บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการศึกษา

5.1 เชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบนาธรรมชาติ

จากการตรวจเลือดกบนาธรรมชาติจำนวน 160 ตัว จาก 6 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ เชียงใหม่ แพร่และสระแก้ว ตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2549 ถึงเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2549 พบเชื้อ *Lankesterella* sp.ในเลือดของกบนาจำนวน 53 ตัว คำนวณค่าการติดเชื้อและค่าความหนาแน่นเชื้อดังต่อไปนี้

5.1.1 ค่าการติดเชื้อ *Lankesterella* sp.ในกบนาธรรมชาติ

จากผลการตรวจเลือดกบนาธรรมชาติพบว่ากบนาจำนวน 53 ตัวติดเชื้อ *Lankesterella* sp. ระยะสปอโรซอยท์ในเลือดจากจำนวนตัวอย่างกบนาที่ศึกษา 160 ตัว คำนวณค่าการติดเชื้อได้เท่ากับ 33.13 % โดยค่าการติดเชื้อในประชากรกบนาจากจังหวัดอุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ เชียงใหม่ แพร่และสระแก้ว คือ 56.36%, 2.86 %, 28.57%, 55.56 %, 5.88 % และ 36.67 % ตามลำดับ โดยพบค่าการติดเชื้อสูงสุดในประชากรกบนาจากจังหวัดอุบลราชธานีที่เก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคมถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2549 คือ 56.36 % (พบการติดเชื้อในกบ 31 ตัวจากกบ 55 ตัว) และค่าการติดเชื้อต่ำสุดในประชากรกบนาจากจังหวัดนครราชสีมาที่เก็บตัวอย่างในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2549 มีค่าการติดเชื้อต่ำที่สุดคือ 2.86 % (พบการติดเชื้อในกบ 1 ตัวจากกบ 35 ตัว) แสดงให้เห็นว่าค่าการติดเชื้อในกบแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันไป การศึกษาครั้งนี้รายงานการพบเชื้อเป็นครั้งแรกในกบนาจากจังหวัดอุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ แพร่ และสระแก้ว เพิ่มเติมจากรายงานของ Chutmongkonkul and Pariyanonth (2005) ที่สำรวจพบเชื้อในเลือดกบนาธรรมชาติจากจังหวัดน่านมีค่าการติดเชื้อ 71.42 % และรายงานของ Chutmongkonkul *et. al.* (2005) ที่สำรวจพบเชื้อในเลือดกบนาธรรมชาติจากจังหวัดชลบุรีและจากบ่อเลี้ยงกบในจังหวัดเชียงใหม่มีค่าการติดเชื้อ 44.44% ส่วนการสำรวจเชื้อในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่นในประเทศไทยนั้นมีรายงานการพบเชื้อ *Lankesterella* sp.ในเลือดของกบห้วยขาปุ่ม *Limnonectes kuhlii* และกบทูด *Rana blythii* มีค่าการติดเชื้อ 66.7% และ 7.1% ตามลำดับ (Chutmongkonkul *et. al.* 2006)

5.1.2 ค่าความหนาแน่นเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบนาธรรมชาติ

จากการนับจำนวนสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lanketerella* sp. ที่พบในเลือดกบนา 53 ตัวมาคำนวณค่าเฉลี่ยความหนาแน่นเชื้อในกบทั้งหมดได้เท่ากับ 0.63% (± 2.22%) โดยค่าเฉลี่ยความหนาแน่นเชื้อของประชากรกบนาจากจังหวัดอุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ เชียงใหม่ แพร่และ

สระแก้ว คือ 0.51 %, 0.01 %, 0.07 %, 0.10 %, 0.50 % และ 1.49 % ตามลำดับ โดยประชากรกบนาจากจังหวัดสระแก้วที่เก็บตัวอย่างในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549 มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นเชื้อสูงสุด คือ 1.49 % ส่วนประชากรกบนาจากจังหวัดนครราชสีมาที่เก็บตัวอย่างในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2549 มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นเชื้อต่ำสุดคือ 0.01% แสดงให้เห็นว่าค่าความหนาแน่นเชื้อในกบแต่ละพื้นที่ มีความแตกต่างกันไปซึ่งน่าจะมีปัจจัยในด้านการแพร่กระจายและความชุกชุมของปลิงที่เป็นพาหะนำเชื้อรวมไปถึงปัจจัยในเรื่องอายุกบที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ที่ไม่ได้ดำเนินการตรวจสอบ อย่างไรก็ดี การศึกษาครั้งนี้รายงานการค่าเฉลี่ยความหนาแน่นเชื้อในประชากรกบนา เป็นครั้งแรกของรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *Lankesterella* sp.ในประเทศไทย

5.1.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโพรโทซัว *Lankesterella* sp. ที่พบในกบนาธรรมชาติ

จากการตรวจศึกษาเชื้อ *Lankesterella* sp. ระยะสปอโรซอยท์ในเลือดกบพบว่ามีสองรูปแบบคือ รูปแบบที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง และรูปแบบที่อยู่เป็นอิสระนอกเม็ดเลือดแดง ตรงกันกับรายงานของ Chutmongkonkul and Pariyanonth (2005) ที่ศึกษาเชื้อ *Lankesterella* sp. ในเลือดของกบนาธรรมชาติจากจังหวัดน่านโดยสปอโรซอยท์ทั้งสองรูปแบบมีลักษณะเรียวโค้ง นิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์ พารานิวเคลียร์บอดีติดสีจาง อยู่ทางด้านหน้าและด้านท้ายของนิวเคลียสด้านละ 1 อัน เมื่อเปรียบเทียบขนาดสปอโรซอยท์ที่พบในการศึกษาครั้งนี้กับสปอโรซอยท์ของ *L. minima* จากรายงานของ Clark et. al. (1969) พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกัน

ในตารางที่ 5-2 แสดงการเปรียบเทียบขนาดของสปอโรซอยท์ของ *Lankesterella* spp. จากรายงานของ Clark et. al. (1969), Chutmongkonkul and Pariyanonth (2005) กับการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบรูปร่างและขนาดของสปอโรซอยท์พบว่าสปอโรซอยท์ที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีรูปร่างเหมือนกับสปอโรซอยท์ที่พบจากรายงานการศึกษาดังกล่าวและมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิดเดียวกัน

จากการเปรียบเทียบขนาดระหว่างสปอโรซอยท์รูปแบบที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงและรูปแบบที่อยู่เป็นอิสระ พบว่าสปอโรซอยท์รูปแบบที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงมีขนาดความกว้างเซลล์โดยเฉลี่ยมากกว่ารูปแบบที่อยู่เป็นอิสระ สปอโรซอยท์ที่อยู่เป็นอิสระมีขนาดความยาวเซลล์โดยเฉลี่ยมากกว่ารูปแบบที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (ตารางที่ 5-1) ซึ่งจากรายงานของ Heller (1974) ที่ได้ทำการศึกษาเชื้อ *Lankesterella minima* ในกบ *Rana pipiens* ตั้งข้อสังเกตว่าโดยปกติเชื้อจะอยู่ในเม็ดเลือดแดง เมื่อเจาะเลือดกบและทำแผ่นฟิล์มเลือดบนสไลด์ทำให้เชื้อบางตัวออกมาจากเม็ดเลือดแดงอย่างรวดเร็วมาอยู่ในพลาสมา เชื้อมีการเคลื่อนที่ในลักษณะเกลียวคลื่นและมีการยืดตัวขณะเคลื่อนที่ จึงทำให้สปอโรซอยท์ที่พบในพลาสมามักจะมีขนาดความยาวเซลล์มากกว่า แต่มีขนาดความกว้างเซลล์น้อยกว่าสปอโรซอยท์ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง

ลักษณะของสปอโรซอยท์ที่สังเกตจากการศึกษาครั้งนี้มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *L. minima* เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *L. minima* โดย Tse *et. al.* (1974) ในขณะเดียวกันข้อมูลขอบเขตการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อ *L. minima* นั้นพบในกบหลายชนิดจากทวีปอเมริกาเหนือ อเมริกากลาง ยุโรปและเอเชีย (Clark *et. al.*, 1969; Levine and Nye, 1977; Barta and Desser, 1984; Ray, 1984; Barta, 1989; Desser *et. al.*, 1990; Paperna and Ogara, 1996; Desser, 2001; Jimenez *et. al.*, 2001) โดยเฉพาะในรายงานของ Ray (1984) ที่กล่าวว่าพบเชื้อ *L. minima* ในเลือดกบ *R tigrina* จากประเทศอินเดีย แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *L. minima* อาจมีขอบเขตการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์มาถึงประเทศไทย อันเป็นข้อสนับสนุนว่าเชื้อที่พบในการศึกษาในครั้งนี้อาจจะเป็นเชื้อชนิด *L. minima*

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Lankesterella* sp. ที่พบในการศึกษาครั้งนี้กับเชื้อชนิดอื่นในสกุลเดียวกันที่ได้มีการบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาไว้ พบว่าเชื้อที่พบจากการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างจากเชื้อ *Lankesterella bufonis* ที่รายงานไว้โดย Mansour and Mohammed (1962) กล่าวถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *L. bufonis* ที่พบเชื้อในคางคก *Bufo regularis* จากประเทศอียิปต์ไว้ว่าสปอโรซอยท์พบในเลือดมีทั้งที่อยู่ภายในเม็ดเลือดแดงและอยู่เป็นอิสระ สปอโรซอยท์มีขนาดเล็กเรียวบางและโค้ง ติดสีด้านหน้าเข้มกว่าด้านท้าย นิวเคลียสรูปร่างกลมอยู่ค่อนไปทางด้านท้ายของเซลล์ มีแวคิวโอลขนาดใหญ่ 1 อันอยู่ค่อนไปทางด้านหน้าของเซลล์ ดังนั้นเชื้อที่พบจึงไม่ใช่ *L. bufonis*

Stehbens (1966)[1] กล่าวถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Lankesterella hylae* ที่พบในกบ *Hyla caerulea* จากประเทศออสเตรเลียไว้ว่าสปอโรซอยท์พบในเลือดมีทั้งที่อยู่ภายในเม็ดเลือดแดงและอยู่เป็นอิสระ สปอโรซอยท์มีรูปร่างเรียวยาวและโค้ง ปลายด้านหนึ่งทู่และสั้นกว่าปลายอีกด้านหนึ่ง สปอโรซอยท์ส่วนน้อยอยู่เป็นอิสระนอกเม็ดเลือดแดง นิวเคลียสอยู่บริเวณกลางเซลล์หรืออยู่ใกล้ไปทางปลายด้านหน้าติดสีม่วงเป็นแถบ บางครั้งเป็นจุดหรือแกรนูล ที่ปลายของนิวเคลียสทางด้านหน้าและด้านท้ายปรากฏด้วยแวคิวโอล ในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลอยู่ทั่วไป บนส่วนเว้าของสปอโรซอยท์ใกล้นิวเคลียสมีการโป่งขึ้นออกมาคล้ายโดม ซึ่งเป็นลักษณะที่ใช้วินิจฉัย *L. hylae* ลักษณะดังกล่าวไม่พบในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นเชื้อที่พบจึงไม่น่าเป็น *L. hylae*

รายงานการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโพรโทซัว *Lankesterella* sp. ที่พบในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ได้มีการอธิบายลักษณะสปอโรซอยท์ของเชื้อโพรโทซัวสกุล *Lankesterella* จำนวน 6 ชนิดได้แก่ *L. minima*, *L. monilis*, *L. canadensis*, *L. bufonis*, *L. hylae* และ *L. dicroglossi* (ภาพที่ 5.1) สปอโรซอยท์ที่พบในเลือดกบในการศึกษาครั้งนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อชนิด *L. minima* และ *L. dicroglossi* เนื่องจากมีนิวเคลียสอยู่กลางเซลล์ มีพารานิวเคลียร์บอดีอยู่ทางด้านหน้าและทางด้านท้ายของนิวเคลียสด้านละ 1 อัน เชื้อทั้งสองชนิดแตกต่างในระยะการเจริญสปอโรโกนี คือระยะโอโอซีสต์ของ *L. dicroglossi* จะไม่มีลักษณะ cytoplasmic bridge เชื่อม

ตารางที่ 5-2 แสดงขนาดสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* spp. เปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่พบในกบนาจากการศึกษาครั้งนี้กับรายงานการศึกษาโดย Clark *et. al.* (1969) และ Chutmongkonkul and Pariyanonth (2005)

Lankesterella species	Host species	Localities	Studies	Form	Size (μ)	
					length	wide
L. sp.	*Hoplobatrachus rugulosus*	Thailand	(this study)	intracellular form	10.1	2.1
L. sp.	*H. rugulosus*	Thailand	Chutmongkonkul and Pariyanonth (2005)	intracellular form	7.3	1.6
L. minima	*Rana cascade*	USA, North America	Clark *et. al.* (1969)	intracellular form	10.1	2.2
L. sp.	*H. rugulosus*	Thailand	(this study)	extracellular form	11.0	1.7
L. sp.	*H. rugulosus*	Thailand	Chutmongkonkul and Pariyanonth (2005)	extracellular form	11.3	1.1
L. minima	*R. cascade*	USA, North America	Clark *et. al.* (1969)	extracellular form	12.4	1.5

5.2 กบที่ใช้ในการทดลอง

จากการสำรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. ในตัวอย่างกบนาธรรมชาติ 160 ตัว พบว่ากบนาตัวที่มีค่าความหนาแน่นเชื้อสูงสุดได้แก่กบนาจากจังหวัดสระแก้วที่เก็บตัวอย่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549 มีค่าความหนาแน่นเชื้อ 7.68% นำไปใช้เป็นกบตัวให้เชื้อในการทดลองแพร่เชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Chutmongkonkul *et. al.* (2005) ที่สำรวจพบเชื้อในเลือดกบนาธรรมชาติจากจังหวัดชลบุรีมีค่าความหนาแน่นเชื้อสูงสุด 4.74% พบว่ากบนาจากจากจังหวัดสระแก้วที่ค่าความหนาแน่นเชื้อสูงสุดจากการศึกษาครั้งนี้มีค่าความหนาแน่นเชื้อสูงกว่า ประกอบกับผลการตรวจเลือดไม่พบเชื้อปรสิตชนิดอื่น กบนาตัวนี้จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการทดลองเป็นกบนาตัวให้เชื้อสอดคล้องกับวิธีการของ Desser *et. al.* (1990) ที่ทดลองแพร่เชื้อ *L. minima* ในลูกอ๊อดกบบูลฟรอก *Rana catesbeiana* โดยใช้ปลิงในกลุ่ม glossiphoniid ชนิด *Batracobdella picta* เป็นพาหะ และใช้กบบูลฟรอกตัวเต็มวัยธรรมชาติที่มีค่าความหนาแน่นของเชื้อสูงเป็นตัวให้เชื้อ

