

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาโคจาก 3 จังหวัดของประเทศไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Detection of bacterial pathogens in cattle lice from three provinces of Thailand



Miss Chulaluk Promrangsee

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

Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาโคจาก 3 จังหวัด ของประเทศไทย
โดย	น.ส.จุฬาลักษณ์ พรหมรังษี
สาขาวิชา	ปรสตีวิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์เผด็จ สิริยะเสถียร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. นายแพทย์กนก พฤตวิทย์บุญ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงกัญญรัตน์ กรัยวิเชียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์เผด็จ สิริยะเสถียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. นายแพทย์กนก พฤตวิทย์บุญ)

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

จุฬาลักษณ์ พรมรังษี : การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาโคจาก 3 จังหวัดของประเทศไทย. (Detection of bacterial pathogens in cattle lice from three provinces of Thailand) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร, อ.ที่ปรึกษา
ร่วม : ดร. นพ.กนก พฤฒิวัดัญญู

เหาโค (Cattle lice) เป็นแมลงดูดเลือดชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสาเหตุหลักของปัญหาสุขภาพสัตว์ทั่วโลก หลายงานวิจัยได้เปิดเผยข้อมูลการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาโคและเหาโคอาจมีศักยภาพที่สามารถทำหน้าที่เป็นพาหะนำโรคต่าง ๆ ที่สามารถติดต่อโดยเหา และการศึกษาชนิดของเหาโคโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาและการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในประเทศไทย ยังไม่มีการรายงาน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาโคและจำแนกชนิดของเหาโคที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย โดยตัวอย่างเหาโคทั้งหมด 109 ตัวอย่างจะนำมาสกัดดีเอ็นเอและใช้เทคนิค PCR ศึกษาบนตำแหน่งยีน *18S rRNA* ที่ได้ทำการพัฒนาออกแบบขึ้นเพื่อระบุชนิดของเหาโค และตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp., *Acinetobacter* spp. และ *Rickettsia* spp. จากนั้นนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจากผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *18S rRNA* แสดงให้เห็นว่าชนิดของเหาโคในงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ *Haematopinus quadripertusus* และ *Haematopinus* spp. ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *H. tuberculatus* และสามารถตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ทั้งยีน *gltA* และ *rpoB* ทั้งหมด 25 ตัวอย่างจาก 109 ตัวอย่าง (22.93%) พบทั้งในระยะไข่และตัวเต็มวัย เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการของยีน *gltA* และ *rpoB* พบว่าเชื้อ *Bartonella* spp. ในงานวิจัยนี้มีความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ *B. bovis* งานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกของการตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในเหาโคที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย และทำให้ทราบถึงข้อมูลชนิดของเหาโคในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา ซึ่งข้อมูลเหล่านี้อาจนำมาใช้เพื่อระบุศักยภาพของเหาโคที่จะทำหน้าที่เป็นพาหะนำโรคและอาจถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้จากสัตว์มาสู่มนุษย์

สาขาวิชา ปรีติวิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6074054830 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORD: Cattle louse, *Bartonella* spp., 18S rRNA, *gltA*, *rpoB*, Thailand

Chulaluk Promrangsee : Detection of bacterial pathogens in cattle lice from three provinces of Thailand. Advisor: Prof. PADET SIRIYASATIEN, M.D.,Ph.D. Co-advisor: Kanok Preativatanyou, M.D.,Ph.D.

Cattle lice are obligate blood-sucking parasites. The several studies have revealed that pathogenic bacteria could be found in cattle lice. The data about cattle lice identification and their pathogenic bacteria in Thailand have never been evaluated. In this study, we aim to determine the presence of bacterial pathogens and identify species of cattle lice collected from three provinces of Thailand. Total genomic DNA was extracted from 109 cattle louse samples and PCR of *18S rRNA* was developed to identify the cattle louse. Moreover, PCR was used for screening *Bartonella* spp., *Acinetobacter* spp., and *Rickettsia* spp. in cattle louse samples. The phylogenetic tree based on the partial *18S rRNA* sequences demonstrated that cattle lice species in this study are classified into two groups; *Haematopinus quadripertusus* and *Haematopinus* spp. closely related to *H. tuberculatus*. The pathogen detection revealed that *Bartonella* spp. DNA of *gltA* and *rpoB* were detected in 25 of 109 samples (22.93%) both egg and adult stages. The *Bartonella* spp. in this study related to *B. bovis*. This study is the first report of the *Bartonella* spp. detected in cattle lice from 3 provinces of Thailand and to classify the species of cattle lice using by molecular biology techniques. This information may be used to determine whether the cattle lice can serve as a potential vector can be transmitted pathogenic bacteria from these animals to humans.

Field of Study: Medical Parasitology

Student's Signature

Academic Year: 2018

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ดิฉันขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร อาจารย์ประจำภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่กรุณาให้การสนับสนุน ให้คำแนะนำ และชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหาในทุก ๆ ด้านตลอดระยะเวลาของการทำงานวิจัยนี้ รวมถึงการจัดหาแหล่งทุนวิจัยและการตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.พญ.กัญญารัตน์ กรัยวิเชียร, อ.ดร.นพ.กนก พงศ์วิทย์ และ ศ.พอ.ดร.นพ.มจิรุต มุ่งถิ่น ที่มีความกรุณาสละเวลาเพื่อเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์นี้ และให้คำแนะนำเพื่อการปรับปรุงแก้ไขพัฒนาให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ให้ความช่วยเหลือและมีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้ อ.ดร.ปฐมเมศร์ โฆษิฐารัตนกุล, อ.ดร.ภักดิ์ สมหวัง อาจารย์ประจำคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง และ ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านการเก็บรวบรวมตัวอย่างเหาโคจากพื้นที่ต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณ อ.พญ.นริศา บราวเนล และ ดร.อัจฉรา ภูมิ ที่ให้คำแนะนำด้านการวิเคราะห์ผลและตรวจทานแก้ไขเนื้อหาต่าง ๆ ของงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณแหล่งเงินทุนสนับสนุนในการทำงานวิจัย จากโครงการทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (RA62/067)

ขอขอบคุณ นายสกล สุนันทราภรณ์ นิสิตระดับปริญญาเอก ที่คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคด้านการปฏิบัติการ การวิเคราะห์ผล การเขียนรูปเล่ม รวมไปถึงการตรวจทานแก้ไขเนื้อหาต่าง ๆ ให้คำชี้แนะตลอดการทำวิจัย ซึ่งเกิดประโยชน์ต่องานวิจัยเป็นอย่างมาก และขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ ร่วมห้องปฏิบัติการหน่วยภูมิวิทยา ภาควิชาปรสิตวิทยา ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีและให้กำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จลุล่วงไม่ได้หากไม่ได้รับการสนับสนุนด้านการศึกษา และกำลังใจที่สำคัญจากบิดา มารดา รวมไปถึงญาติพี่น้องในครอบครัว คุณประโยชน์ที่เกิดจากงานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ดิฉันขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมในความสำเร็จของงานวิจัยนี้

จุฬาลักษณ์ พรหมรังษี

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามงานวิจัย.....	4
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	4
1.4 สมมติฐานของการวิจัย.....	4
1.5 กรอบแนวความคิดการวิจัย.....	5
1.6 คำสำคัญ	7
1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย	7
1.8 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
2.1 ลักษณะทั่วไปของเหาโค (Cattle lice).....	9
2.2 วงจรชีวิตและสัณฐานวิทยาของเหาโค.....	10
2.2.1 วงจรชีวิตของเหาโค	10

2.2.2	ระยะไข่ (egg หรือ nit).....	11
2.2.3	ระยะตัวอ่อนหรือตัวกลางวัย (nymph).....	11
2.2.4	ระยะตัวเต็มวัย (adult).....	11
2.3	เหาโคที่มีความสำคัญทางการแพทย์.....	12
2.4	การเป็นพาหะนำเชื้อโรคของแมลงดูดเลือดในโค.....	15
2.5	การเป็นพาหะนำเชื้อโรคของเหาในมนุษย์.....	15
2.6	เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะ.....	16
2.6.1	<i>Bartonella</i> spp.....	17
2.6.2	<i>Rickettsia</i> spp.....	18
2.6.3	<i>Acinetobacter</i> spp.....	19
2.7	การติดเชื้อแบคทีเรียที่มีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะและการก่อโรคในมนุษย์.....	21
2.7.1	การติดเชื้อ <i>Bartonella</i> spp. และการก่อโรค.....	21
2.7.2	การติดเชื้อ <i>Rickettsia</i> spp. และการก่อโรค.....	23
2.7.3	การติดเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. และการก่อโรค.....	23
2.8	การศึกษาทางอนุชีววิทยาของเหาโค.....	24
2.9	การศึกษาทางอนุชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค.....	25
บทที่ 3	วิธีการดำเนินงาน.....	27
3.1	รูปแบบการวิจัย.....	27
3.2	กลุ่มประชากรเป้าหมาย.....	27
3.2.1	การคำนวณขนาดประชากร.....	27
3.3	วิธีการดำเนินการวิจัย.....	28
3.3.1	การเก็บตัวอย่างเหาโค.....	28
3.3.2	การจำแนกทางสัณฐานวิทยาของเหาโค.....	28
3.3.3	การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction).....	28

3.3.4 การออกแบบ Primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน 18S ribosomal RNA (18S rRNA)	29
3.3.5 การเพิ่มยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)	30
3.3.6 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาโค	31
3.3.7 การตรวจสอบ PCR product โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)	35
3.3.8 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA ligation)	35
3.3.9 การถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ competent cells ด้วยวิธี Heat shock (Transformation)	36
3.3.10 การคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนยีนโดยวิธี colony PCR	36
3.3.11 การสกัดพลาสมิด	37
3.3.12 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Sequencing)	38
3.3.13 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	38
3.3.14 การสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)	38
บทที่ 4 ผลการทดลอง	39
4.1 จำนวนตัวอย่างและพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างเหาโคที่ใช้ในการศึกษา	39
4.2 ผลการจำแนกชนิดของเหาโคจากฐานฐานวิทยาและการตรวจด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา	40
4.2.1 ผลการจำแนกชนิดของเหาโคโดยใช้ลักษณะฐานฐานวิทยา	40
4.2.2 ผลการจำแนกชนิดของเหาโคโดยใช้เทคนิค PCR	41
4.2.2.1 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค Colony PCR	42
4.2.2.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเหาโค	43
4.2.2.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเหาโคกับฐานข้อมูล NCBI	44
4.2.2.4 ผลการขึ้นทะเบียนขอหมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 18S rRNA ของเหาโค	45

4.2.2.5 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของ เหาโค.....	45
4.3 ผลการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และ ในตัวอย่างเหาโคโดยเทคนิค PCR	48
4.3.1 การตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยเทคนิค Colony PCR.....	50
4.3.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>gltA</i> และ <i>rpoB</i> กับฐานข้อมูล NCBI..	50
4.3.3 ผลการขึ้นทะเบียนหมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>gltA</i> และ <i>rpoB</i> ของเชื้อ <i>Bartonella</i> spp.	51
4.3.4 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของเชื้อ <i>Bartonella</i> spp. ที่ตรวจพบในตัวอย่าง DNA เหาโค.....	51
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	54
บรรณานุกรม.....	59
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	66
ภาคผนวก ข ข้อมูลตัวอย่างและผลการวิจัย	72
ภาคผนวก ค ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ.....	77
ประวัติผู้เขียน.....	88

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงการศึกษาทางอนุชีววิทยาของเชื้อ Bartonella spp.....	25
ตารางที่ 2 แสดงการศึกษาทางอนุชีววิทยาของเชื้อ Rickettsia spp.....	26
ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน 18S rRNA.....	30
ตารางที่ 4 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน 18S rRNA.....	30
ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน 18S rRNA.....	31
ตารางที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน gltA.....	31
ตารางที่ 7 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน gltA.....	31
ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน gltA.....	32
ตารางที่ 9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน rpoB.....	32
ตารางที่ 10 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน rpoB.....	32
ตารางที่ 11 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน rpoB.....	33
ตารางที่ 12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน gltA.....	33
ตารางที่ 13 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน gltA.....	33
ตารางที่ 14 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน gltA.....	34
ตารางที่ 15 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน rpoB.....	34
ตารางที่ 16 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน rpoB.....	34
ตารางที่ 17 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน rpoB.....	35
ตารางที่ 18 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ.....	36
ตารางที่ 19 แสดงข้อมูลรหัสตัวอย่างและจำนวนเหาโคที่เก็บในพื้นที่ 3 จังหวัดจากประเทศไทย.....	39
ตารางที่ 20 แสดงผลการจำแนกชนิดของเหาโคที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย.....	45

ตารางที่ 21 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ Bartonella spp. ในดีเอ็นเอเหาโคบนตำแหน่งยีน gltA และ rpoB โดยใช้เทคนิค PCR..... 49

ตารางที่ 22 ข้อมูลตัวอย่างเหาโคและรหัสขึ้นทะเบียนยีน 18S rRNA ทั้งหมด 109 ตัวอย่าง..... 72

ตารางที่ 23 ข้อมูลตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ Bartonella spp. และรหัสขึ้นทะเบียนยีน gltA ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง 75

ตารางที่ 24 ข้อมูลตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ Bartonella spp. และรหัสขึ้นทะเบียนยีน rpoB ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง 76



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 วงจรชีวิตของเหาโค.....	10
รูปที่ 2 ลักษณะของเหากระปือ <i>Haematopinus tuberculatus</i>	12
รูปที่ 3 ลักษณะของเหาโค <i>Haematopinus eurysternus</i>	13
รูปที่ 4 ลักษณะของเหาโค <i>Haematopinus quadripertusus</i>	13
รูปที่ 5 ลักษณะของเหาโค <i>Linognathus vituli</i>	14
รูปที่ 6 ลักษณะของเหาโค <i>Solenopotes capillatus</i>	14
รูปที่ 7 วงจรการติดต่อแพร่เชื้อโรคจากเห็บ	21
รูปที่ 8 วงจรการติดเชื้ <i>Bartonella</i> spp.....	22
รูปที่ 9 วงจรการติดต่อแพร่เชื้อ <i>Rickettsia</i> spp.....	23
รูปที่ 10 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหาโคสกุล <i>Haematopinus</i>	40
รูปที่ 11 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน 18S rRNA ด้วยวิธี Gel electrophoresis (1.5% agarose gel) ภายใต้กำลังไฟ 100 โวลต์	41
รูปที่ 12 แสดงลักษณะของ colony ของแบคทีเรียสีขาวยและสีฟ้าบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	42
รูปที่ 13 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยเทคนิค colony PCR ด้วยวิธี Gel electrophoresis (1.5% agarose gel) ภายใต้กำลังไฟ 100 โวลต์.....	43
รูปที่ 14 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปของกราฟ chromatogram ยีน 18S rRNA ของเหาโค (แสดงผลบางส่วน).....	44
รูปที่ 15 แสดงผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 18S rRNA ของเหาโค (แสดงผลบางส่วน).....	44
รูปที่ 16 แสดงผลวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของเหาโคในการศึกษาครั้งนี้จากตัวอย่างเหาโคทั้งหมด 109 ตัวอย่าง โดยเทียบกับ reference sequence จากตำแหน่งยีน 18S rRNA ของเหาโคสายพันธุ์ต่าง ๆ	47

รูปที่ 17 ผลการตรวจหาเชื้อ Bartonella spp. ในตัวอย่าง DNA ของเหาโคบนตำแหน่งยีน gltA โดยเทคนิค PCR..... 49

รูปที่ 18 ผลการตรวจหาเชื้อ Bartonella spp. ในตัวอย่าง DNA ของเหาโคบนตำแหน่งยีน rpoB โดยเทคนิค PCR..... 50

รูปที่ 19 แสดงผลวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อ Bartonella spp. ที่ตรวจพบในเหาโคที่ตำแหน่งยีน gltA (A) และยีน rpoB (B) โดยเทียบกับ reference sequence ของเชื้อ Bartonella spp. สายพันธุ์ต่าง ๆ ของแต่ละตำแหน่งยีน 53



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เหา (Lice) เป็นแมลงดูดเลือดชนิดหนึ่ง โดยจัดอยู่ในอันดับ (order) Phthiraptera ซึ่งเป็นปรสิตภายนอกของทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก (1) เหาแต่ละชนิด (species) มีความจำเพาะกับชนิดของโฮสต์ (host specificity) และยังมีความจำเพาะกับอวัยวะของโฮสต์อีกด้วย (site specificity) เหาแบ่งออกเป็น 4 ซับอเดอร์ (suborder) ได้แก่ Amblycera, Ischnocera, Anoplura และ Rhynchophthirina เหาในซับอเดอร์ Anoplura เป็นเหาดูด (sucking lice, anopluran) ส่วนอีก 3 ซับอเดอร์ จัดว่าเป็นเหากัด (biting lice, chewing lice และ mallophagan) (2) การติดเหาสามารถเกิดขึ้นได้ทั่วโลก เหาติดต่อกันได้ง่ายโดยการสัมผัส เช่น การใกล้ชิดกับคนที่มีเหา การใช้หัว หมวก ผ้าเช็ดตัว หรือหมอนผ้าห่มร่วมกับคนที่มีเหา (3, 4) การถูกรบกวนจากเหาอาการที่เห็นได้ชัดที่สุด คือ มีอาการคันและรู้สึกระคายเคืองที่ผิวหนัง อาจส่งผลกระทบต่อด้านสุขภาพกายเนื่องจากเกิดการคัน ผิวหนังอักเสบ และเกาจนเกิดแผลบริเวณผิวหนังทำให้สามารถเกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนได้ (5) นอกจากนี้เหาจะสร้างความรำคาญและเป็นพาหะนำโรคในคนแล้ว ยังสามารถพบได้ในสัตว์เลี้ยงและปศุสัตว์ เหาที่อาศัยอยู่บนตัวสัตว์อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสัตว์โดยตรง คือ ทำให้เกิดโรคผิวหนังในสัตว์ ทำให้มีอาการคัน รู้สึกไม่สบายตัว และเกิดแผลบริเวณผิวหนัง หากสัตว์มีเหาอาศัยอยู่จำนวนมากอาจทำให้สัตว์มีภาวะซีดได้ และเหายังสามารถเป็นพาหะนำเชื้อโรคต่าง ๆ มาสู่สัตว์ได้เช่นกัน (6, 7)

ในประเทศไทยการทำปศุสัตว์เป็นอาชีพที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในทุกภาคทั่วประเทศ โดยเฉพาะการเลี้ยงโคเพื่อจำหน่ายและบริโภค การแพร่ระบาดของโรคผิวหนังในโคยังคงเป็นปัญหาหลักที่พบได้ทั่วประเทศ ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากการถูกปรสิตภายนอกกัดและดูดเลือด เช่น ไร เห็บ เหา เพราะสามารถติดต่อกันได้ง่ายหากมีการเลี้ยงที่ไม่ถูกต้องตามหลักสุขาภิบาลและไม่มีการควบคุมป้องกันโรคอย่างถูกวิธี ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อรายได้ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคและเศรษฐกิจของประเทศ (8) นอกจากนี้การติดโรคในโคอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้เลี้ยง เนื่องจากอาจเป็นการติดเชื้อที่สามารถถ่ายทอดจากสัตว์ไปสู่คน

เหาโค (cattle lice) สามารถพบได้บริเวณที่มีขนยาว เช่น พู่หาง ไหล่ คอ และส่วนหน้าของโค จัดอยู่ในซับอเดอร์ Anoplura เป็นเหาดูด (sucking lice) เหาในซับอเดอร์นี้ส่วนใหญ่เป็นปรสิตภายนอกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เหาจะดูดกินเลือดเป็นอาหารสามารถดูดเลือดได้ทั้งระยะตัวอ่อน (nymph) และตัวเต็มวัย (adult) มันจะอาศัยอยู่บนโฮสต์ตลอดวงจรชีวิต โดยวงศ์ (Family) ที่สามารถพบได้ในโค ได้แก่ วงศ์ Haematopinidae สกุลที่มีความสำคัญ คือ *Haematopinus* spp.

ประกอบด้วย *H. tuberculatus* พบในกระปือ *H. eurysternus* พบในโคและกระปือ *H. quadripertusus* พบบริเวณหางของโค และอีกวงศ์หนึ่ง คือ Linognathidae ประกอบด้วยชนิด *Linognathus vituli* พบบริเวณไหล่ คอ ลำตัวของโคและ *Solenopotes capillatus* ในประเทศไทยพบที่ส่วนหน้าของโค มีรายงานในต่างประเทศสามารถพบได้ที่บริเวณรอบปาก คอ ไหล่ หลัง และหาง การจำแนกเหาโดยดูจากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นทำได้ยาก เนื่องจากในวงศ์เดียวกันเหาแต่ละชนิดมีลักษณะที่ค่อนข้างคล้ายคลึงกัน จะมีความแตกต่างในส่วนของบริเวณที่อยู่อาศัยและลักษณะโครงสร้างภายนอกบางส่วนเท่านั้น (9, 10)

เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในโคสามารถตรวจพบได้หลายชนิดและมีความสำคัญทางการแพทย์ เช่น ตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในโคจาก 5 ประเทศทั่วโลกโดยมีรายงาน ได้แก่ ไทย 10% จอร์เจีย 57% กัวเตมาลา 20.6% เคนยาและญี่ปุ่นไม่พบเชื้อ และเชื้อ *Bartonella* spp. ที่ตรวจพบในโคมีรายงาน 3 สายพันธุ์ คือ *B. bovis*, *B. schoenbuchensis* และ *B. chomelii* แต่ส่วนใหญ่รายงานว่าพบสายพันธุ์ *B. bovis* และมีความชุกที่แตกต่างกันไปของแต่ละประเทศ คือ สหรัฐอเมริกา 50-89% กายอานา 70% ฝรั่งเศส 36% อิตาลี 24% และแอฟริกาตะวันตก 20% (11-21) ในการศึกษาจากประเทศโปแลนด์มีความชุกของ *B. bovis* ในโคที่ต่ำกว่าประเทศอื่นมาก คือ 6.8% (12) เชื้อ *Bartonella* spp. มักจะไม่ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกในโค แต่สายพันธุ์ *B. bovis* จะเกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบในโค (22, 23) และมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *Bartonella* spp. พบว่าเชื้อชนิดนี้มีสัตว์ขาปล้องเป็นพาหะนำโรค เช่น หมัดหนู หมัดแมว หมัดกระต่าย โลงน รวมถึงรินฝอยทราย (24, 25) และมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในเหาที่เก็บมาจากหนูป่า และพบใน *Rhipicephalus microplus* คือ เห็บที่เก็บได้จากวัวในประเทศไต้หวัน (21) นอกจากนี้ยังมีแมลงที่เกี่ยวข้อง เช่น แมลงวันกัด สายพันธุ์ *Haematobia* spp. และ *Stomoxys* spp. จากโคในแคลิฟอร์เนีย (26) และแมลง *Hippobosca equina* จากยุโรป (27) ซึ่งเชื้อ *Bartonella* spp. แต่ละสายพันธุ์จะกระจายอยู่ในโฮสต์และพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่มีความจำเพาะ ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการถ่ายทอดเชื้อจากสัตว์สู่คน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีปฏิสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างคนกับสัตว์ (28)

Rickettsia spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่กระจายอยู่ทั่วโลกแต่จำกัดภูมิภาคตามเชื้อก่อโรคและสายพันธุ์ สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้แต่ปกติจะเป็นเชื้อที่ติดต่อยุ่ระหว่างสัตว์กับสัตว์โดยเฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สัตว์ฟันแทะ สุนัข แมว เป็นต้น ซึ่งมีแมลงเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ ได้แก่ เหา เห็บ หมัด และไร คนจะติดเชื่อได้โดยบังเอิญเมื่อถูกแมลงที่มีเชื้อ (29-32) จากการศึกษาพบว่าในประเทศไทยไม่ได้มีเพียงเชื้อแบคทีเรีย *Orientia tsutsugamushi* ที่ก่อโรคสครับไทฟัส (ไข้ไรป่า) ที่มีไรอ่อนเป็นพาหะเท่านั้น แต่ยังมีเชื้อก่อโรค *Rickettsia* spp. อีกหลากหลายสายพันธุ์ที่มีการแพร่ระบาดของโรคในหลายพื้นที่ของประเทศไทย (33, 34) ในประเทศ

ลาวตรวจพบเชื้อ *R. felis* ในหมัดที่มีมากถึง 76.6% และตรวจพบเชื้อใน *Boophilus* spp. ซึ่งเป็นเห็บที่เก็บจากโค (35) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Rickettsia* spp. ในเหาโคสายพันธุ์ *H. eurysternus* และ *L. vituli* รวมไปถึงในเหาแพะสายพันธุ์ *L. stenopsis* จากประเทศฮังการี (36) แต่ยังไม่มียางานการตรวจพบเชื้อจากเหาโคในประเทศไทยนอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. หลากหลายสายพันธุ์ในเหาลำตัวและเหาศรีษะที่เก็บจากคนที่ไร้ที่อยู่อาศัย รวมไปถึงการตรวจพบในเหาศรีษะที่เก็บจากนักเรียนในโรงเรียนต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย ซึ่งเชื้อชนิดนี้มีความสำคัญทางการแพทย์ คือ ก่อให้เกิด nosocomial infection ในคนได้ จึงเป็นอีกเชื้อหนึ่งที่น่าสนใจนำมาศึกษา

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับอนุชีววิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของเหาโคในต่างประเทศเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาเชิงวิวัฒนาการ และเปรียบเทียบความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์เหาโคในพื้นที่ต่าง ๆ ซึ่งเหาโคในแต่ละพื้นที่อาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน โดยมีการศึกษาจากยีนในนิวเคลียสคือ ยีน 18S ribosomal RNA (28) และยีนในไมโทคอนเดรีย คือ ยีน Cytochrome C oxidase subunit I (COI) (37) ซึ่งในขณะที่ประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเหาโคที่สามารถใช้อ้างอิงได้ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเหาโคในประเทศไทยอาจมีความแตกต่างจากเหาโคประเทศอื่น และสายพันธุ์ของเหาโคอาจมีความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคด้วย เพราะฉะนั้นการศึกษาด้านอนุชีววิทยาและการทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเหาโคจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

การศึกษานี้จึงทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ในเหาโคที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย โดยตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. และ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเหาโคด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อศึกษาความเป็นพาหะนำโรคและสำรวจความชุกของเชื้อแบคทีเรียในเหาโคในพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเหาโคโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในตำแหน่งยีน 18S rRNA และจำแนกความหลากหลายโดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในงานระบาดวิทยา การควบคุม และการป้องกันโรคให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นในอนาคต

1.2 คำถามงานวิจัย

1.2.1 สามารถตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. และ *Acinetobacter* spp. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาโคที่เก็บได้จากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทยหรือไม่

1.2.2 เหาโคจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งยีน *18S rRNA* หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.3.1 เพื่อตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. และ *Acinetobacter* spp. ในเหาโคที่เก็บได้จากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย

1.3.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งยีน *18S rRNA* ในเหาโคที่เก็บได้จากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย

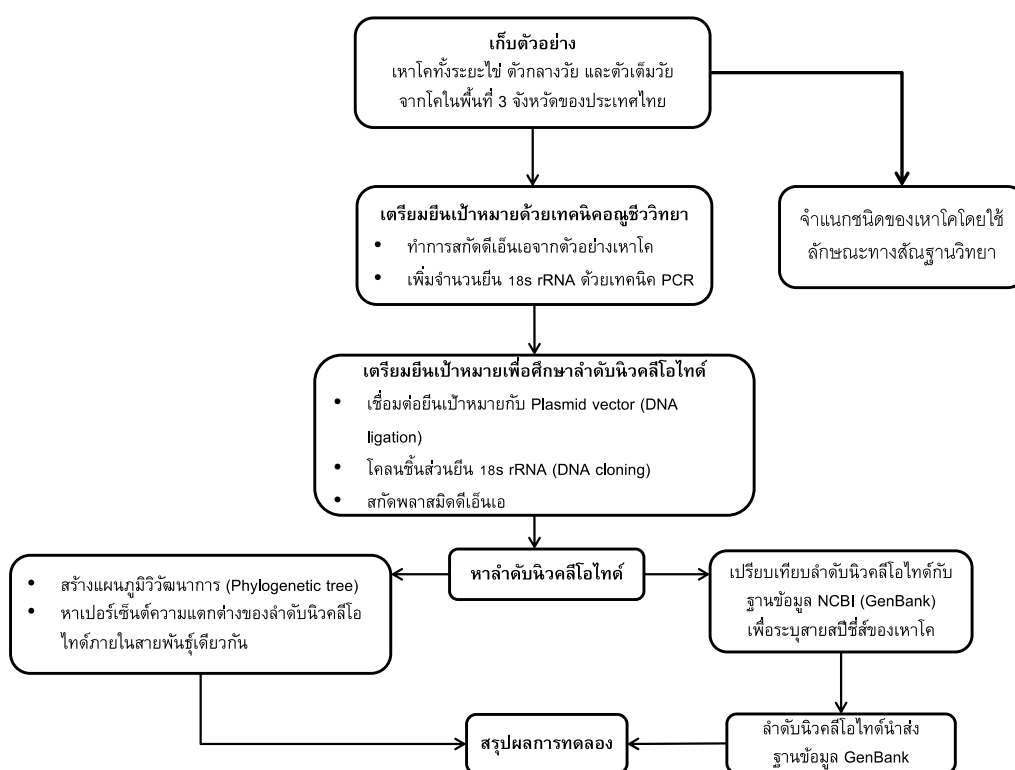
1.4 สมมติฐานของการวิจัย

1.4.1 ตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. และ *Acinetobacter* spp. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาโคที่เก็บได้จากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทยได้

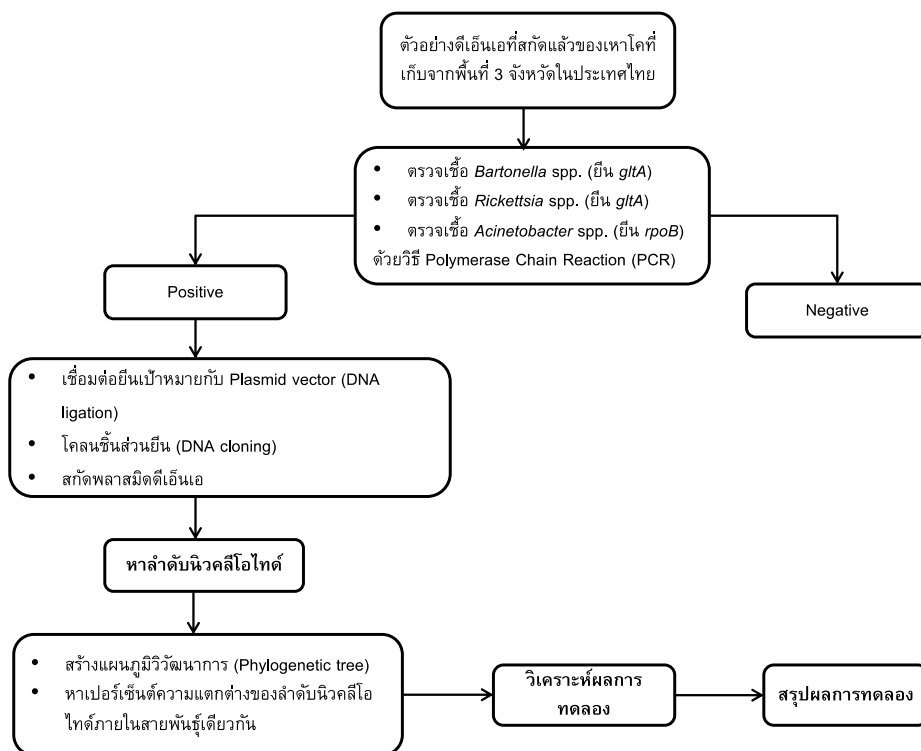
1.4.2 เหาโคที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งยีน *18S rRNA*

1.5 กรอบแนวความคิดการวิจัย

ส่วนที่ 1 การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของเหาโค



ส่วนที่ 2 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากตัวอย่างดีเอ็นเอเหาโค



1.6 คำสำคัญ

Cattle louse

Bartonella spp.

gltA gene

rpoB gene

18S rRNA gene

Thailand

1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1.7.1 *Haematopinus* คือ สกกุลของแมลงในอันดับย่อย Anoplura ซึ่งเป็นเหาดูด *Haematopinus* เป็นสกุลเดียวที่อยู่ในวงศ์ Haematopinidae รู้จักกันโดยทั่วไปว่าเป็นเหาในสัตว์เท้ากีบ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชนิดที่มีความสำคัญทางสัตวแพทย์และเป็นกลุ่มเหาที่อันตรายที่สุดในปรสิตภายนอกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพื้นเมืองและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดใหญ่จำนวนมาก รวมทั้งโค ม้า ลา กระบือ ละคร่าง ม้าลาย กวาง และอูฐ

1.7.2 *Bartonella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม Alpha-proteobacteria สามารถพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายประเภทรวมถึงคนด้วย นอกจากนี้ยังพบได้ในสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าหลายชนิด *Bartonella* spp. แต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะกับสัตว์กักเก็บโรคที่แตกต่างกัน ซึ่งหลายสายพันธุ์สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ (Zoonosis) สัตว์ที่เป็น reservoir มักติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการหรือมีอาการป่วยเล็กน้อย แต่จะพบอาการรุนแรงมากขึ้นในสัตว์ที่เป็นโฮสต์สุดท้าย ซึ่งเมื่อรับเชื้อแล้วจะไม่สามารถแพร่เชื้อให้แก่สัตว์อื่น การติดต่อ *Bartonella* spp. ระหว่าง reservoir host กับ accidental host อาศัยพาหะจำพวกสัตว์ขาเป็นปล้อง (arthropod vector) เช่น หมัดหนู หมัดแมว หมัดกระต่าย โลงน แมลงวันเหืองในแกะ *Melophagus ovinus* (sheep ked) รวมทั้งริ้นฝอยทราย ซึ่งเชื้อ *Bartonella* spp. แต่ละชนิดทำให้เกิดโรคและอาการทางคลินิกแตกต่างกัน

1.7.3 *18S rRNA* gene หรือ 18S ribosomal RNA gene เป็นส่วนหนึ่งของ ribosomal RNA ซึ่ง S ใน 18S แสดงถึงหน่วย Svedberg และ *18S rRNA* เป็นโครงสร้าง RNA ซึ่งเป็นส่วนประกอบขนาดเล็กของ eukaryotic cytoplasmic ribosomes นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบพื้นฐานของเซลล์ยูคาริโอตทั้งหมด ข้อมูลลำดับเบสจากยีน *18S rRNA* ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ทางโมเลกุลเพื่อศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังเนื่องจากมีอัตราของวิวัฒนาการช้าจึงทำให้สามารถศึกษาความแตกต่างทางวิวัฒนาการในอดีตจนถึงปัจจุบัน

1.7.4 Phylogenetic tree เป็นการศึกษาเชิงวิวัฒนาการโดยอาศัยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ หรือ evolutionary tree เพื่อวิเคราะห์ถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนหรือโปรตีนที่ก่อให้เกิดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่แตกแขนงออกไปจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน โดยในการศึกษาจะนำข้อมูลของสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในปัจจุบันศึกษาย้อนกลับไปหาที่มาและความสัมพันธ์ที่เคยมีในอดีต นอกจากนี้อาจทำให้ทราบสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่ทำให้สิ่งมีชีวิตบางชนิดสูญพันธุ์ไป หรือสิ่งมีชีวิตหนึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็นสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งความรู้เหล่านี้มีประโยชน์สำหรับการรักษาโรคทางพันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์ของพืชและสัตว์เพื่อให้พืชหรือสัตว์มียืนในรูปแบบที่เราต้องการได้

1.8 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.8.1 สามารถอธิบายความหลากหลายทางพันธุกรรมของเหาโคเพื่อการจำแนกชนิดของเหาโคที่สามารถพบในโคได้

1.8.2 การตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *Bartonella* spp. ในเหาโค สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อการควบคุมโรคและการป้องกันโรคได้

1.8.3 สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเกี่ยวกับเหาโคและแบคทีเรียก่อโรคในเหาโคที่พบในพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทยเพื่อใช้ประโยชน์ในการทำงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของเหาโค (Cattle lice)

อาณาจักร (Kingdom): Animalia

ไฟลัม (Phylum): Arthropoda

ชั้น (Class): Insecta

อันดับ (Order): Phthiraptera

อันดับย่อย (Suborder): Anoplura

วงศ์ (Family): Haematopinidae

Linognathidae

สกุล (Genus): *Haematopinus*

Linognathus

Solenopotes

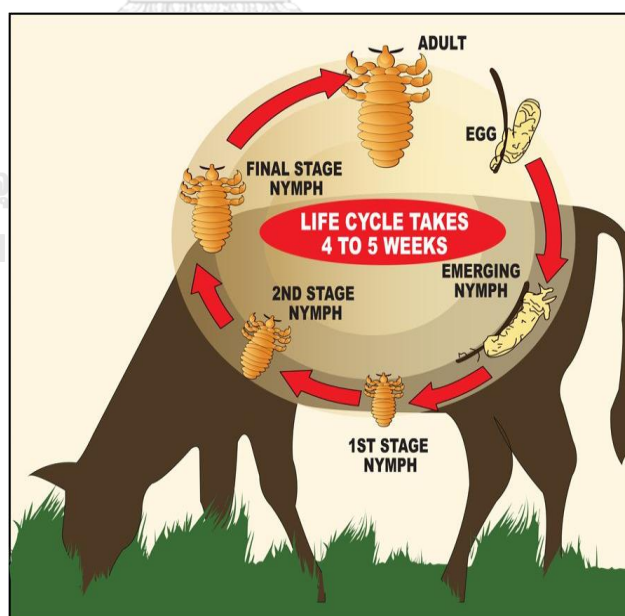
เหาโคจัดอยู่ในอันดับ (order) Phthiraptera อันดับย่อย (suborder) Anoplura เป็นเหาคูด (sucking lice) ส่วนใหญ่เป็นปรสิตภายนอกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (1) และจะดูดกินเลือดเป็นอาหารสามารถดูดเลือดได้ทั้งระยะตัวอ่อน (nymph) และตัวเต็มวัย (adult) มันจะอาศัยอยู่บนโฮสต์ตลอดวงจรชีวิต เหาโคพบในวงศ์ Haematopinidae และวงศ์ Linognathidae มีหลายชนิดทั่วโลก ซึ่งแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อการเกิดโรคและลักษณะภูมิประเทศที่แตกต่างกัน เหาโคสามารถพบในบริเวณที่มีขนยาว เช่น บริเวณใบหน้า ไหล่ คอ และพุงหาง มักพบในลูกโคและโคที่มีสุขภาพไม่ดี วงศ์ Haematopinidae เหาที่อยู่ในวงศ์นี้เป็นเหาคูดที่ไม่มีตา แต่จะมี ocular point ยื่นออกมาสกุลที่สำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ คือ *Haematopinus* spp. ประกอบด้วย *H. tuberculatus* *H. eurysternus* และ *H. quadripertusus* นอกจากนี้ยังมีเหาโคที่จัดอยู่ในวงศ์ Linognathidae มีชนิดที่สำคัญ ได้แก่ *Linognathus vituli* และ *Solenopotes capillatus* เหาในวงศ์นี้ไม่มีตาและไม่มี ocular point ซึ่งการจำแนกเหาโดยดูจากลักษณะสัณฐานวิทยานั้นทำได้ยาก เนื่องจากในวงศ์เดียวกันเหาแต่ละชนิดมีลักษณะที่ค่อนข้างคล้ายคลึงกัน จะมีความแตกต่างในส่วนองบริเวณที่อยู่อาศัยและลักษณะโครงสร้างภายนอกบางส่วนเท่านั้น (2, 9, 10)

2.2 วงจรชีวิตและสัณฐานวิทยาของเหาโค

เหาโคจัดเป็นแมลงที่มีขนาดเล็กลำตัวยาวประมาณ 1-4 มิลลิเมตร ตัวแบน (flat body) มีหนวด 2 เส้น มีขา 3 คู่ ซึ่งมีลักษณะพิเศษที่ใช้เกาะขนได้ดีโดยมีเล็บ (claw) ไว้ยึดเส้นขน ลักษณะปากเป็นแบบเจาะดูด เหาแต่ละชนิด (species) มีความจำเพาะกับชนิดของโฮสต์ (host specificity) และยังมี ความจำเพาะกับอวัยวะของโฮสต์อีกด้วย (site specificity) เหาจะอาศัยอยู่บนตัวโฮสต์ตลอดเวลาไม่ว่าจะในระยะใดของวงจรชีวิตก็ตามถ้าเหาอยู่นอกตัวโฮสต์จะมีชีวิตอยู่ได้ไม่นานก็จะตาย และเหาสามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดเวลา (2, 9)

2.2.1 วงจรชีวิตของเหาโค

วงจรชีวิตของเหาโคแบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะไข่ ระยะตัวอ่อน และระยะตัวเต็มวัย มีวงจรชีวิตที่สมบูรณ์เมื่ออยู่ในสภาวะเหมาะสมนานประมาณ 18 วัน เหาโคเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์แล้วจะวางไข่ภายใน 18-48 ชั่วโมง และวางไข่วันละ 1 ฟอง โดยปล่อยสารคล้ายกาวเหนียวเพื่อให้ยึดติดกับโคนเส้นขนใกล้กับผิวหนังจากนั้นประมาณ 1-2 สัปดาห์ ตัวอ่อนจะฟักออกจากไข่ จากนั้นตัวอ่อนแต่ละตัวจะมีการลอกคราบ 3 ครั้ง ซึ่งการลอกคราบ 3 ครั้งจะใช้เวลาประมาณ 10 วัน (ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของอากาศโดยรอบและอุณหภูมิของผิวหนัง) และจะพัฒนาต่อเป็นระยะตัวเต็มวัย ซึ่งวงจรชีวิตของเหาโคมีช่วงเวลาระหว่าง 4-5 สัปดาห์และเหาโคจะมีชีวิตอยู่ประมาณ 42 วัน เหาโคเพศเมียสามารถวางไข่ได้ถึง 50 ฟองในตลอดช่วงชีวิตของมัน (38)



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของเหาโค

(ที่มา: <https://www.bimectin.com/disease-information-cdn/cattle/lice>)

2.2.2 ระยะไข่ (egg หรือ nit)

เหาโคเพศเมียที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วจะวางไข่วันละ 1 ฟอง โดยปล่อยสารคล้ายกาวเหนียวซึ่งเป็นโปรตีนประเภทเคอร์ราตินเพื่อให้ไข่ยึดติดกับโคนเส้นขนใกล้กับผิวหนัง ลักษณะของไข่เหาจะมีเปลือกแข็งและมีความมันวาว มีฝาเปิด (operculum) ซึ่งเป็นทางออกของตัวอ่อนและถ่ายเทอากาศ ไข่ 1 ใบจะมีตัวอ่อน 1 ตัว มีขนาดประมาณ 0.8-1 มิลลิเมตร ลักษณะทรงรี ยาว สีของไข่เหาจะมีสีขาวขุ่นปนเทา หรือน้ำตาลอ่อน จะสามารถเห็นได้ชัดเมื่อติดอยู่กับเส้นขน

2.2.3 ระยะตัวอ่อนหรือตัวกลางวัย (nymph)

หลังจากเหาเพศเมียวางไข่ประมาณ 1-2 สัปดาห์ ตัวอ่อนจะฟักออกจากไข่ จากนั้นตัวอ่อนแต่ละตัวจะมีการลอกคราบ 3 ครั้ง ซึ่งการลอกคราบ 3 ครั้งจะใช้เวลาประมาณ 10 วัน (ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของอากาศโดยรอบและอุณหภูมิของผิวหนัง) หลังการฟักออกจากไข่ตัวอ่อนจะสามารถดูดกินเลือดจากโฮสต์ได้ทันทีที่ระยะตัวอ่อนจะมีการเจริญของระบบสืบพันธุ์ที่ยังไม่สมบูรณ์ ซึ่งจะยังไม่สามารถแยกเพศได้ ตัวอ่อนระยะที่ 1 จะมีขนาดเล็กและอยู่นิ่งไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ จากนั้นพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 และ 3 ซึ่งจะมีลำตัวขนาดใหญ่ขึ้นตามลำดับ สามารถเคลื่อนย้ายไปสู่โฮสต์ตัวอื่นได้จากการสัมผัสอย่างใกล้ชิด

2.2.4 ระยะตัวเต็มวัย (adult)

เหาระยะตัวเต็มวัยจะมีระบบสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์แล้วจึงสามารถแยกเพศผู้เพศเมียได้ เหาเพศผู้จะมีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมีย เหาแต่ละชนิดมีขนาดแตกต่างกันลำตัวจะมีลักษณะยาวและแบนจากบนลงล่าง (dorsal-ventrally flattened) ยาวประมาณ 0.5-10 มิลลิเมตร โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง บางสกุลมีตาแต่เหาโคจัดอยู่ในสกุลที่ไม่มีตา หนวดมีขนาดสั้น จำนวน 3-5 ปล้อง เหาโคจะมีปากแบบคูด (stylet-like mouthpart) สามารถหดเข้าไปอยู่ในถุงที่อยู่บริเวณหัว (stylet sac) ปากจะโผล่ออกมาก็ต่อเมื่อจะใช้งานเท่านั้น ส่วนอกแบ่งเป็นปล้องไม่ชัดเจน บนอกปล้องที่สอง (mesothorax) มีรูเปิดของระบบหายใจ (spiracle) หนึ่งคู่ ส่วนท้องแบ่งออกเป็น 7 ปล้อง แต่ละปล้องมีรูหายใจหนึ่งคู่เช่นกันยกเว้นปล้องสุดท้ายไม่มีรูหายใจ สำหรับขาของเหาจะยื่นออกมาจากปล้องอกแต่ละปล้อง ขามีขนาดค่อนข้างใหญ่ปลายขาของเหาโคมีเล็บจำนวน 1 เล็บ (claw) โดยจะพัฒนาเป็น tibiotarsal claw ซึ่งใช้ช่วยในการยึดเกาะกับเส้นขนของโฮสต์ ลำตัวของเหาโคจะปกคลุมไปด้วยขน (seta) บางชนิดด้านข้างของปล้องท้องแต่ละปล้องจะมี paratergal plate ปกคลุมอยู่ นอกจากนี้ด้านล่างของลำตัวเหาจะมีโครงสร้างแข็ง (sclerotized plate) ช่วยป้องกันอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (genitalia) ส่วนในเพศเมียมีโครงสร้างที่เรียกว่า gonopod ที่ช่วยในการวางไข่ เหาโคจะมีสีเทาดำ หรือน้ำตาล ระยะตัวอ่อนอาจมีสีเทาขาวได้และเมื่อดูดกิน

เลือดลำตัวจะมีสีแดง เหาไม่สามารถกระโดดหรือบินได้จะเคลื่อนที่อย่างช้า ๆ ใต้ไปตามเส้นขน เหาจะอาศัยอยู่บนตัวโฮสต์ตลอดเวลาไม่ว่าจะในระยะใดของวงจรชีวิตก็ตามถ้าเหาอยู่นอกตัวโฮสต์จะมีชีวิตอยู่ได้ไม่นานก็จะตายและเหาสามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดเวลา (9, 39)

ความแตกต่างของเหาโคเพศผู้และเพศเมียในระยะตัวเต็มวัยโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะเปรียบเทียบที่ขนาดลำตัว ซึ่งเพศผู้จะมีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย ขนาดหน้าของเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมียเพื่อใช้ในการเกาะเพศเมียช่วงการผสมพันธุ์ และบริเวณส่วนปลายของปล้องท้องเพศผู้บริเวณปลายท้องจะมน บางครั้งพบรอยค้ำของอวัยวะสืบพันธุ์ยื่นคล้ายเข็มมาบริเวณปลาย (aedeagus) เพศเมียบริเวณปลายท้องมีgonopod 1 คู่ ลักษณะคล้ายรูปอักษรดับเบิ้ลยู (W shape) เรียกว่า bilobe

2.3 เหาคอที่มีความสำคัญทางการแพทย์

Haematopinus tuberculatus มีชื่อสามัญว่า buffalo louse เหาชนิดนี้พบในกระปือ โค อูฐ จามรี อาจจะมีสังเกตเห็นเหาชนิดนี้ได้ยากบนตัวกระปือเนื่องจากมีสีที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่สำหรับระยะไข่อาจสังเกตเห็นได้ง่ายกว่า ส่วนของ thoracic sternal plate มีรูปร่างเกือบเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าและไม่มี antero-medial projection มีขนยื่นออกมาจากบริเวณ paratergal plate ส่วน sternal pit อยู่ที่ด้านนอกของ thoracic sternal plate



รูปที่ 2 ลักษณะของเหากระปือ *Haematopinus tuberculatus*

ที่มา: http://www.ces.csiro.au/aicn/system/c_4051.htm

Haematopinus eurysternus เป็นชนิดที่สามารถพบได้บนตัวของโคและกระบือ มีชื่อสามัญว่า Short nose cattle louse ลักษณะของ thoracic sternal plate มีส่วนด้านยาวมากกว่าส่วนด้านกว้างและมี anteromedian projection ที่ค่อนข้างมน ส่วน sternal pit อยู่ที่ด้านนอกของ thoracic sternal plate



รูปที่ 3 ลักษณะของเหาโค *Haematopinus eurysternus*

ที่มา: <http://www.zoologie.frasma.cz/mmp%200214%20sestinozi/%C5%A1estinoz%C3%AD%20web.html>

Haematopinus quadripertusus เหาชนิดนี้มักพบบริเวณพู่หางของโค มีชื่อสามัญ คือ tail louse ซึ่งพบได้เสมอในประเทศไทย ลักษณะของ thoracic sternal plate มีส่วนด้านยาวมากกว่าส่วนด้านกว้างและมี anteromedian projection ที่ค่อนข้างแหลม ส่วน sternal pit อยู่ที่ด้านนอกของ thoracic sternal plate



รูปที่ 4 ลักษณะของเหาโค *Haematopinus quadripertusus*

ที่มา: <http://dailyparasite.blogspot.com/2010/07/july-29-haematopinus-quadripertusus.html>

Linognathus vituli มีชื่อสามัญ คือ long-nosed cattle louse พบบริเวณไหล่ คอ และ ลำตัวของโค ลำตัวมีความยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ไม่มีตาและไม่มี ocular point ขาคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 มีขนาดใหญ่กว่าขาคู่ที่ 1 ปลายขามีเล็บที่หุ้ม (claw) ไม่มี thoracic sternal plate หรือถ้ามีก็ยังไม่เจริญไม่ดี ไม่มี paratergal plate และไม่มี abdominal tubercle เหาชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อโคที่อายุน้อย สำหรับโคอายุมากนั้นอาจกระทบต่อผลผลิตได้



รูปที่ 5 ลักษณะของเหาโค *Linognathus vituli*

ที่มา: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Linognathus-vituli-lice.JPG>

Solenopotes capillatus เหาชนิดนี้มีชื่อสามัญว่า little blue cattle louse ในประเทศไทยสามารถพบเหาชนิดนี้ที่บริเวณใบหน้าของโค ในต่างประเทศมีรายงานว่าพบที่บริเวณรอบปาก คอ ไหล่ หลังและหาง ทำให้โคเกิดอาการคันและระคายเคืองซึ่งเหาชนิดนี้มีขนาดลำตัวประมาณ 1.2-1.5 มิลลิเมตร เป็นเหาที่มีขนาดเล็กที่สุดของเหาโค ไม่มีตาและไม่มี ocular point ขาคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 มีขนาดใหญ่กว่าขาคู่ที่ 1 ปลายขามีเล็บที่หุ้ม (claw) มี thoracic sternal plate ที่เห็นชัด มี abdominal tubercle ยื่นออกมาเล็กน้อย



