บทที่ 2

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

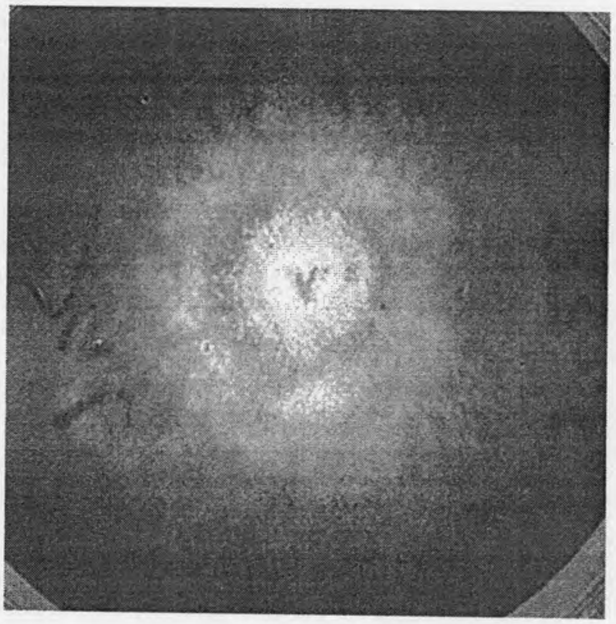
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธาน และ ลักษณะของเชื้อ *P. insidiosum*

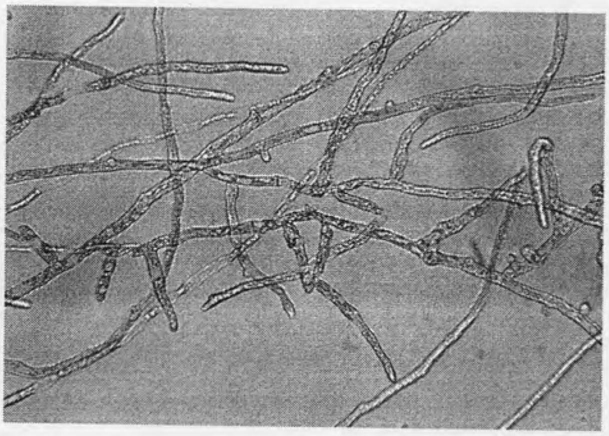
Pythium insidiosum จัดอยู่ใน Kingdom Straminipila, Phylum Oomycota, Order Peronosporales และ Family Pythiaceae เป็น aquatic fungus-like organism หรือ parafungus ซึ่งแตกต่างจากเชื้อราทั้งสัณฐานวิทยาในธรรมชาติและลำดับเบสในบริเวณ rRNA gene โดยมีการสร้าง zoospore ที่มี flagella และผนังเซลล์มีสารประกอบเป็น cellulose เป็นส่วนใหญ่ ไม่ใช่ chitin และเชื้อ parafungus นี้จะไม่ถูกทำลายด้วยยาฆ่าเชื้อรา (50) แหล่งธรรมชาติที่พบ ได้แก่ ดินและแหล่งน้ำในเขตอบอุ่น และแถบเส้นศูนย์สูตร

เท่าที่มีรายงานจนถึงปัจจุบันนั้น *P. insidiosum* เป็นเพียงสปีซีส์เดียวใน genus *Pythium* ที่สามารถก่อโรคชื่อ pythiosis ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมถึงคนด้วย ส่วนสปีซีส์อื่นจะเป็น เชื้อที่พบทั่วไป (saprophyte) หรือ ก่อโรคในพืช (plant pathogen) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ (47, 48)

ลักษณะทางมหสัณฐานโคโลนีของ *P. insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) เป็นสีขาวครีม คล้ายเชื้อราทั่วไป (รูปที่ 1) เส้นใยของโคโลนีจะแผ่ออกเป็นวงกลมใต้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ (submerged mycelium) ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 28- 37 องศาเซลเซียส (รูปที่1) สำหรับลักษณะจุลสัณฐาน จะพบเส้นใยไม่มีสี ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 ถึง 10 ไมโครเมตร มีการแตกกิ่งก้านสาขา เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นเส้นใยจะมีผนังกั้น (septate) (รูปที่ 2)

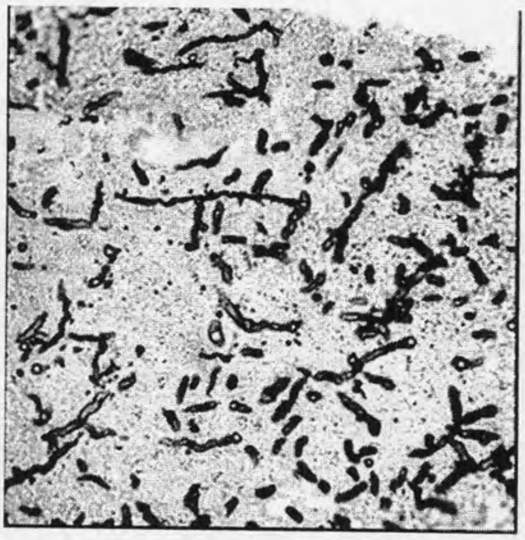


รูปที่ 1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *P. insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) (www.mycology.adelaide.edu.au)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อ *P. insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA (http://medtech.cls.msu.edumedtechmendozaphotos.html)

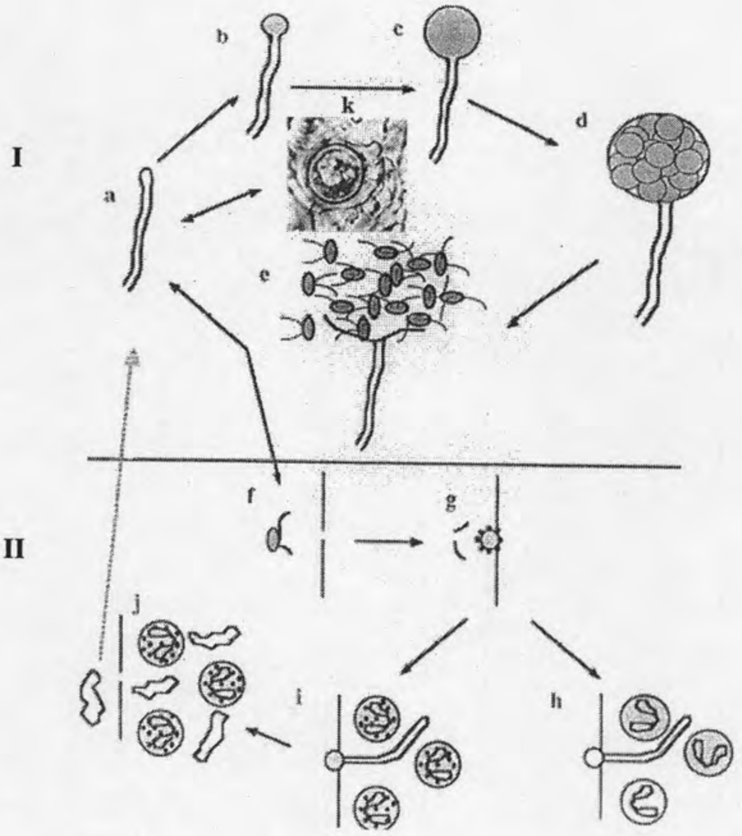
หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



<u>**รูปที่ 3**</u> แสดงการย้อม Gomori methenamine silver stain (GMS) จาก จากชิ้นเนื้อ cutaneous pythiosis (http://medtech.cls.msu.edumedtechmendozaphotos.html)

2.2 วงจรชีวิตของเชื้อ *P. insidiosum*

ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *P. insidiosum* ในธรรมชาติมักจะพบเป็น เส้นใยและ zoospores จึงสามารถใช้รูปร่างนี้เป็นส่วนหนึ่งในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ มีรายงานว่าน้ำที่เป็นแหล่งธรรมชาติของเชื้อนี้จะมีความเข้มข้นของไอออนเล็กน้อย ฤทธิ์ความเป็นกรดด่างจะเป็นกลาง (pH ประมาณ 7) และ จะเจริญเกาะบน substrate คือ พืชเพื่อการดำรงชีวิต เชื้อนี้จะสร้าง sporangium เมื่อถึงภาวะที่จะเพิ่มจำนวน เมื่อ sporangium โตเต็มที่ zoospores ภายในจะแตกออกและว่ายในแหล่งน้ำนั้น ๆ เพื่อการดำรงชีวิตต่อไป (51) zoopore มี flagella 2 เส้น เส้นหนึ่งจะยาวอีกเส้นจะสั้น การที่ zoospore สามารถว่ายด้วย flagella เส้นยาว มายังบริเวณบาดแผลทั้งคนและสัตว์อาจเป็นเพราะมี chemotactic factor จาก host ดึงให้ zoospore มาเกาะ จากนั้น flagella เส้นสั้นจะเกาะยึดกับผิวหน้าของรอยโรค และสลัดออกจากนั้นสร้างสารเมือกชนิด glycoprotein เพื่อการเกาะติดกับ host จากนั้นเส้นใยจะยืดยาวออกจาก zoospore และแทงเข้าทางบาดแผลนั้น (รูปที่ 4) ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ชั้น cutaneous หรือ หลอดเลือด ฉะนั้น จะเห็นว่า zoospore มีบทบาทสำคัญด่านแรกในการก่อโรคในคนและสัตว์ (32) สำหรับรายละเอียดเกี่ยวกับการเกิดโรคจะกล่าวในภายหลัง



<u>รูปที่ 4</u> วงจรชีวิตของเชื้อ *P. insidiosum* ภาพ **I** เป็นวงจรชีวิตของเชื้อ *P. insidiosum* ในธรรมชาติ อาศัยอยู่ตามพืชในแหล่งน้ำ ในรูปแบบของเส้นใย (a), และพัฒนาสร้าง sporangium (b ถึง c), เมื่อโตเต็มที่จะมีการสร้าง zoospore ภายใน sporangium (d), zoospore แตกออกจาก sporangium (e), zoospore ว่ายไปเกาะกับพืช และ encyst จากนั้นงอกเส้นใยออกจาก zoospore และเริ่มวงจรชีวิตใหม่ ภาพ **II** จะเป็นวงจรชีวิตที่ก่อโรค pythiosis ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเมื่อคนหรือสัตว์ที่มีบาดแผลสัมผัสน้ำที่มีเชื้อ *P. insidiosum* อาศัยอยู่ zoospore จะว่ายตรงมาบริเวณที่มีบาดแผล (f), zoospore ว่ายมาเกาะบาดแผลและสลัด biflagella ออก สร้างเมือกเหนียว (sticky substance) ซึ่งช่วยในการเกาะติด และ encyst (g), งอกเส้นใยตรงเข้าสู่เนื้อเยื่อในบาดแผลในคน สัตว์ (h) และ สัตว์ (i), ก่อโรค pythiosis (j) ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ oogonium จะเกิดขึ้นตามธรรมชาติ (k) (32)

2.3 Pythiosis

2.3.1 อุบัติการณ์

การรายงานครั้งแรกของโรค pythiosis มีเมื่อกลางศตวรรษที่ 19 โดยสัตวแพทย์อินเดีย พบรอยโรคที่ผิวหนัง มีลักษณะเป็น cutaneous granulomas โดยสาเหตุของการเกิดโรคนั้นยังไม่เป็นที่ทราบ ส่วนรายงานครั้งแรกที่แสดงถึงจุลชีพที่มีลักษณะคล้ายเชื้อราและทำให้เกิดรอยโรค cutaneous granulomas ในทำนองเดียวกัน โดยการติดเชื้อเป็นการติดเชื้อจากธรรมชาติ นั้นมีหลักฐานการตีพิมพ์โดย Smith ในปี ค.ศ.1884 (52), และต่อมามีการหลักฐานการรายงานอีกหลายฉบับ (15)

ในปี ค.ศ. 1901 ที่ประเทศอินโดนีเซีย โดย de Haan และ Hookamer สามารถแยกเชื้อได้จากม้าตัวที่มีรอยโรคที่ผิวหนังเป็น granulomas ได้เป็นครั้งแรก อย่างไรก็ตาม เชื้อที่แยกได้นั้นไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็นเชื้ออะไรเนื่องจากไม่พบการสร้างสปอร์แม้เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดก็ตาม และได้ตั้งชื่อโรคนั้นว่า hyphomycosis destruens (10)

ในปี ค.ศ. 1902 de Haan ได้เปลี่ยนชื่อโรคเป็น hyphomycosis destruens equi (9) ต่อมาในปี ค.ศ. 1924 นักวิทยาศาสตร์ชาวดัชต์ได้แยกเชื้อจุลชีพชนิดหนึ่ง จาก รอยโรคที่มีลักษณะคล้ายกันที่พบในม้าที่ประเทศอินโดนีเซีย และได้เขียนบทความตีพิมพ์ที่ค่อนข้างสมบูรณ์เกี่ยวกับการเกิดโรค pythiosis ในม้า อธิบายถึงลักษณะรอยโรค ลักษณะอาการของโรค การดำเนินโรค ด้านจุลชีววิทยา ด้านการวินิจฉัย ด้านภูมิคุ้มกันวิทยา และการรักษา อย่างไรก็ตามในช่วงเวลาเดียวกันลักษณะรอยโรค cutaneous granuloma ที่คล้ายกันนี้เกิดจากการติดเชื้อจากหนอน nematode ใน genus *Habronema* ด้วยไม่มีหลักฐานแน่ชัดว่าม้าที่ติดเชื้อนั้นเกิดจาก nematode หรือ *Pythium* ณ ช่วงเวลานั้นเชื่อกันว่าม้านั้นน่าจะเกิดโรค equine habronemiasis มากกว่าโรค pythiosis (61)

37 ปี ถัดมา คือ ในปี ค.ศ. 1961 Bridges และ Emmon ได้แยกเชื้อจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเส้นใย จากม้าในมลรัฐเท็กซัส และ ฟลอริดา และได้เรียกเชื้อที่แยกได้ว่า *Hyphomycoces destruens* อย่างไรก็ตามยังไม่ประสบผลสำเร็จในการกระตุ้นให้เชื้อนั้นสร้างสปอร์แม้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดก็ตาม จึงได้สรุปไว้ว่า เชื้อที่แยกได้นั้นน่าจะมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อใน genus *Mortierella* ในกลุ่ม Zygomycetes เช่นเดียวกับที่ Amemiya และ Nishiyama ที่แยกเชื้อราที่ก่อให้เกิดรอยโรค granular dermatitis ในม้าที่ประเทศญี่ปุ่นและได้รายงานว่าเชื้อที่แยกได้นั้นเป็นเชื้อราใน class Phycomycete*s* (หรือ class Zygomycetes) , Family *Mortierellaceae* (5)

ในปี ค.ศ. 1974 Austwick และ Copland ได้แยกเชื้อจากม้าใน ประเทศปาปัว นิวกินี พบ biflagella zoospore เมื่อทำการเลี้ยงในน้ำซังข้าวโพด พวกเขาจึงสรุปว่าเชื้อที่แยกได้นั้นควรอยู่ในกลุ่ม Oomycetes genus *Pythium*(2) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1974 เป็นต้นมามีรายงานการแยกเชื้อได้ จากม้า สุนัข สัตว์ปศุสัตว์ และได้พิสูจน์ว่าเกิดจากการติดเชื้อ *Pythium spp.* เช่นกัน

ในปี ค.ศ. 1980 Ichitani และคณะ (22) การแยกเชื้อจากรอยโรค cutaneous granuloma ในม้าที่ประเทศญี่ปุ่น พบเชื้อลักษณะเป็นเส้นใย มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ คือ oogonia และ aplerotic oospore และได้ทำการพิสูจน์ว่าเชื้อก่อโรคนั้นคือ *Pythium gracile* แต่การพิสูจน์ของพวกเขาไม่ได้รับการยืนยันจากผู้วิจัยอื่นๆ

ในปี ค.ศ. 1987 de Cock และคณะ (8)ได้ทำการแยกเชื้อ *Pythium* สายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จาก ม้า สุนัข และ จากคน ที่มีแหล่งที่มาจาก ประเทศคอสตาริกา ญี่ปุ่น ปาปัว นิวกินี อเมริกา และไทย พบว่า 3 สายพันธุ์ที่ได้จากประเทศคอสตาริกา นั้นมีการสร้าง oogonia จึงสรุปว่าเชื้อที่แยกมาได้ทั้งหมดนั้นควรอยู่ภายใต้สปีชีส์ *Pythium* และให้ชื่อว่า *Pythium insidiosum* และในช่วงเวลา 5 เดือนต่อมา ที่ประทศออสเตรเลีย Shipton ได้ทำการแยกเชื้อจากม้า และพบว่าเชื้อมีการสร้าง sexual production จึงได้ตั้งชื่อใหม่ และเรียกว่า *Pythium destruens*

ต่อมาปี ค.ศ. 1989 เชื้อที่ Shipton (31)ได้แยกมานั้นได้ถูกนำมาศึกษาอีกครั้งโดย Mendoza และ Martin พบว่าไม่มีความแตกต่างกับสายพันธุ์ที่ก่อโรค pythiosis ที่ได้เคยทำการแยกเชื้อมาได้เช่นกัน และผลที่ได้ก็เป็นเชื้อตัวเดียวกับ *Pythium insidiosum* โดยยืนยันจากผลการศึกษาคุณสมบัติการเป็นแอนติเจน antigenic properties ด้วยวิธี ID (immunodiffusion) และ florescent antibody tests จึงสรุปได้ว่า *P. detruens* ของ Shipton และ *P. insidiosum* ของ de Cock เป็นตัวเดียวกัน

จะเห็นได้ว่าตั้งแต่ปี ค.ศ. 1976 เป็นต้นมามีรายงานการแยกเชื้อ *P. insidiosum* จากรอยโรคในสัตว์หลายชนิด เช่น ม้า, สุนัข , แมว , วัว , อูฐ และหมี สำหรับการรายงานโรคติดเชื้อ *P. insidiosum* ในคนเริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1986 และมีรายงานเป็นระยะมาจนกระทั่งปัจจุบัน(35)

2.3.2 พยาธิกำเนิด (pathogenesis)

กลไกการก่อโรค pythiosis นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากไม่สามารถจำลองการติดเชื้อจากธรรมชาติได้ ข้อมูลที่มีเกี่ยวกับการก่อโรคนั้นพบว่า zoospore มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคและเป็นสาเหตุหลักให้เกิดการติดโรคทั้งในสัตว์และพืช (32) ที่เกิดจากการได้สัมผัสน้ำตามแหล่งธรรมชาติ เท่าที่มีรายงานยังไม่พบการติดเชื้อจากแหล่งน้ำที่เป็นระบบเปิด(แหล่งน้ำไหล)อาจเนื่องจากแหล่งน้ำนั้นส่วนใหญ่จะพบ เส้นใย, oogonia หรือ สปอร์ของเชื้อ ที่พักตัวแล้ว (14)