5.3 การเลือกตัวอย่างปลิงที่ใช้ในการทดลอง

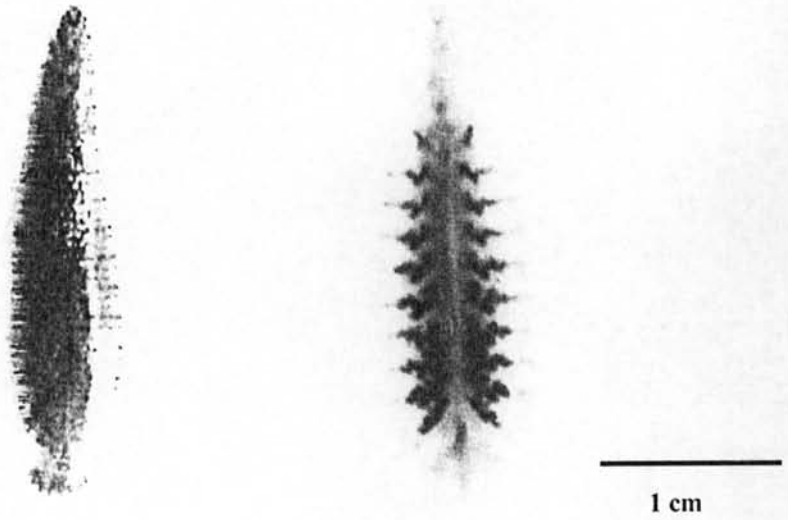
ในการเก็บตัวอย่างปลิงเพื่อนำมาใช้ในการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบนา ได้ทำการเก็บตัวอย่างปลิงน้ำจืดจากสัตว์น้ำที่เป็นผู้ให้อาศัยและแหล่งน้ำธรรมชาติใน 5 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี สระบุรี กรุงเทพมหานคร อุบลราชธานีและนครพนม โดยเก็บตัวอย่างปลิงจากแหล่งน้ำและจากสัตว์น้ำที่เป็นผู้ให้อาศัยตามวิธีการของ Lincoln and Sheals (1979) ที่กล่าวถึงการเก็บตัวอย่างปลิงที่อาศัยอยู่ในน้ำโดยการใช้ปากคีบ ปลิงส่วนหนึ่งนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทำให้ปลิงสลบด้วยการใส่ปลิงใน 5-10 % ethyl alcohol รักษาสภาพตัวอย่างใน 10% formalin สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปลิงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่าปลิงที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจำแนกได้ 3 ชนิด คือ *Placobdelloides siamensis* (Oka, 1917), *Alboglossiphonia weberi* (Blanchard, 1897) และ *Hirudinaria javanica* (Wahlberg, 1856)

ปลิงชนิด *Hirudinaria javanica* (ภาพที่ 5-2) จัดเป็นปลิงในกลุ่ม aquatic jawed leech (Order Arhynchobdellida; Family Hirudinidae) หรือปลิงที่มีขากรรไกรและฟันที่ใช้ในการกัดผิวหนังของผู้ให้อาศัยให้เป็นแผลก่อนที่จะดูดเลือดเข้าไป ปลิงในกลุ่มนี้ยังไม่มีรายงานสนับสนุนที่แน่ชัดเกี่ยวกับการเป็นพาหะนำเชื้อโพรโทซัวติดต่อในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก จากการเพาะเลี้ยงปลิง *Hirudinaria javanica* ในห้องปฏิบัติการด้วยการให้ดูดเลือดหนู *Rattus rattus* เนื่องจากปลิงชนิดนี้มีผู้ให้อาศัยหลักคือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Sawyer, 1986) นั้นยังไม่ถึงขั้นที่ปลิงระยะตัวเต็มวัยที่มีการผสมพันธุ์ได้ ทำให้การขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนปลิงชนิดนี้จึงยังไม่สามารถกระทำได้ จากสองเหตุผลดังกล่าว จึงไม่นำปลิงชนิดนี้มาเป็นปลิงพาหะในการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp.

ภาพที่ 5-2 แสดงตัวอย่างปลิง *Hirudinaria javanica* จากแหล่งน้ำธรรมชาติ
ภาพซ้าย: ด้านหลัง ภาพขวา: ด้านท้อง

ปลิงชนิด *Placobdelloides siamensis* (ภาพที่ 5-3) และปลิง *Alboglossiphonia weberi* (ภาพที่ 5-4) จัดเป็นปลิงในกลุ่ม glossiphoniid หรือปลิงในวงศ์ Glossiphoniidae ซึ่งมีรายงานว่าปลิงในกลุ่มนี้เป็นพาหะนำเชื้อโพรโทซัวหลายชนิดในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก เช่นในรายงานที่ปรากฏใน Swayer (1986) กล่าวถึงรายงานของ Nöller ในปี ค.ศ. 1912 ที่พบว่าปลิง *Hemiclepsis marginata* เป็นพาหะนำเชื้อ *Trypanosoma rotatorium* ในกบ *Rana esculenta* อีกรายงานปรากฏใน Sawyer (1986) ที่กล่าวถึงการสำรวจของ Cordero ในปี ค.ศ. 1937 พบว่าปลิง *Haementeria depressa* และ *H. molesta* ดูดเลือดกบ *Leptodactylus ocellatus* เป็นอาหารและแพร่เชื้อ *T. leptodactyli* ไปสู่กบ

การเพาะเลี้ยงปลิง *P. siamensis* และ *A. weberi* ในห้องปฏิบัติการโดยการให้ปลิงดูดเลือดผู้ให้อาศัยชนิดเดียวกับที่พบว่ามีปลิงชนิดนั้นเกาะอาศัยอยู่ในธรรมชาติ ได้แก่ เต่านา *Malayemys subtrijuga* และกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ตามลำดับ ปลิงทั้งสองชนิดใช้เวลาเติบโตตั้งแต่ระยะลูกปลิงจนถึงปลิงระยะโตเต็มวัยที่มีการผสมพันธุ์และวางไข่ภายในระยะเวลาสองเดือน ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการปฏิบัติการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. เมื่อพิจารณาปลิง *P. siamensis* พบว่าดูดเลือดเต่าเป็นอาหารหลัก ลูกปลิงบางตัวที่ดูดเลือดกบแต่ปริมาณเลือดที่ดูดก็ไม่มากพอที่จะทำให้เติบโตได้ ส่วนปลิง *A. weberi* ดูดเลือดกบเป็นอาหารหลัก สังเกตได้จากการที่ปลิงชนิดนี้ที่เพาะเลี้ยงทุกตัวสามารถเติบโตขึ้นจากการดูดเลือดกบเป็นอาหาร ทำให้มีโอกาสที่จะได้รับเลือดกบเป็นปริมาณมากเข้าสู่ตัวปลิง คาดว่าเมื่อทดลองโดยใช้ปลิงดูดเลือดกบนาติดเชื้อ ปลิง *A. weberi* จะได้รับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในปริมาณมากกว่าปลิง *P. siamensis* ดังนั้นจึงเลือกปลิง *A. weberi* เป็นปลิงพาหะสำหรับการทดลองแพร่เชื้อ



ภาพที่ 5-3 แสดงตัวอย่างปลิง *Placobdelloides siamensis* จากแหล่งน้ำธรรมชาติ
ภาพซ้าย: ด้านหลัง ภาพขวา: ด้านท้อง

ภาพที่ 5-4 แสดงตัวอย่างปลิง *Alboglossiphonia weberi* จากแหล่งน้ำธรรมชาติ
ภาพซ้าย: ด้านหลัง ภาพขวา: ด้านท้อง

5.4 การแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิง

5.4.1 การหาจำนวนวันที่เชื้อ *Lankesterella* sp. เคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำลายของปลิง

จากการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. จากกบนาติดเชื้อไปสู่ปลิง *Alboglossiphonia weberi* ตรวจผลการติดเชื้อในปลิงโดยวิธีการผ่าตัดและย้อมด้วยสี Giemsa พบเชื้อระยะสปอโซอยท์ในทางเดินอาหารของปลิงหลังจากปลิงดูดเลือดกบติดเชื้อไปในวันที่ 14, 21, 28, 35 และ 42 พบการติดเชื้อระยะสปอโซอยท์ในต่อมน้ำลายหลังจากปลิงดูดเลือดกบติดเชื้อไปในวันที่ 28, 35 และ 42 แสดงให้เห็นว่าเชื้อใช้เวลาในการเคลื่อนที่จากทางเดินอาหารไปยังต่อมน้ำลายของปลิงใช้เวลาอย่างน้อย 28 วัน เพื่อยืนยันจำนวนวันดังกล่าวให้เป็นที่แน่ชัดจึงได้ทำการตรวจสอบการติดเชื้อในปลิงพาหะอีกครั้งด้วยการนำปลิงมาดูดเลือดกบติดเชื้อ ตรวจผลการติดเชื้อในปลิงด้วยวิธีการตัดชิ้นเนื้อเยื่อแบบ Ultra-thin section และย้อมด้วยสี Toluidine Blue พบการติดเชื้อระยะสปอโซอยท์ในทางเดินอาหารหลังจากปลิงดูดเลือดกบติดเชื้อไปในวันที่ 28, 35, 42 และ 49 ส่วนในต่อมน้ำลายของปลิงพบการติดเชื้อระยะสปอโซอยท์หลังจากปลิงดูดเลือดกบติดเชื้อไปในวันที่ 35, 42 และ 49 จากผลการตรวจเชื้อในปลิงทั้งสองวิธี ทำให้ทราบจำนวนวันที่น้อยที่สุดที่เชื้อใช้ในการเคลื่อนที่จากอวัยวะระบบทางเดินอาหารมายังต่อมน้ำลายของปลิงคือ 28 วัน โดยพบค่าการติดเชื้อในปลิงที่ทำการทดลอง คือ 66.67 % (ตารางที่ 4-5) จำนวนวันที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นจำนวนวันที่ให้เชื้อเคลื่อนที่จากทางเดินอาหารมายังต่อมน้ำลายของปลิงสำหรับการทดลองแพร่เชื้อจากปลิงไปสู่กบคือ 35 วัน โดยพบค่าการติดเชื้อในปลิงที่ทำการทดลอง คือ 100 % (ตารางที่ 4-6) เมื่อเปรียบเทียบจำนวนวันที่เชื้อเคลื่อนที่จากทางเดินอาหารไปยังต่อมน้ำลายของปลิงที่นำไปใช้ในการทดลองแพร่เชื้อดังกล่าวน้อยกว่าในการทดลองของ Desser *et. al.* (1990) ที่ทำการทดลองแพร่เชื้อ *L. minima* ในลูกอ๊อดกบบูลฟรอก *Rana catesbeiana* โดยผ่านการดูดเลือดของปลิง *Batracobdella picta* ที่ประเทศแคนาดา โดยใช้ปลิงที่ดูดเลือดกบที่ติดเชื้อมาแล้ว 50 วัน อย่างไรก็ตามรายงานดังกล่าวไม่ปรากฏที่มาของจำนวนวันที่ทดลอง ดังนั้นระยะเวลา 50 วันดังกล่าวอาจมาจากการประมาณ จึงเป็นระยะเวลาที่นานกว่าในการศึกษาการแพร่เชื้อในกบนาของการศึกษาครั้งนี้ หรืออาจเป็นไปได้ว่าชนิดของปลิงที่ใช้ทำการศึกษานั้นต่างชนิดกัน โดยปลิง *B. picta* พบการแพร่ กระจายเฉพาะในทวีปอเมริกาเหนือ ในขณะที่การศึกษาครั้งนี้ใช้ปลิง *A. weberi* เนื่องจากปลิงชนิดนี้ดูดเลือดกบนาในธรรมชาติของประเทศไทย

การศึกษาการแพร่เชื้อในปลิงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านนั้น ไม่พบการติดเชื้อในต่อมน้ำลายของปลิงในวันที่ 35 ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าการทดลองแพร่เชื้อในปลิงตรวจผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านใช้จำนวนซ้ำที่น้อยเกินไป หรือเป็นไปได้ว่าการตรวจหาเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านนั้นใช้กำลังขยายที่สูงถึง 2,000 ถึง 10,000 เท่า การตรวจหาเชื้อจึงใช้ระยะเวลานาน เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านจึงไม่ใช่วิธีการที่ดีสำหรับการตรวจหาเชื้อในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยเหตุนี้จำนวนวันที่เหมาะสมที่จะนำไป

ใช้เป็นจำนวนวันที่ให้เชื้อเคลื่อนที่จากทางเดินอาหารมายังต่อมน้ำลายของปลิงในการทดลองแพร่เชื้อจากปลิงไปสู่กบคือ 35 วัน ในขณะเดียวกันการพบเชื้อระยะสปอโรซอยท์ในต่อมน้ำลายของปลิงหลังจากปลิงดูดเลือดกบติดเชื้อไปในวันที่ 42 และ 49 ช่วยสนับสนุนว่าสปอโรซอยท์เดินทางไปอยู่ในต่อมน้ำลายของปลิงและสะสมตัวอยู่ภายในเซลล์ต่อมน้ำลายรอกระทั่งปลิงดูดเลือดกบจึงแพร่ไปสู่กบต่อไป

5.4.2 ลักษณะของเชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิง

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายในของเชื้อ *Lankesterella* sp. ในทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของปลิงด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่าไม่แตกต่างกันและมีลักษณะเหมือนกับในรายงานของ Tse *et. al.* (1986) ที่ได้ทำการทดลองแพร่เชื้อ *L. minima* จากกบบูลฟรอก *Rana catesbeiana* ไปสู่ปลิง *Batracobdella picta* และศึกษาลักษณะโครงสร้างภายในของเชื้อในต่อมน้ำลายของปลิงที่ติดเชื้อจากการทดลอง โดยใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบสปอโรซอยท์ในท่อของต่อมน้ำลายของปลิงที่ดูดเลือดกบที่ติดเชื้อไปแล้ว 30 วัน โดยสปอโรซอยท์เข้าไปอยู่แทนที่หยดน้ำลายและถูกห่อหุ้มด้วยพาราซิโตฟอรัสแวคิวโอล

5.5 การแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบ

จากการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. จากกบนาติดเชื้อไปสู่กบนาปลอดเชื้อโดยผ่านปลิงพาหะนั้น พบการติดเชื้อในเลือดของกบกลุ่มทดลองทั้งสองวิธีคือวิธีการให้กบถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อและวิธีการให้กบกินปลิงที่ติดเชื้อเข้าไป แตกต่างกันที่ระยะเวลาของการตรวจพบการติดเชื้อหลังจากได้รับเชื้อ (prepatence period) ในกบที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อมีระยะเวลาของการตรวจพบการติดเชื้อหลังจากได้รับเชื้อ 20 วัน ในขณะที่กบที่กินปลิงที่ติดเชื้อตรวจพบการติดเชื้อหลังจากกินปลิงไปแล้ว 32 วัน

เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาของการตรวจพบการติดเชื้อหลังจากได้รับเชื้อในการศึกษาครั้งนี้กับรายงานการศึกษาของ Desser (1990) ที่ทำการทดลองแพร่เชื้อ *L. minima* ในลูกอ๊อดกบบูลฟรอก *Rana catesbeiana* ที่ประเทศแคนาดา โดยใช้ปลิง *Batracobdella picta* เป็นพาหะนำเชื้อโดยวิธีการดูดเลือด ผลการทดลองพบเชื้อระยะเมอโรซอยท์ในเลือดของลูกอ๊อดหลังจากถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อไปแล้ว 22 วัน และพบเชื้อระยะโอโอซีสต์ในม้ามของลูกอ๊อดหลังจากถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อไปแล้ว 28 และ 32 วัน

ตารางที่ 5-2 แสดงการเปรียบเทียบการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella minima* โดย Desser (1990) กับการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในการศึกษาครั้งนี้

รายละเอียด	การทดลองของ Desser (1990)	การทดลองครั้งนี้
ชนิดของเชื้อ *Lankesterella*	*Lankesterella minima*	*Lankesterella* sp.
ชนิดผู้ให้อาศัยสุดท้าย	กบบูลฟรอก *Rana catesbeiana*	กบนา *Hoplobatrachus rugulosus*
ระยะของผู้ให้อาศัยสุดท้าย	ลูกอ๊อด	ลูกกบ อายุ 1-2 เดือน
ชนิดพาหะ	ปลิง *Batracobdella picta*	ปลิง *Alboglossiphonia weberi*
วิธีการแพร่เชื้อ Lankesterella	ปลิงที่ติดเชื้อดูดเลือดลูกอ๊อด	- กบถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อ - กบกินปลิงที่ติดเชื้อ
เชื้อระยะเมอโรซอยท์	พบในเลือดลูกอ๊อด วันที่ 22	- วิธีการให้ปลิงดูดเลือดกบ พบเชื้อระยะเมอโรซอยท์ในเลือดกบ วันที่ 20, 24, 28 และ 32 - วิธีการให้กบกินปลิงที่ติดเชื้อ พบเชื้อระยะเมอโรซอยท์ในเลือดกบ วันที่ 32, 40, 44, 52, 56 และ 60
เชื้อระยะโอโอซีสต์	พบในม้ามลูกอ๊อด วันที่ 28 และ 32	- วิธีการให้กบถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อ พบเชื้อระยะโอโอซีสต์ในตับกบ วันที่ 36 และ 40
เชื้อระยะสปอโรซอยท์	พบในเลือดลูกอ๊อด วันที่ 36 และหลังจากนั้นอีกสองเดือนถัดมา	- วิธีการให้กบถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อ พบเชื้อระยะสปอโรซอยท์ในเลือดกบ วันที่ 40, 44, 48, 52, 56 และ 60