รูปที่ 6 ลักษณะของเหาโค *Solenopotes capillatus*

ที่มา: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/large-animal-lice/deck/1378319>

2.4 การเป็นพาหะนำเชื้อโรคของแมลงดูดเลือดในโค

โรคที่เกิดกับโคบางชนิดสามารถติดได้กับสัตว์อื่น ๆ เช่น กระจับปี่ สุกร รวมถึงบางชนิดสามารถแพร่เชื้อโรคมาสู่คนได้ เช่น โรคแอนแทรกซ์ หากไม่มีการป้องกันอาจทำให้เกิดการแพร่ระบาด และติดต่อสู่คนได้ง่ายในการเลี้ยงโคที่เป็นอุตสาหกรรมนั้น นอกจากนี้จำเป็นต้องมีการเลี้ยงดูดี อาหารดี สายพันธุ์ดีแล้ว ยังต้องมีการป้องกันรักษาโรคที่ดีอีกด้วย เพราะสัตว์ที่มีสุขภาพไม่สมบูรณ์ย่อมให้ผลผลิตสูงไม่ได้ โรคที่ร้ายแรงในโค ได้แก่ โรคปากและเท้าเปื่อย โรคคอบวม โรคแอนแทรกซ์ โรคมูเซิลโลซิส หรือโรคแท้งติดต่อ โรคแบลคเลก วัณโรค นอกจากนี้ยังมีพยาธิอีกหลายชนิดที่เป็นศัตรูต่อสุขภาพโค ทั้งยังมีแมลงต่าง ๆ ที่ทำอันตรายโคได้โดยตรง และเป็นพาหะนำเชื้อโรคอีกด้วย เช่น เห็บ เหา เหลือบ แมลงวันบางชนิด การป้องกันไม่ให้เกิดโรคพยาธิและแมลงพาหะนำโรคเป็นสิ่งจำเป็นที่สุด เพราะอาจส่งผลกระทบต่อด้านผลผลิตและอาจจะเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนได้

1. โรคไข้เห็บ

สาเหตุเกิดจากเชื้อพยาธิที่อาศัยอยู่ในเห็บโค เมื่อโคถูกเห็บที่มีเชื้อดูดเลือดเชื้อจะปนกับน้ำลายเข้าสู่เส้นเลือดและเชื้อจะไปเพิ่มจำนวนในเลือดทำลายเม็ดเลือดแดง โรคนี้มักระบาดในช่วงต้นฤดูฝนที่มีแมลงดูดเลือดชุกชุม

2. โรคไข้ขาแข็ง

เกิดจากเชื้อไวรัส ที่เข้าสู่ร่างกายโคโดยแมลงดูดเลือด

3. โรคแอนแทรกซ์

เป็นโรคที่เกิดมาจากเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายสัตว์ทางบาดแผลซึ่งอาจเกิดจากการถูกแมลงดูดเลือดกัดแล้วคัน เกาจนเกิดแผล หรือการกินอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนโรคนี้อาจเป็นโรคอันตรายที่สามารถติดต่อเข้าสู่คนได้โดยการสัมผัสเลือดของสัตว์ที่ป่วยตายหรือกินเนื้อโคสุก ๆ ดิบๆ

4. โรคปรสิตภายนอก

เกิดจากมีแมลงดูดเลือดกัด เช่น เห็บ เหา ทำให้สัตว์รำคาญคันกินอาหารน้อยลงมีกลิ่นเหม็นอาจเกิดแผลจากการเกาและติดเชื้อหนองหรือมีแมลงวันมาไข่เป็นหนองพยาธิภายในทำให้สัตว์ซูบผอมและมีขนหยาบ

2.5 การเป็นพาหะนำเชื้อโรคของเหาในมนุษย์

เหาในมนุษย์ (*Pediculus humanus*) จะมีรูปร่างคล้ายกับเหาในสกุล *Haematopinus* ที่พบในสัตว์ แต่เหาสกุลนี้จะมีตาและมี Paratergal plate แบ่งเป็น 3 ชนิดหลักๆ ตามบริเวณที่อาศัยบนร่างกายมนุษย์ คือ เหาศีรษะ (*P. humanus capitis*) อาศัยอยู่บนศีรษะของมนุษย์ เหาลำตัว (*P.*

humanus corporis) พบบริเวณเส้นขนบนร่างกายของมนุษย์หรือบนเสื้อผ้าที่สวมใส่ และโลน (Pubis louse) จะอาศัยอยู่ตามเส้นขนที่อวัยวะสืบพันธุ์ (9)

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการเป็นพาหะนำเชื้อโรคของเหาพบว่า เหาสามารถเป็นพาหะนำเชื้อโรคได้หลายชนิด เช่น เหาดำ (*P. humanus corporis*) เป็นพาหะนำเชื้อได้ 3 ชนิด คือ 1. *Rickettsia prowazekii* เป็นสาเหตุของโรค epidemic typhus 2. เชื้อ *Bartonella quintana* เป็นสาเหตุของโรค trench fever 3. เชื้อ *Borrelia recurrentis* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรค louse-borne relapsing fever (40) นอกจากนี้เหาดำแล้วยังพบว่าเหาศีรษะมีความสามารถในการเป็นพาหะนำเชื้อโรคได้ เช่น เชื้อ *B. quintana* ซึ่งมีรายงานการตรวจพบครั้งแรกในเด็กที่อาศัยอยู่ในชุมชนแออัดประเทศเนปาล (41) และตรวจพบเชื้อในไข่เหาที่เก็บจากบุคคลไร้บ้านในประเทศฝรั่งเศส (42, 43) ปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในแมลงดูดเลือด เช่น แมลงวัน (tsetse fly) ริ้นฝอยทราย ยุง หมัด เห็บ และเหา (37) ซึ่งมีหลายงานวิจัยรายงานว่าตรวจพบเชื้อ *A. baumannii* ในเหาดำและเหาศีรษะ (44) ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *A. baumannii*, *A. radioresistens* และ *A. schindleri* เป็นครั้งแรกในเหาศีรษะของเด็กนักเรียนจากหลายจังหวัดทั่วประเทศ (45) ซึ่งเชื้อ *A. baumannii* มีความสำคัญทางการแพทย์ก่อให้เกิดโรค nosocomial infection ทำให้เกิดอาการได้หลายลักษณะ เช่น อาการปอดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ หรือเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ

2.6 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะ

โรคติดต่อหรือโรคติดเชื้อเกิดจากเชื้อโรคซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกันทั้งขนาด รูปร่างลักษณะ ความรุนแรงในการทำให้เกิดอาการของโรค รวมทั้งการแพร่กระจายจากที่หนึ่งไปสู่อีกที่หนึ่ง เชื้อแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์หรือเชื้อโรคที่จัดอยู่ในจำพวกฟิซเซลล์เดียว มีการเจริญเติบโต การกินอาหาร ขับถ่ายของเสียแบบเดียวกับฟิซ ขยายพันธุ์โดยการแบ่งตัวเป็นเชื้อโรคที่มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายประมาณ 1,500 เท่า

จากการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค พบว่ามีแมลงหรือสัตว์ขาปล้องเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญหลายชนิด เช่น โรคลีม์ (Lyme disease) มีเห็บกวาง (Deer Tick) เป็นพาหะซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Borrelia* spp. และ *B. burgdorferi sensu lato*, โรคบาร์โทเนลโลสิส (Bartonellosis) มีหมัด (Fleas) เหากล่ำตัว (Body Louse) ริ้นฝอยทราย (Sand Fly) เห็บ (Tick) และยุง (Mosquito) เป็นพาหะ โดยเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Bartonella* spp. และโรคไข้ริคเก็ตเซีย (Rickettsial Fever) มีหมัดและเห็บเป็นพาหะ เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Rickettsia* spp. นอกจากนี้ยัง

รายงานการตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในแมลงดูดเลือด เช่น แมลงวันกัด (tsetse flies) รื่นฝอยหาย ยุง หมัด เห็บ และเหา ซึ่งมีหลายงานวิจัยรายงานว่าตรวจพบเชื้อ *A. baumannii* ในเหาตัว และเหาศีรษะ เป็นต้น (44-47)

ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาเกี่ยวกับการตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. และ *Rickettsia* spp. ในเหาโคเนื่องจากเป็นเชื้อที่มีรายงานว่าสามารถก่อโรคในคน (41-43) และเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ ซึ่งการรักษาจะยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกเพราะมักติดต่อยาปฏิชีวนะ และมีโอกาสที่เชื้อจะแพร่ไปในกระแสเลือด เกิดภาวะช็อกตามมาได้ เชื้อ *Bartonella* spp. เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ซึ่งแบคทีเรียรูปร่างนี้มักทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ ไต กระจกน้ำดี และไส้ติ่ง (โรคไส้ติ่งอักเสบ) นอกจากนี้เชื้อทั้ง 2 ชนิดยังมีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะนำโรค เช่น เหา เห็บ หมัด ซึ่งเหาสามารถติดได้ง่ายโดยการสัมผัสอย่างใกล้ชิด โดยผู้ที่เลี้ยงโคต้องมีความใกล้ชิดกับโคเป็นประจำทุกวัน จึงมีความเสี่ยงที่จะถูกเหากัด และเหาโคอาจเป็นพาหะนำโรคที่ติดต่อกับสัตว์สูคนได้

2.6.1 *Bartonella* spp.

เป็นแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม *Alpha-proteobacteria* รูปร่างเป็นแท่ง ขนาดประมาณ 1-1.7 μm สามารถพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายประเภทรวมถึงคนด้วย นอกจากนี้ยังพบได้ในสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าหลายชนิด *Bartonella* spp. แต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะกับสัตว์ที่เป็น reservoir ที่แตกต่างกัน ซึ่งหลายสายพันธุ์สามารถติดต่อกับสัตว์สูคนได้ (Zoonosis) สัตว์ที่เป็น reservoir มักติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการหรือมีอาการป่วยเล็กน้อย แต่จะพบอาการรุนแรงมากขึ้นในสัตว์ที่เป็นโฮสต์สุดท้าย ซึ่งเมื่อรับเชื้อแล้วจะไม่สามารถแพร่เชื้อให้แก่สัตว์อื่น การติดต่อ *Bartonella* spp. ระหว่าง reservoir host กับ accidental host อาศัยพาหะจำพวกสัตว์ขาเป็นปล้อง (arthropod vector) เช่น หมัดหนู หมัดแมว หมัดกระต่าย โลน แมลงวันเหลืองในแกะ *Melophagus ovinus* (sheep ked) รวมทั้งรื่นฝอยทราย *Bartonella* spp. แต่ละชนิดทำให้เกิดโรคและอาการทางคลินิกแตกต่างกันไป เช่น เชื้อ *B. bacilliformis* ทำให้เกิดโรค oraya fever เชื้อ *B. quintana* เป็นสาเหตุของโรคไข้กลับ (trench fever) เชื้อ *B. hensalae* จะแสดงอาการของโรคไข้แมวข่วน cat-scratch disease (CSD) และเชื้อ *B. bovis* เป็นชนิดที่มีโคเป็น reservoir host

มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในโคจาก 5 ประเทศทั่วโลกโดยมีรายงานที่พบได้แก่ ไทย 10% จอร์เจีย 57% กัวเตมาลา 20.6% เคนยาและญี่ปุ่นไม่พบเชื้อและเชื้อ *Bartonella* spp. ที่ตรวจพบในโคมีรายงาน 3 สายพันธุ์ คือ *B. bovis*, *B. schoenbuchensis* และ *B. chomelii* แต่ส่วนใหญ่รายงานว่าพบสายพันธุ์ *B. bovis* และมีความชุกที่แตกต่างกันไปของแต่ละประเทศคือ สหรัฐอเมริกา 50-89% กายอานา 70% ฝรั่งเศส 36% อิตาลี 24% และแอฟริกาตะวันตก 20% ในการศึกษาจากประเทศโปแลนด์มีความชุกของ *B. bovis* ในโคที่ต่ำกว่าประเทศอื่นมาก คือ 6.8% เชื้อ

Bartonella spp. มักจะไม่ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกในโค แต่สายพันธุ์ *B. bovis* จะเกี่ยวข้องกับเชื้อบูหัวใจอักเสบในโค (11-21) และมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *Bartonella* spp. พบว่าเชืชนิดนี้มีสัตว์พาปล้องเป็นพาหะนำโรค เช่น หมัดหนู หมัดแมว หมัดกระต่าย โลน รวมถึงรึนฝอยทราย และมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในเหาที่เก็บมาจากหนูป่า และพบใน *Rhipicephalus microplus* คือเห็บที่เก็บได้จากวัวในประเทศไต้หวัน นอกจากนี้ยังมีแมลงที่เกี่ยวข้อง เช่น แมลงวันกัดสายพันธุ์ *Haematobia* spp. และ *Stomoxys* spp. จากโคในแคลิฟอร์เนีย และแมลง *Hippobosca equina* จากยุโรป ซึ่งเชื้อ *Bartonella* spp. แต่ละสายพันธุ์จะกระจายอยู่ในโฮสต์และพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่มีความจำเพาะ ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการถ่ายทอดเชื้อจากสัตว์สู่คนโดย เฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีปฏิสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างคนกับสัตว์ (21, 26, 28)

2.6.2 *Rickettsia* spp.

เป็นจุลินทรีย์หรือเชื้อโรคที่มีขนาดเล็กกว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ใหญ่กว่าเชื้อไวรัสมีสภาพกึ่งแบคทีเรียกึ่งไวรัส คือมีรูปร่างได้หลายอย่างคล้ายแบคทีเรียแต่ต้องอาศัยเจริญเติบโตในเซลล์ ที่มีชีวิตจะย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างกึ่งกลมกึ่งรี (coccobacillary forms) เชื้อ *Rickettsia* spp. สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ มักอาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นซึ่งเป็นพาหะของโรค เช่น เห็บเหา หมัด เป็นต้น (29-32) สามารถพบได้ทุกทวีปทั่วโลกและการแสดงออกของโรคที่แตกต่างกันไปตามการติดเชื้อ แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม spotted fever ได้แก่ โรค Rocky mountain spotted fever (RMSF), โรค Rickettsial pox และโรค Boutonneuse fever กลุ่ม typhus ได้แก่ โรค Louse-borne (epidemic) typhus, โรค Brill-Zinsser disease (เช่น relapsing louse-borne typhus) และ murine (endemic or flea-borne) typhus และกลุ่ม scrub typhus อาการที่สำคัญของคนติดเชื้อโรคชนิดนี้ คือ มีไข้สูง มีผื่นแดงตามตัว พบรอยแมลงกัดที่ผิวหนังเป็นแผลขอบยกสีแดง มีสะเก็ดสีดำตรงกลาง เรียกว่า eschar ซึ่งเชื้อ *Rickettsia* spp. อาศัยอยู่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ฟันแทะ เช่น หนูบ้าน หนูนา กระรอก (29-34) โรคติดเชื้อ *Rickettsia* spp. ที่มีรายงานในประเทศไทย ได้แก่ โรค scrub typhus, โรค murine typhus และ โรคในกลุ่ม spotted fever (48) หากไม่ได้รับการรักษาอาจมีอาการแทรกซ้อนรุนแรงถึงแก่ชีวิต อาทิ ภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต ตับวาย ไตวาย ปอดอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เนื่องจากเชื้อก่อพยาธิสภาพทำให้หลอดเลือดอักเสบ (Vasculitis) ได้ทั่วร่างกาย ทั้งนี้ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรค สภาพร่างกายของผู้ติดเชื้อและการรักษา (49)

Rickettsia spp. เป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด รวมถึงกลุ่มของไข้รากสาดใหญ่และโรคไข้พุง ซึ่งพบได้ในเขตภูมิศาสตร์ที่หลากหลาย โดยมีสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกัน ดังนี้

- โรคไข้รากสาดใหญ่ชนิดระบาด (*Rickettsia prowazekii*) — ทั่วโลก

- ไรค์ไข้รากสาดใหญ่จากหนู (*Rickettsia typhi*) — ทั่วโลก
- ไรค์ไข้พุงทองเทือกเขาร็อคกี้ (*Rickettsia rickettsii*) — ซีกโลกตะวันตก
- ไรค์ไข้เห็บกัดแอฟริกัน (*Rickettsia africae*) — แอฟริกาใต้
- ไรค์ไข้รากสาดใหญ่จากเห็บไซบีเรีย (*Rickettsia sibirica*) — ไซบีเรีย มองโกเลีย จีนตอนใต้
- ไรค์ไข้เมดิเตอร์เรเนียน (*Rickettsia conorii*) — ประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน แอฟริกา เอเชียตะวันตกเฉียงใต้ อินเดีย
- ไรค์ไข้รากสาดใหญ่จากเห็บออสเตรเลีย (*Rickettsia australis*) — ออสเตรเลีย
- ไรค์ไข้พุงทองจากหมัด (*Rickettsia felis*) — อเมริกาเหนือและใต้ ยุโรปตอนใต้ ออสเตรเลีย
- ไรค์ไข้พุงทองตะวันออก (*Rickettsia japonica*) — ญี่ปุ่น
- ไรค์โรคเก็ดเซียลพอกซ์ (*Rickettsia akari*) — สหรัฐอเมริกา รัสเซีย ยูเครน แอฟริกาใต้ เกาหลี และกลุ่มประเทศบอลข่าน

ในประเทศไทยเชื้อ *Rickettsia* spp. ก่อปัญหาโรคระบาดในทหารหลายครั้ง เกิดการสูญเสียกำลังพลมากเมื่อปี พ.ศ. 2545 มีรายงานการระบาดของโรคในกลุ่มกำลังพลทหารที่กลับจากการฝึกภาคสนาม ในพื้นที่ อ.บ่อทอง จ.ชลบุรี การสอบสวนโรคพบร่องรอยการติดเชื้อไรค์ไข้สครับไทฟัสในน้ำเหลืองของทหารที่เข้าฝึกภาคสนาม ร้อยละ 9.8 การสืบสวนวงจรการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับแมลงขาปล้องดูดเลือดที่เป็นพาหะนำโรค และสัตว์ฟันแทะที่จะมีบทบาทเป็นสัตว์รังโรค พบว่าในพื้นที่ฝึกภาคสนามดังกล่าวมีสัตว์ฟันแทะที่ติดเชื้อก่อไรค์ไข้ไรป่า ถึงร้อยละ 46.4 ซึ่งเป็นอัตราการติดเชื้อที่สูงและพบแมลงขาปล้องดูดเลือด คือ ตัวไรอ่อน (Chigger) สายพันธุ์ที่ศึกษาทราบแล้วว่าเป็นพาหะนำโรคการสำรวจของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (สวพท.) ในปี 2547-2550 พบเชื้อก่อโรค *Rickettsia* spp. หลายสายพันธุ์ที่แพร่ระบาดในพื้นที่ปฏิบัติการทางทหารตามแนวชายแดนหลายแห่งในประเทศไทย ได้แก่ พื้นที่ชายแดนไทย-เมียนมาร์ ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ตาก กาญจนบุรี เพชรบุรี ชุมพร และพื้นที่ชายแดนไทยกัมพูชา ในเขตจังหวัดสุรินทร์ ศรีสะเกษ และปราจีนบุรี รวมไปถึงพื้นที่อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ซึ่งเป็นพื้นที่ป่าติดต่อกับชายแดนไทยกัมพูชาตอนเหนือ (33, 34) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Rickettsia* spp. ในเหาโคสายพันธุ์ *H. eurytenuis* และ *L. vituli* รวมไปถึงในเหาแพะสายพันธุ์ *L. stenopsis* จากประเทศฮังการี (36)

2.6.3 *Acinetobacter* spp.

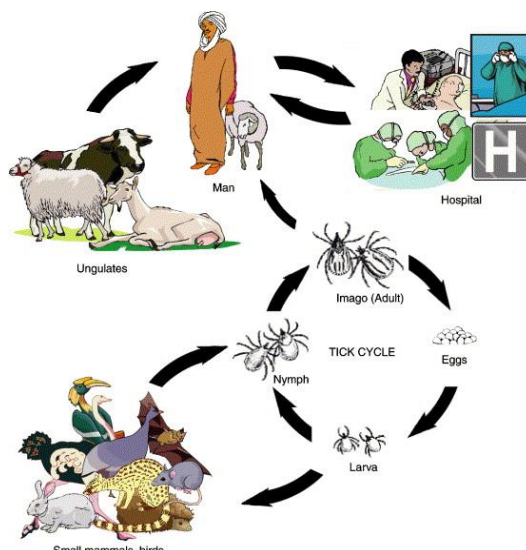
เชื้อ *Acinetobacter* spp. จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างทรงแท่ง ที่มีความสำคัญมากขึ้นในฐานะที่เป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อยขึ้นและมักเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด *Acinetobacter* spp. เป็นสาเหตุของโรคปอดบวม (pneumonia) ชนิด ventilator-

associated ที่พบบ่อยที่สุดในหอผู้ป่วยหนัก (Intensive Care Unit, ICU; Intermediate Care Unit) ของโรงพยาบาล (50) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อนี้มากขึ้นในหลาย ๆ ประเทศ โดยส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาล แม้ว่าจะมีรายงานการติดเชื้อ *Acinetobacter* จากชุมชน แต่ก็ไม่มากนักเมื่อเทียบกับการติดเชื้อในโรงพยาบาล ความสำคัญของ *Acinetobacter* spp. คือ เชื้อเหล่านี้มักจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะพร้อม ๆ กันหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการดื้อต่อยาในกลุ่ม Carbapenems โดยเชื้อที่ดื้อต่อ Carbapenems มักจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดในเวลาเดียวกัน ทำให้มีความยากลำบากในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาภาวะติดเชื้อ *Acinetobacter* spp. ซึ่งเชื้อ *Acinetobacter Baumannii* เป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุด โดยพบมากถึง 80% ของการติดเชื้อ *Acinetobacter* ทั้งหมดในสหรัฐอเมริกา อ้างอิงจากศูนย์ป้องกันและควบคุมโรค (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) (51)

ความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *Acinetobacter* spp. ซึ่ง CDC ได้กล่าวว่าคนที่มีสุขภาพแข็งแรงมีความเสี่ยงในการติดเชื้อชนิดนี้ต่ำมาก ปัจจัยดังต่อไปนี้จะเพิ่มความเสี่ยงในการติดเชื้อสายพันธุ์นี้มากขึ้น ได้แก่ มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอ, เป็นโรคปอดเรื้อรัง, เป็นเบาหวาน, นอนโรงพยาบาลนาน ๆ, มีความเจ็บป่วยที่ต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ, มีแผลเปิดที่ต้องรักษาในโรงพยาบาล และต้องได้รับการรักษาที่ต้องใช้เครื่องมือทางการแพทย์ เช่น สายสวนปัสสาวะ ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้ติดต่อกันโดยการสัมผัสเชื้อผ่านพื้นผิวสิ่งของ หรือผิวหนังของผู้ป่วยที่ปนเปื้อนเชื้อ *Acinetobacter Baumannii*

อาการของการติดเชื้อ *Acinetobacter* spp. เชื้อนี้เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สามารถทำให้เกิดโรคได้หลายโรคและหลายอาการ โดยโรคที่สามารถเกิดขึ้นจากการติดเชื้อชนิดนี้ประกอบด้วย ปอดอักเสบ, การติดเชื้อในกระแสเลือด, เยื่อหุ้มสมองอักเสบ, การติดเชื้อที่แผลหรือแผลผ่าตัด การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ซึ่งรวมถึงการติดเชื้อแบคทีเรียชั้นรุนแรงที่เรียกว่า necrotizing fasciitis การรักษาการติดเชื้อ *Acinetobacter Baumannii* และเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยา CDC ได้กล่าวว่าเชื้อกลุ่ม *Acinetobacter* ซึ่งรวมถึงเชื้อ *Acinetobacter Baumannii* เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่รุนแรงเนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้มักมีการดื้อยาหลายตัว โดยพบว่าเชื้อกลุ่ม *Acinetobacter* ถึง 63% เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด มีรายงานในวารสาร Clinical Microbiology Reviews ได้กล่าวว่า ในช่วงก่อนยุคปี 1970 เชื้อกลุ่มนี้สามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น กลุ่ม aminoglycosides, beta-lactams และ tetracyclines แต่ในปัจจุบัน เชื้อ *Acinetobacter Baumannii* บางสายพันธุ์เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในลำดับแรก ๆ และกลุ่ม carbapenems ที่มักใช้เป็นลำดับสุดท้าย การรักษาการติดเชื้อ *Acinetobacter Baumannii* จึงมักต้องใช้ในการทดสอบการดื้อยาของเชื้อที่ดูว่ายาดัวยังสามารถรักษาการติดเชื้อดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในผู้ป่วยบางรายยาในกลุ่ม sulbactam และ polymyxin ยังคงสามารถใช้รักษาการติดเชื้อ *Acinetobacter Baumannii* ที่มีการดื้อยาตัวอื่น ๆ ได้ (52)

2.7 การติดเชื้อแบคทีเรียที่มีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะและการก่อโรคในมนุษย์



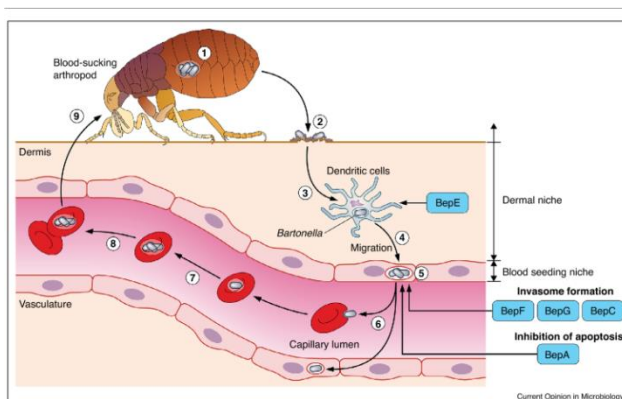
รูปที่ 7 วงจรการติดต่อแพร่เชื้อโรคจากเห็บ

ที่มา: <https://kathleenhalme.com/explore/fever-clipart-non-infectious-disease/>

โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonosis) คือโรคของสัตว์ที่สามารถติดต่อมายังคนได้ ซึ่งรวมถึง สัตว์เลี้ยง สัตว์บ้าน และสัตว์ป่า เช่น นก หมู สุนัข แมว โคกระบือ เป็นต้น อาจมีสัตว์ที่เป็นพาหะนำโรคหรือติดจากการสัมผัสสารคัดหลั่ง การสัมผัสบาดแผล หรือจากการรับประทานเนื้อสัตว์ที่ติดโรค โดยเฉพาะติดเชื้อโรคจากสัตว์เลี้ยงที่มีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะ เช่น เห็บ หมัด เหา และผู้เลี้ยงต้องมีความใกล้ชิดกับสัตว์เลี้ยงเป็นประจำ ย่อมมีความเสี่ยงสูงที่จะถูกแมลงที่เป็นพาหะกัดมีอาการคัน และเกาทำให้เกิดบาดแผล อาจทำให้ได้รับเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายได้

2.7.1 การติดเชื้อ *Bartonella* spp. และการก่อโรค

Bartonellosis เป็นกลุ่มโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรีย *Bartonella* spp. ประกอบด้วยแบคทีเรียอย่างน้อย 22 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะติดต่อโดยมีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะ ได้แก่ หมัด เหา และริ้นฝอยทรายเชื้อ *Bartonella* spp. สามารถติดได้ในทั้งในสัตว์เลี้ยงในประเทศและสัตว์ป่าโดยพาหะเหล่านี้ มีกลุ่มเชื้อ *Bartonella* spp. อย่างน้อย 14 ชนิดที่คนมีส่วนเกี่ยวข้องในโรคที่สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ (zoonotic disease) โรคเหล่านี้จะติดไปยังคนได้จากสัตว์เลี้ยงที่มีความใกล้ชิดกับคน ซึ่งมีแมลงดูดเลือดที่เป็นพาหะอาศัยอยู่ โดยปกติจะมีร่องรอยการถูกกัดจากแมลงหรือติดเชื้อทางบาดแผลบริเวณผิวหนัง (53)



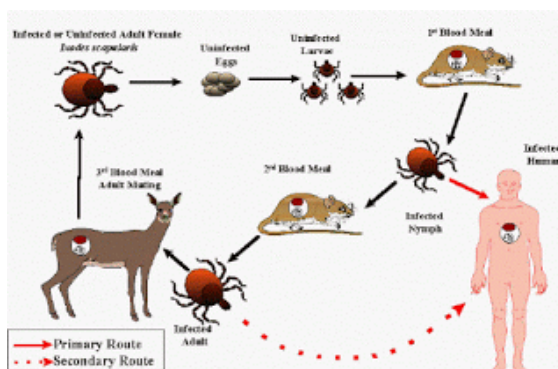
รูปที่ 8 วงจรการติดเชื้อ *Bartonella* spp.

