บทที่ 1

บทนำ

1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีสำคัญ หรือสมมติฐาน

การระบาดของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ซึ่งเป็นโปรโตซัวที่เป็นสาเหตุของโรคเซอรา (surra) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางด้านการปศุสัตว์และเศรษฐกิจของประเทศไทย และการควบคุมโรคทำได้ยาก เนื่องจากประเทศไทยมีความชุกของแมลงพาหะที่สามารถนำเชื้อได้ ซึ่งบางครั้งเกิดการระบาดรุนแรงของโรคเซอราและมีสัตว์ล้มตายเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะม้า และอาจเกิดจากการติดเชื้อซ้ำจากเชื้อหลายสายพันธุ์ ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีการรายงานการแยกสายพันธุ์ของเชื้อ*T. evansi* มาก่อน การศึกษาการระบาดของเชื้อในขั้นต้นเป็นการหาความแตกต่างของสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อ *T. evansi* เพื่อบ่งชี้ความสัมพันธ์และความแตกต่างของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ทำให้สามารถบอกได้ว่าสัตว์ที่ติดเชื้อ *T. evansi* ที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงกันเกิดจากสายพันธุ์ที่มีความเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันหรือไม่ หรือเกิดจากจำนวนประชากรของเชื้อมากกว่า 1 กลุ่ม (mixed population) หรือเกิดจากการขนย้ายสัตว์ระหว่างพื้นที่ ดังนั้นวิธีการนี้สามารถหาสาเหตุได้ว่าการติดเชื้อ *T. evansi* ของสัตว์เกิดจากประชากรเชื้อใดในพื้นที่เก่าหรือพื้นที่ใหม่ที่สัตว์เพิ่งจะถูกย้ายเข้ามา เนื่องจากปัจจุบันไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *T. evansi* แต่ละสายพันธุ์ได้ด้วยการดูรูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์หรือทางซีรั่มวิทยา

ในประเทศไทยได้มีผู้รายงานถึงความแตกต่างของ DNA ของเชื้อ *T. evansi* ในปี ค.ศ. 1989 Viseshakul ได้ใช้วิธี Southern blot hybridization โดยใช้ DNA ตรวจสอบ (DNA probe) ชื่อ pTec.21 และ Watanapokasin และคณะ (1998) ใช้วิธี Arbitrary Primered-Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) ทำให้ได้ DNA fingerprinting profiles ของเชื้อ *T. evansi* และใช้อธิบายการเกิดการระบาดของเชื้อดังกล่าวในฟาร์มโคนมที่อำเภอค่ายบางระจัน และอำเภออินทร์บุรี จังหวัดสิงห์บุรีได้ว่าเกิดจากประชากรของเชื้อ *T. evansi* มากกว่า 1 isolate นอกจากนั้นในปี ค.ศ.1999 Basagoudanavar และคณะ และปี ค.ศ.2001 Omanwar และคณะ ยังพบว่าเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆที่ทำการศึกษามี DNA polymorphisms โดยแสดงเป็น DNA fingerprinting profiles ด้วยวิธี AP-PCR

เนื่องจากห้องปฏิบัติการของหน่วยปรสิตวิทยาได้เก็บเชื้อ *T. evansi* isolate Npl 8/2 ที่ผ่านการโคลนมาแล้วจาก Vriej University of Brussels ประเทศเบลเยี่ยม (Viseshakul, 1989) ซึ่งมั่นใจได้ว่ามาจากเชื้อเพียง 1 ประชากร โดยจะทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสของ internal transcribed spacer 1 (ITS1) ระหว่างเชื้อ *T. evansi* isolate Npl 8/2 กับ เชื้อ isolate อื่นที่ไม่ได้

ผ่านการโคลนเพื่อยืนยันว่าเชื้อ *T. evansi* isolate NpI 8/2 เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์จริง ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) สำหรับ DNA fingerprinting profiles ของเชื้อ *T. evansi* ด้วยการตรวจสอบด้วยวิธี minisatellites PCR

ในการศึกษาครั้งนี้มีความสนใจที่จะศึกษาหาความแตกต่างของเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี minisatellites PCR โดยใช้ inverted primers ที่ออกแบบจากลำดับเบสของ DNA ตรวจสอบ (pTec.21) ที่รายงานไว้โดย Viseshakul (1989) ซึ่งจะทำให้ได้ ชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน เนื่องจากแต่ละ minisatellite unit มีระยะห่างที่แตกต่างกันและมีลักษณะที่จำเพาะในแต่ละ isolate ทำให้เกิดเป็น DNA fingerprinting profile ของ minisatellites ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาการระบาดของประชากรเชื้อ *T. evansi*

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อ *T. evansi* สายพันธุ์ NpI 8/2 ที่ใช้เป็นสายพันธุ์หลักของการศึกษาเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่โคลนมาจาก 1 ปรสิตและนำมาเป็นตัวควบคุมบวกของ DNA fingerprint 1 profile
2. เพื่อศึกษาหาความหลากหลายของพันธุกรรมภายในชนิดของเชื้อ *T. evansi* แต่ละ isolate ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ inverted primers ที่ออกแบบจาก DNA ตรวจสอบ pTec.21
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างข้อมูลลำดับเบสของ ITS1 และ minisatellites
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetics) ของเชื้อ *T. evansi* สายพันธุ์ต่างๆ โดยอาศัยลำดับเบสในส่วนของ small subunit rRNA gene ร่วมกับ DNA fingerprint

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. เชื้อ *T. evansi* สายพันธุ์ NpI 8/2 เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์จริงหรือไม่
2. เชื้อ *T. evansi* แต่ละ isolate มีความแตกต่างของ DNA fingerprinting profiles หรือไม่ ด้วยเทคนิค PCR ที่มี primer ออกแบบจาก 122 bp (คู่เบส) ของ pTec.21 ที่ใช้เป็น DNA ตรวจสอบ
3. ความสัมพันธ์ใกล้ชิด (relatedness) และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetics) ของเชื้อ *T. evansi* สายพันธุ์ NpI 8/2 กับเชื้อ *T. evansi* isolate อื่นๆที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นอย่างไร เมื่อใช้ลำดับเบสของ 18S rRNA gene และ DNA fingerprinting profiles

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงความแตกต่างภายในชนิดของเชื้อ *T. evansi* ด้วยการใช้วิธี PCR
2. ทราบถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆ
3. เป็นประโยชน์ในด้านการศึกษาการระบาดของเชื้อ *T. evansi* ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยในอนาคต