsoni* ร้อยละ 6.3 (n=16) จากผลการศึกษาพบว่าริ้นฝอยทรายที่พบเชื้อลิชมาเนียมีโอกาสนำเชื้อมาสู่คนและได้ ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาระบบการเฝ้าระวังโรคลิชมาเนีย เพื่อการป้องกันควบคุมโรคในประเทศไทย

คำสำคัญ ริ้นฝอยทราย โรคลิชมาเนีย

Abstract

Leishmaniasis is an emerging disease In Thailand. The disease has been continuous reported since 1960. Sand fly is known as main vector which are common found in Thailand. Transmission occurs when a person is bitten by infected female sand flies carrying leishmania parasites. The symptoms of leishmaniasis are classified into three types based on the underlying pathology: Cutaneous Leishmaniasis (CL), a skin wound caused by a sand fly bite. Visceral Leishmaniasis (VL), also known as Kala azar, is an infection in the body's organs such as bone marrow, spleen, lymph nodes, and liver. Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL) is a skin lesion on mucous membranes such as the nose, mouth, etc. Untreated patient can lead to severe symptoms and death.

The objective of this study was to detected leishmania in various sand flies species, which collected from the area where patients were reported during 2016 to 2019. These areas were Chiang Rai, Phayao, Ubon Ratchathani, Amnat Charoen, Srisaket, and Surat Thani in total 6 provinces. Three to five thorax of female sand flies from same species, same area and collected date were pool. Then DNA of leishmania in female sand flies were examined by Conventional Polymerase chain reaction method.

The results found that there were 30 diversity sand flies species which can be classified into two genus. These were Phlebotomus, Sergentomyia and unidentified sandflies 36.50% 57.59% and 5.91% respectively (n=474). Leishmania's DNA was detected in 2 types of sandflies. Including *Phlebotomus asperulus* 7.7% (n=13) and *Sergentomyia hodgsoni* 6.3% (n=16). They are might be a potential vector of parasites, responsible for human and animal leaishmaniasis. The result strongly suggested that strengthen leishmaniasis surveillance system in Thailand is an urgent needed.

Keyword sand fly, leishmaniasis

กิตติกรรมประกาศ

โรคลิชมาเนียเป็นโรคอุบัติใหม่และปัจจุบันมีรายงานพบผู้ป่วยด้วยโรคนี้มากขึ้น โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคเหนือ และภาคใต้ และมักพบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ ดังนั้นผู้ศึกษาจึงมีความมุ่งหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์กับ ประชากรกลุ่มเสี่ยง บุคลากรทางการแพทย์ และเจ้าหน้าที่สาธารณสุขผู้ทำหน้าที่ในการรักษา และเฝ้าระวังป้องกันควบคุมโรค เพื่อให้เกิดการลดโรค ลดตายจากโรคนี้ได้ รวมถึงการได้ให้ความรู้ผู้ที่สนใจศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโรคลิชมาเนีย ได้บ้างไม่มากก็น้อย การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้ทำการศึกษาในครั้งนี้ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างควบคุมบวกที่ใช้ในการศึกษา และขอบคุณการสนับสนุนจากบุคลากรในศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค นักกีฏวิทยาและบุคลากรจากสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่รับผิดชอบด้านการเฝ้าระวังโรคลิชมาเนีย ที่ได้ทุ่มเทและตั้งใจทำงานนี้เพื่อประโยชน์ต่อผู้ป่วย ประชากร และการป้องกันควบคุมโรคของประเทศไทย และขออุทิศคุณงามความดีนี้แก่ผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคลิชมาเนียทุกท่าน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 คำถามการศึกษา	3
1.3 วัตถุประสงค์	3
1.4 สมมุติฐาน	3
1.5 ขอบเขตการศึกษา	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 สถานการณ์โรคลิชมาเนีย	4
2.2 วงจรการถ่ายทอดเชื้อมาลาเรีย	4
2.3 อาการแสดงของโรคลิชมาเนีย	5
2.4 ริ้นฝอยทรายแมลงพาหะนำโรคลิชมาเนีย	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการศึกษา	9
3.1 รูปแบบการศึกษา	9
3.2 พื้นที่ทำการศึกษา	9
3.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา	10
3.4 ขั้นตอนการทำการศึกษา	11
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล	14
บทที่ 4 ผลการศึกษา	15
4.1 ผลการตรวจหาเชื้อลิชมาเนียในตัวอย่างริ้นฝอยทราย ด้วยวิธี PCR	15
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผล	17
เอกสารอ้างอิง	19

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันพบว่ามีการติดเชื้อโรคลิชมาเนียในประชากรหลายทวีปทั่วโลก ได้แก่ แอฟริกา เอเชีย และละตินอเมริกา พบว่าปี ค.ศ. 2020 มีการระบาดมากถึง 98 ประเทศ โดย 71 ประเทศพบการระบาดของโรคลิชมาเนียทั้งชนิดติดเชื้อที่แสดงอาการที่อวัยวะภายใน visceral leishmania (VL) หรือ kala azar และ ชนิดติดเชื้อที่แสดงอาการทางผิวหนัง cutaneous leishmania (CL) 8 ประเทศพบเฉพาะการระบาดของ VL เพียงอย่างเดียว และ 19 ประเทศพบการระบาดของ CL เพียงอย่างเดียว (1) ทั้งนี้ยังพบว่ามีผู้ป่วยประเภท VL ประมาณ 0.2-0.4 ล้านคน ซึ่งผู้ป่วยมากถึงร้อยละ 90 พบใน 6 ประเทศ ได้แก่ อินเดีย เนปาล บังคลาเทศ ซูดาน ซูดานใต้ และบราซิล ส่วนผู้ป่วยประเภท CL ประมาณ 0.7-1.2 ล้านคน นั้นพบว่าผู้ป่วยจำนวนมากถึงร้อยละ 70-75 กระจายตัวอยู่ในประเทศ อัฟกานิสถาน แอลจีเรีย โคลอมเบีย บราซิล อิหร่าน ซีเรีย เอธิโอเปีย ซูดานเหนือ คอสตาริกา และเปรู (2) โดยในอดีตผู้ป่วยลิชมาเนียที่พบในประเทศไทยครั้งแรกเป็นการติดเชื้อลิชมาเนียประเภท VL ซึ่งทั้งหมดเป็นชาวต่างชาติที่เข้ามารักษาตัวในประเทศไทย จำนวน 3 ราย ได้แก่ชาวปากีสถาน ชาวอินเดีย และชาวบังคลาเทศ พบในปี พ.ศ. 2503 2520 และ 2527 ตามลำดับ และแรงงานไทยซึ่งมีประวัติเดินทางไปทำงานต่างประเทศซาอุดิอาระเบีย จำนวน 5 ราย (3) ในปี พ.ศ. 2527-2535 มีการรายงานว่าผู้ป่วยชายไทย อายุระหว่าง 25 – 42 ปี ซึ่งมีประวัติเดินทางไปทำงานต่างประเทศ ในแถบประเทศตะวันออกกลางซึ่งมีโรคลิชมาเนียเป็นโรคประจำถิ่นได้ติดเชื้อลิชมาเนียประเภท CL จำนวนทั้งสิ้น 11 ราย (4) ในปี 2539 - 2553 มีรายงานพบผู้ป่วยชาวไทยที่ไม่มีประวัติเดินทางไปนอกประเทศ (Indigenous case) จำนวน 15 ราย เป็นการติดเชื้อลิชมาเนีย ประเภท CL จำนวน 2 ราย และ VL จำนวน 13 ราย โดยผู้ป่วยบางรายมีการติดเชื้อเอชไอวีร่วมด้วย (3) ซึ่งผู้ป่วยได้อาศัยอยู่ในจังหวัดทางภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และส่วนใหญ่ได้อาศัยอยู่ในจังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย (5)

แมลงพาหะที่สำคัญของโรคลิชมาเนีย คือริ้นฝอยทราย ซึ่งมีมากกว่า 700 ชนิด และพบว่าประมาณ 70 กว่าชนิดเท่านั้นที่มีความสามารถเป็นพาหะนำเชื้อมาสู่คนและสัตว์ (5-7) ริ้นฝอยทรายเป็นแมลงที่จัดอยู่ในอันดับ (order) Diptera วงศ์ (family) Psychodidae และวงศ์ย่อย (subfamily) Phlebotomidae ประกอบด้วย 6 สกุล (genus) คือ *Phlebotomus, Lutzomyia*, *Sergentomyia, Warileya, Hertigia* และ *Brumpttomyia* (6) โดยริ้นฝอยทรายสกุล *Phlebotomus, Lutzomyia* และ *Sergentomyia* เท่านั้นที่ชอบดูดเลือดคน และสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง จึงคาดว่าริ้นฝอยทรายในสกุลดังกล่าวมีโอกาสนำโรคมาสู่คนและสัตว์ได้ โดยมีรายงานว่าพบริ้นฝอยทรายในทุกภาคของประเทศไทย (8) ในประเทศไทยนั้นมีการศึกษาชนิดและการกระจายตัวของริ้นฝอยทรายในพื้นที่ที่มีรายงานการเกิดโรคลิชมาเนีย จากกรณีศึกษาในพื้นที่ใกล้เคียงในจังหวัดเชียงราย พบความหลากหลายของริ้นฝอยทรายสกุล Sergentomyia และ Phlebotomus จำนวนรวมกันถึง 17 ชนิด (9) ต่อมามีการศึกษายืนยันว่าริ้นฝอยทรายชนิด *Sergentomyia gemmea* และ *Sergentomyia barraudi* นั้นเป็นพาหะที่มีโอกาสในการนำเชื้อ *Leishmania siamensis* ที่พบทางภาคใต้ของประเทศไทย (10, 11)