ที่มา: Siemer S, Dehio C. New insights into the role of Bartonella effector proteins in pathogenesis. Current opinion in microbiology. 2015;23:80-5.

วงจรการติดเชื้อที่พบโดยทั่วไปของเชื้อ *Bartonella* spp. จากรูปที่ 8 แสดงให้เห็นถึงการติดเชื้อใน reservoir host กับเชื้อ *Bartonella* spp. ซึ่งจะถูกส่งต่อโดยแมลงดูดเลือดที่เป็นพาหะ เชื้อที่อยู่ในผนังลำไส้ของแมลงจะถูกขับออกมาพร้อมกับมูลของแมลง จากนั้นเชื้อจะเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านทางบาดแผลบริเวณผิวหนัง โดยจะเข้าไปที่ผิวหนังชั้น dermis และเคลื่อนย้ายไปที่ผนังหลอดเลือด และถูกขนส่งไปยังเยื่อภายในของหลอดเลือดฝอย โดยที่เชื้อแบคทีเรียจะยังคงอยู่ภายในเซลล์เตรียมเข้าสู่กระแสเลือด จากนั้นเชื้อจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงและมีการเพิ่มจำนวนแบบจำกัดอยู่ภายในเม็ดเลือดแดง ซึ่งเชื้อจะยังคงอยู่ภายในหลอดเลือดจนกว่าจะถูกส่งออกไปโดยแมลงดูดเลือดที่เป็นพาหะ (54)

โรคที่เกิดจากเชื้อ *Bartonella* spp. ได้แก่ เชื้อ *B. bacilliformis* ทำให้เกิดโรค oraya fever เชื้อ *B. quintana* เป็นสาเหตุของโรคไขก้น (trench fever) และเชื้อ *B. hensalae* จะแสดงอาการของ cat-scratch disease (CSD) โรคไข้แมวข่วน นอกจากนี้เชื้อ *Bartonella* spp. ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคผิวหนัง ความผิดปกติของหลอดเลือดฝอยในตับ (peliosis hepatis) เยื่อหัวใจอักเสบ (endocarditis) จอประสาทตาอักเสบ (neuroretinitis) ภาวะที่มีแบคทีเรียในกระแสเลือด (bacteremia) และมีความผิดปกติของสมอง (encephalopathy) การศึกษาจำนวนมากได้มีการตรวจสุขภาพทางคลินิกในคนพบว่ามีการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาเป็นบวกต่อเชื้อนี้ สำหรับการติดเชื้อที่ไม่รุนแรงมักมีแนวโน้มที่จะหายเองได้โดยไม่มีการรักษา (self-limiting) ส่วนในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV/AIDS มักมีแนวโน้มที่จะเป็นโรคร้ายแรงและอันตรายถึงชีวิต (55)

2.7.2 การติดเชื้อ *Rickettsia* spp. และการก่อโรค



รูปที่ 9 วงจรการติดต่อแพร่เชื้อ *Rickettsia* spp.

ที่มา: <https://ntangakeneth.blogspot.com/2017/05/rickettsiae.html>

วงจรในธรรมชาติของเชื้อ *Rickettsia* spp. จะอาศัยอยู่ภายในเซลล์ของแมลงดูดเลือด เช่น หมัด เห็บ เหา โลน ไร ซึ่งถือว่าเป็นทั้ง reservoir และ vector โฮสต์ตามธรรมชาติของแมลงดูดเลือด พบได้ในสัตว์ทั่วไป เมื่อถูกแมลงมากัดดูดกินเลือดเชื้อที่อยู่ในน้ำลายหรือในมูลจะเข้าสู่ร่างกายผ่านทางผิวหนัง และเชื้อชนิดนี้มีการถ่ายทอดเชื้อจากรุ่นแม่ไปสู่รุ่นลูกผ่านทางไข่ (transovarian transmission) โดยส่วนใหญ่คนจะเป็นโฮสต์โดยบังเอิญ (accidental host) จะสามารถติดเชื้อได้เมื่อถูกแมลงดูดเลือดที่เป็นพาหะกัดเมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะเข้าไปที่เยื่อบุผนังเส้นเลือดฝอย แล้วมีการแบ่งตัวอย่างช้า ๆ ในไซโทพลาซึมประมาณ 8-12 ชั่วโมง หากเชื้อเจริญเติบโตได้ดีจะทำลายเซลล์และระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เช่น ทำลายผนังเส้นเลือดฝอยในทุกอวัยวะ เกิดของเหลวคั่งในสมอง ก่อให้เกิดอาการสมองอักเสบ หรือเนื้องอกที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันทำลายเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น

อาการที่สำคัญของคนติดเชื้อโรคลุ่มนี้ คือ มีไข้สูง หนาวสั่น เหงื่อออก คลื่นไส้ อาเจียน ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ มีผื่นนูนแดงตามลำตัวแขนขาร้อยละ 30 พบรอยแมลงดูดเลือดกัดที่ผิวหนังเป็นแผลขอบยกสีแดงมีสะเก็ดสีดำตรงกลาง เรียกว่า eschar หากติดเชื้อไม่รุนแรงสามารถรักษาให้หายขาดได้ด้วยยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลิน เชื้อบางชนิดหากไม่ได้รับการรักษาอาจมีอาการแทรกซ้อนรุนแรงถึงแก่ชีวิต เช่น ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ตับวาย ไตวาย ปอดอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เนื่องจากเชื้อก่อพยาธิสภาพทำให้หลอดเลือดอักเสบ (Vasculitis) ได้ทั่วร่างกาย (55, 56)

2.7.3 การติดเชื้อ *Acinetobacter* spp. และการก่อโรค

เชื้อ *Acinetobacter* spp. จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสำคัญมาก พบได้ตามดินและแหล่งน้ำตามธรรมชาติ มักอยู่ในสถานพยาบาลเป็นเชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic pathogen) และก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) มักเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *Acinetobacter* spp. มีปัจจัยดังต่อไปนี้ ได้แก่ ภูมิคุ้มกันอ่อนแอ, เป็นโรค

ปอดเรื้อรัง, เป็นเบาหวาน, นอนโรงพยาบาลนาน ๆ, มีความเจ็บป่วยที่ต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ, มีแผลเปิดที่ต้องรักษาในโรงพยาบาล และต้องได้รับการรักษาที่ต้องใช้เครื่องมือทางการแพทย์ เช่น สายสวนปัสสาวะ ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้ติดต่อโดยการสัมผัสเชื้อผ่านพื้นผิวสิ่งของ หรือผิวหนังของผู้ป่วยที่ปนเปื้อนเชื้อ *Acinetobacter Baumannii* มีรายงานการตรวจพบเชื้อชนิดนี้ในหาศรีษะที่เก็บจากเด็กนักเรียนในโรงเรียนต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย (45) และมีการตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในหาโคสายพันธุ์ *L. vituli* และ *S. capillatus* จากประเทศเอธิโอเปีย (37) ซึ่งหาโคอาจมีบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งกักเก็บโรคและอาจพัฒนาต่อไปเป็นพาหะนำเชื้อโรคจากสัตว์มาสู่คนได้

2.8 การศึกษาทางอณูชีววิทยาของหาโค

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สามารถใช้ศึกษาได้ทั้งส่วนที่เป็นยีน (coding sequence) และส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non-coding sequence) และสามารถใช้ในการศึกษาการจัดเรียงดีเอ็นเอรวมไปถึงการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ซึ่งในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับอณูชีววิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของหาโคในต่างประเทศเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาเชิงวิวัฒนาการเปรียบเทียบความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์หาโคในพื้นที่ต่าง ๆ ซึ่งหาโคในแต่ละพื้นที่อาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน โดยมีการศึกษาจากยีนในนิวเคลียส คือ ยีน 18S ribosomal RNA และยีนในไมโทคอนเดรีย คือ ยีน Cytochrome C oxidase subunit I (COI) (28-37) ในขณะที่ประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของหาโคที่สามารถใช้อ้างอิงได้

การศึกษาเกี่ยวกับอณูชีววิทยาของหาโคศึกษาบนตำแหน่งยีน 18S rRNA ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากยีนในกลุ่มของ ribosomal DNA จัดอยู่ในกลุ่มที่อยู่ในตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม โดยยีนมีลักษณะเป็นครอบครัว (gene family) จำนวนมากและเป็นยีนที่มีจำนวนชุดซ้ำสูงมาก เรียงซ้ำต่อกันอยู่ในทิศทางเดียวกันตลอด (tandem repeat) เนื่องจากมีความต้องการผลผลิตจากยีนดังกล่าวในปริมาณสูงมาก ซึ่ง ribosomal RNA (rRNA) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน ยีน rRNA ส่วนใหญ่อยู่บนตำแหน่ง nuclear organizer region (NOR) บนโครโมโซมที่จำเพาะและมีปริมาณหลายร้อยถึงหลายพันชุด แต่ละชุดประกอบด้วย ยีนที่ถอดรหัสเป็น 18s, 5.8s และ 28s rRNA จะยังคงเป็นชุดเดิมตลอด นอกจากนี้ยังพบว่ายีนกลุ่ม rRNA เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved genes) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงทั้งในลำดับเบสและความยาวเบสเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน โดยมีความนิยมนำมาใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและการจำแนกสิ่งมีชีวิต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ยีน 18S rRNA ในการศึกษาด้านอณูชีววิทยาของหาโคและใช้จำแนกชนิดของหาโค

2.9 การศึกษาทางอณูชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ตารางที่ 1 แสดงการศึกษาทางอณูชีววิทยาของเชื้อ *Bartonella* spp.

ยีน	ชนิดของเชื้อ	ตัวอย่าง	Author (ref.)
<i>gltA</i> (Citrate synthase)	<i>B. bovis</i>	เลือดโค	Dahmani et al. (2016)
		เห็บโค (<i>Haemaphysalis</i> <i>bispinosa</i>)	Kho et al. (2015)
	<i>B. schoenbuchensis</i>	เลือดโค	Dahmani et al. (2016)
	<i>B. henselae</i>	เลือดโค	Gutierrez et al. (2014)
	Uncultured <i>Bartonella</i> sp.	เห็บโค (<i>H. quadripertusus</i>)	Gutierrez et al. (2014)
	<i>B. chomelii</i>	เลือดโค	Bai et al. (2013)
<i>rpoB</i> (Beta subunit of RNA polymerase)	<i>B. bovis</i>	เลือดโค	Dahmani et al. (2016)
	Uncultured <i>Bartonella</i> sp.	เห็บโค (<i>H. quadripertusus</i>)	Gutierrez et al. (2014)
<i>ITS</i> (Internal transcribed spacer)	<i>B. bovis</i>	เลือดโค	Dahmani et al. (2016)
	<i>B. chomelii</i>		
<i>ftsZ</i> (Filamenting temperature- sensitive mutant Z)	<i>Bartonella</i> spp.	เลือดโค	Dahmani et al. (2016)
	<i>B. bovis</i>		
<i>16srRNA</i> (16s ribosomal RNA)	<i>B. bovis</i>	เลือดโค	Dahmani et al. (2016)
	<i>B. schoenbuchensis</i>		

ตารางที่ 2 แสดงการศึกษาทางอณูชีววิทยาของเชื้อ *Rickettsia* spp.

ยีน	ชนิดของเชื้อ	ตัวอย่าง	Author (ref.)
<i>gltA</i> (Citrate synthase)	<i>Rickettsia</i> spp.	เหาโค (<i>H. eurytenuis</i>)	Hornok et al. (2010)
	<i>R. felis</i>	หมัดแมว	Hornok et al. (2018)
23s rRNA (23s ribosomal RNA)	<i>R. helvetica</i>	เหาโค (<i>Linognathus vituli</i>)	Hornok et al. (2010)
<i>ompA</i> (Outer membrane protein A)	<i>R. felis</i>	หมัดแมว	Hornok et al. (2018)

จากข้อมูลที่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Bartonella* spp. *Rickettsia* spp. และ *Acinetobacter* spp. ในโคและปรสิตภายนอกของโค ทำให้สนใจศึกษาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาโคที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย โดยอาศัยเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาในการตรวจเชื้อแบคทีเรียจะศึกษาที่ตำแหน่งยีน *gltA* และ *rpoB* ของเชื้อต่าง ๆ เนื่องจากเป็นยีนที่ใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียในหลายงานวิจัย ซึ่งใช้จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้ดีและสามารถตรวจพบเชื้อได้หลากหลายสายพันธุ์และจากนั้นจะทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยแผนภูมิวิวัฒนาการเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในงานวิจัยอื่นต่อไป

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive study) ซึ่งได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมในสัตว์และได้รับการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ จากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ใบรับรอง 005/2562

3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย

การทำวิจัยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างเหาโคในทุกระยะ คือ ระยะไข่ ตัวกลางวัย และตัวเต็มวัย จากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่, เชียงราย และนครราชสีมา

3.2.1 การคำนวณขนาดประชากร

ขนาดตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาความผันแปรของยีน *18S rRNA* ในเหาโคและการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค ได้อาศัยข้อมูลจากการศึกษาเกี่ยวกับเหาโคและความชุกของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในโคจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งเท่ากับ 10% ขนาดของประชากรตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในครั้งนี้คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

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

$$n = 34.95$$

โดยจะเก็บตัวอย่างเหาโคอย่างน้อย 35 ตัวอย่าง

ซึ่งในการศึกษานี้เก็บตัวอย่างเหาโคทั้งหมด 109 ตัวอย่าง จึงทำให้ผลการวิจัยมีความน่าเชื่อถือ

n = ขนาดตัวอย่าง

α = ค่าความผิดพลาดในการสรุปผลอ้างอิงจากตัวอย่างสู่ประชากร

Z = confidence coefficient ได้จากระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด ($1-\alpha$)

กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% หรือ $\alpha = 0.05$ ($Z\alpha / 2 = 1.96$)

P = ค่าสัดส่วนจากการศึกษาที่ผ่านมา

e = ค่าความคลาดเคลื่อนสูงสุดที่ยอมรับได้ระหว่างสัดส่วนในประชากร

กำหนดให้ $e = 0.1$ (ยอมรับให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ 10 %)

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเก็บตัวอย่างเหาโค

3.3.1.1 ติดต่อฟาร์มโคและเจ้าของโคเพื่อขอความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างเหาโค จากนั้นส่งหนังสือยินยอมให้กับเจ้าของโค หลังจากได้รับอนุญาตแล้วจึงแจกเอกสารที่อธิบายเกี่ยวกับวิธีการเก็บตัวอย่างและแบบฟอร์มการกรอกข้อมูล การเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บพื้นที่ 3 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย, เชียงใหม่ และนครราชสีมา

3.3.1.2 การเก็บตัวอย่างเหาโคเจ้าของโคจะช่วยทำการสำรวจดูบริเวณพุงหาง คอ ไหล่ และบริเวณใบหน้าของโคว่ามีตัวเหาหรือมีไข่เหาอยู่บนเส้นขนหรือไม่ จากนั้นเมื่อพบตัวเหาจะใช้ forceps คีบตัวเหาออกมา โดยจะเก็บทั้งระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย แยกใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml โดย 1 หลอด จะใส่เหาจากโค 1 ตัวในกรณีที่เป็นไข่เหาที่ติดอยู่กับเส้นขนจะใช้กรรไกรตัดเส้นขนที่มีไข่เหาติดอยู่ใส่ microcentrifuge เช่นกัน จากนั้นบันทึกข้อมูลจำนวนเหาโคและจำนวนไข่ที่เก็บได้จากพื้นที่นั้น ๆ

3.3.1.3 เก็บตัวอย่างเหาโคใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีสารละลาย 70% ethanol เพื่อรักษาสภาพของเหาโคก่อนนำส่งห้องปฏิบัติการหน่วยกีฏวิทยา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 การจำแนกทางสัณฐานวิทยาของเหาโค

นำตัวอย่างเหาโคที่เก็บได้ในระยะที่เป็นตัวเหามาถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนำไปศึกษาเปรียบเทียบกับหนังสือคู่มือการจำแนกชนิดของเหา (57, 58)

3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ตัวอย่างเหาโคที่เก็บใน 70% ethanol ต้องนำมาแยกใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 1 ตัว ในกรณีที่เป็นไข่เหาให้เลือกไข่ที่ตัวอ่อนยังไม่ฟักโดยแบ่งใส่หลอด จากนั้นเติมสาร 1X PBS (phosphate-buffered saline) เพื่อล้างเอา 70% ethanol ออก

3.3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอเหาโคโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปจาก Invisorb® Spin Tissue Mini kit (Invitek GmbH, ประเทศเยอรมนี)

1. หลังจากล้าง 70% ethanol ออกแล้ว เติม Lysis buffer G ปริมาตร 200 µl จากนั้นใช้ไม้บดตัวอย่างเหาจนละเอียด แล้วเติม Lysis buffer G อีก 200 µl และ proteinase K ปริมาตร 20 µl นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 52°C ประมาณ 3-4 ชั่วโมง

2. เมื่อครบเวลานำมาปั่นแยกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ย้ายส่วนใส (supernatant) ใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่ จากนั้นใส่สารละลาย Binding buffer A ปริมาตร 200 µl (ผสมให้เข้ากันเบา ๆ)

3. ย้ายใส่ในหลอดที่มีชุดตัวกรอง (spin filter) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที จากนั้นปั่นตกด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสที่ปั่นตกทิ้ง
4. ใส่สารละลาย Wash buffer ปริมาตร 550 μ l แล้วปั่นล้างด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสที่ปั่นตกทิ้ง
5. ปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อเอา Ethanol ออก
6. ย้ายชุดตัวกรองไปใส่ในหลอด microcentrifuge จากนั้นใส่ elution buffer ปริมาตร 40 μ l (ทำการ prewarm elution buffer ที่อุณหภูมิ 52°C ก่อนนำมาใช้) บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm 2 นาที นำชุดตัวกรองทิ้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างสารละลาย ดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำดีเอ็นเอไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.3.4 การออกแบบ Primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน 18S ribosomal RNA (18S rRNA)

การศึกษา ยีน 18S rRNA ของเหาโคโดยออกแบบ primer แบบ Degenerate primer โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) เลือก ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเหาโคแต่ละสายพันธุ์ คือ *H. quadripertusus* Accession number KJ522491.1 *Linognathus vituli* Accession number AY077774.1 *H. tuberculatus* Accession number GU569180.1 *H. eurysterunus* Accession number HM171381.1 จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.2.6 ทำการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ แต่ละเส้นจากนั้นหาบริเวณที่มีความเหมือนกันมากที่สุดสร้างเป็น forward และ reverse primer ขนาดประมาณ 18-30 เบส ทำการคำนวณหา Tm (Melting temperature) จากเส้น primer โดยใช้สูตร $Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$ ซึ่งค่า Tm ทั้ง 2 เส้นควรอยู่ระหว่าง 55-65 °C และค่าไม่ควร ต่างกันเกิน 5°C จากนั้นใช้โปรแกรม Oligocal เพื่อตรวจหา self-complementary และการเกิด Hairpin ทำการตรวจความจำเพาะของเส้น primer ที่ออกแบบกับโปรแกรม primer-blast เพื่อทดสอบว่ามีความจำเพาะในการจับกับยีน 18S rRNA ของเหาโคได้หรือไม่ และมีขนาดยีนเท่าไร เมื่อได้ลำดับเบสแล้วจึงทำการส่งลำดับเบสของ primer ไปที่บริษัท Bioneer Corporation ประเทศเกาหลี โดยมีบริษัท Prime Scientific จำกัด เป็นตัวแทนจัดส่ง เพื่อทำการสังเคราะห์ primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนในขั้นตอน PCR ต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน *18S rRNA*

Primer	Sequences (5'-3')
18s-F	CCGCGAAAGGCTCATTAAATCAG
18s-R	CCTKCAATGGATACTCGTTAAATG

หมายเหตุ: K แทนเบส G/T

3.3.5 การเพิ่มยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.3.5.1 การตรวจจำแนกชนิดเหาโค

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *18S rRNA* โดยอาศัยหลักการทำงานร่วมกับ primer ที่จำเพาะต่อบริเวณ *18S rRNA* การใช้สารละลายในสัดส่วนที่เหมาะสมและปฏิกิริยาของวิธี PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วนำไปตรวจสอบดู PCR Product โดยวิธี gel electrophoresis

ตารางที่ 4 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *18S rRNA*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ(cycle)
1. Initial denaturation	95	3	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	1	35
- Annealing	58	1	
- Extension	72	1.30	
3. Final extension	72	7	1

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *18S rRNA*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	2.5
2.5 mM dNTPs	2
10 μM Primer 18s-F	0.4
10 μM Primer 18s-R	0.4
Taq polymerase (5U/μl)	0.2
DNA template	2
ddH ₂ O	15
รวม	25

3.3.6 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาโค

3.3.6.1 การตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. ในเหาโค (ยีน *gltA*)

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธีข้างต้น โดยทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์ยีน *gltA* ซึ่งเป็น Housekeeping gene ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะ (Norman et al.,1995)

ตารางที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน *gltA*

Primer	Sequences (5'-3')
BhCS(<i>gltA</i>)781-F	GGGGACCAGCTCATGGTGG
BhCS(<i>gltA</i>)1137-R	AATGCAAAAAGAACAGTAAACA

ตารางที่ 7 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *gltA*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ(cycle)
1.Initial denaturation	95	3	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	30 วินาที	} 35
- Annealing	57	30 วินาที	
- Extension	72	1	
3. Final extension	72	7	1

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *gltA*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	2.5
2.5 mM dNTPs	2
10 μM Primer BhCS(<i>gltA</i>)781-F	0.5
10 μM Primer BhCS(<i>gltA</i>)1137-R	0.5
Taq polymerase (5U/μl)	0.2
DNA template	5
ddH ₂ O	11.8
รวม	25

3.3.6.2 การตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. ในเหาโค (ยีน *rpoB*)

การตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. ในตัวอย่างเหาโคซ้ำอีกครั้ง เพื่อเป็นการยืนยันผลการวิจัยให้ถูกต้อง โดยทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์ยีน *rpoB* ซึ่งเป็น Housekeeping gene ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะ (Yvonne et al., 2019)

ตารางที่ 9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน *rpoB*

Primer	Sequences (5'-3')
Barto- <i>rpoBF</i>	GATGTGCATCCTACGCATTATGG
Barto- <i>rpoBR</i>	AATGGTGCCTCAGCACGTATAAG

ตารางที่ 10 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *rpoB*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ(cycle)
1. Initial denaturation	95	3	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	30 วินาที	} 35
- Annealing	55	30 วินาที	
- Extension	72	1	
3. Final extension	72	7	1

ตารางที่ 11 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *rpoB*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	2.5
2.5 mM dNTPs	2
10 µM Primer Barto- <i>rpoBF</i>	0.5
10 µM Primer Barto- <i>rpoBR</i>	0.5
Taq polymerase (5U/µl)	0.2
DNA template	5
ddH ₂ O	11.8
รวม	25

3.3.6.3 การตรวจหาเชื้อ *Rickettsia* spp. ในเหาโค

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ดีเอ็นเอโดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์ ยีน *gltA* ซึ่งเป็น Housekeeping gene ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะ (Rolain et al.,2002)

ตารางที่ 12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน *gltA*

Primer	Sequences (5'-3')
CS877F	GGGGCCTGCTCACGGCGG
CS1258R	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA

ตารางที่ 13 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *gltA*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ(cycle)
1.Initial denaturation	95	2	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	15 วินาที	} 40
- Annealing	54	8 วินาที	
- Extension	72	15 วินาที	
3. Final extension	72	7	1

ตารางที่ 14 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *gltA*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	2.5
2.5 mM dNTPs	2
10 μM Primer CS877F	0.5
10μM Primer CS1258R	0.5
Taq polymerase (5U/μl)	0.2
DNA template	5
ddH ₂ O	11.8
รวม	25

3.3.6.4 การตรวจหาเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในเหาโค (ยีน *rpoB*)

การตรวจหาเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างเหาโค โดยทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์ยีน *rpoB* ซึ่งเป็น Housekeeping gene ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะ (Kempf et al., 2012)

ตารางที่ 15 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน *rpoB*

Primer	Sequences (5'-3')
<i>rpoB</i> -F	TACTCATATACCGAAAAGAAACGG
<i>rpoB</i> -R	GGYTTACCAAGRCTATACAC

ตารางที่ 16 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *rpoB*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ(cycle)
1. Initial denaturation	95	3	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	30 วินาที	} 35
- Annealing	62	30 วินาที	
- Extension	72	1	
3. Final extension	72	7	1

ตารางที่ 17 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *rpoB*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	2.5
2.5 mM dNTPs	2
10 μM Primer <i>rpoB</i> -F	0.5
10 μM Primer <i>rpoB</i> -R	0.5
Taq polymerase (5U/μl)	0.2
DNA template	5
ddH ₂ O	11.8
รวม	25

3.3.7 การตรวจสอบ PCR product โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

เตรียมแผ่นเจลสำหรับใช้ในการรันดีเอ็นเอโดยใช้วุ้น Agarose ความเข้มข้น 1.5% จากนั้นนำ PCR product ที่ผสมกับ loading buffer หยอดลงในช่องวุ้นจนครบทุกตัวอย่างหลังจากนั้นจึงใส่ negative control, positive control และ DNA marker ลงในช่องวุ้นที่เหลือตามลำดับ รันเจลด้วยไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 30-40 นาที หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำประมาณ 20 นาที และนำเจลที่ได้เข้าเครื่องถ่ายภาพเจลด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (gel documentation)

3.3.8 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA ligation)

เป็นการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ เมื่อเพิ่มจำนวนยีนที่เราสนใจด้วยวิธี PCR แล้ว นำยีนที่สนใจมาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ (vector) ชนิด plasmid เรียกว่า ขั้นตอน DNA ligation โดยใช้ pGEM[®]-T Easy (Promega[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา) เป็น vector ในขั้นตอนการทำ ligation ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อเตรียมสารผสมเรียบร้อยแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปทำต่อในขั้นตอนถัดไปทันที โดยส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาแสดงดัง ตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
2x Rapid ligation buffer	2.5
pGEM [®] T easy vector (50 ng/µl)	0.5
T4 ligase enzyme (5 U/µl)	0.5
PCR product (50 ng/µl)	1.5
รวม	5

3.3.9 การถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ competent cells ด้วยวิธี Heat shock (Transformation)

เป็นการนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell โดยวิธีกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) ในที่นี้ใช้เชื้อ *Escherichia coli* DH5 α เป็น competent cell โดยนำ competent cell ตั้งไว้ในน้ำแข็งเพื่อให้ละลายประมาณ 10 นาที เมื่อละลายแล้วค่อย ๆ ดูด competent cell ปริมาตร 30 µl ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมอยู่ แล้ววางในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเกาะที่ permeable site บริเวณผนังเซลล์ของ competent cell หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell โดยกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 50 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยการนำไปวางบนน้ำแข็ง 2 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปเติม SOC medium ปริมาตร 200 µl แล้วนำไปปั่นแบบเขย่าที่ความเร็ว 170 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายมา spread บนจานเพาะเชื้อ LB agar ที่มีส่วนผสมของ Ampicillin 100 µg/ml, Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) 40 µl และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) 40 µl จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.3.10 การคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนยีนโดยวิธี colony PCR

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ DNA เป้าหมาย เพื่อตรวจสอบโคโลนีที่เราเลือกว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เราสนใจแทรกอยู่หรือไม่ โดยทำการเลือกโคโลนีที่มีสีขาวในจานเลี้ยงเชื้อแต่ละตัวอย่าง โดยเลือกประมาณ 5-10 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่างมาตรวจสอบด้วยวิธี Colony PCR โดยเตรียมส่วนประกอบในขั้นตอน PCR ซึ่งสารที่ใช้ในปฏิกิริยาและสภาวะ PCR ที่เหมาะสมใช้เหมือนในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนยีนที่กล่าวแล้วข้างต้นจากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยโคโลนีที่เลือกไว้แล้วขีดลงบน plate ต้นแบบ (master plate) และใส่ในหลอด PCR ที่มี master mix ของ PCR อยู่ ผสมให้เข้ากันแล้ว

นำไปใส่เครื่องทำ PCR จากนั้นเมื่อทำ PCR เสร็จแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1.5 % เพื่อดูว่ามีชิ้นส่วนของยีนที่เราสนใจหรือไม่ ส่วน master plate นำไปบ่มที่ 37 °C เพื่อรอนำโคโลนีที่ให้ผลที่เป็น Positive จากวิธี colony PCR ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการเลี้ยงพลาสมิดจะเลี้ยงในหลอด 15 ml เริ่มจากใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 7 ml. และใส่ยา Ampicillin ปริมาตร 7 µl จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยโคโลนีที่ซิดไว้ใน master plate แล้วใส่ไม้จิ้มฟันลงในหลอดอาหารที่เตรียมไว้ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็ว 170 rpm เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

3.3.11 การสกัดพลาสมิด

ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของบริษัท Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (Invitek GmbH, ประเทศเยอรมนี)

1. นำเชื้อแบคทีเรีย (*E. coli* strain DH5 α) ที่เลี้ยงไว้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน ด้วยความเร็ว 11,000 rpm เวลาประมาณ 5 นาที เทส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง
2. ใส่สาร Solution A ปริมาตร 250 µl และนำไป Vortex เพื่อทำการละลายตะกอนให้เป็นอย่างดี
3. ใส่สาร Solution B ปริมาตร 250 µl ผสมด้วยปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆประมาณ 4-6 ครั้ง
4. ใส่สาร Solution C ปริมาตร 250 µl ผสมโดยใช้มือพลิกหลอดไปมาเบาๆ (invert) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. ย้ายส่วนใสใส่ลงในเซตตัวกรอง (Spin filter) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง
6. ทำการล้างตะกอนของ DNA Plasmid โดยใส่ Wash solution ปริมาตร 750 µl จากนั้นปั่นล้างตะกอนด้วยความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง
7. ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเอา ethanol ออก
8. ย้ายตัวกรองใส่ลงในหลอด elute จากนั้นใส่ elution solution ปริมาตร 40 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เมื่อครบเวลา ปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
9. นำ Plasmid DNA ไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) แบ่ง Plasmid DNA ปริมาตร 20 µl ส่งให้บริษัทเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

3.3.12 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Sequencing)

ในงานวิจัยนี้ได้รับการวิเคราะห์ข้อมูลจากบริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลี) โดยมีบริษัท เอ็นพี เคมีคอล ซัพพลาย จำกัด เป็นตัวแทนในการจัดส่งตัวอย่าง

3.3.13 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTN ซึ่งจะแสดงค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (percentage identities) จากนั้นหาเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecific divergence) และระหว่างสายพันธุ์ (interspecific divergence) ในแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7 โดยเลือก sequence identity matrix จะได้ค่า % identity แล้วนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความต่าง} = 100 - \text{เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์}$$

3.3.14 การสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรมออนไลน์ IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) ซึ่งกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ maximum-likelihood และใช้ bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ จากนั้นผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้จะเปิดโดยใช้โปรแกรม FigTree version 1.4.4 เพื่อดูและปรับรูปแบบของแผนภูมิตามที่ต้องการ และใช้ references sequences ที่เกี่ยวข้องกันแต่ละยีนมาทำการเปรียบเทียบ เพื่อให้ตัวอย่างแยกกลุ่มกันอย่างชัดเจน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 จำนวนตัวอย่างและพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างเหาโคที่ใช้ในการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเหาโคจำนวนทั้งหมด 109 ตัวอย่าง แบ่งเป็นระยะไข่จำนวน 11 ตัวอย่าง และระยะตัวเต็มวัยจำนวน 98 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างเหาโคจากพื้นที่ 3 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 99 ตัวอย่าง เชียงราย จำนวน 7 ตัวอย่าง และ นครราชสีมา จำนวน 3 ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงข้อมูลรหัสตัวอย่างและจำนวนเหาโคที่เก็บในพื้นที่ 3 จังหวัดจากประเทศไทย

จังหวัด	รหัสตัวอย่าง	ระยะ	จำนวน (n=109)
	HEE1-1, HEE1-2, HEE1-3, HEE1-4, HEE1-5, HEE1-6, HKE4-1, HKE4-2, HKE4-3, HKE4-4, HKE4-5	ไข่	11
เชียงใหม่	PS1-1, PS1-2, PS1-3, PS1-4, PS1-5, PS1-6, PS1-7, PS1-8, PS1-9, PS1-10, PS2-1, PS2-2, PS2-3, PS2-4, PS2-5, PS2-6, PS2-7, PS2-8, PS2-9, PS2-10, PS2-11, PS3-1, PS3-2, PS3-3, PS3-4, PS3-5, PS3-6, HE1-1, HE1-2, HE1-3, HE2-1, HE2-2, HE2-3, HE2-4, HE2-5, HE2-6, HE2-7, HE3-1, HE3-2, HE3-3, HE4-1, HE4-2, HE4-3, HE4-4, HE4-5, HE4-6, HK1-1, HK1-2, HK1-3, HK1-4, HK1-5, HK1-6, HK1-7, HK1-8, HK1-9, HK1-10, HK1-11, HK2-1, HK2-2, HK2-3, HK2-4, HK2-5, HK2-6, HK2-7, HK2-8, HK2-9, HK2-10, HK2-11, HK2-12, HK2-13, HK2-14, HK3-1, HK3-2, HK3-3, HK3-4, HK3-5, HK3-6, HK3-7, HK3-8, HK3-9, HK3-10, HK3-11, HK3-12, HK4-1, HK4-2, HK4-3, HK4-4, HK4-5	ตัวเต็มวัย	88
เชียงราย	CR1, CR2, CR3, CR4, CR5, CR6, CR7	ตัวเต็มวัย	7
นครราชสีมา	CL1, CL2, CL3	ตัวเต็มวัย	3

4.2 ผลการจำแนกชนิดของเหาโคจากสัณฐานวิทยาและการตรวจด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา

4.2.1 ผลการจำแนกชนิดของเหาโคโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา

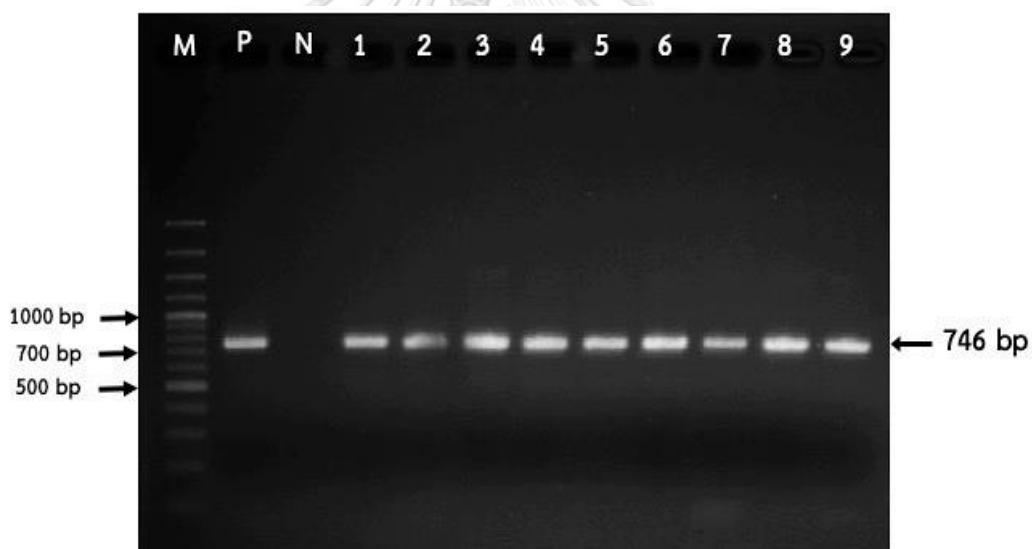
ตัวอย่างเหาโคจำนวนทั้งหมด 109 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งเป็น ระยะไข่จำนวน 11 ตัวอย่าง และระยะตัวเต็มวัยจำนวน 98 ตัวอย่าง โดยระยะไข่ของเหาโคนั้นไม่สามารถจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ ส่วนตัวอย่างระยะตัวเต็มวัยสามารถจำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยาได้ โดยพบว่าตัวอย่างเหาโคทั้งหมดจำนวน 98 ตัวอย่าง สามารถจำแนกเป็นสกุล (Genus) *Haematopinus* ซึ่งพบว่าลำตัวของเหาโคมีลักษณะแบนจากบนลงล่าง (dorsal-ventrally flattened) โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ส่วนหัวมีขนาด 2 เส้น ลักษณะปากเป็นแบบเจาะดูด (stylet-like mouthpart) ส่วนอกแบ่งเป็นปล้องไม่ชัดเจน นอกปล้องที่สอง (mesothorax) มีรูเปิดของระบบหายใจ (spiracle) หนึ่งคู่ ส่วนท้องแบ่งออกเป็น 7 ปล้อง แต่ละปล้องมีรูหายใจหนึ่งคู่เช่นกัน ยกเว้นปล้องสุดท้ายไม่มีรูหายใจ มีขาจำนวน 3 คู่ ที่มีขนาดเท่ากันทุกคู่ สำหรับขาของเหาจะยื่นออกจากปล้องอกแต่ละปล้อง ขามีขนาดค่อนข้างใหญ่ปลายขาของเหาโคมีเล็บที่โค้งแหลมจำนวน 1 เล็บ (claw) ต่อขา 1 ข้าง เพื่อใช้ในการยึดเกาะเส้นขนของโฮสต์ ลำตัวของเหาโคจะปกคลุมไปด้วยขน (seta) นอกจากนี้ด้านล่างของลำตัวเหาจะมีโครงสร้างแข็ง (sclerotized plate) ช่วยป้องกันอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (genitalia) ส่วนในเพศเมียมีโครงสร้างที่เรียกว่า gonopod



รูปที่ 10 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหาโคสกุล *Haematopinus* ที่พบในพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย

4.2.2 ผลการจำแนกชนิดของเหาโคโดยใช้เทคนิค PCR

การศึกษาจำแนกชนิดเหาโคด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างเหาโคจำนวนทั้งหมด 109 ตัวอย่าง ที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย โดยทำการสกัด DNA ของเหาโคโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งยีน *18S rRNA* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ Primer ที่ออกแบบขึ้นมาอย่างจำเพาะต่อชนิดของเหาโค คือ Forward Primer คือ 18s-F 5'CCGCGAAAGGCTCATTAAATCAG 3' และ Reverse Primer คือ 18s-R 5'CCTKCAATGGATACTCGTTAAATG 3' จากนั้นเมื่อทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยใช้วิธี Gel electrophoresis เมื่อย้อมด้วย ethidium bromide และดูภายใต้แสง UV จะพบว่า PCR product ของยีน *18S rRNA* มีขนาดประมาณ 746 bp โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (รูปที่ 11)

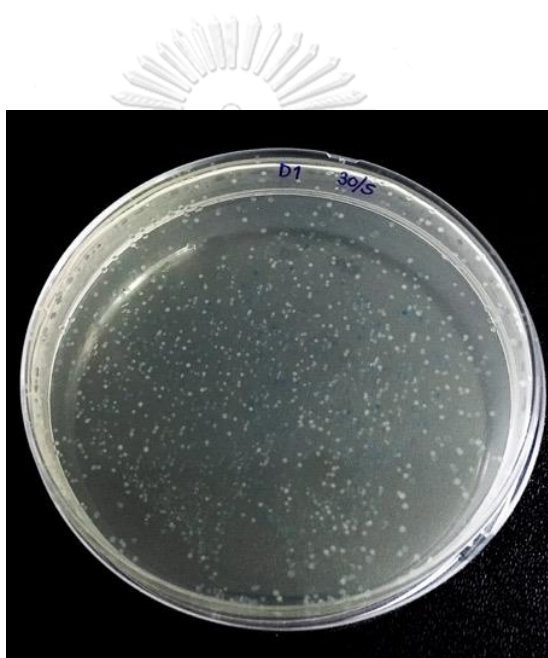


รูปที่ 11 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี Gel electrophoresis (1.5% agarose gel) ภายใต้กำลังไฟ 100 โวลต์

: Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) 100 bp, Lane P คือ Positive control (พลาสติกดีเอ็นเอของเหาโคที่มียีน *18S rRNA*), Lane N คือ Negative control (น้ำกลั่น), Lane 1-9 คือ PCR product ของยีน *18S rRNA* ของตัวอย่างเหาโค

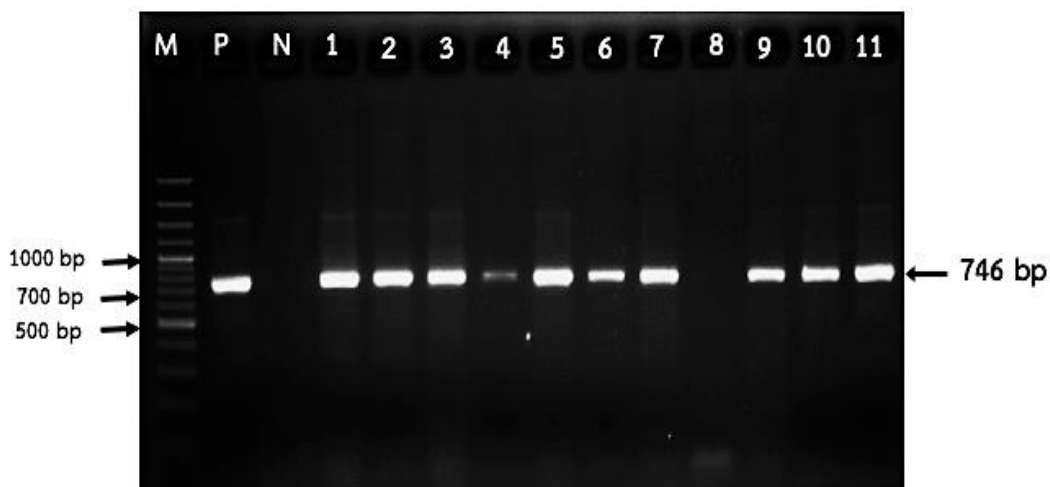
4.2.2.1 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยเทคนิค Colony PCR

จากขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบนตำแหน่งยีน *18S rRNA* โดยเทคนิค PCR และการตรวจสอบผลโดยวิธี Gel electrophoresis หลังจากนั้นจึงทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน *18S rRNA* เข้ากับ pGEM-T easy vector โดยเรียกว่าขั้นตอน DNA ligation จากนั้นทำการถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่ competent cell ด้วยการใช้ความร้อน (Heat shock) และเมื่อนำไปเลี้ยงบนจานที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อจะเห็นเป็น colony ของแบคทีเรียสีขาวยาวและสีฟ้า (รูปที่ 12) จึงทำการคัดเลือก colony สีขาวมาทดสอบด้วยเทคนิค colony PCR และตรวจสอบด้วยวิธี Gel electrophoresis ซึ่งจะพบผลของ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 746 bp โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (รูปที่ 13)



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 12 แสดงลักษณะของ colony ของแบคทีเรียสีขาวยาวและสีฟ้าบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

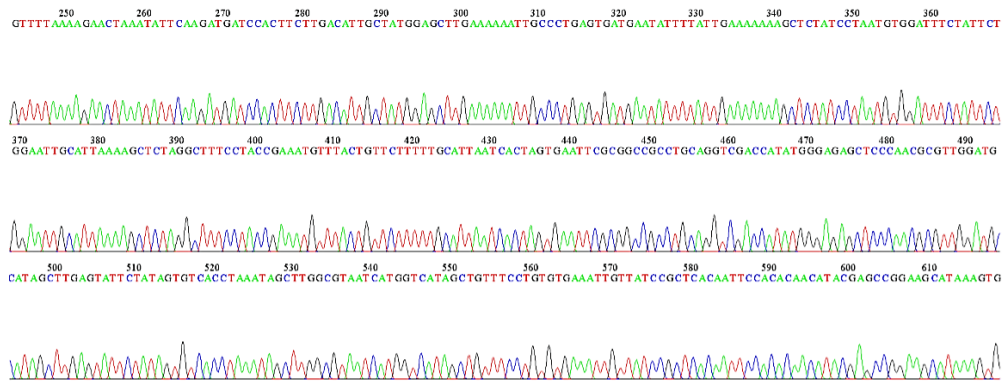


รูปที่ 13 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยเทคนิค colony PCR ด้วยวิธี Gel electrophoresis (1.5% agarose gel) ภายใต้กำลังไฟ 100 โวลต์

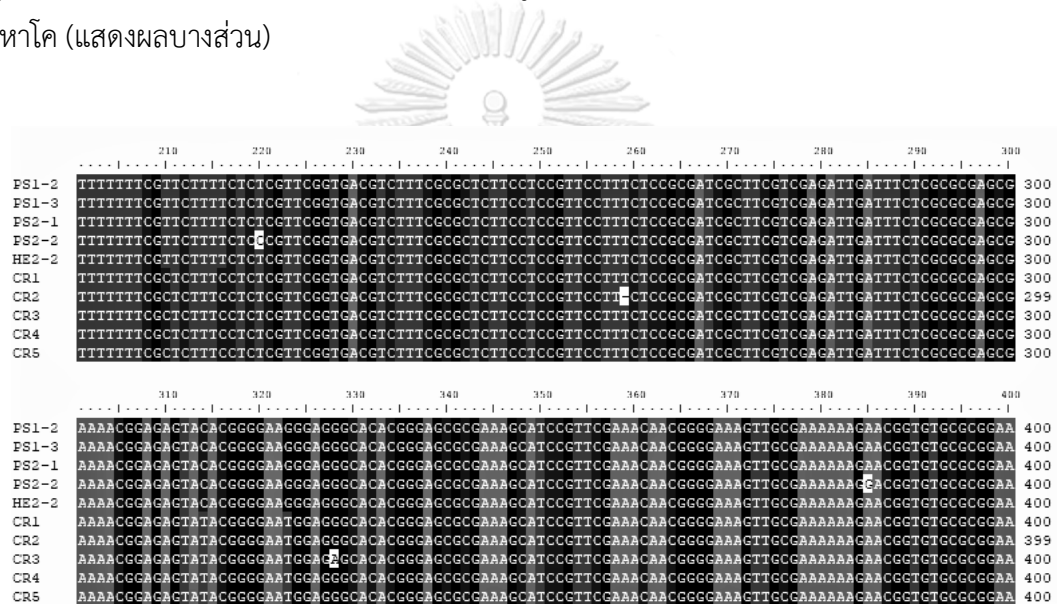
: Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) 100 bp, Lane P คือ Positive control (พลาสมิดดีเอ็นเอของเหาโคที่มียีน *18S rRNA*), Lane N คือ Negative control (น้ำกลั่น), Lane 1-11 คือ colony PCR product ของตัวอย่างโคลนที่มีชิ้นส่วนยีน *18S rRNA*

4.2.2.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเหาโค

เมื่อทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปและวัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลี) โดยมีบริษัท เอ็นพี เคมีคอล ซัพพลาย จำกัด เป็นตัวแทนในการจัดส่งตัวอย่าง และเพื่อการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์จะทำการส่งตัวอย่างละ 2 โคลน เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริษัทที่ทำการ sequencing แล้ว จะทำการวิเคราะห์เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการตัดหัวและท้ายของเส้น เพื่อตัดส่วนของ insert gene และ vector ออก และพบว่าผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตัดแต่งแล้วของตัวอย่างเหาโคทั้งหมดจะมีขนาดความยาว 745-746 bp



รูปที่ 14 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปของกราฟ chromatogram ยีน 18S rRNA ของเหาโค (แสดงผลบางส่วน)



รูปที่ 15 แสดงผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 18S rRNA ของเหาโค (แสดงผลบางส่วน)

4.2.2.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเหาโคกับ

ฐานข้อมูล NCBI

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการตัดแต่งเรียบร้อยแล้วจะนำมาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA ของเหาโคบนฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ซึ่งโปรแกรมจะแสดงค่าความเหมือนเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าจากตัวอย่างเหาโคจำนวนทั้งหมด 109 ตัวอย่าง มีเหาโคจำนวน 98 ตัวอย่าง (ระยะไข่จำนวน 7 ตัวอย่างและระยะตัวเต็มวัย 88 ตัวอย่าง) ที่มีความเหมือนกับเหาโคสาย

พันธุ์ *Haematopinus quadripertusus* จากประเทศอิสราเอล (Accession no. KJ522491) ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 99.06-100% ส่วนเหาโคอีกจำนวน 11 ตัวอย่าง (ระยะไข่ 4 ตัวอย่าง และระยะตัวเต็มวัย 7 ตัวอย่าง) มีความเหมือนกับเหาโค *Haematopinus sp.* จากประเทศจีน (Accession no. JQ309927) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่าง 99.46-99.87%

ตารางที่ 20 แสดงผลการจำแนกชนิดของเหาโคที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย

จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง (n)	การจำแนกชนิดของเหาโคโดยเทคนิค PCR (18S rRNA)			
		<i>H. quadripertusus</i> (n)		<i>Haematopinus spp.</i> (n)	
		ไข่	ตัวเต็มวัย	ไข่	ตัวเต็มวัย
เชียงใหม่	99	7	88	4	-
เชียงราย	7	-	-	-	7
นครราชสีมา	3	-	3	-	-
รวม	109	7	91	4	7
			98		11