เมื่อคนหรือสัตว์ที่เข้าไปในแหล่งน้ำที่มีเชื้อ *P.insidosum* อาศัยอยู่ zoospore ของเชื้อ จะว่ายน้ำไปยังบริเวณบาดแผล และทำการ encyst และหลั่งสารเหนียวจำพวกไกลโคโปรตีนออกมาซึ่งจะช่วยในการเกาะติดเนื้อเยื่อบาดแผลในช่วงแรกในขั้นตอนการก่อโรค ประกอบทั้งอุณหภูมิของคนหรือสัตว์นั้นจะช่วย encyst zoospore นั้น สร้าง germ tube แทงเข้าสู่บาดแผลและดำเนินโรคต่อ (32) และจากการทดลองของ Ravishankar และ Davis พบว่า zoospore ของเชื้อ *P. insidiosum* นั้นไม่สามารถก่อโรคในผิวหนังปกติที่ไม่มีบาดแผล (42)

2.3.2.1 ในคน

การเกิดโรค pythiosis ในคนนั้นสามารถเกิดได้ทั้งแบบเฉพาะที่ (localize) และ ทั่วร่างกาย (systemic) หรือ ตามระบบเลือด (vascular form) ตัวอย่างบริเวณที่เกิดจากการติดเชื้อแบบ localize คือ keratitis, corneal ulcers และ cutaneous หรือ subcutaneous (53) ส่วนแบบ systemic pythosis มักพบในผู้ป่วยที่เป็น thalassemia (46) และ anemia-paroxysmal nocturnal hemoglobiruria (PNH) (60) โดยที่เชื้อไปอยู่ที่หลอดเลือดแดงแล้วทำให้เกิดการอุดตันของ เลือด โดยเฉพาะบริเวณขาทำให้เกิดการขาดเลือดไปเลี้ยงขามีผลทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณนั้น (46, 60) และผู้ป่วยมักจะตายเป็นส่วนใหญ่ ถ้าการติดเชื้อไปสู่เส้นเลือดแดงหลัก เช่น aliac artery, aorta หรือ renal artery (53)

พบผู้ป่วยที่เป็นโรค pythiosis มากที่สุดในประเทศไทย ส่วนในประเทศอื่นๆมีรายงานเช่นกัน เช่น ประเทศ ออสเตรเลีย, เฮติ, นิวซีแลนด์ และ อเมริกา(8) ผู้ป่วย pythiosis 5 รายที่มีรายงานครั้งแรกที่พบในคน เป็นเพศหญิง 2 คน และ 3 คนเป็นเพศชาย อาศัยอยู่ภาคเหนือของประเทศไทย (46) จากนั้นก็พบผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอีก 10 คนในภาคเดียวกัน ส่วนใหญ่ผู้ป่วยมีประวัติเป็นโรคเลือด (hemoglobinopathic syndrome) ลักษณะของโรค จะเกิดเนื้อตายบริเวณขา เจ็บขา ซึ่งทั้งหมดเป็นการติดเชื้อที่เส้นเลือด พบลักษณะการอุดตันของเส้นเลือดแดง (รูปที่ 6) เช่น iliac, popliteal และ femoral aterties ซึ่งการรักษาโดยการตัดขาทิ้ง ประสบผลสำเร็จ 7 คนใน15 คน (60) ส่วนผู้ป่วยเป็นที่ subcutaneous orbital pythiosis พบที่ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นเด็กชายที่สุขภาพดี จาก มลรัฐเท็กซัส ตาขวาบวมปิด เป็นจ้ำแดง (รูปที่ 5) และสามารถเพาะแยกเชื้อ *P. insidiosum* ได้จากตา (43) เด็กชายอายุ 2 ขวบ จากมลรัฐ แทนซาเนีย (50), ที่ประเทศออสเตรเลีย เป็นเด็กชายอายุ 11 และ14 ปี ติดเชื้อที่ตาและยังพบใน ประเทศเฮติ (59) ประเทศนิวซีแลนด์ (17) และที่ประเทศไทย (23) และ ลักษณะทาง histophatology ของ subcutaneous pythiosis ในคนจะมีลักษณะคล้ายกับที่พบในม้าคือ มีการชุมนุมของ eosinophil ล้อมรอบต่อตัวเชื้อ เป็นลักษณะกลุ่มก้อนใหญ่ (56)

<u>รูปที่ 5</u> แสดง orbital pythiosis (subcutaneous pythiosis) ในเด็กชาย จากมลรัฐเท็กซัส (ที่มา : http://medtech.cls.msu.edu/medtech/mendoza/photos.html)

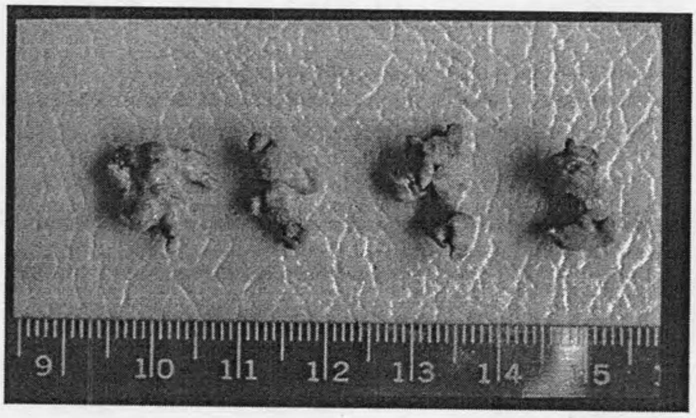
รูปที่ 6 แสดง human arterial pythiosis ซึ่งผู้ป่วยถูกตัดขาขวาทิ้ง
(ที่มา : http://medtech.cls.msu.edu/medtech/mendoza/photos.html)

2.3.2.2 ในสัตว์

pythiosis ในสัตว์ สามารถเกิดได้ทั้ง cutaneous, subcutaneous (39), bone lesion (29), esophagitis (40), gastrointestinal disease (1) และ pulmonary infection (18) ได้ใน ม้า, สุนัข, แมว, สัตว์ปศุสัตว์ และหมี เมื่อมีการบุกรุกของเชื้อระบบภูมิคุ้มกันแรกที่ตอบสนองต่อตัวเชื้อคือ cell-mediated immune (CMI) ซึ่งเป็น eosinophil ส่วนมาก และ neutrophil (34, 37) การเกิดโรค pythiosis ในม้านั้นจะไม่มีความเกี่ยวข้องทางด้านเพศ และอายุ และรอยโรคที่เกิดนั้น สามารถพบได้แถบทุกส่วนของม้า โดยมากมักพบในส่วนบริเวณที่ไปสัมผัสน้ำ รอยโรคที่พบเช่น ช่วงท้อง, คอ, ไหล่, อวัยวะสืบพันธุ์ และหัว รอยโรคที่เกิดนั้นสามารถเกิดได้มากกว่าหนึ่งรอยเป็นต้นไป การติดเชื้อ pythiosis แบบเรื้อรัง (chronic pythiosis) ในม้านั้น จะทำให้ม้าซูบผอม และมักเกิดการติดเชื้อโรคอื่นตามมาโดยมาก รอยโรคที่เกิดบริเวณผิวหนังนั้นจะมีลักษณะกลม มีขนาดตั้งแต่ 5 ถึง 500 มิลลิเมตร เมื่อวัดตามเส้นผ่านศูนย์กลาง (37) มีรอยท่อระบาย (sinuse) ซึ่งข้างในมีทั้งเลือด น้ำเหลือง และซึมออกมา ม้าจะมีอาการคันบริเวณแผลอย่างรุนแรง เมื่อโรคดำเนินไปจะพบลักษณะแผลคล้าย ก้อนหินปะการัง (coral-like mass) ที่เรียกกันว่า kunker ข้างในนั้นจะประกอบไปด้วย เส้นใยของเชื้อ *P. insidiosum* ที่มีชีวิตอยู่ ซึ่งจะพบก้อนนี้ในรอยท่อระบายอากาศของแผล การแพร่กระจายของเชื้อนั้น สามารถไปสู่ ปอด หรือ กระดูก ซึ่งเป็นอวัยวะที่พบการติดเชื้อบ่อยในม้า ในลักษณะรอยแผล subcutaneous นั้นจะพบหนองหลายๆจุด ลักษณะ histophatology จะพบชุมนุมของ eosinophil จำนวนมาก, netrophil, lymphocyte และ macrophage ที่มาล้อมรอบตัวเชื้อเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Splendore-Hoeppli-like phenomenon (35) ส่วนในลักษณะที่มีการติดเชื้อเรื้อรัง

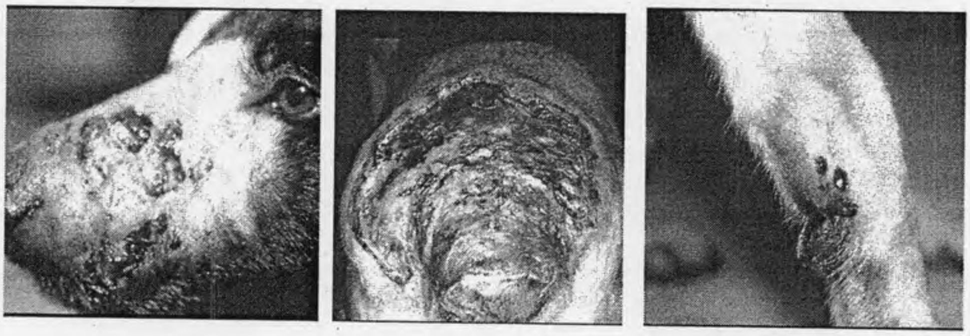
จะพบการชุมนุมของ eosinophil จำนวนมากเกิดลักษณะเป็น gaint cell ต่อตัวเชื้อในบริเวณที่มีการอักเสบ สามารถพบลักษณะที่เกิดนี้ได้ในก้อน kunker (รูปที่ 7 และ8) (29)