สัตว์รังโรคของเชื้อลิชมาเนียมีความหลากหลาย โดยในพื้นที่ป่ามักเป็นสัตว์ป่า ส่วนในพื้นที่ชนบทและกึ่งเมืองพบว่าสัตว์รังโรคนั้นเป็นจำพวกสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข และสัตว์กัดแทะจำพวกหนู (3) มีการศึกษาพบว่าหนูท้องขาว *Rattus rattus* เป็นสัตว์รังโรคที่มีส่วนในการแพร่เชื้อลิชมาเนียชนิด *Leishmania siamensis* ได้ (10) ต่อมานริศราและคณะ 2560 ได้ทำการศึกษา และรายงานการค้นพบเชื้อลิชมาเนียชนิดใหม่ ซึ่งมีชื่อว่า *Leishmania (Mundinia) orientalis* จัดอยู่ในชั้น (class) Kinetoplasea อันดับ (order) Trypanosomatidae สกุลย่อย (subgenus) *Leishmania (Mudinia)* ชนิด (species) *Leishmania (Mundinia) orientalis* และพบปัญหาในการรายงานผลยืนยันชนิดเชื้อลิชมาเนียชนิด *L. siamensis* ในผู้ป่วยก่อนหน้านี้นั้น เนื่องจากยังไม่มีการรายงานอย่างเป็นทางการ ไม่มีแหล่งตัวอย่างอ้างอิง (*nomen dunum*) และในกลุ่มตัวอย่างที่รายงาน ชนิดเชื้อ *L. siamensis* พบว่าไม่มีลักษณะเป็น monophyletic แต่มีลักษณะร่วมกันของเชื้อ 2 สายพันธุ์ คือ *L.enriettii* complex และ *L. (mundinia) matiniquensis* ดังนั้นจึงควรพิจารณายกเลิกการใช้ชื่อ *L. siamensis* (12-14)

วิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เพื่อวินิจฉัยโรคนี้ แบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ

1. การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อหาโดยตรงว่ามีเชื้อลิชมาเนียในตัวอย่างส่งตรวจหรือไม่ วิธีนี้ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) เมื่อตรวจพบเชื้อสามารถยืนยันได้ว่าผู้ป่วยติดเชื้อลิชมาเนีย วิธีนี้จะใช้สีย้อม เช่น Giemsa, Wright, Hematoxylin and eosin, Fluorescent in *situ* hybridization (FISH) และ Immunohistochemistry (IHC) โดยตัวอย่างที่เหมาะสมในการตรวจสำหรับผู้ป่วย CL คือการเจาะดูดตัวอย่างชิ้นเนื้อ (skin aspiration) การตัดชิ้นเนื้อ (skin biopsy) หรือ การขูดบริเวณผิวหนังรอยโรค (skin scraping) สำหรับผู้ป่วย VL ได้แก่ เลือด ไขกระดูก ม้าม ต่อมน้ำเหลือง วิธีนี้มีความจำเพาะสูงแต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความไวค่อนข้างต่ำ ขึ้นกับตัวอย่างส่งตรวจ ระยะของโรค และประสบการณ์ของผู้ตรวจ (5, 15-17) นอกจากนี้ยังสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อลิชมาเนียเพื่อแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างส่งตรวจมีเชื้อลิชมาเนียอยู่ ซึ่งจะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Schnieder's insect medium แต่วิธีนี้ใช้เวลานาน และต้องอาศัยผู้มีความชำนาญ

2. การตรวจวินิจฉัยทางอ้อม ได้แก่การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อลิชมาเนีย เหมาะกับผู้ป่วยประเภท VL เช่น Direct agglutination test (DAT), Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT), ELISA และ rK39 strip test เป็นต้น (7, 18, 19)

3. การตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนีย ได้แก่ การตรวจโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR), Quantitative PCR (qPCR) และ Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) ส่วนของยีนที่นิยมใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนีย ได้แก่ kDNA (kinetoplast DNA), ssRNA, ribosomal internal transcribed spacer (ITS), tubulin และ gp63 เป็นต้น (20, 21)

การรักษาโรคลิชมาเนียในปัจจุบัน ยาที่ใช้ในการรักษาโรคลิชมาเนียมีหลายชนิดได้แก่ ยา Amphotericin B, Pentavalent antimonials, Pentamidine, Miltefosine และ Paromomycin (5) การเลือกใช้ยารักษาขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของแพทย์ โดยยาที่ใช้รักษา CL ใช้ยาทาแผล paramomycin และยารับประทาน Azithromycin ยารักษา VL ขนานแรกคือยา Miletefosine และยาขนานที่สอง คือยา Amphotericin B และ Ambisome (Liposomal Amphotericin B) (3)

ในประเทศไทยถือได้ว่ามีปัจจัยและองค์ประกอบที่ก่อให้เกิดโรคลิชมาเนีย และทำให้เกิดการระบาดได้ เนื่องจากมีทั้งผู้ป่วยในประเทศ มีริ้นฝอยทรายซึ่งเป็นแมลงพาหะนำโรค ตัวเชื้อโรค และสัตว์มีกระดูกสันหลังเลี้ยงลูกด้วยนมที่คาดว่าจะเป็นรังโรคได้ อีกทั้งยังมีปัจจัยเสริมที่เกี่ยวข้องกับการระบาดในพื้นที่ เช่น การพัฒนาทางด้านเศรษฐกิจอย่างรวดเร็ว การบุกรุกพื้นที่ป่า ทำให้สิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วตามไปด้วย ในกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ตามชนบทมักจะประสบกับปัญหาเรื่องสุขาภิบาลที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ส่งผลให้แหล่งเพาะพันธ์ของริ้นฝอยทรายเพิ่มมากขึ้น และมีโอกาสเข้าดูดเลือดคนในชุมชนมากขึ้น (22) การอพยบย้ายถิ่นฐาน การเดินทางเพื่อไปทำงาน (23) อีกทั้งในระยะหลังพบว่ามีผู้ป่วยลิชมาเนียที่มีการติดเชื้อเอชไอวีร่วมด้วยเป็นจำนวนมากขึ้น และในประเทศไทยก็ได้พบผู้ป่วยลิชมาเนียรายแรกที่ติดเชื้อเอชไอวีร่วมด้วยเมื่อปี พ.ศ. 2552 (24) ปัจจุบันโรคนี้มีวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความถูกต้องแม่นยำ และมียาที่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เพื่อรักษาชีวิตของผู้ป่วยนอกเหนือจากการตรวจหาสาเหตุของโรคที่ถูกต้องแม่นยำ และการรักษาอย่างทันท่วงทีแล้ว การเฝ้าระวังป้องกันโรคก็มีความสำคัญไม่น้อยไปกว่ากัน ดังนั้นจึงนำมาสู่การศึกษาวิจัยครั้งนี้ เพื่อเป็นการเฝ้าระวังเชื้อในแมลงพาหะ จึงได้ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทรายซึ่งเป็นพาหะนำโรค เพื่อบ่งชี้ถึงความสำคัญของชนิดริ้นฝอยทรายที่อาจจะมีแนวโน้มเป็นพาหะที่มีศักยภาพนำโรค (potential vector) ของเชื้อลิชมาเนีย

1.2 คำถามการศึกษา

ชนิดของริ้นฝอยที่พบสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียมีแนวโน้มที่สามารถเป็นแมลงพาหะที่มีศักยภาพนำโรค (potential vector) ของเชื้อลิชมาเนียหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทราย โดยใช้วิธี PCR และอัตราการติดเชื้อก่อโรคลิชมาเนียของริ้นฝอยทราย

1.4 สมมุติฐาน

ริ้นฝอยทรายที่สำรวจจากพื้นที่ที่พบผู้ป่วย และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนีย คาดว่าน่าจะมีแนวโน้มที่สามารถเป็นแมลงพาหะที่มีศักยภาพนำโรค (potential vector) ของเชื้อลิชมาเนีย

1.5 ขอบเขตการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ดำเนินการศึกษาจากการรวบรวมข้อมูลการสำรวจริ้นฝอยทรายในจังหวัดที่ได้ดำเนินการเฝ้าระวังโรคลิชมาเนียในแมลงพาหะริ้นฝอยทรายในพื้นที่ที่มีรายงานพบผู้ป่วยลิชมาเนีย จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย พะเยา อุบลราชธานี อำนาจเจริญ ศรีสะเกษ และสุราษฎร์ธานี ในช่วงเวลาระหว่างปี พ.ศ.2559 – 2562 และทำการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในห้องปฏิบัติการ โดยดำเนินการ ณ ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อนำโดยแมลง กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความหลากหลายของชนิดฝอยทรายที่พบในพื้นที่จากภาคต่าง ๆ ที่ดำเนินการศึกษา
2. ทราบอัตราการติดเชื้อลิชมาเนียของริ้นฝอยทรายที่ทำการศึกษา

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สถานการณ์โรคลิชมาเนียในประเทศไทย