- : ไม่พบตัวอย่าง

4.2.2.4 ผลการขึ้นทะเบียนขอหมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 18S rRNA ของ

เหาโค

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเหาโค ได้ทำการยื่นขอหมายเลขขึ้นทะเบียน (accession number) ของเหาโคทุกตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ BankIt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/>) เพื่อกรอกข้อมูลและเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 18S rRNA ของเหาโคที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทยลงในฐานข้อมูลสากล NCBI (GenBank) โดยผลการขอหมายเลขขึ้นทะเบียนของตัวอย่างทั้งหมด 109 ตัวอย่าง คือ MK734185-MK734293

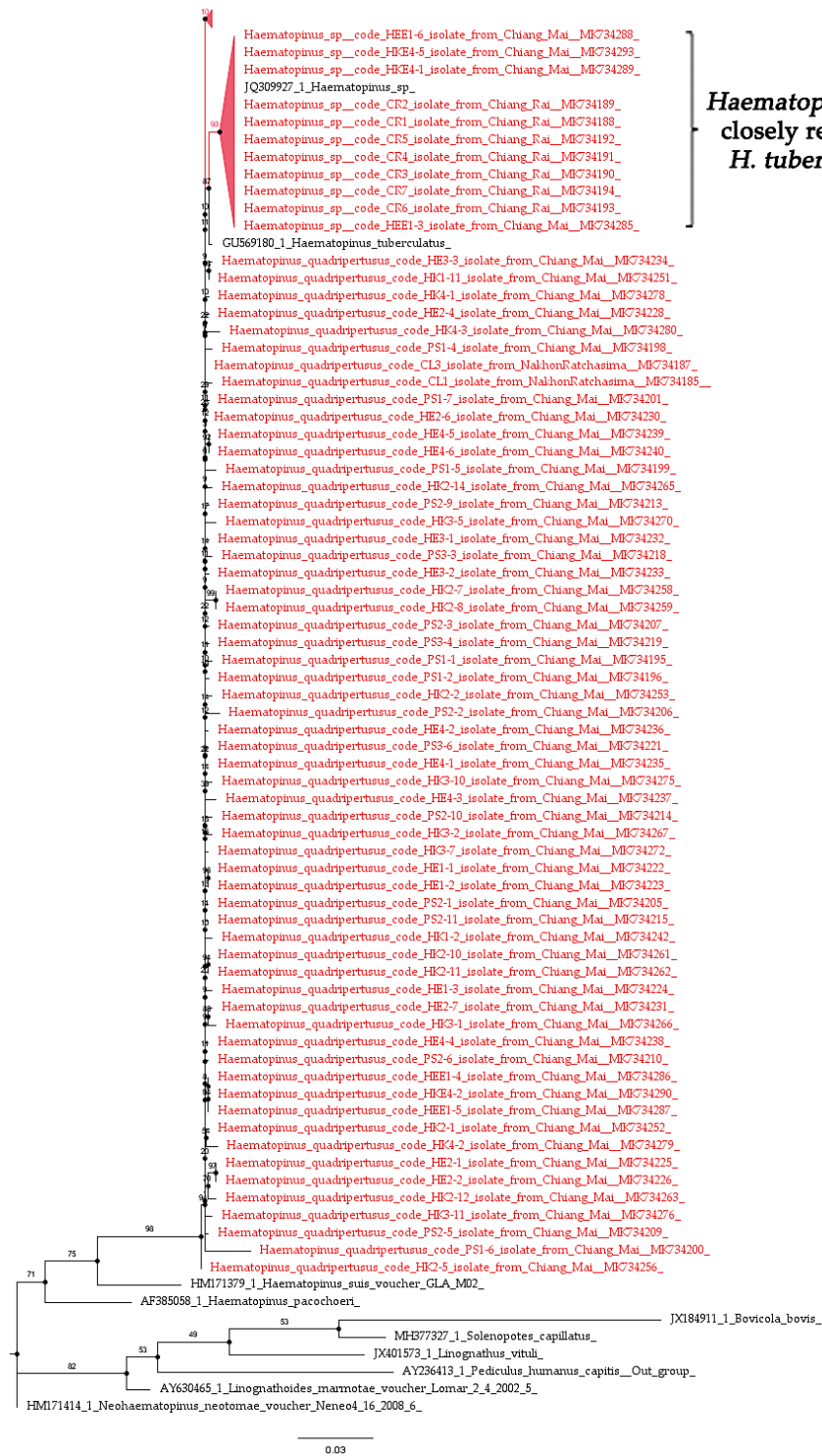
4.2.2.5 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic

tree) ของเหาโค

การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 18S rRNA ของตัวอย่างเหาโคทั้งหมด โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) ซึ่งกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ maximum-likelihood และใช้ bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ จากนั้นผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้จะเปิดโดยใช้โปรแกรม FigTree version 1.4.4

เพื่อดูและปรับปรุงแบบของแผนภูมิตามที่ต้องการ โดยจะทำการเปรียบเทียบกับ reference sequence ของเหาโคสายพันธุ์ต่าง ๆ คือ *Haematopinus* sp. (acc no. JQ309927), *Haematopinus quadripertusus* (acc no. KJ522491), *Solenopotes capillatus* (acc no. MH377327), *Linognathus vituli* (acc no. JX401573), *Haematopinus tuberculatus* (acc no. GU569180), *Haematopinus eurysterunus* (acc no. HM171381), *Haematopinus suis* (acc no. HM171379), *Haematopinus pacochoeri* (acc no. AF385058), *Linognathoides marnotae* (acc no. AY630465), *Neohaematopinus neotomae* (acc no. HM171414), *Bovicola bovis* (acc no. JX184911) และ *Pediculus humanus capitis* (acc no. AF139484)

จากแผนภูมิวิวัฒนาการของเหาโคที่แสดงในภาพที่ 17 สามารถวิเคราะห์วิวัฒนาการของเหาโคได้ว่า เมื่อเทียบตัวอย่างเหาโคทั้ง 109 ตัวอย่างกับ reference sequence ตำแหน่งยีน *18S rRNA* ของเหาโคสายพันธุ์ต่าง ๆ สามารถแยกตัวอย่างเหาโคออกเป็น 2 กลุ่ม อย่างชัดเจน คือ กลุ่มที่ 1 มีเหาโค 98 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่ม *Haematopinus quadripertusus* (Accession no. KJ522491) แต่พบว่ามีเหาโค 1 ตัวอย่าง code HK2-5 แยกออกจากกลุ่มของ *Haematopinus quadripertusus* เมื่อได้ทำการเทียบเส้นลำดับนิวคลีโอไทด์กับตัวอย่างอื่นในกลุ่มเดียวกันแล้ว พบว่ามีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่นในบางตำแหน่งเบส และนำเข้าโปรแกรม BLASTN พบว่ามีความเหมือนกับ *Haematopinus quadripertusus* (Accession no. KJ522491) 99.06% และกลุ่มที่ 2 มีเหาโค 11 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่ม *Haematopinus* sp. (Accession no. JQ309927) และเหาโคในกลุ่มที่ 2 มีความเกี่ยวข้องใกล้ชิดกับสายพันธุ์ *Haematopinus tuberculatus* (Accession no. GU569180)



รูปที่ 16 แสดงผลวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของเหาโคในการศึกษารั้งนี้จากตัวอย่างเหาโคทั้งหมด 109 ตัวอย่าง โดยเทียบกับ reference sequence จากตำแหน่งยีน *18S rRNA* ของเหาโคสายพันธุ์ต่าง ๆ

4.3 ผลการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และ ในตัวอย่างเหาโคโดยเทคนิค PCR

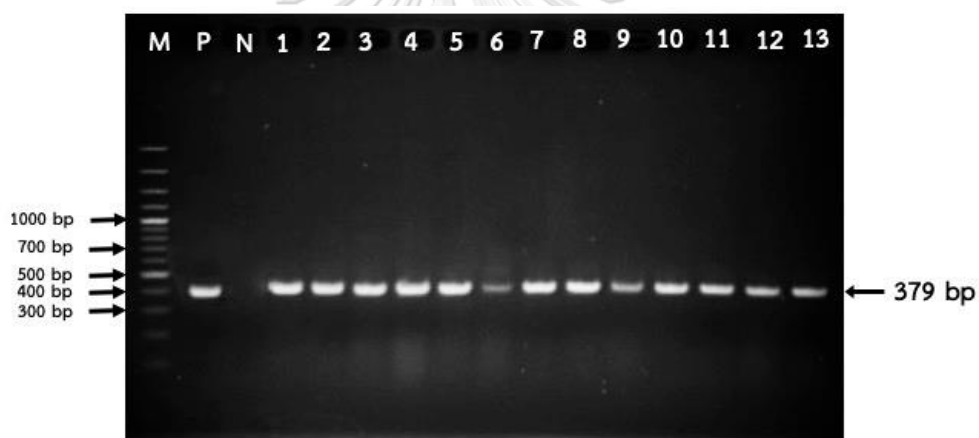
ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคคือ *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. และ *Acinetobacter* spp. จากตัวอย่าง DNA ของเหาโคจำนวนทั้งหมด 109 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด สำหรับเชื้อ *Rickettsia* spp. ศึกษาบนตำแหน่งยีน *gltA* ในการตรวจหาเชื้อ *Acinetobacter* spp. ทำการศึกษาบนตำแหน่งยีน *rpoB* ซึ่งพบว่า ไม่สามารถตรวจพบเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ในตัวอย่าง DNA ของเหาโค สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. จะทำการตรวจบนยีน 2 ตำแหน่ง และใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ จากตำแหน่งยีน *gltA* ซึ่งผลของ PCR product มีขนาดประมาณ 379 bp (รูปที่ 17) และเพื่อเป็นการยืนยันผลจึงได้ทำการตรวจเชื้อ *Bartonella* spp. บนยีนอีกหนึ่งตำแหน่ง คือยีน *rpoB* ซึ่งผลของ PCR product มีขนาดประมาณ 406 bp (รูปที่ 18) โดยพบว่าเทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในตัวอย่าง DNA ของเหาโค จำนวน 25 ตัวอย่าง (ระยะไข่จำนวน 3 ตัวอย่าง และระยะตัวเต็มวัยจำนวน 22 ตัวอย่าง) จากตัวอย่างทั้งหมด 109 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็น 22.93% โดยสามารถตรวจพบเชื้อในตัวอย่างเดียวกันทั้ง 2 ยีน

ตัวอย่าง DNA ของเหาโคที่ตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. จำนวน 25 ตัวอย่าง สามารถพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในเหาโคสายพันธุ์ *H. quadripertusus* จำนวน 22 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่ระบุว่าเป็นเหาโคสายพันธุ์ *H. quadripertusus* จำนวน 98 ตัวอย่าง คิดเป็น 22.45% ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ (ระยะไข่จำนวน 2 ตัวอย่างและระยะตัวเต็มวัยจำนวน 17 ตัวอย่าง) และจากจังหวัดนครราชสีมา (ระยะตัวเต็มวัยจำนวน 3 ตัวอย่าง) และสามารถพบเชื้อในเหาโคสายพันธุ์ *Haematopinus* spp. จำนวน 3 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่ระบุว่าเป็นเหาโคสายพันธุ์ *Haematopinus* spp. จำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็น 27.27% โดยเป็นตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ (ระยะไข่จำนวน 1 ตัวอย่าง) และจากจังหวัดเชียงราย (ระยะตัวเต็มวัยจำนวน 2 ตัวอย่าง) ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. ในดีเอ็นเอเหาโคบนตำแหน่งยีน *gltA* และ *rpoB* โดยใช้เทคนิค PCR

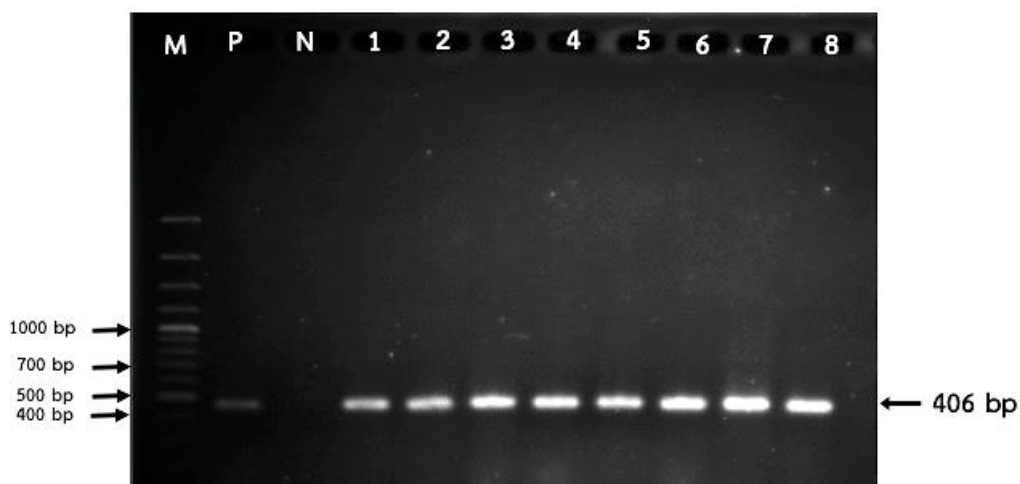
จังหวัด	<i>H. quadripertusus</i> (n)		<i>Haematopinus</i> spp. (n)	
	ไข่	ตัวเต็มวัย	ไข่	ตัวเต็มวัย
เชียงใหม่	2/7	17/88	1/4	-
เชียงราย	-	-	-	2/7
นครราชสีมา	-	3/3	-	-
รวม	22/98		3/11	
	25/109			

จำนวน : จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ/จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจ; - : ไม่พบตัวอย่าง



รูปที่ 17 ผลการตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. ในตัวอย่าง DNA ของเหาโคบนตำแหน่งยีน *gltA* โดยใช้เทคนิค PCR

: Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) 100 bp, Lane P คือ Positive control, Lane N คือ Negative control (น้ำกลั่น), Lane 1-13 คือ PCR product ของยีน *gltA* ของเชื้อ *Bartonella* spp. ในตัวอย่าง DNA ของเหาโค



รูปที่ 18 ผลการตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. ในตัวอย่าง DNA ของเหาโคบนตำแหน่งยีน *rpoB* โดยเทคนิค PCR

: Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) 100 bp, Lane P คือ Positive control, Lane N คือ Negative control (น้ำกลั่น), Lane 1-8 คือ PCR product ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *Bartonella* spp. ในตัวอย่าง DNA ของเหาโค

4.3.1 การตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยเทคนิค Colony PCR

จากขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบนตำแหน่งยีน *gltA* และ *rpoB* โดยวิธี PCR และการตรวจสอบผลโดยวิธี Gel electrophoresis หลังจากนั้นจึงทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน *gltA* และ *rpoB* เข้ากับ pGEM-T easy vector โดยเรียกว่าขั้นตอน DNA ligation จากนั้นทำการถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่ competent cell ด้วยการใช้ความร้อน (Heat shock) และเมื่อนำไปเลี้ยงบนจานที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อจะเห็นเป็น colony ของแบคทีเรียสีขาวยาวและสีฟ้า จึงทำการคัดเลือก colony สีขาวมาทดสอบด้วยเทคนิค colony PCR และตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ซึ่งผลของ PCR product ของยีน *gltA* และ *rpoB* มีขนาดประมาณ 379 bp และ 406 bp ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp

4.3.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gltA* และ *rpoB* กับฐานข้อมูล NCBI

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการตัดแต่งเรียบร้อยแล้วจากนั้นจะนำมาเปรียบเทียบความคล้ายกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน *gltA* และ *rpoB* ของเชื้อ *Bartonella* spp. บน

ฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLASTN ซึ่งโปรแกรมจะแสดงค่าความเหมือนเป็นเปอร์เซ็นต์

พบว่าตัวอย่างเหาโคทั้งหมด 25 ตัวอย่าง (ระยะไข่จำนวน 3 ตัวอย่างและระยะตัวเต็มวัย 22 ตัวอย่าง) ที่ตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ซึ่งพบเชื้อในตัวอย่างเดียวกันทั้ง 2 ยีน โดยที่ตำแหน่งยีน *gltA* เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank มีความเหมือนกับ *Uncultured Bartonella* spp. (Accession no. KJ522487) ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 99.21-99.74% และที่ตำแหน่งยีน *rpoB* มีความเหมือนกับ *Uncultured Bartonella* spp. (Accession no. KJ522489) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่าง 99.78-100% ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Bartonella* spp. ที่ตรวจพบในเหาโคที่เก็บจากฟาร์มโคนมในประเทศอิสราเอล

4.3.3 ผลการขึ้นทะเบียนขอหมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *gltA* และ *rpoB* ของเชื้อ *Bartonella* spp.

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gltA* และ *rpoB* ของเชื้อ *Bartonella* spp. ได้ทำการยื่นขอหมายเลขขึ้นทะเบียน (accession number) ทุกตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ BankIt เพื่อเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *gltA* และ *rpoB* ของเชื้อ *Bartonella* spp. ในเหาโคที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทยลงในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยผลการขอหมายเลขขึ้นทะเบียนของตัวอย่างทั้งหมด คือ MK748474-MK748498 สำหรับยีน *gltA* และ MK762880-MK762904 สำหรับยีน *rpoB* ตามลำดับ

4.3.4 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม่วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของเชื้อ *Bartonella* spp. ที่ตรวจพบในตัวอย่าง DNA เหาโค

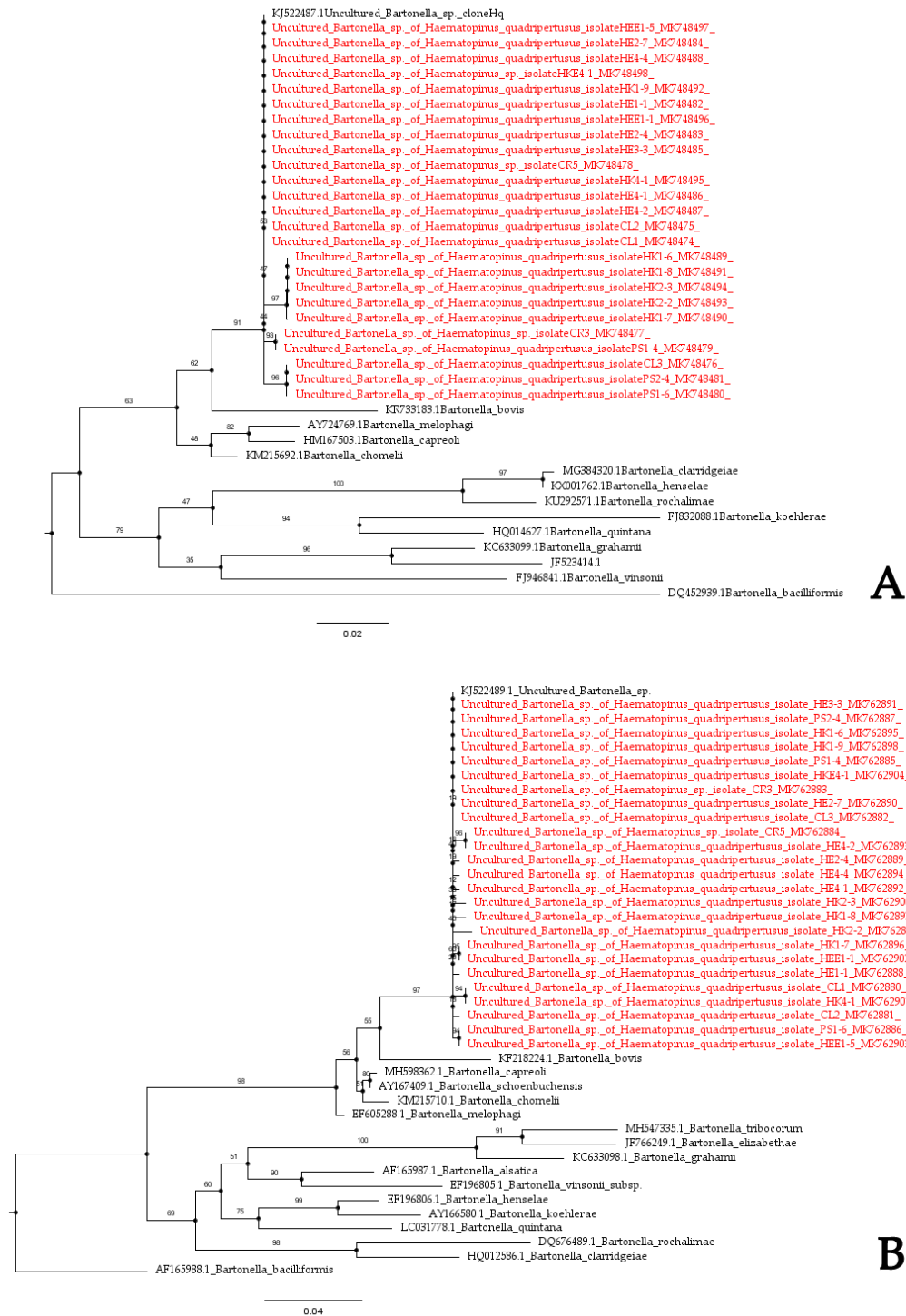
สำหรับการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง DNA ของเหาโคที่ตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ทั้งยีน *gltA* และ *rpoB* โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) ซึ่งกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ maximum-likelihood และใช้ bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ จากนั้นผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้วัดโดยโปรแกรม FigTree version 1.4.4 เพื่อดูและปรับรูปแบบของแผนภูมิตามที่ต้องการ โดยทำการเปรียบเทียบตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อในแต่ละยีนกับ reference sequence ของเชื้อ *Bartonella* spp. สายพันธุ์ต่าง ๆ

สำหรับตำแหน่งยีน *gltA* ได้แก่ *Uncultured Bartonella* sp. (acc no. KJ522487), *Bartonella melophagi* (acc no. AY724769), *Bartonella capreoli* (acc no.

HM167503), *Bartonella clarridgeiae* (acc no. MG384320), *Bartonella rochalimae* (acc no. KU292571), *Bartonella vinsonii* (acc no. FJ946841), *Bartonella koehlerae* (acc no. FJ832088), *Bartonella grahamii* (acc no. KC633099), *Bartonella quintana* (acc no. HQ014627), *Bartonella bovis* (acc no. KR733183), *Bartonella chomelii* (acc no. KM215692), *Bartonella henselae* (acc no. KX001762) และ *Bartonella bacilliformis* (acc no. DQ452939)

สำหรับตำแหน่งยีน *rpoB* ได้แก่ *Uncultured Bartonella* sp. (acc no. KJ5224879), *Bartonella alsatica* (acc no. AF165987), *Bartonella bacilliformis* (acc no. AF165988), *Bartonella bovis* (acc no. KF218224), *Bartonella capreoli* (acc no. MH598362), *Bartonella chomelii* (acc no. KM215710), *Bartonella schoenbuchensis* (acc no. AY167409), *Bartonella melophagi* (acc no. EF605288), *Bartonella rochalimae* (acc no. DQ676489), *Bartonella clarridgeiae* (acc no. HQ012586), *Bartonella henselae* (acc no. EF196806), *Bartonella koehlerae* (acc no. AY166580), *Bartonella vinsonii* subsp. (acc no. EF196805), *Bartonella grahamii* (acc no. KC633098), *Bartonella tribocorum* (acc no. MH547335), *Bartonella elizabethae* (acc no. JF766249) และ *Bartonella quintana* (acc no. LC031778)

จากแผนภูมิวิวัฒนาการของเชื้อ *Bartonella* spp. ที่แสดงในรูปที่ 19 สามารถวิเคราะห์ลำดับวิวัฒนาการได้ว่า เมื่อเทียบตัวอย่างเหาโคที่ตรวจพบเชื้อทั้ง 25 ตัวอย่างกับ reference sequence ที่ตำแหน่งยีน *gltA* และ *rpoB* ของเชื้อ *Bartonella* spp. สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าแผนภูมิวิวัฒนาการของทั้ง 2 ยีน สามารถจัดตัวอย่างเป็น 1 กลุ่ม อย่างชัดเจน คือ ตัวอย่างเหาโคที่ตรวจพบเชื้อทั้ง 25 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Uncultured Bartonella* sp. ที่เป็น reference sequence ของแต่ละยีน และตัวอย่างทั้ง 2 ยีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ *Bartonella bovis* โดยที่ตำแหน่งยีน *gltA* เป็นสายพันธุ์ที่ตรวจพบในเลือดโคจากประเทศมาเลเซีย (acc no. KR733183) และที่ตำแหน่งยีน *rpoB* เป็นสายพันธุ์ที่พบในเลือดกระบือจากประเทศไทย (acc no. KF218224)



รูปที่ 19 แสดงผลวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อ *Bartonella* spp. ที่ตรวจพบในเหาโคที่ตำแหน่งยีน *gltA* (A) และยีน *rpoB* (B) โดยเทียบกับ reference sequence ของเชื้อ *Bartonella* spp. สายพันธุ์ต่าง ๆ ของแต่ละตำแหน่งยีน

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาสืบค้นข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับชนิดของเหาโคที่สำรวจพบในประเทศไทยในฐานข้อมูลสากลพบว่า ประเทศไทยเคยมีรายงานวิธีการจำแนกชนิดของเหาโคจากพื้นที่ต่าง ๆ โดยศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนความต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหาโค ซึ่งการจำแนกชนิดของเหาโคโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาที่ถูกต้องและแม่นยำนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ที่สำคัญ เช่น ระยะของตัวอย่างเหาโค, ความสมบูรณ์ของอวัยวะต่าง ๆ ของเหาโค และประสบการณ์ความชำนาญของนักกีฏวิทยา ซึ่งการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกชนิดของเหาโคในระยะตัวเต็มวัยมักจะสามารถจำแนกได้ง่ายกว่าและมีความถูกต้องมากกว่าเหาโคในระยะอื่น ๆ เนื่องจากเหาโคระยะตัวเต็มวัยจะมีลักษณะรูปร่างและโครงสร้างของอวัยวะต่าง ๆ ที่ชัดเจน แต่การศึกษาเพื่อจำแนกตัวอย่างเหาโคในระยะไข่, ระยะตัวอ่อน รวมไปถึงตัวอย่างเหาโคที่มีลักษณะรูปร่างที่ไม่สมบูรณ์ นั้นอาจไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกได้ เนื่องจากเหาโคในระยะไข่และระยะตัวอ่อนในแต่ละชนิดมักมีลักษณะรูปร่างภายนอกที่ค่อนข้างคล้ายกันเป็นอย่างมากจึงทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างเหาโคจะทำการเก็บโดยใช้มือดึงตัวเหาออกจากบริเวณผิวหนังของโค ซึ่งอาจทำให้ตัวอย่างเหาบางตัวเกิดความเสียหายบ้าง เช่น ส่วนขาหลุด หรือลำตัวกับส่วนหัวแยกขาดจากกันได้ ส่งผลทำให้เหาโคในตัวอย่างนั้น ๆ มีลักษณะรูปร่างที่ไม่สมบูรณ์ อาจจะต้องใช้ความชำนาญเป็นอย่างมากในการนำมาจำแนกชนิดหรืออาจจะไม่สามารถจำแนกชนิดโดยดูจากลักษณะสัณฐานวิทยาได้ จากที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ทราบว่าข้อมูลการจำแนกชนิดของเหาโคในประเทศไทยมีเพียงการศึกษาโดยใช้การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเท่านั้น ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาและเกิดข้อจำกัดต่าง ๆ ในการจำแนกชนิดของเหาโคได้ เพราะเหตุนี้จึงนำไปสู่การศึกษาจำแนกชนิดของเหาโคที่เก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางด้านอนุชีววิทยาในการวิเคราะห์ เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องและให้ผลการจำแนกชนิดของเหาโคที่แม่นยำยิ่งขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงได้แสดงให้เห็นถึงขั้นตอนและวิธีการใช้เทคนิค PCR มาศึกษาบนตำแหน่งยีน *18S rRNA* ของเหาโค เพื่อระบุสายพันธุ์ของเหาโคที่เก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทยที่ถูกต้องที่สุด และเป็นงานวิจัยแรกที่ใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาในการจำแนกชนิดของเหาโคในประเทศไทย

ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเหาโคกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank พบว่า จากตัวอย่างเหาโคทั้งหมด 109 ตัวอย่าง สามารถพบเหาโคได้ 2 สายพันธุ์ คือ *H. quadripertusus* และ *Haematopinus* sp. ซึ่งการวิเคราะห์ผลการจำแนกชนิดเหาโคจากแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *18S rRNA* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเหาโคสายพันธุ์ *H. quadripertusus* ที่พบในงานวิจัยนี้มี

ความคล้ายคลึงกับ *H. quadripertusus* ที่เก็บจากโคในประเทศอิสราเอล (Accession no. KJ522491) (28) และตัวอย่างเหาโคสายพันธุ์ *Haematopinus* sp. ที่พบในงานวิจัยนี้ มีความคล้ายคลึงกับ *Haematopinus* sp. ที่เก็บจากโคในประเทศจีน (Accession no. JQ309927) (59) นอกจากนี้เหาโคสายพันธุ์ *Haematopinus* sp. ที่พบในงานวิจัยนี้ยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ reference sequence ของเหาโคสายพันธุ์ *H. tuberculatus* ที่เก็บจากโคในประเทศญี่ปุ่น (Accession no. GU569180) (60) ซึ่งอาจจะสามารถบ่งบอกได้ว่าเหาโคในกลุ่ม *Haematopinus* sp. ในงานวิจัยนี้มีวิวัฒนาการที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ *H. tuberculatus* ซึ่งจากการเก็บตัวอย่างในบางพื้นที่พบว่าเจ้าของฟาร์มได้มีการเลี้ยงโคและกระบือไว้รวมกัน และเหาสายพันธุ์ *H. tuberculatus* ส่วนมากมักจะพบในกระบือมากกว่าโค แต่ก็สามารถพบในโคได้เช่นกัน ซึ่งข้อมูลของการศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกชนิดเหาที่เก็บจากโคและกระบือในประเทศไทยมีการรายงานว่ามีเหา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *H. quadripertusus*, *H. euryesternus*, *L. vituli*, และ *S. capillatus* ซึ่งเป็นการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหา (61, 62) ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับแผนภูมิวิวัฒนาการของเหาโคทั้งหมด 109 ตัวอย่างทั้งระยะไข่และระยะตัวเต็มวัยที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย เพื่อให้ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเหาโค อย่างไรก็ตามจากข้อจำกัดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการระดับอนุชีวิวิทยาของเหาโคในประเทศไทยที่ยังไม่เคยมีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของเหาโคไว้ในฐานข้อมูลระดับสากล จึงทำให้ไม่สามารถนำผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปเปรียบเทียบกับผลของงานวิจัยอื่น ๆ ในประเทศไทยได้

การเลือกศึกษาดำแหน่งยีนของเหาโคในงานวิจัยนี้ เมื่อได้ทำการศึกษาสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยที่จำแนกชนิดของเหาโคโดยใช้เทคนิคทางอนุชีวิวิทยา พบว่ามีหลายงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาและอธิบายเกี่ยวกับตำแหน่งยีนในไมโทคอนเดรีย คือ ยีน Cytochrome C oxidase subunit I (COI) (63) และยีนในนิวเคลียส คือ ยีน *18S rRNA* และ *EF-1 α* (37, 63) ที่ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ของเหาโค ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกตำแหน่งยีน *18S rRNA* มาใช้ในการศึกษาจำแนกชนิด เนื่องจากผลงานวิจัยที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ได้ระบุว่าตำแหน่งยีนนี้สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดของเหาโคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (63) และสามารถแสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการของเหาโคได้ (64) นอกจากนี้ในฐานข้อมูล GenBank ยังพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของเหาโคที่ตำแหน่งยีน *18S rRNA* จากหลายพื้นที่ทั่วโลกและมีจำนวนมากกว่ายีนตำแหน่งอื่น ๆ รวมไปถึงการมีความยาวของลำดับเบสที่เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *18S rRNA* ของเหาโคสายพันธุ์ต่าง ๆ ในฐานข้อมูลมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของเหาโคมากยิ่งขึ้นเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้ และผลจากการศึกษาของงานวิจัยนี้ทำให้ได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์

ที่ตำแหน่งยีน *18S rRNA* ของตัวอย่างเหาโคที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดในประเทศไทยทั้งหมด 109 ตัวอย่าง ซึ่งได้ขึ้นทะเบียนไว้แล้วในฐานข้อมูล GenBank

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในตัวอย่างเหาโค งานวิจัยนี้ศึกษาโดยใช้เทคนิค PCR เพื่อทำการตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. และ *Acinetobacter* spp. ซึ่งเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้มีความสำคัญทางการแพทย์เป็นอย่างมากและสามารถติดต่อโดยผ่านทางแมลงดูดเลือดที่เป็นพาหะ เช่น เห็บ เหา ซึ่งเป็นปรสิตภายนอกที่พบได้บ่อยบนลำตัวของโค ผลจากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Rickettsia* spp. และ *Acinetobacter* spp. ไม่สามารถตรวจพบในตัวอย่างเหาโคจากงานวิจัยนี้ แต่การศึกษารั้งนี้สามารถตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในตัวอย่างเหาโค 25 ตัวอย่าง จากเหาโคทั้งหมด 109 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 2 คู่ ได้แก่ ตำแหน่งยีน *gltA* และ *rpoB* เนื่องจากมีรายงานการตรวจพบเชื้อชนิดนี้ในเหาโคและเลือดของโคจากงานวิจัยอื่น ๆ พบว่าที่ตำแหน่งยีนทั้ง 2 ตำแหน่งนี้สามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อชนิดนี้ได้ดีที่สุดและสามารถระบุชนิดของเชื้อได้หลากหลายที่สุด งานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาที่ยีน 2 ตำแหน่งเพื่อเป็นการยืนยันผลงานวิจัยที่ถูกต้องอีกครั้ง ซึ่งเชื้อ *Bartonella* spp. ที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้ สามารถพบทั้งในตัวอย่างเหาโคสายพันธุ์ *H. quadripertusus* และ *Haematopinus* sp. ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ *H. tuberculatus* ทำให้ได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gltA* และ *rpoB* ของเชื้อ *Bartonella* spp. เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล พบว่าชนิดของเชื้อที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้มีความคล้ายคลึงกับ *Uncultured Bartonella* spp. ที่เคยตรวจพบในเหาโคสายพันธุ์ *H. quadripertusus* ที่เก็บจากบริเวณชนทางของโคในฟาร์มโคนมที่ประเทศอิสราเอล (ยีน *gltA* Accession no. KJ522487 และยีน *rpoB* Accession no. KJ522489) (28) นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gltA* และ *rpoB* ของเชื้อ *Bartonella* spp. ในงานวิจัยนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *B. bovis* strain I724598 ที่เคยตรวจพบในเลือดของโคจากประเทศมาเลเซีย (Accession no. KR733183) (11) และพบในเลือดของกระบือจากประเทศไทย (Accession no. KF218224) (18) ซึ่งเชื้อ *Bartonella* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถดำรงชีวิตและเจริญเติบโตได้ในทุกส่วนภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Facultative intracellular) ส่วนมากพบได้ในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและกลุ่มของแมลงดูดเลือด เช่น เห็บ, เหา, หมัด และริ้นฝอยทราย (65) การพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในโคเคยมีการรายงานว่ามีการตรวจพบเชื้อ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. bovis*, *B. schoenbuchensis* และ *B. chomelii* แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์นี้สามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ (66) และมีรายงานว่ากล่าวว่าการติดเชื้อ *Bartonella* spp. มักมีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อนี้ไปสู่มนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ เช่น เชื้อ *B. henselae* สามารถติดต่อจากหมัดแมวสายพันธุ์ *Ctenocephalides felis* และเชื้อ *B. quintana* ที่สามารถติดต่อผ่านทางเหาลำตัวสายพันธุ์ *Pediculus humanus* (67, 68) และนอกจากนี้ยังมีความชุกของเชื้อ *Bartonella* spp. ที่สามารถ

ตรวจพบจากเลือดของหนูจำนวนมากและพบได้ในหลายประเทศโซนเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมไปถึงเขตประเทศ สปป. ลาว 11.9%, ไทย 11% และกัมพูชา 9.6% (69) ซึ่งในประเทศไทยมีหลายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับปัญหาการก่อโรคของเชื้อ *Bartonella* spp. พบว่าในเชื้อชนิดนี้จะก่อให้เกิดโรคที่มีอาการป่วย มีไข้สูง รวมถึงอาการเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) ในสัตว์ที่เป็นโฮสต์และสัตว์กักเก็บโรค (70, 71) ซึ่งมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในเลือดโคที่มีสุขภาพแข็งแรงคิดเป็น 10% (จำนวน 4 ตัวอย่าง จาก 40 ตัวอย่าง) และตรวจพบเชื้อสายพันธุ์ *B. bovis* ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้จากตัวอย่างเลือดกระบือในประเทศไทย คิดเป็น 6.8% (จำนวน 7 ตัวอย่าง จาก 103 ตัวอย่าง) (18) อย่างไรก็ตามข้อมูลที่จะใช้ระบุว่าหาโคมีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในมนุษย์ยังมีข้อจำกัดในการศึกษาในประเทศไทย ซึ่งจากการศึกษาผลของงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง พบว่าเชื้อ *Bartonella* spp. มีความชุกสูงในหลายพื้นที่ทั่วโลกและมีความหลากหลายทางพันธุกรรม เมื่อได้มีการตรวจพบในกลุ่มของแมลงขาปล้องดูดเลือดที่เป็นพาหะทั่วโลกยกตัวอย่างเช่น ความชุกของเชื้อ *B. bovis* ในโคมีรายงานการตรวจพบในหลายประเทศ ได้แก่ อิตาลี 24.2% (13), ฝรั่งเศส 59% (72), และโปแลนด์ 6.8% (12) ซึ่งในสหรัฐอเมริกา มีรายงานว่า *B. bovis* มีอัตราการติดเชื้อที่แตกต่างกันในแต่ละเขตภูมิภาค และในรัฐแคลิฟอร์เนียมีอัตราการติดเชื้อสูงถึง 81-96%, รัฐคาโรไลน่า 82.4% (73) และที่ประเทศจอร์เจียมีอัตราการติดเชื้อต่ำที่สุด คิดเป็น 47% (17) ส่วนในแง่ของวิธีการติดเชื้อแบคทีเรียในแมลงเหล่านี้ยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่นอน แต่มีงานวิจัยอื่น ๆ ที่ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ทั้งการติดเชื้อที่ติดมาจากสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคหรือติดโดยการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (37) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนี้อาจ จะสามารถถ่ายทอดไปสู่แมลงตัวอื่นโดยผ่านทางพันธุกรรมจากรุ่นแม่สู่รุ่นลูกหลาน (vertical transmission), การผสมพันธุ์, การกินอาหารร่วมกัน และการสัมผัสสูดจากระยะ ในงานวิจัยนี้สามารถตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ทั้งในหาโคระยะไข่และระยะตัวเต็มวัย อาจสามารถใช้เป็นผลข้อมูลที่สำคัญเพื่อสนับสนุนความเป็นไปได้ที่ว่าเชื้อชนิดนี้สามารถถ่ายทอดส่งต่อจากรุ่นแม่ไปสู่รุ่นลูกหลานของแมลงได้

งานวิจัยนี้คืองานวิจัยแรกที่ตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในหาโคที่เก็บจากพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย และเป็นการตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในระยะไข่หาโคครั้งแรกซึ่งเป็นการบ่งบอกและชี้ให้เห็นว่าเชื้อชนิดนี้อาจสามารถถ่ายทอดจากรุ่นแม่สู่รุ่นลูกหลานได้ แม้ว่าก่อนหน้านี้มีเพียงข้อมูลความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างโคกับเชื้อ *Bartonella* spp. ที่ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ในโคได้ แต่ในมนุษย์ก็ยังคงมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้อาจจะมีบทบาทในการติดเชื้อจากสัตว์ไปสู่มนุษย์ (Zoonotic) โดยผ่านการกัดของแมลงดูดเลือดในฟาร์มปศุสัตว์หรือติดต่อกับสัตว์ที่ติดเชื้อโดยการสัมผัสเลือดผ่านทางผิวหนังที่มีรอยบาดแผลได้ ซึ่งการศึกษาเพิ่มเติมจึงมีความจำเป็นเพื่อเป็นการยืนยันสมมติฐานดังกล่าวข้างต้น และแมลงดูดเลือดชนิดอื่น ๆ ทั้งในฟาร์มปศุสัตว์โคเนื้อและโคนมในพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทยควรมีเป้าหมายในการนำมาศึกษาต่อในอนาคต รวมไปถึง

การศึกษาในตำแหน่งอื่นอื่น ๆ เพิ่มเติม เพื่อชี้แจงบทบาทและศักยภาพในการเป็นพาหะนำโรคของ
 แผลงดูดเลือดเหล่านี้ที่เกี่ยวข้องกับวงจรชีวิตระหว่างโคกับเชื้อ *Bartonella* spp. และนอกจากเชื้อ
Bartonella spp., *Rickettsia* spp. และ *Acinetobacter* spp. ที่ได้ทำการตรวจในงานวิจัยนี้แล้ว
 ควรมีการทดลองตรวจเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติมในอนาคต เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อ
 ทางการแพทย์และทางการแพทย์ต่อไป และจากการทำวิจัยในครั้งนี้พบว่า มีข้อจำกัดเกี่ยวกับการ
 เก็บรวบรวมจำนวนตัวอย่างเหาโคจากพื้นที่ต่าง ๆ เป็นอย่างมาก เนื่องจากการเก็บตัวอย่างเหาจากตัว
 โคนั้นทำได้ค่อนข้างยากถ้าหากไม่ใช่เจ้าของโคหรือผู้เลี้ยงที่มีความใกล้ชิดเป็นประจำจะไม่สามารถเข้า
 ใกล้โคได้ เพราะโคอาจเกิดความกลัวและเครียดได้ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีผู้เลี้ยงโคคอย
 ควบคุมดูแลตลอดเวลาระหว่างการเก็บตัวอย่าง เพราะอาจจะเกิดอันตรายต่อผู้วิจัยที่ลงไปสัมผัสกับ
 ตัวโคได้ และนอกจากนี้ยังสามารถเก็บตัวอย่างได้ค่อนข้างน้อยในบางพื้นที่ที่ทำการศึกษา เนื่องจาก
 ในปัจจุบันเกษตรกรผู้เลี้ยงโคได้มีการหันมาใช้ยาฆ่าแมลงในฟาร์มโคค่อนข้างมาก เพื่อกำจัดเหาโค
 และแมลงดูดเลือดชนิดอื่น ๆ ที่มาอาศัยบนตัวโค เพื่อให้โคที่เลี้ยงมีสุขภาพดีและถูกสุขอนามัย
 เพราะแมลงดูดเลือดเหล่านี้มักจะกัดและดูดกินเลือดโคทำให้โคมีอาการคัน เกิดแผลบริเวณผิวหนัง
 หรืออาจเป็นพาหะนำโรคต่าง ๆ มาสู่โคได้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อธุรกิจเชิงพาณิชย์ระดับประเทศของ
 เกษตรกรผู้เลี้ยงโค รวมไปถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคเนื้อและนมโคซึ่งอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อ
 โรคต่างๆได้อีกด้วย

บรรณานุกรม

1. Weiss RA. Apes, lice and prehistory. *J Biol.* 2009;8(2):20.
2. Busvine JR. The head and body races of *Pediculus humanus* L. *Parasitology.* 1948;39(1-2):1-16.
3. Janniger CK, Kuflik AS. Pediculosis capitis. *Cutis.* 1993;51(6):407-8.
4. Leung AK, Fong JH, Pinto-Rojas A. Pediculosis capitis. *J Pediatr Health Care.* 2005;19(6):369-73.
5. Madke B, Khopkar U. Pediculosis capitis: an update. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2012;78(4):429-38.
6. Benelli G, Caselli A, Di Giuseppe G, Canale A. Control of biting lice, Mallophaga - a review. *Acta Trop.* 2018;177:211-9.
7. Heath A, Levot GW. Parasiticide resistance in flies, lice and ticks in New Zealand and Australia: mechanisms, prevalence and prevention. *N Z Vet J.* 2015;63(4):199-210.
8. ทศนีย์ ชมภูจันทร์ สธ, ปันนัท ธนเจริญวัชร, จิรา คงครอง และเอกรินทร์ วัฒนพลาชัยกุล (บรรณาธิการ). คู่มือมาตรฐานการชันสูตรโรคสัตว์. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 2539.
9. เตียวศิริทรัพย์ ส. ปรสิตภายนอกในสัตว์เลี้ยงและปศุสัตว์. 2 ed. กรุงเทพฯ: สามลดา; 2554.
10. Gabaj MM, Beesley WN, Awan MA. Lice of farm animals in Libya. *Med Vet Entomol.* 1993;7(2):138-40.
11. Kho KL, Koh FX, Jaafar T, Nizam QN, Tay ST. Prevalence and molecular heterogeneity of *Bartonella bovis* in cattle and *Haemaphysalis bispinosa* ticks in Peninsular Malaysia. *BMC Vet Res.* 2015;11:153.
12. Welc-Faleciak R, Grono K. The first cases of *Bartonella bovis* infection in cattle from Central Europe. *Vet Microbiol.* 2013;162(2-4):954-6.
13. Martini M, Menandro ML, Mondin A, Pasotto D, Mazzariol S, Lauzi S, et al. Detection of *Bartonella bovis* in a cattle herd in Italy. *Vet Rec.* 2008;162(2):58-9.
14. Raoult D, La Scola B, Kelly PJ, Davoust B, Gomez J. *Bartonella bovis* in cattle in Africa. *Vet Microbiol.* 2005;105(2):155-6.
15. Saisongkorh W, Rolain JM, Suputtamongkol Y, Raoult D. Emerging *Bartonella* in humans and animals in Asia and Australia. *J Med Assoc Thai.* 2009;92(5):707-31.

16. Bermond D, Boulouis HJ, Heller R, Van Laere G, Monteil H, Chomel BB, et al. *Bartonella bovis* Bermond et al. sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002;52(Pt 2):383-90.
17. Cherry NA, Maggi RG, Cannedy AL, Breitschwerdt EB. PCR detection of *Bartonella bovis* and *Bartonella henselae* in the blood of beef cattle. *Vet Microbiol*. 2009;135(3-4):308-12.
18. Bai Y, Malania L, Alvarez Castillo D, Moran D, Boonmar S, Chanlun A, et al. Global distribution of *Bartonella* infections in domestic bovine and characterization of *Bartonella bovis* strains using multi-locus sequence typing. *PLoS One*. 2013;8(11):e80894.
19. Breitschwerdt EB, Sontakke S, Cannedy A, Hancock SI, Bradley JM. Infection with *Bartonella weissii* and detection of *Nanobacterium* antigens in a North Carolina beef herd. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):879-82.
20. Tsai YL, Chang CC, Chuang ST, Chomel BB. *Bartonella* species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2011;34(4):299-314.
21. Tsai YL, Chomel BB, Chang CC, Kass PH, Conrad PA, Chuang ST. *Bartonella* and *Babesia* infections in cattle and their ticks in Taiwan. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2011;34(2):179-87.
22. Maillard R, Petit E, Chomel B, Lacroux C, Schelcher F, Vayssier-Taussat M, et al. Endocarditis in cattle caused by *Bartonella bovis*. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(9):1383-5.
23. Erol E, Jackson C, Bai Y, Sells S, Locke S, Kosoy M. *Bartonella bovis* isolated from a cow with endocarditis. *J Vet Diagn Invest*. 2013;25(2):288-90.
24. Durden LA, Ellis BA, Banks CW, Crowe JD, Oliver JH, Jr. Ectoparasites of gray squirrels in two different habitats and screening of selected ectoparasites for bartonellae. *J Parasitol*. 2004;90(3):485-9.
25. Nelder MP, Reeves WK, Adler PH, Wozniak A, Wills W. Ectoparasites and associated pathogens of free-roaming and captive animals in zoos of South Carolina. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2009;9(5):469-77.
26. Chung CY, Kasten RW, Paff SM, Van Horn BA, Vayssier-Taussat M, Boulouis HJ, et al. *Bartonella* spp. DNA associated with biting flies from California. *Emerg Infect Dis*.

2004;10(7):1311-3.

27. Halos L, Jamal T, Maillard R, Girard B, Guillot J, Chomel B, et al. Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of Bartonella spp. infecting wild and domestic ruminants. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(10):6302-5.

28. Gutierrez R, Cohen L, Morick D, Mumcuoglu KY, Harrus S, Gottlieb Y. Identification of different Bartonella species in the cattle tail louse (*Haematopinus quadripertusus*) and in cattle blood. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(17):5477-83.

29. Leulmi H, Socolovschi C, Laudoisot A, Houemenou G, Davoust B, Bitam I, et al. Detection of Rickettsia felis, Rickettsia typhi, Bartonella Species and Yersinia pestis in Fleas (Siphonaptera) from Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(10):e3152.

30. Kumsa B, Parola P, Raoult D, Socolovschi C. Molecular detection of Rickettsia felis and Bartonella henselae in dog and cat fleas in Central Oromia, Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(3):457-62.

31. Brouqui P, Raoult D. Arthropod-borne diseases in homeless. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1078:223-35.

32. Brouqui P, Stein A, Dupont HT, Gallian P, Badiaga S, Rolain JM, et al. Ectoparasitism and vector-borne diseases in 930 homeless people from Marseilles. *Medicine (Baltimore).* 2005;84(1):61-8.

33. Pickard AL, McDaniel P, Miller RS, Uthaimongkol N, Buathong N, Murray CK, et al. A study of febrile illnesses on the Thai-Myanmar border: predictive factors of rickettsioses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2004;35(3):657-63.

34. Phatharodom P, Limsrichamren S, Kaewwinud J, Chayakulkeeree M. Murine typhus in a liver transplant recipient: report of a first case. *Transpl Infect Dis.* 2015;17(4):574-8.

35. Kernif T, Socolovschi C, Wells K, Lakim MB, Inthalad S, Slesak G, et al. Bartonella and Rickettsia in arthropods from the Lao PDR and from Borneo, Malaysia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012;35(1):51-7.

36. Hornok S, Hofmann-Lehmann R, de Mera IG, Meli ML, Elek V, Hajtos I, et al. Survey on blood-sucking lice (Phthiraptera: Anoplura) of ruminants and pigs with molecular detection of Anaplasma and Rickettsia spp. *Vet Parasitol.* 2010;174(3-4):355-8.

37. Kumsa B, Socolovschi C, Parola P, Rolain JM, Raoult D. Molecular detection of *Acinetobacter* species in lice and keds of domestic animals in Oromia Regional State, Ethiopia. *PLoS One*. 2012;7(12):e52377.
38. C J. Lice infestations on cattle 2018 [updated 4 July 2018; cited 2018 28 September]. Available from: <https://www.agric.wa.gov.au/livestock-parasites/lice-infestations-cattle>.
39. Ko CJ, Elston DM. Pediculosis. *J Am Acad Dermatol*. 2004;50(1):1-12; quiz 3-4.
40. Boutellis A, Veracx A, Angelakis E, Diatta G, Mediannikov O, Trape JF, et al. *Bartonella quintana* in head lice from Senegal. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(7):564-7.
41. Sasaki T, Poudel SK, Isawa H, Hayashi T, Seki N, Tomita T, et al. First molecular evidence of *Bartonella quintana* in *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae), collected from Nepalese children. *J Med Entomol*. 2006;43(1):110-2.
42. Angelakis E, Rolain JM, Raoult D, Brouqui P. *Bartonella quintana* in head louse nits. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;62(2):244-6.
43. Bonilla DL, Kabeya H, Henn J, Kramer VL, Kosoy MY. *Bartonella quintana* in body lice and head lice from homeless persons, San Francisco, California, USA. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(6):912-5.
44. La Scola B, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(9):1671-3.
45. Sunantaraporn S, Sanprasert V, Pengsakul T, Phumee A, Boonserm R, Tawatsin A, et al. Molecular survey of the head louse *Pediculus humanus capitis* in Thailand and its potential role for transmitting *Acinetobacter* spp. *Parasit Vectors*. 2015;8:127.
46. Louni M, Mana N, Bitam I, Dahmani M, Parola P, Fenollar F, et al. Body lice of homeless people reveal the presence of several emerging bacterial pathogens in northern Algeria. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(4):e0006397.
47. Zouari S, Khrouf F, M'Ghirbi Y, Bouattour A. First molecular detection and characterization of zoonotic *Bartonella* species in fleas infesting domestic animals in Tunisia. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):436.
48. Linsuwanon P, Krairojananan P, Rodkvamtook W, Leepitakrat S, Davidson S, Wanja E. Surveillance for Scrub Typhus, Rickettsial Diseases, and Leptospirosis in US and

Multinational Military Training Exercise Cobra Gold Sites in Thailand. *US Army Med Dep J.* 2018(1-18):29-39.