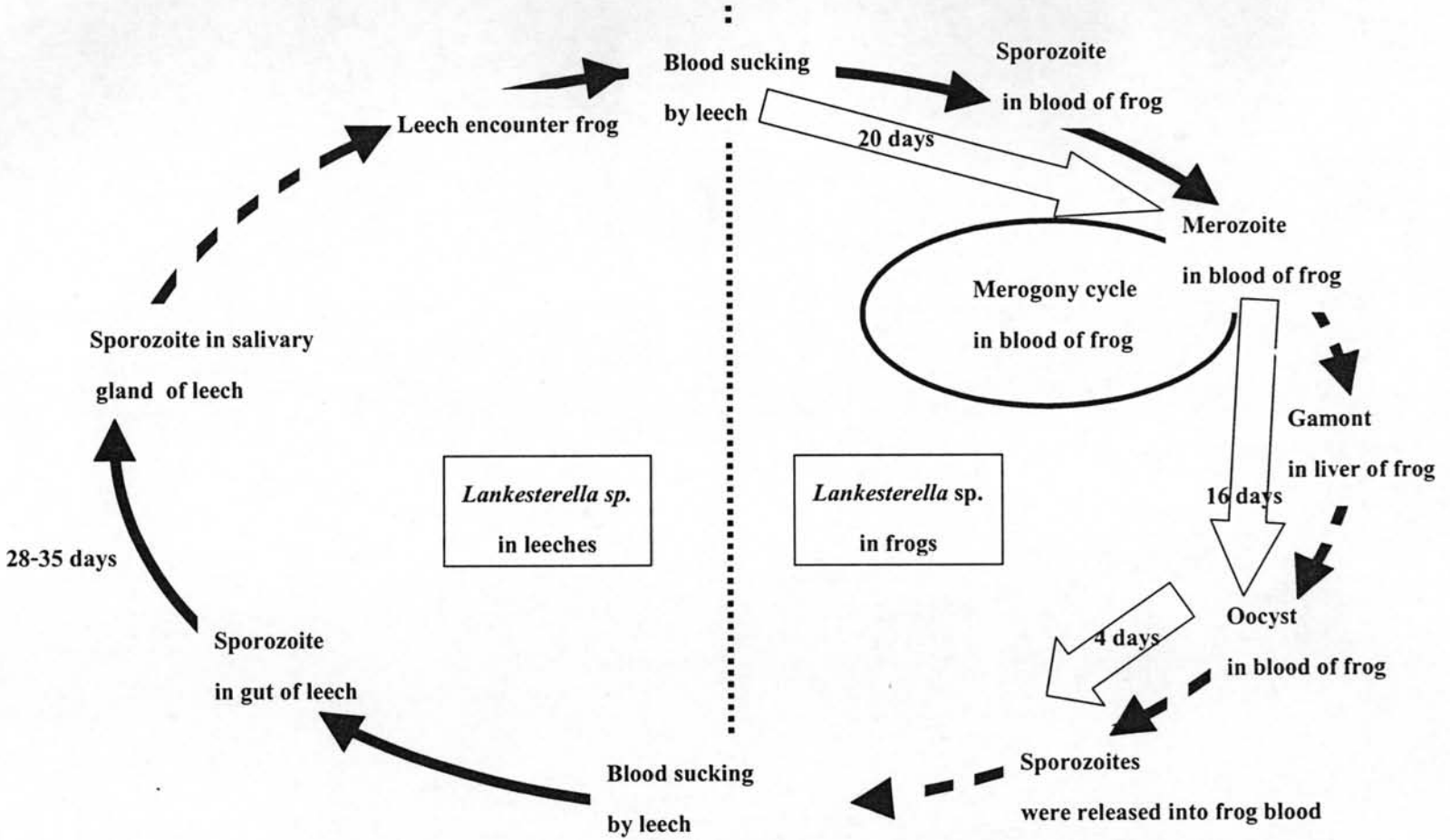
นอกจากนี้พบว่าการแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. โดยผ่านปลิงพาหะทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันโดยผลการตรวจเชื้อในกบที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อนั้นพบเชื้อระยะเมอโรซอยท์ โอโอซีสต์และสปอโรซอยท์ตามลำดับ ส่วนในกบที่กินปลิงที่ติดเชื้อพบแต่เชื้อระยะเมอโรซอยท์เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าวัฏจักรเมอโรซอยท์เกิดขึ้นในเวลาที่แตกต่างกันระหว่างวิธีการแพร่เชื้อทั้งสองแบบโดยวิธีการแพร่เชื้อในกบผ่านการดูดเลือดของปลิงพาหะนั้นเป็นไปได้ว่าเป็นกลไกที่ทำให้สปอโรซอยท์จากต่อมน้ำลายของปลิงเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรง เข้าไปอาศัยอยู่ในเม็ดลือดแดงและดำเนินวัฏจักรเมอโรโกนีได้ใน 20 วันหลังจากที่เชื้อเข้าสู่กบ ในขณะที่วิธีการแพร่เชื้อในกบผ่านการกินปลิงพาหะนั้นเป็นไปได้ว่าเป็นกลไกที่ทำให้สปอโรซอยท์เข้าสู่กระแสเลือดโดยทางอ้อมคือ เชื้อเข้าสู่ทางเดินอาหารของกบ หลังจากนั้นเชื้อออกจากปลิงโดยการย่อยและคาดว่ามีการเคลื่อนที่ผ่านผนังลำไส้เข้าสู่กระแสเลือด จึงใช้ระยะเวลาในการเข้าสู่วัฏจักรเมอโรโกนีนานกว่าวิธีการแพร่เชื้อในกบผ่านการดูดเลือดของปลิงพาหะ แต่การที่กบกินปลิงที่มีเชื้อเข้าไปนั้นทำให้กบได้รับเชื้อที่มีอยู่ในตัวปลิงทั้งหมดแสดงว่าได้รับเชื้อมากกว่าวิธีการที่กบถูกดูดเลือด

ผลการทดลองในครั้งนี้สนับสนุนสมมุติฐานการแพร่เชื้อในกบว่ามีความเป็นไปได้ทั้งสองวิธีแต่ระยะเวลาการติดเชื้อและเวลาการเกิด วัฏจักรเมอโรโกนีแตกต่างกันนั้นส่งผลถึงระยะเวลาภาพรวมในวงชีวิตของเชื้อ แต่ในธรรมชาติของกบนั้นกินอาหารที่มีการเคลื่อนไหว ในขณะที่ปลิง *A. weberi* ไม่สามารถว่ายน้ำได้และเคลื่อนที่ได้โดยการยืดหดตัวไปบนพื้นผิวที่แข็งเท่านั้น ดังนั้นการกินปลิงของกบจึงมีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อย ในขณะเดียวกันการดูดเลือดกบของปลิง *A. weberi* นั้นเป็นความจำเป็นในทางชีววิทยาของปลิงอยู่แล้ว ดังนั้นในธรรมชาติ การแพร่เชื้อโดยผ่านการดูดเลือดของปลิงพาหะจึงมีโอกาสเกิดขึ้นได้มากกว่าการกินปลิงพาหะ