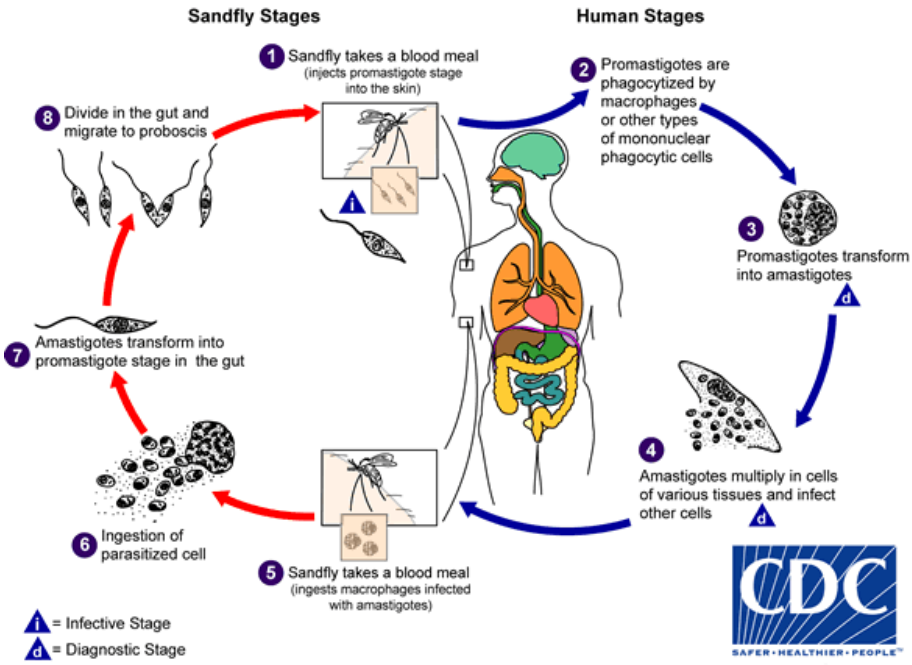
ผู้ป่วยโรคลิชมาเนียในประเทศไทย มีรายงานการพบอยู่ ๒ ประเภท คือ Visceral leishmaniasis (VL) และ Cutaneous leishmania (CL) จากทั้งหมดที่มีการแบ่งออกเป็น ๓ ประเภท โดยประเภทที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย คือ ชนิด Mucocutaneous leishmaniasis ในประเทศไทยมีรายงานการพบผู้ป่วยลิชมาเนียทั้ง 2 ประเภทดังกล่าวประปรายต่ำกว่า 5 รายในแต่ละปี ในอดีตพบเพียงเฉพาะการติดเชื้อจากต่างประเทศ แต่ในระยะ 20 ปีที่ผ่านมาพบว่า การรายงานการพบผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในประเทศ ในบริเวณภาคเหนือตอนบน และภาคใต้ จำนวนผู้ป่วยที่มีการรายงานครั้งล่าสุด ในปีงบประมาณ 2561 มีทั้งหมด 4 ราย โดย 3 ราย (VL=1 ราย, CL=2 ราย) เป็นการติดเชื้อในประเทศ 1 ราย (CL) เป็นการติดเชื้อนอกประเทศ ในขณะที่ปีงบประมาณ ๒๕๖๒ และ ๒๕๖๓ ที่ยังไม่มีรายงานผู้ป่วยรายใหม่

เกณฑ์การกำจัดโรคลิชมาเนียขององค์การอนามัยโลก คือการพบผู้ป่วย Visceral leishmaniasis รายใหม่ต่อปีไม่เกิน 1: 10,000 ในหน่วยอำเภอ องค์การอนามัยโลกให้ความสำคัญกับโรคลิชมาเนียชนิดนี้ เนื่องจากสามารถทำให้ผู้ติดเชื้อเสียชีวิตได้ จากที่ประเทศไทยมีรายงานการพบผู้ป่วยรายใหม่ประปรายในแต่ละปี มาตรการจึงเน้นหนักไปที่การเฝ้าระวังโรคเชิงรับเป็นหลัก ในรายที่สงสัยว่าเป็นโรคลิชมาเนียจะถูกส่งโลหิตและน้ำลาย เพื่อตรวจหาเชื้อลิชมาเนียด้วยวิธี PCR หรือในโรงพยาบาลอาจจะมีการเจาะไขกระดูกเพื่อตรวจหาเชื้อ และรายงานเข้าระบบการเฝ้าระวังโรคของประเทศ

การดำเนินงานเชิงรุก จะถูกดำเนินการต่อเมื่อมีรายงานการพบผู้ป่วยลิชมาเนียรายใหม่ ให้มีการส่งผู้ป่วยเข้ารับการรักษาให้หายขาด ค้นหาผู้ติดเชื้อเพิ่มเติม สำรวจริ้นฝอยทรายซึ่งเป็นพาหะ สำรวจรังโรคในสัตว์ และดำเนินการควบคุมโรค ด้วยการพ่นสารเคมี แนะนำให้นอนในมุ้งชุบสารเคมีเพื่อป้องกันริ้นกัด และแนะนำให้มีการปรับสภาพรอบบ้านไม่ให้เป็นแหล่งเกาะพักของพาหะ รวมไปถึงการสื่อสารความเสี่ยง

2.2 วงจรชีวิตของเชื้อลิชมาเนีย

เชื้อลิชมาเนียมีการเจริญเป็น 2 ระยะ คือ ระยะ amastigote พบในคนและสัตว์มีกระดูกสันหลัง และระยะ promastigote พบในริ้นฝอยทรายซึ่งเป็นแมลงพาหะนำโรค การติดต่อของโรคลิชมาเนียเกิดจากริ้นฝอยทรายเพศเมียดูดกินเลือดของคนหรือสัตว์ที่มีเชื้อลิชมาเนียอยู่ จากนั้นเชื้อลิชมาเนียระยะ amastigote ในเลือดจะเข้าสู่ทางเดินอาหารของริ้นฝอยทราย และเจริญเติบโตจากระยะ amastigote เป็นระยะ procyclics ใช้เวลา 18-24 ชั่วโมง และเจริญต่อเป็นระยะ nectomanads ใช้เวลา 3-4 วัน จนเข้าสู่ระยะ promastigote ซึ่งเป็นระยะติดต่อ (metacyclics) ใช้เวลา 8-12 วัน เมื่อริ้นฝอยทรายที่มีเชื้อดูดกินเลือดคนหรือสัตว์ ก็จะปล่อยเชื้อระยะ promastigote สู่คนหรือสัตว์และตัวเชื้อจะเข้าสู่เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage โดยวิธีกระบวนการ phagocytosis และ เปลี่ยนเป็นระยะ amastigote โดยกระบวนการ phagolysosome จากนั้นจะเพิ่มจำนวน แบบแบ่งสอง (Binary fission) จนกระทั้ง macrophage แตกออกปล่อยระยะ amastigote ออกมาแล้วเข้าสู่ macrophage ใหม่ โดยพบเชื้อในอวัยวะภายใน เช่น ไขกระดูก ตับ ม้าม เป็นต้น เมื่อริ้นฝอยทรายมาดูดกินเลือดของคนหรือสัตว์ที่มีเชื้อก็จะได้รับเชื้อระยะ amastigote และสามารถแพร่เชื้อได้ต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตเชื้อลิชมาเนีย

ที่มา : https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html

2.3 อาการแสดงของโรคลิชมาเนีย

ลักษณะอาการของโรคลิชมาเนีย ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อลิชมาเนียและระดับภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย โดยแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ คือ

1. อาการแสดงที่บริเวณผิวหนัง (Cutaneous leishmaniasis; CL)

เกิดอาการที่ผิวหนังบริเวณที่ถูกริ้นฝอยทรายกัด คือเกิดเป็นตุ่มแดง และจะขยายวงกว้างขึ้น ขอบแผลมีลักษณะนูน พบเลือดหรือน้ำเหลืองแห้งติดบนแผล เมื่อแผลหายอาจเกิดเป็นแผลเป็นได้ และพบว่าประมาณ 10% ของแผลเหล่านี้จะกลายเป็นแผลลักษณะคล้ายแผลซิฟิลิสหรือวัณโรคที่ผิวหนัง บริเวณกลางแผลมีลักษณะปกติ แต่ขอบแผลบวมแดง ใช้เวลานานหลายปีกว่าจะหายสนิท

ภาพที่ 2 อาการแสดงที่บริเวณผิวหนัง (Cutaneous leishmaniasis; CL)

ที่มา : http://www.odermatol.com/wp-content/uploads/image/2015_1/OURD-6-92-g001.jpg

2. อาการแสดงที่อวัยวะภายใน (Visceral leishmaniasis; VL)

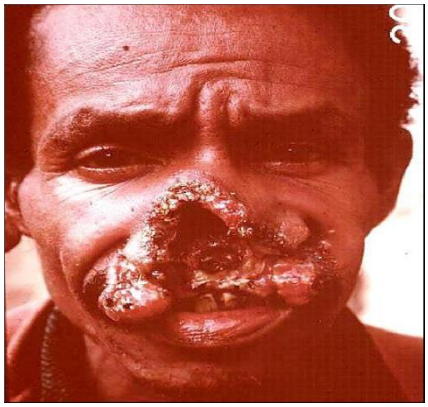
อาการลักษณะนี้เรียกอีกอย่างว่า Kala Azar ผู้ป่วยจะมีอาการอ่อนเพลีย คลื่นไส้ อาเจียน ผิวหนังแห้ง ตับโต ม้ามโต ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะ และบางรายจะมีต่อมน้ำเหลืองโต อีกทั้งมักพบมีลักษณะของเม็ดเลือดต่ำ (Pancytopenia) ซึ่งจะพบว่ามีอาการซีด จำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่า 4,000/ลบ.มม. มีจำนวนเกล็ดเลือดและอัลบูมินต่ำ หากไม่ได้รับการรักษามีโอกาสเสียชีวิตได้ ซึ่งผู้ป่วยจะเสียชีวิตจากภาวะแทรกซ้อนต่างๆ อาการโรคลักษณะนี้นับเป็นลักษณะอาการโรคที่รุนแรง