รูปที่ 7 แสดง cutaneous pythiosis ในม้าบริเวณหัวไหล่ ตรงกลางแผลจะเห็นลักษณะก้อนกลมที่เรียกว่า kunker (ที่มา : http://medtech.cls.msu.edumedtechmendozaphotos.html)



รูปที่ 8 แสดงก้อน kunker ที่นำออกมาจากแผลในม้า ข้างในจะมีเส้นใยของเชื้อ *P. insidiosum* ที่มีชีวิตอยู่ (ที่มา : http://medtech.cls.msu.edumedtechmendozaphotos.html)

โรค pythiosis ในสัตว์อื่น เช่น สุนัข, แมว และ สัตว์ปศุสัตว์ (รูปที่ 9) จะมีลักษณะทางพยาธิสภาพในการเกิดโรคและรอยโรคเหมือนกับที่พบในม้าทั้ง cutaneous, subcutaneous และอวัยวะภายใน (3, 16, 45, 55) ยกเว้นลักษณะของก้อน kunker ที่สามารถพบได้ในม้า (29)



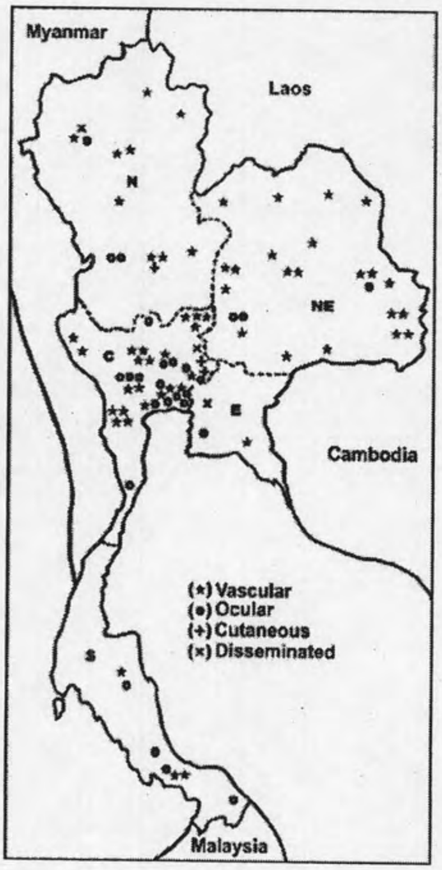
<u>รูปที่ 9</u> แสดงลักษณะ cutaneous pythiosis ในสุนัข บริเวณ ปาก, สะโพก และ ขา (ที่มา : http://medtech.cls.msu.edu/medtech/mendoza/photos.html)

2.4 การกระจายตัวของโรค pythiosis

โรค pythiosis ส่วนใหญ่พบในเขตอุณหภูมิอบอุ่น แถบเส้นศูนย์สูตร (รูปที่ 10) รายงานการเกิดโรคพบในประเทศ อาเจนตินา, ออสเตรเลีย, บราซิล, โคลัมเบีย, คอสตาริกา, เฮติ, อินเดีย, อินโดนีเซีย, ญี่ปุ่น, ปาปัว นิวกินี, นิวซีแลนด์, เกาหลีใต้, ไทย, อเมริกา, เวเนซุเอล่า (11) และล่าสุดในปี ค.ศ. 2005 ได้พบที่ทวีปแอฟริกา ที่ประเทศมาลี (44) แต่ยังไม่พบการรายงานประเทศในยุโรป สำหรับในประเทศไทยพบการรายงานผู้ป่วย pythiosis มากที่สุด และ พบทุกภาคในประเทศ (ดังรูปที่ 11) มีประมาณมากกว่า 200 รายตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (25)

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

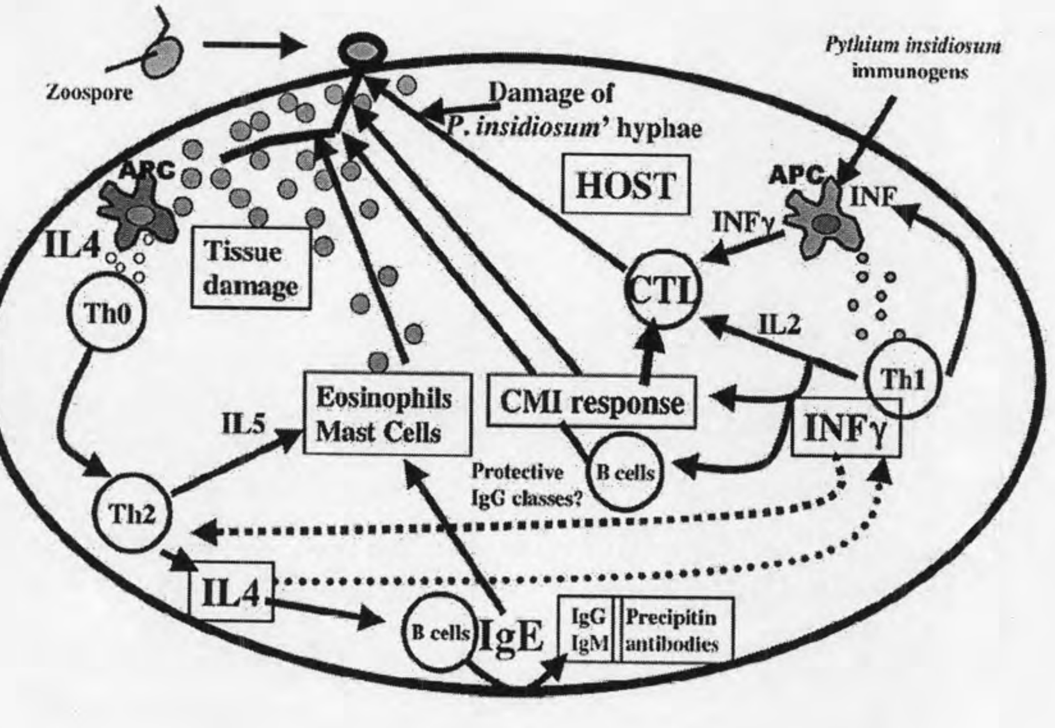
<u>รูปที่ 10</u> แสดงการกระจายตัวของโรค pythiosis ในบริเวณประเทศที่มีอุณหภูมิอบอุ่นและประเทศแถบเส้นศูนย์สูตร(http://medtech.cls.msu.edumedtechmendozaphotos.html)



<u>รูปที่ 11</u> แสดงการกระจายตัวของโรค pythiosis ในผู้ป่วยในประเทศไทย ตามภูมิภาคต่างๆ จำนวน 88 คน (สามารถตามประวัติได้) ตั้งแต่เดือน มกราคม ปี ค.ศ.1985 ถึง มิถุนายน ปี ค.ศ. 2003(25)

2.5 Immunotherapy

เมื่อเชื้อ *P. insidiosum* บุกรุกเข้าสู่ร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ที่ตอบสนองเป็นทางด้าน CMI โดยตัวเชื้อจะปล่อย exoantigen ทำให้มีการตอบสนองทางด้าน Th2 ให้มีการกระตุ้นเซลล์ และหลั่ง cytokine หลายชนิด (eosinophil, mast cells, IgE, IL-4 , IL-5, precipitin รวมถึง IgG และ IgM) จากกระบวนการนี้ทำให้เกิดการล้อมรอบของ eosinophiles และ mast cells ในบริเวณที่เชื้ออยู่ ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า kunker สำหรับการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับ crude antigen ของเชื้อ *P. insidiosum* เพื่อใช้ในการรักษาโรค pythiosis นั้นตัว antigen จะกระตุ้นให้มีการตอบสนองทางด้าน Th1 กับ IFN-γ จะไปยับยั้งการตอบสนองทางด้าน Th2 ในขณะที่ทำให้เกิดการตอบสนองของ mononuclear cells มาทำหน้าที่ในการฆ่าเชื้อ รูปแบบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ได้กล่าวมาข้างต้นเป็นรูปแบบที่พบได้ในม้า (รูปที่ 12) (34)



<u>รูปที่ 12</u> แสดงรูปจำลองระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *P. insidiosum* และ antigen ที่ใช้เป็น immunotherapy ในม้า (34)

2.6 การวินิจฉัยโรค pythiosis ทางห้องปฏิบัติการ

สิ่งส่งตรวจในการวินิจฉัยโรคขึ้นอยู่กับพยาธิสภาพของโรค เช่น ชิ้นเนื้อ กระจกตา เป็นต้น และตัวอย่างส่วนหนึ่งควรนำไปทำการตรวจโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี KOH-preparation หากรอยโรคนั้นติดเชื้อ *P. insidiosum* จริง จะพบเส้นใยลักษณะคล้ายเชื้อรา มีผนังกั้นบ้าง ไม่มีสี เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-9 ไมโครเมตร ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจอีกส่วนหนึ่งนำไปเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-14 วัน ใน 24 ชั่วโมงเส้นใยแผ่ออกโคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20 มิลลิเมตร เมื่อนำมาศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเป็นเส้นใย มีการแตกกิ่งก้านทำมุม 90 องศา