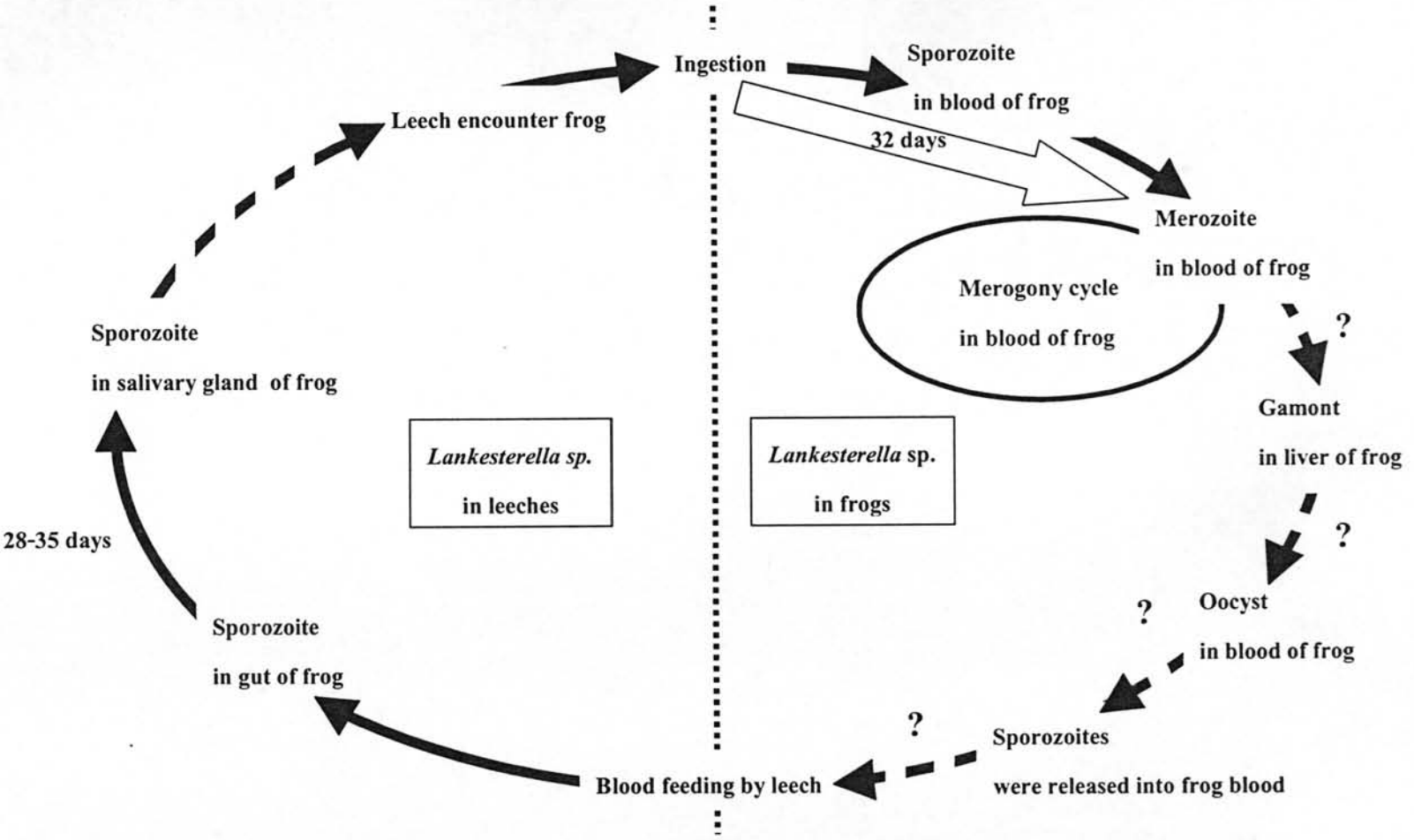
เมื่อเปรียบเทียบวิธีกบถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อกับผลการทดลองของ Desser (1990) พบว่าระยะเวลาที่พบเชื้อระยะเมอโรซอยท์ในเลือดมีความใกล้เคียงกัน เชื้อระยะเมอโรซอยท์ที่พบมาจากการแบ่งตัวของสปอโรซอยท์ที่เข้าไปในเม็ดเลือดแดงได้เมอโรซอยท์จำนวนมาก ซึ่งจัดเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในวัฏจักรเมอโรโกนี (Farmer, 1980) ลักษณะเชื้อระยะเมอโรซอยท์โดย ทั่วไปมีความคล้ายกับเชื้อระยะสปอโรซอยท์ แต่สังเกตว่าเชื้อระยะเมอโรซอยท์มีขนาดเล็กกว่าและอยู่นอกเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนใหญ่ การที่ไม่พบสปอโรซอยท์ในเลือดกบในช่วงวันที่ 4 ถึงวันที่ 2 0 หลังจากกบถูกปลิงดูดเลือดนั้นเพราะสปอโรซอยท์จากต่อมน้ำลายของปลิงที่เข้ามาสู่เลือดกบจนกระทั่งสปอโรซอยท์เข้าสู่วัฏจักรเมอโรโกนี และมีการแบ่งตัวได้เมอโรซอยท์จำนวนมากทำให้มีความหนาแน่นเชื้อสูงขึ้นในเลือดกบ จึงตรวจพบเชื้อระยะเมอโรซอยท์ได้หลังจากวันที่ 20 ไปจนถึงวันที่ 32 แสดงให้เห็นว่าเชื้อได้เข้าสู่วัฏจักรเมอโรโกนีประมาณวันที่ 20 ซึ่งต่อมา วัฏจักรเมอโรโกนีจะดำเนินไปจนกระทั่งวันที่ 32 หลังจากนั้นวันที่ 36 จึงพบเชื้อระยะโอโอซีสต์ในตับ แสดงในเห็นว่าวัฏจักรเมอโรโกนีเกิดขึ้นในตับระหว่างวันที่ 20 – 32 หลังจากกบได้รับเชื้อโดยการดูดเลือดของปลิงที่ติดเชื้อ

5.6 วงชีวิตของเชื้อ *Lankesterella* sp.

เชื้อ *Lankesterella* sp. ที่พบในเลือดกบนาจากการทดลองครั้งนี้มีระยะวินิจฉัยการติดเชื้อในกบคือระยะสปอโรซอยท์ที่เข้าไปอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของกบ การแพร่เชื้อในกบเป็นไปโดยผ่านการดูดเลือดของปลิงพาหะหรือการกินปลิงพาหะ จากการดูดเลือดโดยปลิงทำให้เม็ดเลือดแดงของกบที่ภายในมีสปอโรซอยท์ของเชื้ออยู่นั้นเข้าสู่ทางเดินอาหารของปลิงในทันที เมื่อเม็ดเลือดแดงถูกย่อย สปอโรซอยท์จะออกมาและแทรกตัวผ่านเข้าไปในเซลล์เยื่อบุผนังทางเดินอาหารของปลิง จากนั้นสปอโรซอยท์ส่วนหนึ่งเดินทางไปยังต่อมน้ำลาย โดยมีระยะเวลาที่เชื้อเดินทางมายังต่อมน้ำลายไม่ต่ำกว่า 28-35 วัน เชื้ออีกส่วนหนึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อของทางเดินอาหารของปลิง เชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือเพิ่มจำนวนจนกระทั่งเชื้อแพร่เข้าสู่กบอีกครั้ง โดยสองรูปแบบการแพร่เชื้อคือโดยปลิงดูดเลือดกบหรือโดยให้กบกินปลิง การแพร่เชื้อโดยปลิงดูดเลือดกบนั้นทำให้เชื้อจากต่อมน้ำลายของปลิงเข้าสู่กระแสเลือดของกบโดยการที่ปลิงขับน้ำลายออกมาขณะดูดเลือดกบทำให้เชื้อติดออกมาด้วย ส่วนการแพร่เชื้อโดยกบกินปลิงนั้นทำให้เชื้อในปลิงทั้งที่อยู่ในต่อมน้ำลายและในทางเดินอาหารของปลิงเข้าสู่ทางเดินอาหารของกบ คาดว่าเชื้อสามารถออกจากตัวปลิงและแทรกผ่านเยื่อบุทางเดินอาหารของกบและเข้าสู่กระแสเลือดของกบได้ ซึ่งเป็นกลไกที่เหมือนกับการแพร่เชื้อของโพรโทซัว *Schellackia* (Family Lankesterellidae) ตรงที่สามารถเดินทางผ่านเยื่อบุทางเดินอาหารของผู้ให้อาศัยเข้าสู่กระแสเลือดได้ (Wenyon, 1926) เมื่อเชื้อ *Lankesterella* sp. อยู่ในเลือดของกบจะเข้าไปพักตัวในเม็ดเลือดแดงระยะหนึ่งจึงจะดำเนินวัฏจักรเมอโรโกนีเพิ่มจำนวนเมอโรซอยท์หลายรอบ ซึ่งจัดเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จนกระทั่งเมอโรซอยท์กลายเป็นแกมอนท์สองแบบคือไมโครแกมอนท์และมาโครแกมอนท์ผลิต ไมโครแกมีตและมาโครแกมีตตามลำดับ จัดอยู่ในระยะกาเมโทโกนีหรือช่วงของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เมื่อ ไมโครแกมีตและมาโครแกมีตปฏิสนธิกันได้ไซโกตเจริญไปเป็นโอโอซีสต์ที่พบในตับ ภายในมีการเจริญของสปอโรซอยท์จำนวนมากจัดอยู่ในระยะชิโซโกนี เมื่อโอโอซีสต์เจริญเต็มที่และแตกออก สปอโรซอยท์จะออกสู่กระแสเลือดและเข้าไปอยู่ในเม็ดเลือดแดงของกบ ซึ่งจัดว่าเป็นระยะ สปอโรโกนีซึ่งเป็นระยะเด่นของเชื้อ *Lankesterella* sp. เป็นระยะที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อต่อไป