ภาพที่ 3 อาการแสดงที่อวัยวะภายใน (Visceral leishmaniasis; VL)

ที่มา : https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780323555128001046-f104002-002-9780323555128.jpg

3. อาการแสดงที่เยื่อเมือก (Mucocutaneous leishmaniasis; ML)

ลักษณะอาการคล้ายกับการเกิดที่บริเวณผิวหนังแต่จะเกิดแผลลุกลามในอวัยวะที่มีเยื่อเมือก เช่น จมูก ปาก ผู้ป่วยมีไข้ ซีด อ่อนเพลีย น้ำหนักลด อาจจะทำให้รูปหน้าผิดไปจากเดิม หากอาการรุนแรงไม่ได้รับการรักษา อาจจะทำให้เสียชีวิตได้



ภาพที่ 4 อาการแสดงที่เยื่อเมือก (Mucocutaneous leishmaniasis; ML)

ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/2-Mucocutaneous-leishmaniasis-lesion-Photo-source-unknown_fig2_271207020

2.4 ริ้นฝอยทรายแมลงพาหะนำโรคลิชมาเนีย

วงจรชีวิตของริ้นฝอยทราย

ริ้นฝอยทรายเป็นแมลงที่มีการเจริญแบบสมบูรณ์แบบ Complete metamorphosis ประกอบด้วย 4 ระยะ คือ ระยะไข่ (egg) ระยะตัวอ่อน (larva) ดักแด้ (pupa) และตัวเต็มวัย (adult) ดังภาพที่ 5 และมีวงจรชีวิตตามระยะต่าง ๆ ดังนี้

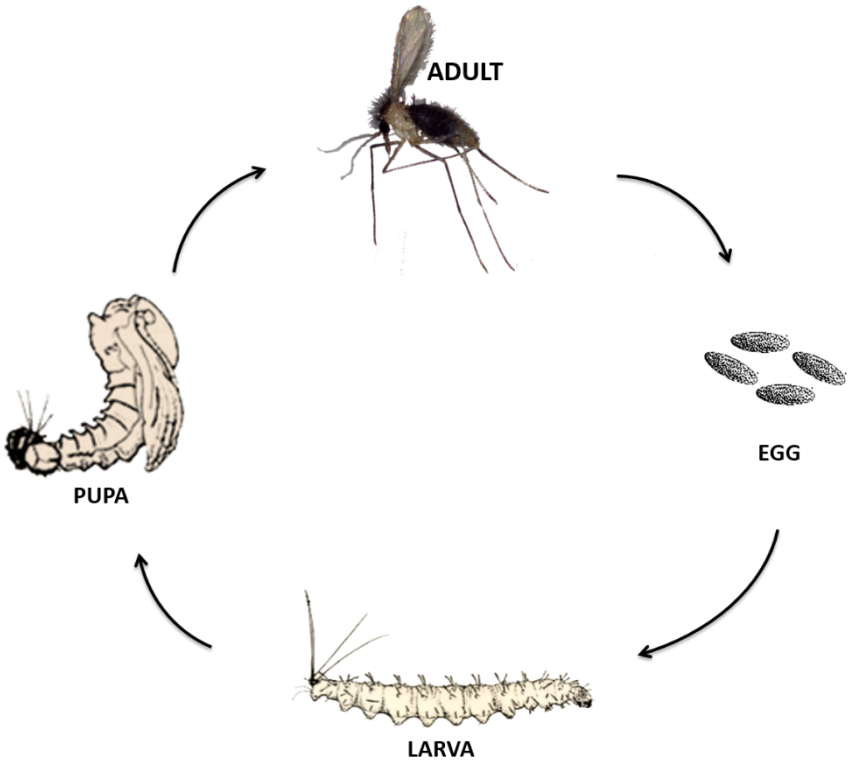
ระยะไข่ ริ้นฝอยทรายเพศเมียจะวางไข่เป็นฟองเดี่ยว ๆ ตามพื้นดินที่ชื้นแฉะ และมีอินทรียวัตถุ ซึ่งจะเป็นแหล่งอาหารของตัวอ่อนหลังจากฟักออกมาจากไข่ เช่น คอกสัตว์ กองขยะ ตามรอยแยกของหินหรืออิฐ รอยแตกของอาคารหรือบ้าน รูที่สัตว์ฟันแทะอาศัยอยู่ โพรงไม้ที่มีความชื้นสูง โดยจะวางไข่ครั้งละ 30-70 ฟอง ภายใน 30-60 ชั่วโมง หลังจากดูดเลือดคนหรือสัตว์ ไข่ของริ้นฝอยทรายมีลักษณะยาวรี ขนาดประมาณ 0.3-0.4 มม. สีน้ำตาลแก่ ผิวเป็นลักษณะคล้ายกระเบื้องโมเสค และจะฟักออกเป็นตัวอ่อนโดยใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และความชื้น

ระยะตัวอ่อน ระยะนี้จะมีการเจริญเติบโตและลอกคราบ 4 ครั้ง ตัวอ่อนมีสีขาว ลักษณะยาวคล้ายหนอนผีเสื้อส่วนหัวและเขี้ยวมีขนาดใหญ่ ลำตัวมี 12 ปล้อง ตัวอ่อนชอบอยู่บริเวรณที่มีความชื้นแฉะ หากอยู่ในที่แห้งอาจตายได้ อาศัยกินอินทรียวัตถุบนที่ชื้น ใช้เวลาประมาณ 3-8 สัปดาห์ จึงลอกคราบเข้าสู่ระยะดักแด้

ระยะดักแด้ ระยะนี้ทนความแห้งแล้งได้ดีกว่าระยะตัวอ่อน ไม่กินอาหาร ใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน จึงจะเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย

ระยะตัวเต็มวัย หลังจากออกมาจากดักแด้แล้ว ตัวเต็มวัยจะมีอายุประมาณ 14-30 วัน ริ้นฝอยทรายเป็นแมลงขนาดประมาณ 1.5-4 มม. มีสีเหลืองหรือเหลืองหม่น มีขนปกคลุมทั่วตัว มีปีกแคบรูปใบหอกตั้งขึ้น มีเส้นปีก (wing venation) เป็นเส้นขนานทั้งหมด เวลาเกาะพักจะหุบปีกเป็นรูปหลังคาคล้ายตัว “V” ปากมีลักษณะเป็นแบบแทงดูด (piecing suckling type) ริ้นฝอยทรายส่วนใหญ่เคลื่อนที่โดยการกระโดด (hopping) หรือโผไปมากกว่าการบิน โดยกระโดดสูงจากพื้นไม่เกิน 1 เมตร และบินได้ไม่ไกล ริ้นฝอยทรายเพศเมียเท่านั้นที่ดูดเลือดคนหรือสัตว์เพื่อการเจริญเติบโตของไข่ และมักออกออกหากินเวลากลางคืน

ในประเทศไทยมีรายงานพบริ้นฝอยทรายแล้วอย่างน้อย 24 ชนิด *ได้แก่ Ph. argentipes, Ph. philippinensis, Ph. asperulus, Ph. hoepplii, Ph. stantoni, Ph. major major, Ph. teshi, Ph. Mascomai, Se. barraudi, Se. adonontis, Se. bailyi, Se. dentata, Se. iyengari, Se. mahadevani, Se. silvatica, Se. gemmea, Se. hodgsoni hodgsoni, Se. indica, Se. peturbans, Se. quatei, Se. punabensis, Nemopalpus vietnamensis, Chinus barbazani* และ *Ph. barguesae* นับจากอดีดถึงปัจจุบันมีรายงานการสำรวจริ้นฝอยทรายอย่างน้อยใน 34 จังหวัดของประเทศไทย โดยใช้การดักจับริ้นฝอยทรายหลายวิธี เช่น การใช้กับดักแสงไฟ (light trap) การใช้สัตว์เป็นเหยื่อล่อ (animal-bait traps) การใช้คนเป็นเหยื่อล่อ (human landing collection) การดูดจับโดยใช้ aspirator และการใช้กับดักเหนียว (sticky trap) เป็นต้น แต่วิธีที่นิยมและมีประสิทธิภาพสูงสุดคือ การใช้กับดักแสงไฟ



ภาพที่ 5 วงจรชีวิตของริ้นฝอยทราย

ที่มา : http://vectorinfo.icmr.org.in/Lifecycle/fly.png

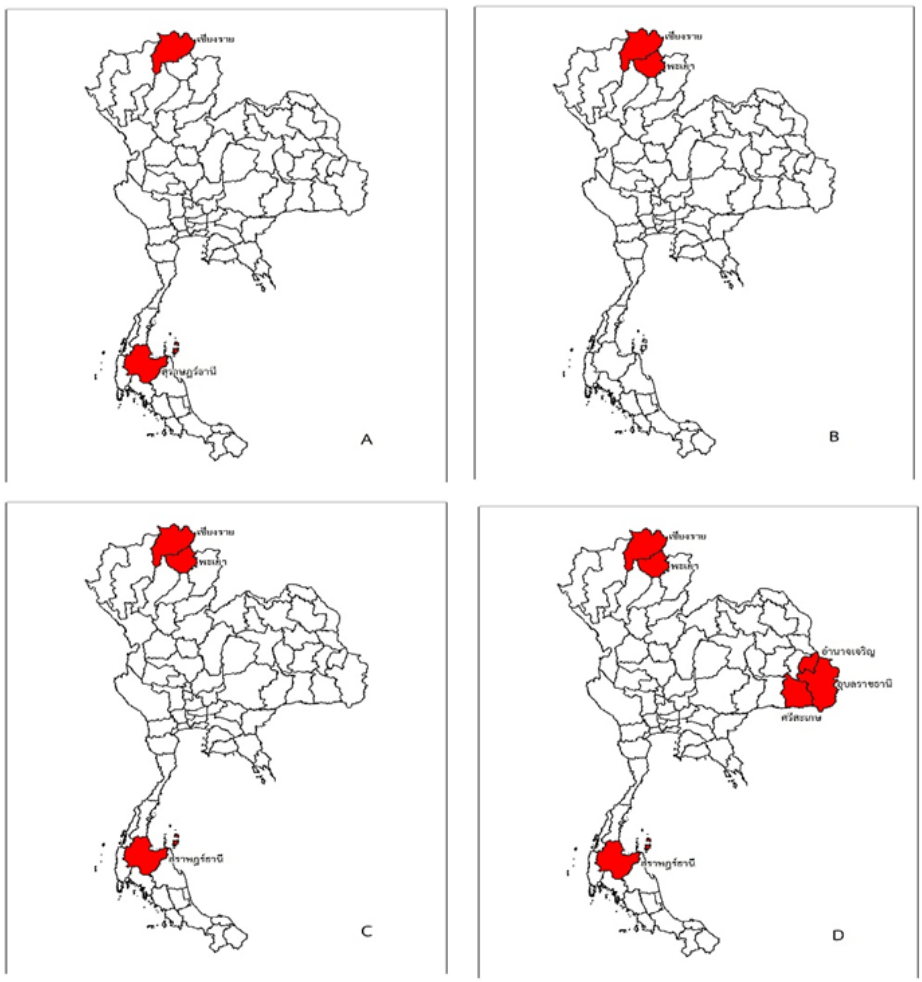
บทที่ 3
วิธีดำเนินการศึกษา

3.1 รูปแบบการศึกษา

การศึกษาโดยการรวบรวมริ้นฝอยทรายจากการสำรวจของหน่วยงานภาคสนามในพื้นที่ที่มีผู้ป่วยลิชมาเนีย แล้วทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทรายด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) และหาอัตราการติดเชื้อก่อโรคลิชมาเนียในริ้นฝอยทราย

3.2 พื้นที่ทำการศึกษา

จังหวัดที่ได้ดำเนินการเฝ้าระวังโรคลิชมาเนียในแมลงพาะหะริ้นฝอยทราย หรือในพื้นที่ที่มีรายงานพบผู้ป่วยลิชมาเนีย จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย พะเยา อุบลราชธานี อำนาจเจริญ ศรีสะเกษ และสุราษฎร์ธานี ในช่วงเวลาระหว่างปี พ.ศ. 2559 – 2562 ดังแสดงในภาพที่ 6 และมีพิกัดจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างริ้นฝอยทรายทั้งหมด 14 จุด โดยมีรายละเอียดแต่ละปีตามรายจังหวัด ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 6 แผนที่ประเทศไทยแสดงจังหวัดที่เก็บริ้นฝอยทรายในจำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย พะเยา อุบลราชธานี อำนาจเจริญ ศรีสะเกษ และจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยภาพ A B C D แสดงจังหวัดที่เก็บตัวอย่างริ้นฝอยทราย ในปี พ.ศ. 2559-2562 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงตำแหน่งพิกัดของจุดที่เก็บตัวอย่างริ้นฝอยทราย ในช่วงเวลาระหว่างปี พ.ศ. 2559-2562

ปี พ.ศ.	จังหวัด	จุดที่เก็บตัวอย่าง
2559	เชียงราย	วัดเจดีย์หลวง
		วนอุทยานถ้ำหลวง-ขุนน้ำนางนอน
	สุราษฎร์ธานี	ถ้ำหอม
2560	เชียงราย	อ. เวียงชัย
	พะเยา	วนอุทยานแห่งชาติดอยภูนาง
2561	เชียงราย	หมู่ 3 บ้านสันบุญเรือง จ.เกาะช้าง อ.แม่สาย
		หมู่ 7 ต.แม่ฟ้าหลวง อ.แม่ฟ้าหลวง
	พะเยา	หมู่ 16 หน่วยจัดการต้นน้ำผาหม่น (ภูอานม้า) ต.ร่มเย็น อ.เชียงคำ
		วัดอนาลโยทิพยาราม อ.เมือง
	สุราษฎร์ธานี	หมู่ 1 บ้านปลายศอก ต.คลองน้อย อ.ชัยบุรี
2562	อุบลราชธานี	ไม่ระบุ
	อำนาจเจริญ	ไม่ระบุ
	ศรีสะเกษ	วิทยาลัยเกษตร และเทคโนโลยี
	เชียงราย	วนอุทยานถ้ำหลวง-ขุนน้ำนางนอน
	พะเยา	โครงการอ่างเก็บน้ำน้ำปี้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ
	สุราษฎร์ธานี	หมู่ 1 บ้านปลายศอก ต.คลองน้อย อ.ชัยบุรี

3.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1.วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 ถุงมือยางแบบไร้แป้ง

1.2 กระดาษทิชชู

1.3 หลอดทดลองขนาด 1.5 มล.

1.4 ที่วางหลอดทดลองขนาด 1.5 – 2.0 มล.

1.5 นาฬิกาจับเวลา

1.6 ชุดน้ำยาสกัด QAIsymphony DSP virus/Pathogen midi Kit (Qiagen, Germany)

1.7 ไมโครปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 2, 20, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.8 Filter tip

1.9 Nuclease free water

1.10 หลอด real-time PCR ชนิดติดกันเป็น strip 8 หลอด ขนาด 200 ไมโครลิตร

1.11 1XPBS

1.12 Isofreeze PCR rack

1.13 Primer

1.14 Invitrogen Taq DNA Polymerase (Thermos Fisher scientific, USA

2. เครื่องมือ

2.1 ตู้เย็น -20 ºC

2.2 Vortex mixer

2.3 Centrifuge

2.4 Heat Block

2.5 เครื่องบดเนื้อเยื่อแมลง Tissue grinder homogenizer และสากบดพลาสติก (tissue grinder pestle)

2.6 Thermocycle รุ่น Bio-Rad C1000 Thermal Cycle

3.4 ขั้นตอนการศึกษา

วิธีการเตรียมตัวอย่างริ้นฝอยทราย

1. เจ้าหน้าที่กีฏวิยาในภาคสนามทำการวางกับดักริ้นฝอยทรายโดยใช้กับดักแสงไฟ (Light trap) ดำเนินการในพื้นที่ที่มีการรายงานการเกิดโรคลิชมาเนีย หรือพื้นที่ใกล้เคียงเพื่อการเฝ้าระวัง เลือกวางกับดักในบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมและเอื้อต่อการเป็นแหล่งเพาะพันธุ์และเป็นที่อยู่ของริ้นฝอยทราย เช่น พื้นที่มีความชื้นสูง ดินบริเวณที่อุดมไปด้วยสารอินทรีย์วัตถุเน่าเปื่อยทับถม โพรงไม้ จอมปลวก คอกเลี้ยงสัตว์ เป็นต้น วางกับดักในช่วงเวลาใกล้ค่ำ และเก็บกับดักในเวลาเช้าของวันถัดไป

2. นำริ้นฝอยทรายที่ได้มาทำให้สลบด้วยอีเทอร์ จากนั้นแยกริ้นฝอยทรายออกจากแมลงอื่นๆ ภายใต้กล้อง stereo microscope คัดเลือกริ้นฝอยทรายเฉพาะเพศเมียตัดริ้นฝอยทรายออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอกถึงท้องปล้องที่ 5 และส่วนท้องปล้องที่ 6-8 แล้วจำแนกชนิดโดยใช้ส่วนหัว และส่วนท้องปล้องที่ 6-8 แล้วนำเฉพาะส่วนอกของริ้นฝอยทรายที่ทราบชนิดแล้ว ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 90-95 % ให้ท่วมตัวอย่าง แล้วปิดฝา พันทับด้วยพาราฟิล์ม และทำการรวมตัวอย่างส่งตรวจแบบรวมตัวอย่าง (pool) ซึ่งรวมตัวอย่างส่วนอกของริ้นฝอยทรายเพศเมียชนิดเดียวกัน ที่เก็บในสถานที่ วัน และเวลาเดียวกัน จำนวน 3-5 ตัวอย่าง/pool แล้วจัดส่งตัวอย่างมายังศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อนำโดยแมลง เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทราย

ขั้นตอนการตรวจตัวอย่างริ้นฝอยทรายด้วยวิธี PCR

1. ลงทะเบียนรับตัวอย่างริ้นฝอยทราย ซึ่ง pool รวมตัวอย่างโดยมีส่วนอกของริ้นฝอยทรายเพศเมีย 3-5 อก/pool ที่เป็นชนิดเดียวกัน เก็บในสถานที่ วัน และเวลาเดียวกัน

2. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทราย

การสกัด DNA จากตัวอย่างริ้นฝอยทรายด้วยชุดสกัด QAIsymphony DSP virus/Pathogen midi Kit (Qiagen, Germany) ด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ QAIsymphony (Qiagen) ซึ่งมีขั้นตอนและวิธีการดังต่อไปนี้