การนำส่งสิ่งส่งตรวจของชิ้นเนื้อที่สงสัยว่ามีเชื้อ *P. insidiosum* นั้นไม่ควรเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากจะทำให้เชื้อตายได้ หากเป็นไปได้ควรรีบส่งชิ้นเนื้อมาทันที หรือถ้าไม่สามารถควรล้างชิ้นเนื้อด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อหลายๆรอบและเก็บไว้ในน้ำกลั่นที่มียาปฏิชีวนะ (ampicillin+streptomycin) ผสมอยู่ และนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ มาวางลงอาหาร SDA และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน ส่วนชิ้นเนื้อที่เหลือนำมาทำ direct examination โดยใช้ KOH-preparation และส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบ ลักษณะเส้นใยคล้ายเชื้อราไม่มีสี septate hyphae ความกว้างประมาณ 4-9 ไมโครเมตร

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *P. insidiosum* ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ SDA ซึ่งเชื้อจะเจริญได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใน 24 ชั่วโมงสามารถเจริญแผ่เส้นใยออกจากจุดศูนย์กลางได้ถึง 20 มิลลิเมตร เมื่อส่องภายใต้กล้อง จะพบเส้นใยของเชื้อทำมุม 90 องศาของการแตกกิ่งก้าน และมองเห็น saptate hyphae ทั้งในชิ้นเนื้อตัวอย่างส่งตรวจ หรือใน colony ที่มีอายุมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (35)

การที่จะตรวจพิสูจน์ว่าเป็นการติดเชื้อ *P. insidiosum* ออกจากเชื้อที่ก่อลักษณะโรคคล้าย pythiosis นั้น ซึ่งถ้าดูจากลักษณะรอยโรคที่เกิด นั้นอาจจะนำไปสู่การวินิจฉัยโรคผิดพลาดได้ เช่น ลักษณะรอยโรค cutaneous หรือ subcutaneous pythiosis ในม้า จะเหมือนกับโรค habronemiasis ที่เกิดจากหนอน nematode *Habronema* หรือ เชื้อราในกลุ่ม zygomycetes (12)

เชื้อที่ก่อโรคคล้ายกับโรค pythiosis คือ เชื้อ *Basidiobolus ranarum* และ *Conidiobolus coronatus* ซึ่งเป็นราในกลุ่ม zygomycetes ก่อโรค basidiobolomycosis และ conidiobolomycosis ตามลำดับ ซึ่งบางครั้งขนาดของเส้นใยก็อาจแยกความต่างได้ เช่น ขนาดของเส้นใยของ *P. insidiosum* จะอยู่ระหว่าง 3-10 ไมโครเมตร ขณะที่ *B. ranaram* หรือ *C. coronatus* จะกว้างกว่าจะอยู่ที่ประมาณ 5-15 ไมโครเมตร

เชื้อในกลุ่ม ascomycetes คือ *Aspergillus flavus* และ *Paracoccidioides brasiliensis* ก่อโรค aspergillosis และ paracoccidiomycosis ตามลำดับ เชื้อ *Prototheca wickerhamii* ซึ่งเป็นสาหร่าย ก่อโรค protothecosis (49) และเชื้อ *Lagenidium giganteum* ก่อโรค lagenidiosis ในสัตว์ (19)

การที่จะจำแนกและพิสูจน์เชื้อว่าเป็น *P. insidiosum* ด้วยการย้อม GMS ดูลักษณะ hyphae ในเนื้อเยื่อสิ่งส่งตรวจนั้นจะพบลักษณะ short, septate hyphae และการชุมนุมของพวก eosinophil ล้อมรอบเส้นใยตัวเชื้อ (Splendore-Hoeppli-like phenomenon) (35) ซึ่งจะคล้ายกับการติดเชื้อ *B. ranarum* และ *C. coronatus* (12) อีกทั้งการที่จะพิสูจน์ว่าเป็น *P. insidiosum* ด้วยการกระตุ้นการสร้าง zoospore (30) ก็ใช้เวลานานเป็นหลายสัปดาห์ เนื่องจาก *P. insidiosum* บางสายพันธุ์ยากที่จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างและบ่อยครั้งที่เมื่อมาทำการกระตุ้นการสร้าง zoospore ซ้ำอีกมักไม่ได้ผล (20)

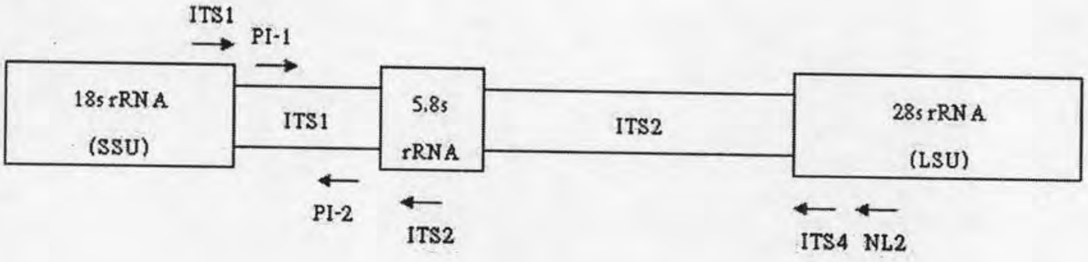
<u>2.61 การวินิจฉัยโรค pythiosis ทางน้ำเหลืองวิทยา</u>

วิธีทางน้ำเหลืองวิทยาที่พัฒนามาใช้ในการวินิจฉัย และติดตามโรค pythiosis เช่น วิธี complement fixation (38), immunoperoxidase test (6) และ fluorescein isothiocyanate-conjugate rabbit antiglobulin ต่อ เส้นใยเชื้อในเนื้อเยื่อสิ่งส่งตรวจ (28) และ ทางด้าน Immuno diffusion test (ID) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันกว้างขวางในการวินิจฉัย (36) แม้ว่า ID test จะจำเพาะต่อเชื้อ *P. insidiosum* ก็ตามแต่ก็ยังพบการรายงาน negative ID เกิดขึ้น ซึ่งได้พิสูจน์แล้วว่าเป็นโรค pythiosis จริง (54) ส่วนทางวิธี emzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ต่อ hyphae antigen เป็นวิธีที่ไวและแม่นยำมากในการวินิจฉัยโรค pythiosis ตั้งแต่ระยะเกิดโรคจนถึง ระยะเรื้อรัง (chronic state) และมักใช้ต่อเมื่อวิธี ID test ไม่ได้ผล (21, 24, 33)

เนื่องจากวิธีทางด้านน้ำเหลืองวิทยายังมีข้อบกพร่องอยู่ ปัจจุบันจึงได้พัฒนาวิธีการทางด้านอณูชีววิทยาขึ้นมาเพื่อเพิ่มความแม่นยำซึ่งมี ความไว และความจำเพาะสูง ซึ่งช่วยลดเวลาที่ใช้ในการการตรวจพิสูจน์เชื้อ *P. insidiosum* ออกจากกลุ่มเชื้อที่ก่อโรคคล้ายคลึงกัน วิธีที่ใช้คือ ปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ พี ซี อาร์ (PCR)

2.7 การตรวจพิสูจน์เชื้อ *P. insidiosum* ทางวิธีอณูชีววิทยา

ปี ค.ศ. 2002 Groosters และ Gee ได้ทำการพัฒนาวิธี Nested Polymerase Chain Reaction จุดประสงค์เพื่อตรวจพิสูจน์เพื่อแยกเชื้อ *P. insidiosum* ออกจาก เชื้อที่ก่อโรคคล้ายกับ pythiosis และ เชื้อ *Pythium* spp. จากธรรมชาติที่ก่อโรคพืช โดยสกัดDNAจากเชื้อ *P. insidiosum* 3 ตัวอย่าง ที่แยกได้สัตว์ และ *Pythium* ที่ก่อโรคพืช คือ *P. graminicola* และ *P. arrhenomanes* และ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง ITS1 (Internal transcribed spacer)โดยใช้ primer ITS1 และ ITS4 ซึ่งเป็น universal primer ในการทำ PCR และ ใช้ primer ITS1 และ ITS2 ซึ่งเป็น universal primer เช่นกันในการนำไปหาลำดับเบสในช่วง ITS1



LSU= large subunit, SSU = small subunit

<u>**รูปที่ 13**</u> แสดงส่วนประกอบ ribosomal RNA (rRNA) gene และ ตำแหน่ง primer ที่ใช้ในงานวิจัยของ Groosters และ Gee ปี 2002 (20)

จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ มาทำ alignment กับเชื้อ *Pythium* spp. 4 สปีชีส์ ที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank พบว่าลำดับเบสของ *P. insidiosum* นั้นมีความต่างกับ *Pythium* spp. อื่น บริเวณ variable จึงได้ออกแบบ specific primer คือ PI-1 และ PI-2 (รูปที่ 13) ซึ่งใช้เป็น primer คู่ที่ 2 (inner primer) ในการทำ Nested PCR และทำ Nested PCR ต่อDNAของเชื้อ *P. insidiosum* จาก 10 ตัวอย่าง (มาจากคน 1 ตัวอย่างและ 9 ตัวอย่างมาจากสัตว์ซึ่งทั้งหมดได้ทำการพิสูจน์ว่าเป็น *P. insidiosum* ด้วยการกระตุ้นการสร้าง zoospore), *B .ranarum*, *C. coronatus*, *Laginidium giganteum* และ *Aspergillus terreus* และ *Pythium* ก่อโรคพืช คือ *P. arrhenomanes*, *P. graminicola*, *P. myriotylum*, *P. irregulare* และ *P. deliense* โดย primer คู่แรกที่ใช้ในการ amplify คือ ITS1 และ ITS2 (NL2 ใช้เฉพาะ *C. coronatus* เนื่องจาก ITS2 primer ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้) ผลปรากฏว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ทุกตัวอย่าง โดยพบ band ที่ชัดเจน