ภาพที่ 5-5 แสดงวงชีวิตของเชื้อ *Lankesterella* sp. จากการสรุปผลการทดลองการแพร่เชื้อในกบนาโดยการให้กบนาถูกดูดเลือดโดยปลิงพาหะ



ภาพที่ 5-6 แสดงวงชีวิตของเชื้อ *Lankesterella* sp. จากการสรุปผลการทดลองการแพร่เชื้อในกบนาโดยการให้กบนากินปลิงพาหะ

5.7 ความสำคัญของเชื้อ *Lankesterella* sp.

ในฐานะที่เชื้อ *Lanketerella* sp. เป็นโพรโทซัวในกลุ่ม coccidians เชื้อจึงมีความสำคัญในเชิงต่างๆ ดังต่อไปนี้

ความสำคัญเชิงเศรษฐกิจ: โพรโทซัวในกลุ่ม coccidians หลายชนิดดำรงชีพเป็นปรสิตในสัตว์เลี้ยงโดยเฉพาะในฟาร์มปศุสัตว์เป็นสาเหตุให้การการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจจำนวนมากในแต่ละปี (Farmer, 1980) ถึงแม้ว่าจะไม่มีรายงานเกี่ยวกับเชื้อ *Lankesterella* sp. ที่ก่อให้เกิดโรคในกบ แต่ถึงกระนั้นการติดเชื้อ *Lankesterella* sp. ในเลือดกบแสดงถึงการมีพาหะอันได้แก่ปลิงในบ่อเลี้ยงกบโดยเฉพาะในบ่อดินหรือบ่อที่เลี้ยงกบโดยใช้น้ำจากแหล่งน้ำจากธรรมชาติที่อาจมีปลิงติดเข้ามาด้วย หรือการนำกบจากธรรมชาติเข้ามาในบ่อเลี้ยง โดยที่ปลิงและกบจากธรรมชาตินั้นเป็นแหล่งของเชื้อ *Lankesterella* sp. หรืออาจรวมไปถึงเชื้อปรสิตอื่นที่ติดต่อในเลือดกบ ซึ่งอาจเป็นเชื้อโพรโทซัว เช่น trypanosome และ *Hepatozoon* หรือเชื้อในกลุ่มอื่น เช่น หนอนพยาธิฟิลาเรีย ราหรือแบคทีเรียที่อาจก่อให้เกิดโรคในกบทำให้สูญเสียมูลค่าทางเศรฐกิจได้ ดังนั้นเชื้อ *Lankesterella* sp. จึงมีแนวโน้มในการเป็นตัวชี้วัดความเสี่ยงในการติดเชื้อปรสิตในเลือดกบและการมีพาหะนำเชื้อปรสิตในเลือดกบอยู่ในแหล่งอาศัยของกบได้ในระดับหนึ่ง

ความสำคัญเชิงนิเวศวิทยา: โพรโทซัวในกลุ่ม coccidians ดำรงชีพเป็นปรสิตในสัตว์ป่าหลายชนิดและในจำนวนที่มาก การที่โรคที่เกิดจากโพรโทซัวในกลุ่ม coccidians หรือที่เรียกว่าคอกคิดิโอซีส (coccidiosis) ยังคงปรากฏให้เห็นนั้นเป็นตัวชี้วัดแนวโน้มความคงอยู่ของระบบนิเวศที่สมดุล (Farmer, 1980) เนื่องจากการเป็นปรสิตที่มีวงชีวิตซับซ้อนต้องการผู้ให้อาศัยมากกว่าหนึ่งชนิด การพบการติดเชื้อโพรโทซัวในกลุ่มนี้ในผู้ให้อาศัยในพื้นที่หนึ่งๆ แสดงถึงการมีผู้ให้อาศัยสื่อกลางและผู้ให้อาศัยสุดท้ายอยู่ร่วมกันในพื้นที่นั้น เช่นเดียวกันกับเชื้อ *Lankesterella* sp. ที่มีวงชีวิตแบบสองผู้ให้อาศัย (heteroxenous life cycle) ดังนั้นในพื้นที่ที่พบการแพร่กระจายของเชื้อแสดงให้เห็นถึงว่าพื้นที่นั้นจะต้องมีกบที่เป็นผู้ให้อาศัยสุดท้ายและปลิงพาหะที่เป็นผู้ให้อาศัยสื่อกลางอยู่ร่วมกัน ซึ่งโดยปกติทั้งกบนาและปลิงต่างเป็นตัวชี้วัดแนวโน้มความคงอยู่ของระบบนิเวศที่สมดุลได้ในระดับหนึ่งเนื่องจากทั้งกบและปลิงต่างก็เป็นสัตว์ที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมค่อนข้างสูง จากการสังเกตในการศึกษาครั้งนี้พบว่าพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างกบนาได้นั้นเป็นพื้นที่ในชนบทที่มีพื้นที่นากว้างขวาง โดยเฉพาะพื้นที่ในจังหวัดอุบลราชธานี นครราชสีมาและสระแก้วที่เก็บตัวอย่างกบนาได้จำนวนมาก นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างปลิงได้จากพื้นที่นาที่กว้างขวางในชนบท ซึ่งถ้าได้มีการศึกษาระบบนิเวศน์ของพื้นที่น่าจะพบว่าเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีแนวโน้มความคงอยู่ของระบบนิเวศที่สมดุล

ความสำคัญเชิงวิวัฒนาการ: ในเชิงวิวัฒนาการ วงชีวิตแสดงให้เห็นข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบจากการคัดเลือกโดยธรรมชาติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวงชีวิตของปรสิตแบบผู้ให้อาศัยเดียวกับวงชีวิตของปรสิตแบบสองผู้ให้อาศัยพบว่า วงจรชีวิตของปรสิตแบบผู้ให้อาศัยเดียว