1) นำตัวอย่างริ้นฝอยทรายมาบดให้ละเอียด โดยเติม 1xPBS ปริมาตร 70 µl ลงในหลอดขนาด 1.5 ml ที่บรรจุริ้นฝอยทราย แล้วบดโดยใช้เครื่อง tissue grinder
2) เติม ALT 500 µl
3) เติม Proteinase K 50 µl แล้ว vertex และปั่นตก ให้สารละลายรวมที่ก้นหลอด
4) Incubate ที่ 56 °C นาน 60 นาที เมื่อครบเวลา ให้ปั่นตก

5) ดูดสารละลายที่ได้จากข้อ 4 ปริมาตร 500 µl ลงใน หลอดปริมาตร 2 มล. แล้วเรียงลงใน rack สำหรับนำตัวอย่างเข้าเครื่องสกัด ตามลำดับ
6) เตรียม carrier RNA และ internal control โดยใช้อัตราส่วนของน้ำยา Carrier RNA, IC และ AVE Buffer ตามจำนวนตัวอย่างที่ทำการสกัด ดังแสดงในตารางที่ 1
7) นำ carrier RNA ที่เตรียมแล้ว เรียงใน rack สำหรับนำเข้าเครื่องสกัด
8) ป้อนคำสั่งขั้นตอนการสกัด DNA ตามคู่มือของบริษัท
9) เก็บตัวอย่าง DNA ที่ Elute มา 60 µl ไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้งาน

ตารางที่ 1 ตารางแสดงอัตราส่วนของน้ำยาเพื่อใช้เตรียม carrier RNA และ internal control

Complex400/800 (Rxn)	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Carrier RNA (µl)	12	15	18	21	24	27	30	33
IC (µl)	36	45	54	63	72	81	90	99
AVE Buffer (µl)	432	540	648	756	864	972	1080	1188
Total (µl)	**480**	**600**	**720**	**840**	**960**	**1080**	**1200**	**1320**
Complex400/800 (Rxn)	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**
Carrier RNA (µl)	36	39	42	45	48	51	54	57
IC (µl)	108	117	126	135	144	153	162	171
AVE Buffer (µl)	1296	1404	1502	1620	1728	1836	1944	2052
Total (µl)	**1440**	**1560**	**1670**	**1800**	**1920**	**2040**	**2160**	**2280**
Complex400/800 (Rxn)	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**
Carrier RNA (µl)	60	63	66	69	72	75	78	81
IC (µl)	180	189	198	207	216	225	234	243
AVE Buffer (µl)	2160	2268	2376	2484	2592	2700	2808	2916
Total (µl)	**2400**	**2520**	**2640**	**2760**	**2880**	**3000**	**3120**	**3240**

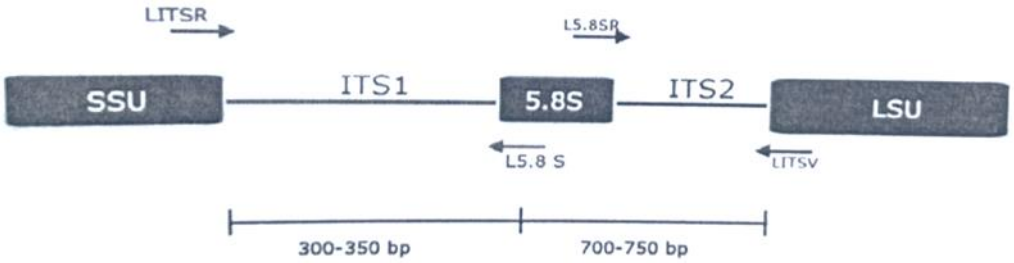
การเตรียมสารละลาย Carrier RNA :

โดยดูด Buffer AVE (2 vials) 1,350 µl **+** carrier RNA (Keep at -20 °C)

<u>หมายเหตุ</u> : 1. ห้ามเติมสารมากกว่า 1.92 ml ในหลอด conical 2 ml.

2. กรณีไม่มี Internal control (IC) ให้เพิ่มปริมาน AVE Buffer แทนปริมาตร IC

3. ตรวจหา DNA ของเชื้อลิชมาเนีย โดยใช้เทคนิค PCR
ซึ่งเป็นการตรวจหาในส่วนของยีน International Transcribed Spacer 1 (ITS1) (25-27)
ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงส่วนของยีน International Transcribed Spacer 1 (ITS1) ของริ้นฝอยทราย

primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของ DNA มีลำดับเบส ดังนี้

Forward primer: LITSR – 5’ CTGGATCATTTTCCGATG 3’

Reverse primer: L5.8S – 5’ TGATACCACTTATCGCACTT 3’

ในปฏิกิริยา PCR เริ่มจากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยอาศัย DNA ต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณที่ต้องการ ทำปฏิกิริยาซ้ำๆ ประมาณ 35 รอบ ในส่วนประกอบของปฏิกิริยาปริมาตรรวมทั้งหมด 20 µl ประกอบด้วยสารต่างๆ ได้แก่ PCR buffer 1x, dNTP 200 µM, $MgCl_2$ 1.5 mM, Primer – LITSR 0.25 µM, Primer - L5.8S 0.25 µM, Taq polymerase enzyme 1 unit nuclease-free water และ DNA template เครื่อง PCR ที่ใช้ คือ Bio-Rad C1000 Thermal Cycle (Bio-Rad Laboratories) ดังแสดงในภาพที่ 8 โดยแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยามีรายละเอียดดังนี้

1. 95 °C 2 mins 1 cycle
2. 95 °C 20 secs
3. 53 °C 30 secs } ขั้นตอนที่ 2-4 35 cycles
4. 72 °C 1 mins
5. 72 °C 6 mins 1 cycle
6. 4 °C hold

ภาพที่ 8 เครื่อง PCR รุ่น Bio-Rad C1000 Thermal Cycle

4. การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้ โดยใช้เทคนิค gel electrophoresis ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกดีเอ็นเอ หรือวิเคราะห์ขนาดและคุณภาพของดีเอ็นเอ ภายใต้สนามไฟฟ้า โดยผ่านตัวกลางคือเจล ใช้ agarose gel ที่ความเข้มข้น 2% ใช้กระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที สีย้อมดีเอ็นเอที่ใช้คือ SYBR® Safe ซึ่งมีความปลอดภัยมากกว่า ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ใช้ DNA marker/DNA ladder ขนาด 100 base pairs ที่รู้ขนาดความยาวของดีเอ็นเอแน่นอนเป็นมาตรฐานเทียบกับขนาดของผลผลิต PCR มี Positive control และ Negative control ด้วยเสมอ เพื่อความถูกต้องน่าเชื่อถือของการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง เครื่องที่ใช้ในการ Run gel electrophoresis คือ เครื่อง Mupid-exU (Mupid, Japan) ดังแสดงในภาพที่ 9

ภาพที่ 9 เครื่อง Run gel electrophoresis รุ่น Mupid-exU

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

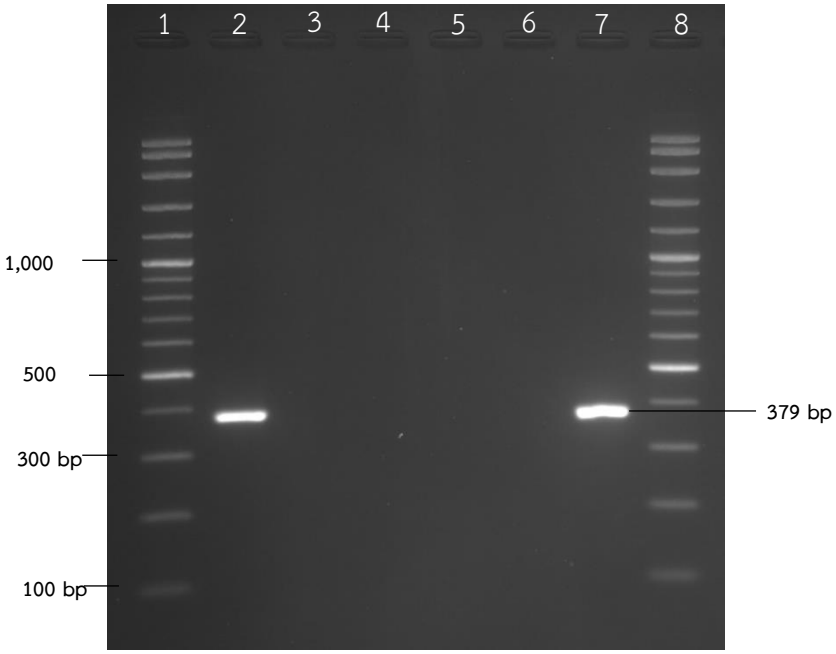
ตรวจสอบความถูกต้อง เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลสถิติเชิงพรรณา ได้แก่ ค่าร้อยละ และหาอัตราการติดเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทราย (Minimum infection rate) (28, 29)
โดยมีสูตรในการคำนวณดังนี้

$$\text{Minimum infection rate} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ (pool)} \times 100}{\text{จำนวนตัวอย่างชนิดเดียวกับที่พบเชื้อทั้งหมด (pool)}}$$

บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 ผลการตรวจหาเชื้อลิชมาเนียในตัวอย่างริ้นฝอยทราย ด้วยวิธี PCR

จากการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer LITSR และ L5.8S ในตัวอย่างบวกพบว่า DNA product ที่ได้จะมีขนาด 379 base pairs ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดงผลตรวจ PCR เมื่อช่องที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 100 bp ช่องที่ 2, 4, 5 แสดงผลตัวอย่างที่มีผลลบ ช่องที่ 3 แสดงผลตัวอย่างที่มีผลบวก ช่องที่ 6 แสดงผลตัวอย่างควบคุมลบ และช่องที่ 7 แสดงผลตัวอย่างควบคุมบวก

จากการรวบรวมข้อมูลพบว่ามีความหลากหลายของชนิดริ้นฝอยทรายจำนวน 29 ชนิด จาก 2 สกุล คือ สกุล *Phlebotomus* จำนวน 173 pool คิดเป็นร้อยละ 30.40 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ชนิดริ้นฝอยทรายที่พบจำนวนมากที่สุดในสกุลนี้คือ *Ph. stantoni* จำนวน 139 pool และสกุล *Sergentomyia* จำนวน 273 pool คิดเป็นร้อยละ 57.59 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ชนิดของริ้นฝอยทรายที่พบมากที่สุดในสกุลนี้คือ *Se. barraudi* จำนวน 77 pool นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายได้ จำนวน 28 pool คิดเป็นร้อยละ 5.91 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และพบว่าจำนวนริ้นฝอยทรายในปี 2561 พบจำนวนริ้นฝอยทรายมากที่สุดจำนวน 175 pool รองลงมาคือ ปี 2560 พบริ้นฝอยทรายจำนวน 156 pool และปี 2559 และ ปี 2562 พบริ้นฝอยทรายจำนวน 91 และ 52 pool ตามลำดับ

ผลการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในตัวอย่างริ้นฝอยทรายเพศเมียทั้งสิ้น 474 pool พบว่าในปี 2559 ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทรายจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Ph. asperulus* (1/13) pool คิดเป็นอัตราการติดเชื้อลิชมาเนียร้อยละ 7.7 และ *Se. hodgsoni* จำนวน (1/16) pool คิดเป็นอัตราการติดเชื้อลิชมาเนีย ร้อยละ 6.3 ในขณะที่ปี 2560-2562 ตรวจไม่พบเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทราย รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของลิชมาเนียในตัวอย่างริ้นฝอยทรายด้วยวิธี PCR ระหว่างปี พ.ศ. 2559 - 2562

ชนิดริ้นฝอยทราย	ปี 2559		ปี 2560		ปี 2561		ปี 2562		รวม	อัตราการติดเชื้อ(%)
	N	P	N	P	N	P	N	P	(pool)	
P. betisi	2		2						4	-
P. argentipes	4				6				10	-
P. asperulus	7	1	5						13	7.7
P. brevicaulis	1								1	-
P. colabaensis	1		1						2	-
P. longiduetus	1								1	-
P. stantoni	8		54		69		8		139	-
P. mascomai					1				1	-
P. teshi					2				2	-
Se. purii	32		9						41	-
Se. anodontis	8		19		2				29	-
Se. barraudi	6		24		35		12		77	-
Se. hodgsoni	5	1	10						16	6.3
Se. iguatei	1								1	-
Se. indica	1		13				10		24	-
Se. iyengari	1		5		11		3		20	-
Se. khawi	1								1	-
Se. linearis	1								1	-
Se. punjabensis	1		1		1				3	-
Se. rudnicki	2								2	-
Se. silvatica	5								5	-
Se. spinigaucis	1								1	-
Se. brevicaulis			4		11		5		20	-
Se. dentata			3		2		1		6	-
Se. pertunbans			1						1	-
Se. bailyi					4		1		5	-
Se. papatasi					1				1	-
Se. quetei					10				10	-
Se. hivernus							9		9	-
Unkhown			5		20		3		28	-
ผลรวมทั้งหมด	89	2	156	-	175	-	52	-	474	0.4
ร้อยละ	18.78	0.42	32.91	-	36.92	-	10.97	-	100	

หมายเหตุ : N=Negative, P=Positive

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผล

วิธีการจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายในการศึกษานี้ใช้สัณฐานวิทยาในการระบุชนิด จากข้อมูลชนิดของริ้นฝอยทรายที่ทำการศึกษา พบว่ามีริ้นฝอยทรายจำนวน 28 pool ที่ไม่สามารถระบุชนิดของริ้นฝอยทรายได้ เนื่องจากริ้นฝอยทรายบางชนิดมีความแตกต่างกันน้อยมาก อีกทั้งเทคนิคในการเตรียมตัวอย่าง และความชำนาญของผู้ตรวจนับว่ามีผลต่อการจำแนกชนิดเป็นอย่างมาก ปัจจุบันมีการนำวิธีการอื่นมาใช้จำแนกชนิดของริ้นฝอยทราย เช่น การศึกษาระดับอณูชีววิทยา โดยการทำ DNA barcode มาแยกชนิดของริ้นฝอยทราย ซึ่งให้ผลที่แม่นยำมากขึ้น (30-32)

ในการศึกษานี้ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในระดับสกุล ดังนั้นในการศึกครั้งต่อไปควรนำเทคนิคการจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อให้ทราบถึงชนิดของเชื้อลิชมาเนีย เช่น การทำ PCR-RFLP และ DNA sequencing ด้วย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ ส่วนการจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายนั้น ควรนำเทคนิคการจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายในระดับอนูชีวโมเลกุล โดยการศึกษา DNA barcode ซึ่งจะช่วยให้ระบุชนิดของริ้นฝอยทรายได้แม่นยำขึ้น

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทรายเพื่อทำการเฝ้าระวังโรคลิชมาเนียในพื้นที่ตามภูมิภาคต่างๆ ที่พบผู้ป่วยในประเทศไทย จากพื้นที่ทั้งหมด 6 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย พะเยา อุบลราชธานี อำนาจเจริญ ศรีสะเกษ และสุราษฎร์ธานี ในช่วงปี พ.ศ. 2559-2562 ตัวอย่างริ้นฝอยทรายที่ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียมีความหลากหลายมากถึง 29 ชนิดแบ่งออกเป็น 2 สกุล คือ *Phlebotomus* จำนวน 173 pool (36.50%) และ *Sergentomyia* จำนวน 273 pool (57.59%) และมีตัวอย่างริ้นฝอยทรายที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้จำนวน 28 pool (5.91%) จำนวนตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 474 pool ชนิดของริ้นฝอยทรายที่พบมาก 3 อันดับแรก คือ *Ph. Stantoni* (29.32%) *Se. barraudi* (16.24%) และ *Se. purii* (8.65%) ในขณะที่การศึกษาของทวีศักดิ์ ศรีวงค์พันธ์ และคณะ ปี 2560 (33) ได้สำรวจริ้นฝอยทรายในภาคเหนือ พบริ้นฝอยทรายสกุล *Phlebotomus* 65 ตัว (15.1%) และสกุล *Sergentomyia* จำนวน 365 ตัว (84.9%) และพบว่ามีความหลากหลายของชนิดริ้นฝอยทรายถึง 17 ชนิด ชนิดที่พบมากที่สุดคือ *Se. punjabensis* (31.2%) และในการศึกษาของรักษิณา และคณะ ปี 2554 (34) ได้ทำการจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายในเขตภาคเหนือตอนล่าง ชนิดของริ้นฝอยทรายที่พบมากที่สุดคือ *Se. anodontis* (47.19%) ดังนั้นจึงคาดว่าริ้นฝอยทรายสกุล *Phlebotomus* และ *Sergentomyia* อาจจะเป็นสกุลที่เด่นในประเทศไทย มีหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการสำรวจริ้นฝอยทรายตามแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย (35-37) ซึ่งพบว่ามีความคล้ายคลึงกับชนิดริ้นฝอยทรายในการศึกษาครั้งนี้ และผลการศึกษานี้ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทรายจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Ph. asperulus* และ *Se. hodgsoni* คิดเป็นอัตราการติดเชื้อเท่ากับร้อยละ 7.7 และ 6.3 ตามลำดับ ถึงแม้ว่ายังไม่มีรายงานการพบเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทรายชนิด *Ph. asperulus* และ *Se. hodgsoni* ดังที่ได้รายงานในผลการศึกษานี้ แต่อาจจะเป็นไปได้ว่าริ้นฝอยทรายทั้งสองชนิดนี้อาจจะมีโอกาสนำเชื้อลิชมาเนียได้ทั้งนี้ต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดหลายประการ อันดับแรกการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการรวบรวมข้อมูลจากการตรวจหาเชื้อลิชมาเนียในริ้นฝอยทรายซึ่งเป็นแมลงพาหะในงานปกติของศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ จึงไม่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลการพบเชื้อในริ้นฝอยทราย ในสัตว์รังโรค และในผู้ป่วย ประการที่สอง การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายไม่สามารถระบุชนิดได้ทั้งหมดเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น ริ้นฝอยทรายบางตัวท้องทำให้ไข่บดบังส่วนของ spermatheca ทำให้ไม่สามารถตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ บางตัวอย่างมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากสามารถแยกชนิดได้ถึงระดับสกุลเท่านั้นไม่สามารถบอกถึงชนิดได้ ดังที่ได้รายงานในการศึกษาของ Depaquit J. และคณะ 2562 พบว่า ริ้นฝอยทรายชนิด *Se. gemmea* ที่ได้ทำการศึกษามีลำดับสารพันธุกรรมที่ไม่ตรงกับ *Se. gemmea* ที่ได้รายงานใน Genbank ก่อนหน้านี้ อีกทั้งยังพบว่ามีความคล้ายกับริ้นฝอยทรายชนิด *Se. khawi* และ *Se. hivernus* จึงได้รายงานการพบริ้นฝอยทรายชนิดใหม่คือ *Se. raynali* n. sp (38) อีกทั้งในการศึกษาครั้งนี้พบทั้งริ้นฝอยทรายชนิด *Se. khawi* และ *Se. hivernus* ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน จึงเป็นที่น่าสังเกตว่าการจำแนกโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์เพียงอย่างเดียวนั้นเพียงพอหรือไม่ ปัจจุบันมีการนำวิธีการอื่นมาใช้จำแนกชนิดของริ้นฝอยทราย เช่น การศึกษาระดับอณูชีววิทยาโดยการทำ DNA barcode มาแยกชนิดของริ้นฝอยทราย ซึ่งให้ผลที่แม่นยำมากขึ้น (30-32) เมื่อมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพาหะนำโรคและเชื้อลิชมาเนียจึงน่าจะมีผลที่น่าเชื่อถือมากขึ้น อีกทั้งยังมีประโยชน์ในด้านอนุกรมวิธานเพราะมีโอกาสตรวจเจอริ้นฝอยทรายชนิดใหม่ในประเทศไทยได้ ประการที่สามการตรวจหาเชื้อลิชมาเนียโดยการตรวจหายีน ITS-1 ในการศึกษานี้ทำให้แยกได้ถึงระดับสกุลของเชื้อลิชมาเนีย ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษาเพิ่มเติมโดยการทำ DNA sequencing เพื่อให้ทราบถึงลำดับของสารพันธุกรรมและสามารถจำแนกชนิดของเชื้อลิชมาเนียได้