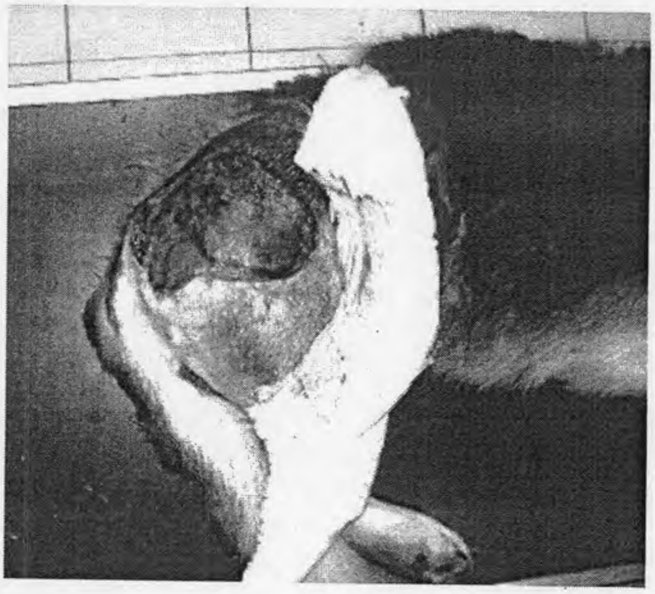
P. insidiosum 10 ตัวอย่าง ให้ขนาดของ band ที่เท่ากัน ส่วนเชื้ออื่นก็ให้ขนาดของ band ที่แตกต่างกันไป จากนั้นนำ PCR ของทุกตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณDNAต่อ ด้วย primer คู่ที่ 2 คือ PI-1 และ PI-2 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณDNAได้เฉพาะ *P. insidiosum* 10 ตัวอย่างเท่านั้นในขนาด 105 คู่เบส ส่วนตัวอย่างเชื้ออื่นๆ ไม่ปรากฏ band ให้เห็น จึงสรุปได้ว่า specific primer ที่ออกแบบมานั้นสามารถแยกเชื้อ *P. insidiosum* ออกจากเชื้อที่ก่อโรคคล้ายคลึงกับเชื้อ *P. insidiosum* และ *Pythium* spp. ได้ (20)

ในปี ค.ศ. 2004 Vanittanakom และคณะ ได้ทดลองใช้ primer ของ Grooters และ Gee คือ PI-1 และ PI-2 ต่อ DNA *P. insidiosum* (ซึ่งทั้งหมดทำการพิสูจน์การกระตุ้นการ zoospore ว่าเป็น *P. insidiosum*) ที่แยกได้ผู้ป่วย Pythiosis 4 คน ที่ได้มาจากขาผู้ป่วยที่เป็น Thalassemia, จากข้อเท้าผู้ป่วยที่เป็น Leukemia ที่ปลูกถ่ายไขกระดูก, จากส่วนเนื้อสมองผู้ป่วยที่เป็น Thalassemia และ จากตา พบว่าไม่สามารถ amplify ได้ 1 ตัวอย่างไม่ว่าจะทำ Nested หรือ Direct PCR จึงให้ความเห็นว่า inner primer นั้นไม่สามารถ amplify เชื้อ *P. insidiosum* ในสายพันธุ์ประเทศไทยได้บางสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม Vanittanakom และคณะได้ทำการออกแบบ primer ในส่วน 18S rRNA โดยใช้ข้อมูลจาก GenBank และทำ PCR กับ DNAของเชื้อ *P. insidiosum* 4 สายพันธุ์ที่แยกมาจากผู้ป่วยทั้ง 4 ตัวอย่างมีขนาดของ PCR product เป็น 580 คู่เบส จากนั้นนำ PCR ที่ได้ไปหาลำดับเบสพบว่า 3 สายพันธุ์มีความเหมือน 100% กับเชื้อ *P. insidiosum* ที่อยู่ใน GenBank ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ มีความเหมือน 99.65% และยังไปคล้ายกับเชื้อในกลุ่ม oomycetes เช่น *Phythoptora undulate* และ *Lagenidium giganteum* จึงได้ทำการออกแบบ primer ใหม่ในส่วน ITS โดยอิงข้อมูลลำดับเบสของเชื้อ *P. insidiosum* จาก Grooters และ Gee (20) และมาทำ PCR พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์เห็น single PCR amplification band ที่ขนาดประมาณ 230 คู่เบส (58)

ในการพิสูจน์เชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้จากคนและสัตว์ โดยใช้ลำดับเบสในส่วน Internal transcribed spacer (ITS) rDNA เป็นที่นิยมใช้ เช่น ในผู้ป่วย cutaneous pythiosis ที่มีรายงานที่เกิดขึ้นในคนครั้งแรกที่ทวีปอเมริกาใต้ คือ ชาวบราซิล อายุ 49 ปี ไม่ได้เป็นโรค thalassemia ได้ติดเชื้อ *P. insidiosum* หลังจากการไปสัมผัสน้ำที่ทะเลสาบ 1 สัปดาห์ จากนั้นก็เกิดแผลบริเวณขวาซ้าย โดยการวินิจฉัยครั้งแรกเกิดจากการติดเชื้อ bacteria จึงรักษาด้วย antimicrobial agent แต่ไม่ได้ผล จึงได้นำหนองมาย้อมสี GMS พบ non-septate hyphae จึงคาดว่าติดเชื้อราในกลุ่ม zygomycetes จึงรักษาด้วย amphotericin B และ itraconazole แต่อาการไม่ดีขึ้น จึงใช้ potassium iodine ร่วมกับการผ่าตัดเนื้อเสียรอบแผล ซึ่งประสบผลสำเร็จ จึงได้ทำการแยกเชื้อจากแผลมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar(PDA) + chloramphenicol + gentamicin และนำมาสกัด DNAทำ PCR ในช่วง ITS โดยใช้ primer ให้ PCR product 850 คู่เบสและหาลำดับเบส และนำข้อมูลลำดับเบสมา blast กับข้อมูลลำดับเบสที่มีอยู่ใน GenBank ปรากฏว่าตรงกับเชื้อ *P. insidiosum* 100%

ดังนั้น การวินิจฉัยโรค pythiosis บางครั้งอาจผิดพลาดเป็นเชื้อราในกลุ่ม zygomycetes ได้วิธีการทางอณูชีววิทยานั้นสามารถที่จะช่วยในการวินิจฉัย ได้ ซึ่งให้ผลที่ แม่น ยำและแน่นอน

ส่วน cutaneous pythiosis ในสุนัขซึ่งเป็นการพบโรคครั้งแรกที่เกิดขึ้นในทวีปแอฟริกาในปี ค.ศ. 2003 ในสุนัขอายุ 8 เดือน พันธุ์ German Shepherd ที่ประเทศมาลี (Mali) (รูปที่ 14) ซึ่งไปเคยไปเล่นน้ำที่แม่น้ำไนเจอร์ก่อนเกิดแผล ได้ถูกนำตัวไปรักษาที่ประเทศฝรั่งเศส ด้วยการผ่าตัด ร่วมด้วย antimicrobial agents และ ketoconazole แต่ก็ไม่ได้ผล จนแผลมีขนาดใหญ่ จึงต้องฆ่าสุนัข ส่วนชิ้นเนื้อจากรอยโรคได้นำมาย้อม GMS พบ septate hyphae และได้นำชิ้นเนื้อมาเพาะเลี้ยงหาสาเหตุของเชื้อที่ก่อโรค บนอาหาร SDA แต่ก็ไม่ได้ผล จึงได้นำชิ้นเนื้อมาสกัด DNAทำ PCR โดยใช้ primer ITS1 และ ITS4 ซึ่ง amplify ในช่วง ITS และนำไปหาลำดับเบส พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อ *P. insidiosum* (GenBank accession no. AY151157-79) (44)



<u>รูปที่ 14</u> แสดงลักษณะรอยโรค pythiosis ในสุนัข อายุ 8 เดือน พันธุ์ German Shepherd บริเวณสะโพก ด้านขวา (44)

ปัจจุบันได้มีการใช้วิธีทางอณูชีววิทยาในการจัดกลุ่มเชื้อ *P. insidiosum* เนื่องจาก *P. insidiosum* แต่ละสายพันธุ์ที่ได้มาจากที่ต่างที่กันก็จะมีลักษณะต่างกันไป เช่น ยา streptomycin ไม่มีผลช่วยในการเจริญจากเชื้อ *P. insidiosum* ที่มาจากประเทศ คอสตาริกา หรือ จากประเทศสหรัฐอเมริกา (ที่มาจากมลรัฐฟลอริดา และ แทนซาเนีย) แต่จะมีผลช่วยในการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* ที่มาจาก สายพันธุ์ที่มาจากคน จากประเทศไทย (27) อีกทั้งลักษณะความใกล้ชิดกัน

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทางสปีซีส์ของเชื้อ *P. insidiosum* กับ *Pythium* spp.ทำให้ลักษณะทางกายภาพมีความใกล้เคียงกัน ทั้งทางมหสัณฐาน หรือ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ เช่น เชื้อ *P. aphandermatum* จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 34-36 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับเชื้อ *P. insidiosum* ส่วน *Pythium* spp.จะอยู่ 25-30 องศาเซลเซียส (57)