ได้เปรียบมากกว่าเมื่อประชากรของปรสิตอาศัยอยู่ภายใต้สภาพปกติที่ผู้ให้อาศัยจำนวนมากรวมตัวอยู่ด้วยกันหนาแน่น ส่วนวงชีวิตของปรสิตแบบสองผู้ให้อาศัยจะได้เปรียบมากกว่าเมื่อผู้ให้อาศัยไม่ได้อยู่รวมตัวกัน หรือกรณีที่ผู้ให้อาศัยแบ่งประชากรเป็นกลุ่มต่างๆ การมีผู้ให้อาศัยสื่อกลางทำให้มีโอกาสที่ปรสิตจะแพร่ไปสู่ผู้ให้อาศัยสุดท้ายได้มากกว่าและเพิ่มโอกาสในการอยู่รอดของปรสิต (Farmer, 1980) เมื่อเปรียบเทียบวงชีวิตของปรสิตแบบสองผู้ให้อาศัยที่มีการแพร่เชื้อโดยการดูดเลือดของผู้ให้อาศัยสื่อกลางและโดยการกินผู้ให้อาศัยสื่อกลางเข้าไปนั้น พบว่าการแพร่เชื้อโดยการดูดเลือดของผู้ให้อาศัยสื่อกลางมีข้อได้เปรียบตรงที่สามารถแพร่เชื้อไปสู่ผู้ให้อาศัยสุดท้ายได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่ถูกทำลาย ผู้ให้อาศัยสื่อกลางแต่ละตัวมีโอกาสแพร่เชื้อได้หลายครั้งและอาจแพร่ไปสู่ผู้ให้อาศัยสุดท้ายได้หลายชนิด ผลจากการศึกษาครั้งนี้ยังพบข้อได้เปรียบเพิ่มเติมของการแพร่เชื้อปรสิตในเลือดผ่านการดูดเลือดของผู้ให้อาศัยสื่อกลางนั้นเป็นการแพร่เชื้อเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรง ดังในกรณีของเชื้อ *Lankesterella* sp. ที่แพร่เชื้อผ่านการดูดเลือดของปลิงพาหะเข้าสู่กระแสเลือดของกบนาโดยตรงและใช้เวลาในการเข้าสู่วัฏจักรเมอโรโกนีซึ่งเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงของกบได้เร็วกว่าการแพร่เชื้อผ่านการกินปลิงพาหะซึ่งจัดเป็นข้อได้เปรียบเทียบทางด้านระยะเวลาที่พร้อมในการสืบพันธุ์ได้เร็วกว่า

ความสำคัญเชิงชีววิทยา: โพรโทซัวในกลุ่ม coccidians มีความน่าสนใจศึกษาด้วยเหตุที่มีชีววิทยาที่ใกล้เคียงกับเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะในด้านวงชีวิต โพรโทซัวในกลุ่ม coccidians ส่วนหนึ่งอาศัยผู้ให้อาศัยสื่อกลางหรือพาหะเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่ดูดเลือดเป็นอาหาร เช่นเดียวกับเชื้อมาลาเรียเป็นจุดที่น่าสนใจว่าน่าจะมีความเกี่ยวข้องในทางวิวัฒนาการ เช่นเดียวกับความสามารถในการเจาะแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อและการอาศัยอยู่ภายในเซลล์ของผู้ให้อาศัยแสดงถึงความเป็นไปได้ว่าโพรโทซัวในกลุ่ม coccidians เป็นบรรพบุรุษของเชื้อมาลาเรีย (Farmer, 1980)

5.8 สรุปผลการศึกษา

1. การศึกษาการแพร่เชื้อโพรโทซัว *Lankesterella* sp. ติดต่อในกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* โดยผ่านปลิงพาหะ *Alboglossiphonia weberi* ครั้งนี้ พบว่าโพรโทซัว *Lankesterella* sp. สามารถแพร่เชื้อจากปลิงเข้าสู่กบได้ 2 วิธีคือ วิธีการดูดเลือดของปลิงและวิธีการกินปลิง โดยการแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบด้วยวิธีผ่านการดูดเลือดของปลิงใช้ระยะเวลาในการแพร่เชื้อไปจนกระทั่งพบการติดเชื้อในกบสั้นกว่าวิธีการแพร่เชื้อผ่านการให้กบกินปลิง

2. ปลิง *A. weberi* ดูดเลือดกบนาเป็นอาหารและสามารถเป็นพาหะนำเชื้อ *Lankesterella* sp. ติดต่อในกบนา โดยเชื้อ *Lankesterella* sp. เข้าสู่ปลิงโดยการที่ปลิงไปดูดเลือดกบที่ติดเชื้อ เชื้อจะเข้าสู่ทางเดินอาหารของปลิงและเดินทางผ่านเนื้อเยื่อไปยังต่อมน้ำลายของปลิงและสะสมตัวจนกระทั่งปลิงไปดูดเลือดกบอีกครั้งหรือปลิงถูกกบกินเข้าไปจึงแพร่เข้าสู่กบ

3. โพรโทซัว *Lankesterella* sp. ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่อาจระบุได้ว่าเป็นเชื้อชนิดใด แต่จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายในของสปอโรซอยท์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่พบว่าเชื้อที่พบมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *L. minima*

4. ปลิง *Alboglossiphonia weberi* สามารถเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการโดยการให้ดูดเลือดกบนาเป็นอาหาร ซึ่งใช้ระยะเวลาการเลี้ยงในปลิงแต่ละรุ่นประมาณ 50-60 วัน

5.9 ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาวงชีวิตของโพรโทซัว *Lankesterella* sp. น่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในระยะการเจริญของเชื้อในกบ ทั้งในวัฏจักรเมอโรโกนีที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงและระยะแกมีโตโกนีที่อยู่ในอวัยวะภายในของกบเพื่อให้ได้ภาพวงชีวิตที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

2. การศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของโพรโทซัว *Lankesterella* sp. ที่พบในเลือดกบ ควรจะมีการเพิ่มเติมการศึกษาในระดับอณูชีววิทยาด้วยการทำเทคนิคตรวจสอบลำดับเบสของเชื้อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลจึงจะสามารถรายงานได้ว่าเป็นเชื้อชนิดใด

3. การศึกษาเพิ่มเติมถึงความสำคัญของโพรโทซัว *Lankesterella* sp. เนื่องจากเป็นปรสิตที่อาศัยอยู่ในเลือดและมีระยะการเจริญในอวัยวะภายในของกบ จึงน่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับพยาธิสภาพในเลือดและในอวัยวะภายในของกบ

4. การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของเชื้อ *Lankesterella* sp. ระยะสปอโรซอยท์ในเลือดกบ ในทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของปลิง เนื่องจากการติดเชื้อในกบนั้นเกิดจากเชื้อระยะสปอโรซอยท์ที่เข้าไปอาศัยอยู่ในปลิงพาหะเท่านั้น แต่จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายในของเชื้อในปลิงไม่พบความเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน เป็นไปได้ว่าเมื่อเชื้ออาศัยอยู่ในปลิงอาจมีการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนทำให้เชื้อเข้าสู่ระยะติดต่อและแพร่มาสู่กบได้

5. การศึกษาแนวทางการป้องกันการแพร่เชื้อของโพรโทซัว *Lankesterella* sp. ในบ่อเลี้ยงกบเนื่องจากเกิดการติดเชื้อในบ่อเลี้ยงกบได้ถ้ามีปลิงพาหะอยู่ในบ่อเลี้ยงซึ่งอาจจะนำเชื้อปรสิตในเลือดชนิดอื่นมาสู่กบได้ จึงควรหาแนวทางป้องกันปลิงพาหะไม่ให้เข้ามาในบ่อเลี้ยงกบ เช่น การใช้น้ำเลี้ยงกบที่ผ่านการกรอง การใส่ปูนขาวเพื่อทำลายปลิง เป็นต้น เพื่อตัดวงชีวิตของเชื้อไม่ให้มีการแพร่เชื้อในบ่อเลี้ยงกบได้

6. การศึกษาเพิ่มเติมในทางนิเวศวิทยาสิ่งแวดล้อมเพื่อศึกษาปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างของค่าการติดเชื้อและค่าความหนาแน่นของเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบธรรมชาติ เช่น ปัจจัยความแตกต่างทางกายภาพของพื้นที่ ผู้ให้อาศัย และความชุกชุมของปลิงพาหะ เป็นต้น

7. การเพาะเลี้ยงปลิงในกลุ่ม glossiphoniid เช่นปลิง *Alboglossiphonia weberi* ในการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลในการเพาะเลี้ยงปลิงเพื่อสนับสนุนการศึกษาทางด้านปรสิตวิทยาการแพร่เชื้อของโพรโทซัวในเลือดของสัตว์ผู้ให้อาศัยที่มีปลิงเป็นพาหะนำเชื้อต่อไปได้