ปัจจุบันยังคงมีรายงานผู้ป่วยโรคลิชมาเนียในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น มีแมลงพาหะนำโรคอยู่ทุกภูมิภาค แต่การศึกษาที่ยืนยันชนิดของแมลงพาหะ และสัตว์รังโรคยังมีไม่เพียงพอ ในอนาคตควรมีการกำหนดหลักเกณฑ์ให้มีการเฝ้าระวังเชื้อลิชมาเนียในแมลงพาหะ การเฝ้าระวังเชื้อลิชมาเนียในสัตว์รังโรค และการเฝ้าระวังในผู้ป่วยสัมผัสใกล้ชิดควบคู่กัน หากทราบชนิดของริ้นฝอยทรายที่มีความสามารถในการนำเชื้อ และชนิดของสัตว์รังโรคที่ชัดเจน จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานและสามารถดำเนินการป้องกันควบคุมโรคได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. [Available from: https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/leishmaniasis.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. 2012;7(5):e35671.
3. กอบอาษา กกธ. คู่มือการปฏิบัติงาน โรคลิชมาเนีย: สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค; 2554. 104 pages p.
4. Viriyavejakul P, Viravan C, Riganti M, Punpoowong BJSAjotm, health p. Imported cutaneous leishmaniasis in Thailand. 1997;28:558-62.
5. สิริยะเสถียร เ. โรคลิชมาเนียและริ้นฝอยทรายแมลงพาหะในประเทศไทย2559. 116 หน้า p.
6. Lane RP, Crosskey RW. Medical insects and arachnids: Springer Science & Business Media; 2012.
7. พลสีลา ร. ริ้นฝอยทรายและโรคอุบัติใหม่ : โรคลิชมาเนีย. ธรรมศาสตร์เวชสาร. 2555;12(มกราคม-มีนาคม 2555):77-96.
8. Apiwathnasorn C, Sucharit S, Surathin K, Deesin TJJotAMCA. Anthropophilic and zoophilic phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Thailand. 1993;9(2):135-7.
9. Taweesak Sriwongphun KC, Surakait Pornchaikittikul, Priwanpeangpis, Wannapa Suwankerd. Species composition of sandfly in Leishmaniasis affected foci in Chiang Rai Province Northern Thailand. Disease Control Journal 2017;43(3 Jul-Sep 2017).
10. Chusri S, Thammapalo S, Silpapojakul K, Siriyasatien PJSAJoTM, Health P. Animal reservoirs and potential vectors of Leishmania siamensis in southern Thailand. 2014;45(1):13.
11. Kanjanopas K, Siripattanapipong S, Ninsaeng U, Hitakarun A, Jitkaew S, Kaewtaphaya P, et al. Sergentomyia (Neophlebotomus) gemmea, a potential vector of Leishmania siamensis in southern Thailand. 2013;13(1):1-4.
12. Jariyapan N, Daroontum T, Jaiwong K, Chanmol W, Intakhan N, Sor-Suwan S, et al. Leishmania (Mundinia) orientalis n. sp.(Trypanosomatidae), a parasite from Thailand responsible for localised cutaneous leishmaniasis. 2018;11(1):1-9.
13. Kwakye-Nuako G, Mosore M-T, Duplessis C, Bates MD, Puplampu N, Mensah-Attipoe I, et al. First isolation of a new species of Leishmania responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the Leishmania enriettii complex. 2015;45(11):679-84.
14. Sereno DJNm, infections n. Leishmania (Mundinia) spp.: from description to emergence as new human and animal Leishmania pathogens. 2019;30:100540.
15. Ho EA, Soong T-H, Li YJTotrSoTM, Hygiene. Comparative merits of sternum, spleen and liver punctures in the study of human visceral leishmaniasis. 1948;41(5):629-36.
16. Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EAJTotRSoTM, Hygiene. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. 1988;82(1):66-8.

17. Zijlstra E, Ali MS, El-Hassan A, El-Toum IA, Satti M, Ghalib H, et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. 1992;86(5):505-7.

18. Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert MJB. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK3 9 dipstick for visceral leishmaniasis. 2006;333(7571):723.

19. Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PC, Murray HWJTL. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. 1998;351(9102):563-5.

20. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck H-P, Felger IJJocm. Identification and differentiation of Leishmania species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. 2003;41(7):3147-53.

21. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. 2003;47(1):349-58.

22. Desjeux PJTotrsotm, hygiene. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. 2001;95(3):239-43.

23. Argaw D, Mulugeta A, Herrero M, Nombela N, Teklu T, Tefera T, et al. Risk factors for visceral leishmaniasis among residents and migrants in Kafta-Humera, Ethiopia. 2013;7(11):e2543.

24. Suankratay C, Suwanpimolkul G, Wilde H, Siriyasatien PJTAjotm, hygiene. Case Report: autochthonous visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus (HIV)-infected patient: the first in Thailand and review of the literature. 2010;82(1):4.

25. Brazil IOCRdJ. Training course molecular epidemiology Leishmaniasis2009. 53 p.

26. Badirzadeh A, Mohebali M, Sabzevari S, Ghafoori M, Arzamani K, Seyyedin M, et al. Case report: First coinfection report of mixed Leishmania infantum/Leishmania major and human immunodeficiency virus–acquired immune deficiency syndrome: report of a case of disseminated cutaneous leishmaniasis in Iran. 2018;98(1):122.

27. El-Beshbishy HA, Al-Ali KH, El-Badry AAJIJoID. Molecular characterization of cutaneous leishmaniasis in Al-Madinah Al-Munawarah province, western Saudi Arabia. 2013;17(5):e334-e8.

28. Lana RS, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Lara-Silva FdO, Lima ACVMdR, et al. Phlebotomine sand fly fauna and Leishmania infection in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a natural Brazilian heritage site. 2015;2015.

29. Paiva BRd, Secundino NFC, Nascimento JCd, Pimenta PFP, Galati EAB, Junior HA, et al. Detection and identification of Leishmania species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. 2006;99(2-3):252-9.

30. Contreras Gutierrez MA, Vivero RJ, Velez ID, Porter CH, Uribe SJPo. DNA barcoding for the identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. 2014;9(1):e85496.

31. Kumar NP, Srinivasan R, Jambulingam PJMER. DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India. 2012;12(3):414-20.

32. Nzelu CO, Cáceres AG, Arrunátegui-Jiménez MJ, Lañas-Rosas MF, Yañez-Trujillano HH, Luna-Caipo DV, et al. DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis-endemic areas of Peru. 2015;145:45-51.

33. Suwonkerd TSKcSPPPW. Species composition of sandfly in Leishmaniasis affected foci inChiang Rai Province Northern Thailand. Disease control Journal 2017;43(July - Sep 2017):11.

34. อภิวัฒนศร รพอวแ. การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายโดยใช้วิธี PCR และ Morphology ในเขตภาคเหนือตอนล่างของไทย. 2554.

35. Apiwathnasorn C, Samung Y, Prummongkol S, Phayakaphon A, Panasopolkul C. Cavernicolous species of phlebotomine sand flies from Kanchanaburi Province, with an updated species list for Thailand. 2011.

36. Apiwathnasorn C, Sucharit S, Rongsriyam Y, Leemingsawat S, Kerdpibule V, Deesin T, et al. A brief survey of phlebotomine sandflies in Thailand. 1989;20(3):429-32.

37. Polseela R, Apiwathnasorn C, Samung YJSAjotm, health p. Seasonal variation of cave-dwelling phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Phra Phothisat cave, Saraburi Province, Thailand. 2007;38(6):1011.

38. Depaquit J, Vongphayloth K, Siriyasatien P, Polseela R, Phumee A, Loyer M, et al. On the true identity of Sergentomyia gemmea and description of a closely related species: Se. raynali n. sp. 2019;33(4):521-9.