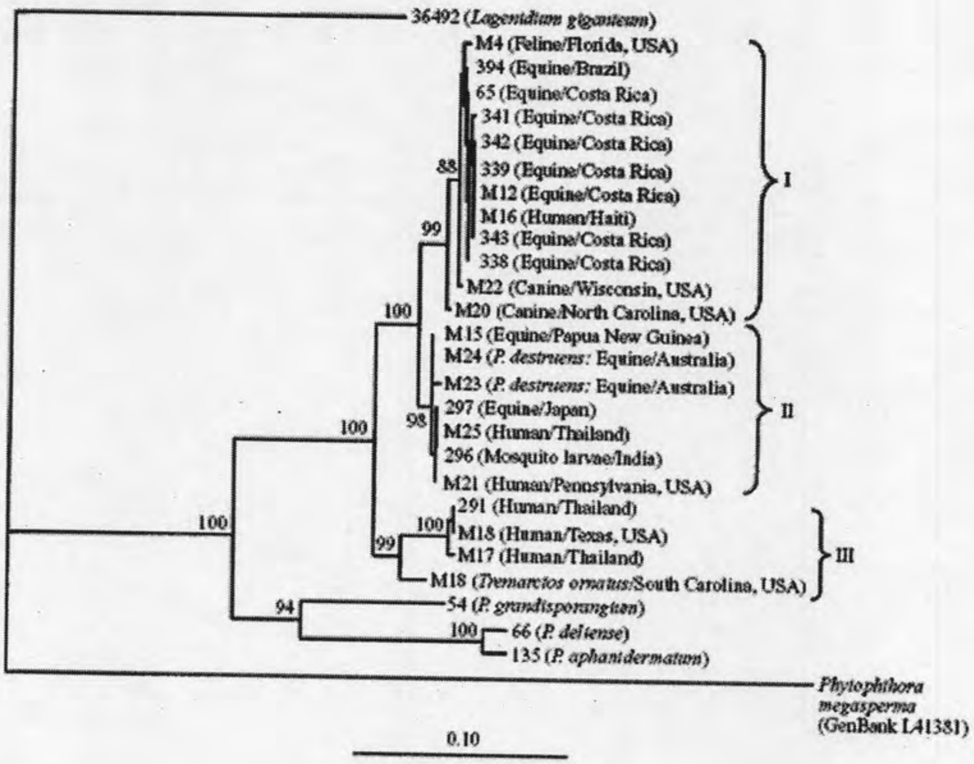
Pythium spp. และ *Phythopthora* spp. นั้นต่างก็อยู่ใน family เดียวกันจะต่างกันในการสร้าง zoospore โดยที่ *Pythium* spp. จะมีการสร้าง zoospore ด้านนอก vesicle ของ sporangium ส่วน *Phythopthora* spp. จะสร้าง zoospore ภายใน zoosporangium ซึ่งอาจบอกได้ว่า *Pythium* spp. อาจสืบทอดสายพันธุ์มาจาก *Phythopthora* spp. ก็เป็นได้ (4, 7)

P. insidiosum และ *Lagenidium* spp. ซึ่งจะมีความคล้ายคลึงกัน ทั้งลักษณะเส้นใย และการสร้าง zoospore แต่จะแตกต่างตรงลักษณะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (8)

ในปี ค.ศ. 2000 Martin ได้ทำการวิเคราะห์ mitochondrial cytochrome oxidase II (*cox* II) gene แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *P. insidiosum*, *P. aphandermatum* และ *P. deliense* นั้นอยู่ในกลุ่มเดียวกัน(26) และในปีเดียวกัน Hudspeth และคณะ ได้ศึกษา *cox* II gene ของเชื้อ *Pythium* spp. และ *Lagenidium* spp. และจัดอยู่ให้ใน clade ที่แยกออกจากเชื้อ *Phythopthora* spp. (41)

ในปี ค.ศ. 2003 Schurko และคณะได้ใช้ลำดับเบสในส่วน rDNA บริเวณ ITS หาเพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบส และทำ phylogenetic relationship ของเชื้อ *P. insidiosum* 23 สายพันธุ์ ต่างซึ่งมาจากภูมิภาคต่างๆ (รูปที่ 15), *Pythium* spp. *(P.deliense, P. apandermatum* และ *P. grandisorangium)* ,*Lagenidium gigateum* และ *Phythopthora megasperma* มาทำ PCR ในช่วง ITS ในส่วน rDNA ยกเว้น *Ph. megasperma* ที่ใช้ข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank อยู่แล้ว มาวิเคราะห์ลำดับเบส ซึ่งพบว่าความยาวของลำดับในช่วง ITS ที่ประกอบไปด้วยส่วน ITS1 , 5.8S และ ITS2 สำหรับเชื้อ *P. insidiosum* มีความแตกต่างกันไม่มาก และมีความยาวอยู่ที่ 833-842 คู่เบส ขณะที่ *P.deliense* ยาว 773 คู่เบส , *P. apandermatum*777 คู่เบส, *L. gigateum* 782 คู่เบส และ *Ph. megasperma* ยาว 818 คู่เบส (จากข้อมูล GenBank) ซึ่งในกลุ่ม *P. insidiosum* 23 สายพันธุ์นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสประมาณ 1-3 คู่เบส จากการ insertion และ deletion ของ gene ส่วนเชื้อที่มีการ insertion และ deletion อย่างมากพบใน *P.deliense, P. apandermatum,P. grandisorangium, Phythopthora megasperma* และ *Lagenidium gigateum* และข้อมูลที่ได้มาทำ phylogenetic relationship

Pythium insidiosum phylogeny

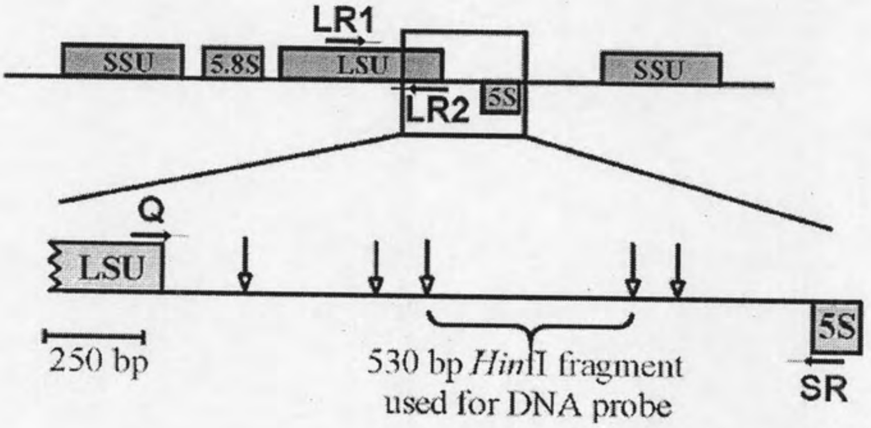


<u>รูปที่ 15</u> แสดง Phylogenetic relationships diagram ของเชื้อ *P. insidiosum* และเชื้อต่างๆ ในส่วนITS จาก rDNA (48)

สามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อ *P. insidiosum* ได้ออกเป็น 3 clade โดยที่ โดยที่ Clade I ประกอบด้วยเชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้มาจาก ทางเหนือ, กลาง และ ทางใต้ ของทวีปอเมริกา Clade II ประกอบด้วยเชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้มาจาก เอเชีย, ประเทศออสเตรเลีย และประเทศสหรัฐอเมริกา และ Clade III ประกอบด้วยเชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้มาจาก ประเทศไทย และประเทศอเมริกา ซึ่ง Clade I และ Clade II จะมีความใกล้ชิดกันมากกว่า Clade III

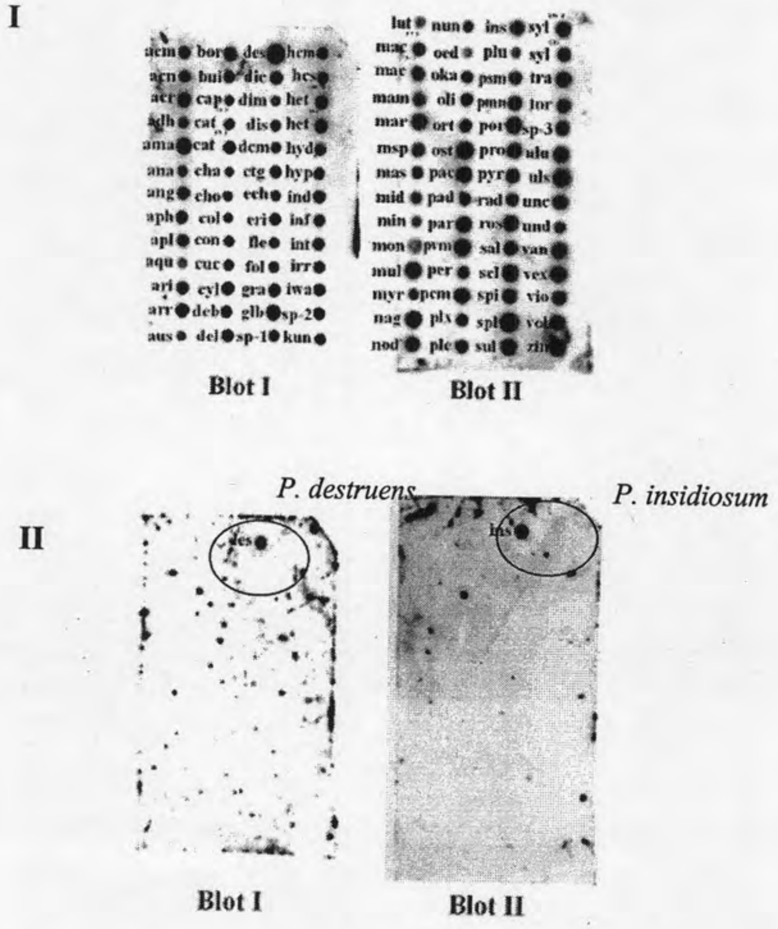
จากการทำ phylogenetic relationships นั้น เชื้อ *P. insidiosum* จะแยกออกจากกลุ่ม *Pythium* spp.(*P.deliense, P. apandermatum* และ *P. grandisorangium*) และแยกออกจากเชื้อ *Lagenidium gigateum* และ *Phythopthora megasperma* ซึ่งมีความห่างไกลจาก *P. insidiosum* ด้านสปีชีส์มากที่สุด (48)

ต่อมา Schurko และคณะได้สร้าง specific DNA probe ซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อจำแนกเฉพาะต่อเชื้อ *P. insidiosum* ออกจากเชื้อ *Pythium* spp. และเชื้อที่ก่อโรคคล้าย pythiosis โดยไม่มี cross-react เกิดขึ้น และยังสามารถจัดจำแนกเชื้อ *P. insidiosum* ที่มาจากภูมิภาคต่างๆได้ออกเป็น 3 clade โดยแบ่งตามความเข้มของการเกิด Hybridization ต่อ DNA probe โดย probe นั้นจะเป็นส่วน 530-bp HinfI fragment ที่ได้มาจากส่วน rDNA (IGS-1) จากเชื้อ *P. insidiosum* ดังรูปที่ 16



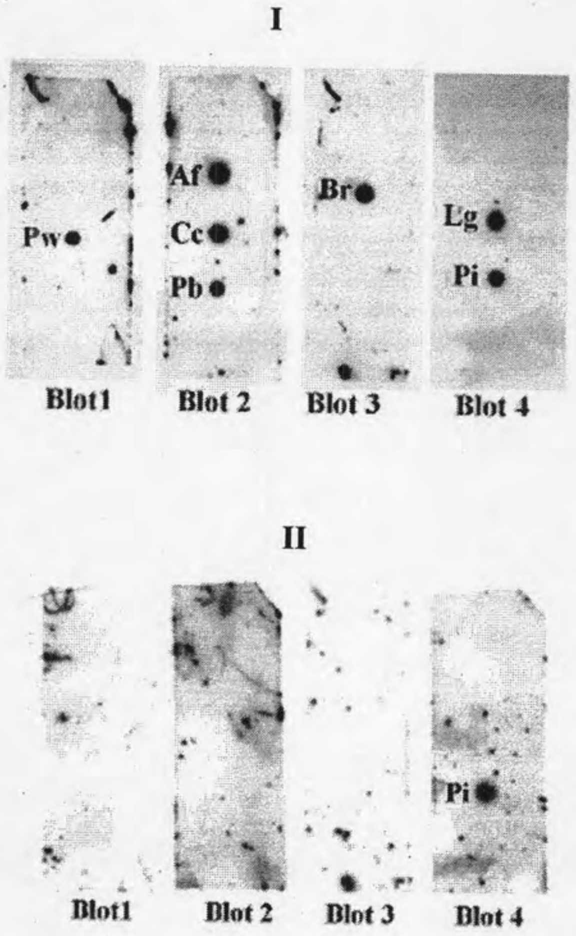
<u>**รูปที่ 16**</u> แสดงตำแหน่ง primer ที่ใช้ในการสร้าง 2,500 bp-LSU rRNA gene probe คือ LR1 และ LR2 รวมทั้งแสดง ตำแหน่งของ primer Q และ SR ในช่วงครอบคลุม IGS-1 ที่ใช้ ในการสร้าง specific DNA probe และ HinfI restriction site ซึ่งอยู่ในส่วน IGS-1 ของ เชื้อ *P. insidiosum* ที่นำมาเป็น specific DNA probe (49)

โดยนำ 104 genomic DNA *Pythium* species มา hybridization กับ 2,500 bp-LSU rRNA gene probe (รูปที่ 17 (I)) จากนั้น ล้าง membrane เพื่อให้ probe หลุดออกแล้วนำมา re-hybridization ด้วย 530-bp HinfI fragment specific probe ใน membrane แผ่นเดิมดังรูปที่ 17 (II) ผลปรากฏว่า มีเพียง *P. insidiosum*และ *P. destruens* (เป็นเชื้อตัวเดียวกับ *P. insidiosum*) เท่านั้น ที่เกิดการ hybridization โดยไม่มีการ cross-react ต่อ *Pythium* spp. อื่นๆที่เหลือ



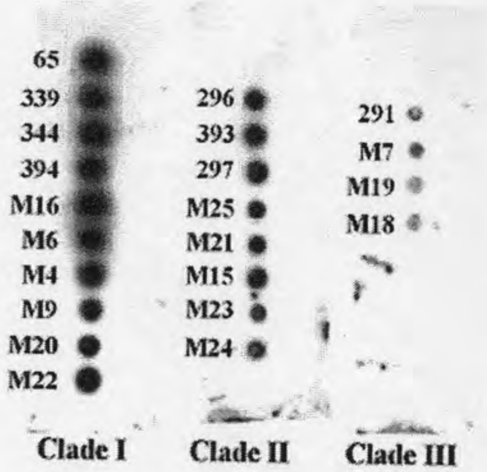
<u>รูปที่ 17</u> แสดงผลการทำ dot blot hybridization ต่อ genomic DNA *Pythium* spp. 104 สายพันธุ์ : รูป **I** แสดงผลการใช้ 2,500 bp-LSU rRNA gene probeต่อ genomic DNA *Pythium* spp. 104 สายพันธุ์ , รูป **II** แสดงผลการ re- hybridization ทั้ง 104 *Pythium* spp. อีกครั้งทั้งในแผ่น membrane เดิมด้วย 530-bp HinfI fragment specific DNA probe (49)

และ 530-bp HinfI fragment specific DNA probe ยังสามารถแยกเชื้อ *P. insidiosum* ออกจากเชื้อที่ก่อโรคคล้าย Pythiosis คือ เชื้อ *B. ranarum* และ *C. coronatus* ซึ่งเป็นราในกลุ่ม zygomycetes, เชื้อในกลุ่ม ascomycetes คือ *A. flavus* และ *P. brasiliensis*, เชื้อ *P. wickerhamii* และเชื้อ *L. giganteum* ดังรูปที่ 18 (II)



<u>รูปที่ 18</u> แสดงผลการทำ dot bot dot blot hybridization ต่อ genomic DNA ของเชื้อ *P. insidiosum* และเชื้อที่ก่อโรคคล้าย pythiosis : รูป **I** แสดงผลการ hybridization ของเชื้อ *Aspergillus flavus*(Af), *Conidiobolus coronatus* (Cc), *Basidiobolus ranarum*(Br), *Lagenidium giganteum* (Lg), *Prototheca wickerhamii* (Pw), *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) และ *Pythium insidiosum* (Pi) ต่อ 2,500 bp-LSU rRNA gene probe, รูป **II** แสดง ผลการ re- hybridization อีกครั้งที่แผ่น membrane เดิม ด้วย 530-bp HinfI fragment specific probe ผลปรากฏว่า hybridization ได้เฉพาะ *P. insidiosum* (49)

530-bp HinfI fragment specific probe ไม่เพียงแต่ที่สามารถแยกเชื้อ *P. insidiosum* ออกจากเชื้อ *Pythium* spp. และ เชื้อที่ก่อโรคคล้าย pythiosis เท่านั้น แต่ยังสามารถจัดแยกเชื้อ *P. insidiosum* ได้ออกเป็น 3 clade โดยนำ 530-bp HinfI fragment specific probe มา hybridization ต่อ genomic DNA ของ 22 สายพันธุ์ของเชื้อ *P. insidiosum* ที่มาจากภูมิภาคต่างๆทั่วโลกทั้งที่มาจากคนและสัตว์ โดยก่อนหน้านั้นนำมา hybridization กับ 2,500 bp-LSU rRNA gene probe ซึ่งทุกตัวเกิดการ hybridization ที่ความเข้มสีเท่ากันเนื่องจากได้มีการปรับปริมาณความเข้มข้นของDNAทุกครั้งก่อนการ dot blot บน membrane และผลปรากฏว่าสามารถแยกประเภทได้ออกเป็น 3 clade ตามความเข้มของการ hybridization ดังรูปที่ 19



__รูปที่ 19__ แสดงผลการ hybridization ด้วย 530-bp HinfI fragment specific probe ต่อ genomic สาร DNA 22 สายพันธุ์ของเชื้อ *P. insidiosum* ที่มาจากภูมิภาคต่างๆทั่วโลก ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 clade ตามความเข้มของการ hybridization (49)

โดยที่ Clade I ประกอบด้วยเชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้มาจาก ทางเหนือ กลาง และ ทางใต้ของทวีปอเมริกา Clade II ประกอบด้วยเชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้มาจาก เอเชีย ออสเตรเลีย และ อเมริกา และ Clade III ประกอบด้วยเชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้มาจาก ประเทศไทย และ อเมริกา

ดังนั้น 530-bp HinfI fragment specific probe ที่ได้มาจากส่วนของ IGS-1 จาก rDNA gene นั้น สามารถแยกเชื้อ *P. insidiosum* ได้ถึงในระดับสปีซีส์ และไม่มีการ cross-react ต่อเชื้อ *Pythium* spp. อื่น รวมถึงเชื้อที่ก่อโรคคล้ายกับโรค pythiosis และยังสามารถแบ่งเชื้อ *P. insidiosum* ได้เป็น 3 clade (49) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการแบ่ง clade ด้วยการทำ Phylogenetic relationships ในส่วน ITS เช่นกัน (48)