49. Graczyk TK, Knight R, Tamang L. Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):128-32.

50. Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL. Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J Hosp Infect.* 1999;42(3):201-4.

51. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2819-25.

52. Kempf M, Abdissa A, Diatta G, Trape JF, Angelakis E, Mediannikov O, et al. Detection of *Acinetobacter baumannii* in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *Int J Infect Dis.* 2012;16(9):e680-3.

53. Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(1):16-25.

54. Siamer S, Dehio C. New insights into the role of *Bartonella* effector proteins in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2015;23:80-5.

55. Sahni A, Fang R, Sahni SK, Walker DH. Pathogenesis of Rickettsial Diseases: Pathogenic and Immune Mechanisms of an Endotheliotropic Infection. *Annu Rev Pathol.* 2019;14:127-52.

56. Lee JK, Stokes JV, Moraru GM, Harper AB, Smith CL, Wills RW, et al. Transmission of *Amblyomma maculatum*-Associated *Rickettsia* spp. During Cofeeding on Cattle. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2018;18(10):511-8.

57. Furman DPC, E.P. *Manual of Medical Entomology.* 4 ed. Cambridge, UK: Cambridge University; 1982.

58. Price MAG, O.H. . *Chewing and Sucking Lice as Parasites of Mammals and Birds.* US Dept of Agriculture, Agricultural Research Service. 1849;1849.

59. Wang Y, Engel MS, Rafael JA, Dang K, Wu H, Wang Y, et al. A unique box in 28S rRNA is shared by the enigmatic insect order Zoraptera and Dictyoptera. *PLoS One.* 2013;8(1):e53679.

60. Yoshizawa K, Johnson KP. How stable is the "Polyphyly of Lice" hypothesis

(Insecta: Psocodea): a comparison of phylogenetic signal in multiple genes. *Mol Phylogenet Evol.* 2010;55(3):939-51.

61. Sangvaranond A. Studies on lice of domesticated cattle and buffaloes in Thailand. *J Thai Vet Med.* 1988(39):165-74.

62. Changbunjong T, Buddhirongawatr R, Suwanpakdee S, Siengsanon J, Yongyuttawichai P, Cheewajorn K, et al. A survey of ectoparasitic arthropods on domestic animals in Tak Province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009;40(3):435-42.

63. Light JE, Smith VS, Allen JM, Durden LA, Reed DL. Evolutionary history of mammalian sucking lice (Phthiraptera: Anoplura). *BMC Evol Biol.* 2010;10:292.

64. Barker S, Whiting M, P. Johnson K, Murrell A. Phylogeny of the lice (Insecta, Phthiraptera) inferred from small subunit rRNA2003. 407-14 p.

65. Kosoy M, Hayman DT, Chan KS. Bartonella bacteria in nature: where does population variability end and a species start? *Infect Genet Evol.* 2012;12(5):894-904.

66. Cheslock MA, Embers ME. Human Bartonellosis: An Underappreciated Public Health Problem? *Trop Med Infect Dis.* 2019;4(2).

67. Pulliainen AT, Dehio C. Persistence of Bartonella spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(3):563-99.

68. Seki N, Kasai S, Saito N, Komagata O, Mihara M, Sasaki T, et al. Quantitative analysis of proliferation and excretion of Bartonella quintana in body lice, Pediculus humanus L. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(3):562-6.

69. Jiyipong T, Jittapalapong S, Morand S, Raoult D, Rolain JM. Prevalence and genetic diversity of Bartonella spp. in small mammals from Southeastern Asia. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(23):8463-6.

70. Watt G, Pachirat O, Baggett HC, Maloney SA, Lulitanond V, Raoult D, et al. Infective endocarditis in northeastern Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(3):473-6.

71. Kosoy M, Bai Y, Sheff K, Morway C, Baggett H, Maloney SA, et al. Identification of Bartonella infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(6):1140-5.

72. Maillard R, Grimard B, Chastant-Maillard S, Chomel B, Delcroix T, Gandoin C, et

al. Effects of cow age and pregnancy on Bartonella infection in a herd of dairy cattle. J Clin Microbiol. 2006;44(1):42-6.

73. Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Heller RM, Kocan KM, Ueno H, et al. Bartonella spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. Emerg Infect Dis. 2000;6(3):306-11.



ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อสำเร็จรูป (Invisorb[®] Spin Tissue Mini kit, เยอรมนี)

Lysis buffer G

Binding buffer A

Proteinase K

Wash buffer

Elution buffer

2. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two, เยอรมนี)

Solution A

Solution B

Solution C

Wash solution

Elution buffer

3. ชุดสารเคมีสำหรับเชื่อมดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับเวกเตอร์ (DNA ligation)

2X Rapid ligation buffer

pGEM[®] - Teasy vector

T4 DNA ligase

4. ชุดสารเคมีสำหรับการทำ PCR

10X *Taq* buffer

25mM MgCl₂

2.5mM dNTPs

Taq DNA polymerase

5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-bertani (LB agar) ปริมาตร 1,000 ml

Bacto-tryptone	10 g
Yeast extracts	5 g
1M NaCl	10 g
Agar	15 g

วิธีเตรียม ชั่งสารทั้งหมดและใส่ลงในขวดแก้วขนาด 1,000 ml สำหรับเตรียมสาร (ยกเว้น Agar จะใส่ทีหลัง) จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรใกล้เคียงตามที่ต้องการและทำการเขย่าให้สารละลายทั้งหมดเมื่อสารในขวดละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด ปรับ pH ให้ได้ค่าเท่ากับ 7.0 จากนั้นเติม Agar ที่ชั่งไว้ และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1,000 ml แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Auto clave ที่อุณหภูมิ 121°C เมื่อนึ่งเสร็จให้นำมาวางที่อุณหภูมิห้องรอให้อุณหภูมิลดลงต่ำกว่า 60°C จากนั้นเติมยา ampicillin (ความเข้มข้น 100 mg/μl) ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงจานสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อให้มีความหนาพอประมาณและทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เมื่อเทเสร็จวางที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็งตัวดี นำไปอบในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้งดี จากนั้นพันจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Parafilm และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เพื่อรอนำไปใช้งาน

ส่วนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว (LB broth) สามารถเตรียมได้โดยใช้ขั้นตอนเดียวกัน แต่ไม่ต้องเติม Agar และหลังจากนำไปนึ่งฆ่าเชื้อให้อุณหภูมิลดลงแล้วนำเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ได้ทันที เมื่อนำไปใช้งานให้เติมยา ampicillin ภายหลัง

6. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย SOB ปริมาตร 100 ml

0.5% Yeast extracts	0.5 g
2% Bacto-tryptone	2 g
1M NaCl	1,000 μl
1M KCl	250 μl
2M Mg ²⁺ stock	1,000 μl

วิธีเตรียม ชั่งและดวงสารทั้งหมดลงในขวดแก้วปริมาตร 100 ml เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.0 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Auto clave จากนั้นเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4°C

7. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC ปริมาตร 10 ml

SOB	10 ml
2M Glucose	100 µl

วิธีเตรียม ดวงสารละลายทั้งหมด ลงในหลอดพลาสติกขนาด 15 ml และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4°C

8. การเตรียมสารละลาย NaCl ปริมาตร 20 ml

1M NaCl	1.1688 g
---------	----------

วิธีเตรียม ชั่งสารใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 50 ml และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ครบปริมาตร 20 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการกรองโดยใช้ Sterilized filter แล้วเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4°C

9. การเตรียมสารละลาย 1M KCl ปริมาตร 20 ml

1M KCl	1.491 g
--------	---------

วิธีเตรียม ชั่งสารใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 50 ml และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ครบปริมาตร 20 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการกรองโดยใช้ Sterilized filter แล้วเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4°C

10. การเตรียมสารละลาย 2M Mg²⁺ stock ปริมาตร 20 ml

$Mg^{2+} = MgSO_4 + MgCl_2$	
1M MgSO ₄	4.930 g
1M MgCl ₂	4.066 g

วิธีเตรียม ชั่งสารใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 50 ml และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ครบ ปริมาตร 20 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการกรองโดยใช้ Sterilized filter แล้วเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4°C

11. การเตรียมสารละลาย 2M Glucose ปริมาตร 10 ml

Glucose (D - glucose) 3.6 g

วิธีเตรียม ชั่งกลูโคสใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 15 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ ปริมาตร 10 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และกรองด้วย Sterilized filter แล้วเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4°C

12. การเตรียมยา Ampicillin ความเข้มข้น 100 mg/μl

Ampicillin 1 g

วิธีเตรียม ทำการเตรียมภายในตู้ Fume Hood ปลอดภัย โดยละลายยาในขวดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้เข็มฉีดยา เมื่อยาละลายดีแล้วให้เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 10 ml แล้วผสมให้เข้ากันอีกครั้ง จากนั้นกรองด้วย Sterilized filter แล้วแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ท่อด้วยฟลอปยด์และเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20°C

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

13. การเตรียมสารละลาย 10X TAE buffer ปริมาตร 1,000 ml

Tris base 48.4 g

EDTA 3.7 g

Glacial acetic acid 11.4 ml

วิธีเตรียม ชั่งสาร Tris base และ EDTA ใส่ในขวดแก้ว ขนาด 1,000 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม Glacial acetic acid ทำภายในตู้ Fume Hood และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Auto clave และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาใช้งานจะทำ

การเจือจางเป็น 1X TAE buffer โดยนำสารละลาย 10X TAE buffer ปริมาตร 100 ml เจือจางในน้ำกลั่นปริมาตร 900 ml ในขวดแก้ว

14. การเตรียมสารละลาย X-gal ความเข้มข้น 20 mg/ml

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside	0.2 g
Dimethylformamide (DMF)	10 ml

วิธีเตรียม ชั่ง X-gal ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 15 ml ละลายด้วย DMF ให้ครบปริมาตร 10 ml และแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ห่อด้วยฟลอยด์ แล้วเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20°C

15. การเตรียมสารละลาย 1M IPTG

Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside	2.38 g
--	--------

วิธีเตรียม ชั่งสารใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 15 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับให้ได้ปริมาตร 10 ml จากนั้นกรองด้วย Sterilized filter แล้วแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ห่อด้วยฟลอยด์และเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20°C

16. การเตรียมสารละลาย TB (Transformation Buffer) ปริมาตร 100 ml

10mM HEPES	0.2383 g
15mM CaCl_2	0.1665 g
250mM KCl	1.8637 g
55mM MnCl_2	1.0880 g

วิธีเตรียม ชั่งสารทั้งหมดใส่ในขวดแก้ว ขนาด 100 ml (ยกเว้น MnCl_2 จะเติมทีหลัง) ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปปรับ pH ให้ได้ค่าเท่ากับ 6.7 แล้วจึงใส่ MnCl_2 ที่ชั่งไว้ เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 100 ml จากนั้นทำการเขย่าให้สารละลายผสมกันดี และทำการกรองแบ่งใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 50 ml โดยใช้ Sterilized filter เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4°C

17. การเตรียม Competent cell จากแบคทีเรีย *E. coli*

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

LB agar plate (ไม่ใส่ยา Ampicillin)

SOC

TB solution

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

วิธีเตรียม

1. นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ไม่ใส่ยา Ampicillin เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ บ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
2. ทำการเลี้ยงเซลล์ starter โดยเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 1 โคโลนี ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงใน SOC ปริมาตร 4 ml โดยเลี้ยงในหลอดขนาด 15 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C ในเครื่องเขย่า โดยเขย่าด้วยความเร็ว 170 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
3. เตรียมขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 ml ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการแบ่งเซลล์ starter ปริมาตร 500 μ l มาเลี้ยงใน SOC ปริมาตร 100 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 17 $^{\circ}$ C ในเครื่องเขย่า โดยเขย่าด้วยความเร็ว 170 rpm เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง คอยสังเกตความขุ่น หากอาหารเลี้ยงเชื้อยังสามารถปรับความเร็วในการเขย่าเป็น 180-200 rpm และปรับอุณหภูมิเป็น 18-19 $^{\circ}$ C ได้
4. วัดค่า Optical Density (OD) ให้ได้ค่าประมาณ 0.4-0.6 ซึ่งจะใช้เวลาในการบ่มประมาณ 1-2 วัน
5. เมื่อได้ค่า OD ที่ต้องการ ให้นำเซลล์มาแบ่งใส่หลอดพลาสติก ขนาด 50 ml จำนวน 2 หลอด แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 8 นาที เมื่อครบเวลาให้นำออกวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งด้วยความเร็วเก็บตะกอนของเซลล์ไว้
6. เติมสารละลาย TB ปริมาตร 16 ml ลงในหลอดที่มีตะกอนเซลล์และผสมกันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ อย่างรวดเร็วเพื่อให้เซลล์กระจายตัว จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 8 นาที เมื่อครบเวลาให้เทสารละลายทิ้ง
7. เติมสารละลาย TB ปริมาตร 4 ml และผสมกันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ อย่างรวดเร็วเพื่อให้เซลล์กระจายตัว
8. เติมสารละลาย DMSO ปริมาตร 280 μ l ใช้ปิเปตคนเบา ๆ แล้วแบ่งเซลล์ที่ได้ใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 200 μ l เก็บรักษาที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -80 $^{\circ}$ C

หมายเหตุ: ขั้นตอนที่ 5 – 8 ต้องเตรียมบนน้ำแข็งตลอดเวลา ทำอย่างเบามือและรวดเร็ว

ภาคผนวก ข
ข้อมูลตัวอย่างและผลการวิจัย

ตารางที่ 22 ข้อมูลตัวอย่างเหาโคและรหัสนี้ขึ้นทะเบียนใน 18S rRNA ทั้งหมด 109 ตัวอย่าง

Code	Stage	Organism	Province	Accession no.
CL1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Nakhon Ratchasima	MK734185
CL2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Nakhon Ratchasima	MK734186
CL3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Nakhon Ratchasima	MK734187
CR1	Adult	<i>Haematopinus sp.</i>	Chiang Rai	MK734188
CR2	Adult	<i>Haematopinus sp.</i>	Chiang Rai	MK734189
CR3	Adult	<i>Haematopinus sp.</i>	Chiang Rai	MK734190
CR4	Adult	<i>Haematopinus sp.</i>	Chiang Rai	MK734191
CR5	Adult	<i>Haematopinus sp.</i>	Chiang Rai	MK734192
CR6	Adult	<i>Haematopinus sp.</i>	Chiang Rai	MK734193
CR7	Adult	<i>Haematopinus sp.</i>	Chiang Rai	MK734194
PS1-1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734195
PS1-2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734196
PS1-3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734197
PS1-4	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734198
PS1-5	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734199
PS1-6	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734200
PS1-7	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734201
PS1-8	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734202
PS1-9	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734203
PS1-10	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734204
PS2-1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734205
PS2-2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734206
PS2-3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734207
PS2-4	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734208
PS2-5	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734209
PS2-6	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734210
PS2-7	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734211
PS2-8	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734212
PS2-9	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734213
PS2-10	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734214
PS2-11	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734215

PS3-1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734216
PS3-2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734217
PS3-3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734218
PS3-4	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734219
PS3-5	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734220
PS3-6	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734221
HE1-1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734222
HE1-2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734223
HE1-3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734224
HE2-1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734225
HE2-2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734226
HE2-3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734227
HE2-4	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734228
HE2-5	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734229
HE2-6	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734230
HE2-7	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734231
HE3-1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734232
HE3-2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734233
HE3-3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734234
HE4-1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734235
HE4-2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734236
HE4-3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734237
HE4-4	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734238
HE4-5	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734239
HE4-6	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734240
HK1-1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734241
HK1-2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734242
HK1-3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734243
HK1-4	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734244
HK1-5	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734245
HK1-6	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734246
HK1-7	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734247
HK1-8	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734248
HK1-9	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734249
HK1-10	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734250
HK1-11	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734251
HK2-1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734252

HK2-2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734253
HK2-3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734254
HK2-4	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734255
HK2-5	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734256
HK2-6	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734257
HK2-7	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734258
HK2-8	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734259
HK2-9	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734260
HK2-10	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734261
HK2-11	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734262
HK2-12	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734263
HK2-13	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734264
HK2-14	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734265
HK3-1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734266
HK3-2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734267
HK3-3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734268
HK3-4	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734269
HK3-5	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734270
HK3-6	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734271
HK3-7	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734272
HK3-8	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734273
HK3-9	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734274
HK3-10	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734275
HK3-11	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734276
HK3-12	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734277
HK4-1	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734278
HK4-2	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734279
HK4-3	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734280
HK4-4	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734281
HK4-5	Adult	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734282
HEE1-1	Egg	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734283
HEE1-2	Egg	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734284
HEE1-3	Egg	<i>Haematopinus sp.</i>	Chiang Mai	MK734285
HEE1-4	Egg	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734286
HEE1-5	Egg	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734287
HEE1-6	Egg	<i>Haematopinus sp.</i>	Chiang Mai	MK734288
HKE4-1	Egg	<i>Haematopinus sp.</i>	Chiang Mai	MK734289

HKE4-2	Egg	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734290
HKE4-3	Egg	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734291
HKE4-4	Egg	<i>Haematopinus quadripertusus</i>	Chiang Mai	MK734292
HKE4-5	Egg	<i>Haematopinus</i> sp.	Chiang Mai	MK734293

ตารางที่ 23 ข้อมูลตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. และรหัสขึ้นทะเบียนยีน *gltA* ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง

Code	Stage	Host	Organism	Province	Accession no.
CL1	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Nakhon Ratchasima	MK748474
CL2	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Nakhon Ratchasima	MK748475
CL3	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Nakhon Ratchasima	MK748476
CR3	Adult	<i>Haematopinus</i> sp.	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Rai	MK748477
CR5	Adult	<i>Haematopinus</i> sp.	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Rai	MK748478
PS1-4	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748479
PS1-6	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748480
PS2-4	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748481
HE1-1	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748482
HE2-4	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748483
HE2-7	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748484
HE3-3	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748485
HE4-1	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748486
HE4-2	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748487
HE4-4	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748488
HK1-6	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748489
HK1-7	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748490
HK1-8	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748491
HK1-9	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748492
HK4-1	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748493
HK2-2	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748494
HK2-3	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748495
HEE1-1	Egg	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748496
HEE1-5	Egg	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748497
HKE4-1	Egg	<i>Haematopinus</i> sp.	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK748498

ตารางที่ 24 ข้อมูลตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. และรหัสขึ้นทะเบียน *rpoB* ทั้งหมด
25 ตัวอย่าง

Code	Stage	Host	Organism	Province	Accession no.
CL1	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Nakhon Ratchasima	MK762880
CL2	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Nakhon Ratchasima	MK762881
CL3	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Nakhon Ratchasima	MK762882
CR3	Adult	<i>Haematopinus</i> sp.	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Rai	MK762883
CR5	Adult	<i>Haematopinus</i> sp.	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Rai	MK762884
PS1-4	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762885
PS1-6	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762886
PS2-4	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762887
HE1-1	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762888
HE2-4	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762889
HE2-7	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762890
HE3-3	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762891
HE4-1	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762892
HE4-2	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762893
HE4-4	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762894
HK1-6	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762895
HK1-7	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762896
HK1-8	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762897
HK1-9	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762898
HK4-1	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762899
HK2-2	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762900
HK2-3	Adult	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762901
HEE1-1	Egg	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762902
HEE1-5	Egg	<i>H. quadripertusus</i>	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762903
HKE4-1	Egg	<i>Haematopinus</i> sp.	<i>Uncultured bartonella</i> sp.	Chiang Mai	MK762904

ภาคผนวก ค

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ



Article

The Prevalence of *Bartonella* Bacteria in Cattle Lice Collected from Three Provinces of Thailand

Chulaluk Promrangsee ¹, Pathamet Khositharattanakool ², Puckavadee Somwang ², Sakone Sunantaraporn ³, Atchara Phumee ^{4,5}, Kanok Preativatanyou ⁴, Apiwat Tawatsin ⁴, Narisa Brownell ⁴ and Padet Siriyasatien ^{4*}

- ¹ Medical Parasitology Program, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; famezaflamingoclub@hotmail.com
- ² School of Medicine, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand; pathamet.kho@mfu.ac.th (P.K.); puckavadee.som@mfu.ac.th (P.S.)
- ³ Medical Science Program, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; narmspace_open@hotmail.com
- ⁴ Vector Biology and Vector Borne Disease Research Unit, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; amphumee@gmail.com (A.P.); junior_science@windowslive.com (K.P.); natnarisa@gmail.com (N.B.)
- ⁵ Thai Red Cross Emerging Infectious Diseases-Health Science Centre, World Health Organization Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses, Chulalongkorn Hospital, Bangkok 10330, Thailand
- ⁶ Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, National Institute of Health, Nonthaburi 11000, Thailand; atawatsin@gmail.com
- * Correspondence: padet.s@chula.ac.th; Tel.: +66-22564387

Received: 30 April 2019; Accepted: 23 May 2019; Published: 28 May 2019

Abstract: Cattle lice are obligatory blood-sucking parasites, which is the cause of animal health problems worldwide. Recently, several studies have revealed that pathogenic bacteria could be found in cattle lice, and it can act as a potential vector for transmitting louse-borne diseases. However, the cattle lice and their pathogenic bacteria in Thailand have never been evaluated. In the present study, we aim to determine the presence of bacterial pathogens in cattle lice collected from three localities of Thailand. Total genomic DNA was extracted from 109 cattle louse samples and the Polymerase Chain Reaction (PCR) of *18S rRNA* was developed to identify the cattle louse. Moreover, PCR was used for screening *Bartonella* spp., *Acinetobacter* spp., and *Rickettsia* spp. in cattle louse samples. The positive PCR products were cloned and sequenced. The phylogenetic tree based on the partial *18S rRNA* sequences demonstrated that cattle lice species in this study are classified into two groups according to reference sequences; *Haematopinus quadripertusus* and *Haematopinus* spp. closely related to *H. tuberculatus*. The pathogen detection revealed that *Bartonella* spp. DNA of *gltA* and *rpoB* were detected in 25 of 109 samples (22.93%) both egg and adult stages, whereas *Acinetobacter* spp. and *Rickettsia* spp. were not detected in all cattle lice DNA samples. The *gltA* and *rpoB* sequences showed that the *Bartonella* spp. DNA was found in both *H. quadripertusus* and *Haematopinus* spp. closely related to *H. tuberculatus*. This study is the first report of the *Bartonella* spp. detected in cattle lice from Thailand. The finding obtained from this study could be used to determine whether the cattle lice can serve as a potential vector to transmit these pathogenic bacteria among cattle and may affect animal to human health.

Keywords: cattle louse; *Bartonella* spp.; *18S rRNA*; *gltA*; *rpoB*; Thailand

1. Introduction

Cattle lice are obligatory blood-sucking ectoparasites, which is an obstacle in the health and product performance of livestock [1]. Two major families of lice have been found on cattle; Haematopinidae family, including *Haematopinus eurysternus*, *H. quadripertusus*, *H. tuberculatus* and Linognathidae family; *Linognathus vituli* and *Solenopotes capillatus* [2]. Especially, the cattle tail blood-sucking louse, *H. quadripertusus*, is commonly found to infest on the cattle tail hair and is widespread in tropical and subtropical regions [3]. Lice infestation are a common cause of animal health and they can be responsible for economic losses by inducing pathophysiological changes in their hosts, including weight loss, skin infections and damage, loss of wool or hair due to scratching, and can cause mild to severe anemia [4]. In Thailand, the domestic cattle and buffaloes lice were reported in 18 provinces of central, eastern, northeastern and southern regions, which were identified as *H. eurysternus*, *H. quadripertusus* and *L. vituli* [5]. *S. capillatus* was first reported in Tak Province, Thailand by Changbunjong et al. (2009) [6]. The relevant information on pathogens in association with cattle lice, their hosts, geographic distribution, seasonality, and association with human or veterinary diseases is limited. Currently, several reports suggested that cattle lice are potentially vector of bacterial pathogens, including *Bartonella* spp. [7–9], *Acinetobacter* spp. [10], *Rickettsia* spp. [10,11], and *Coxiella burnetii* [11]. A study reported by Gutiérrez et al. (2014) demonstrated that *Bartonella* spp. infection in cattle lice; *H. quadripertusus*, and cattle blood from Israel. Moreover, *B. bovis* infection has been reported as a pathogen which causes endocarditis and bacteremia in cattle, and the *B. henselae* infection is the most common cause of cat scratch disease and presents systemic infection and with possible skin lesions in human [12]. The previous studies revealed that *Rickettsia* spp. were detected in *Linognathus* spp. and *H. eurysternus* from ruminants in Hungary [13,14]. Kumsa et al. (2012) showed that different *Acinetobacter* spp. could be found in *L. vituli* of cattle from the Oromia Regional State, Ethiopia [10]. *Acinetobacter* spp. in human head lice collected from school children in Thailand was also reported [15]. However, molecular techniques of cattle lice species and their pathogenic bacteria in Thailand have never been investigated. In this study, we demonstrated the use of molecular techniques for cattle lice species identification and detection of the potential bacterial pathogens in cattle louse samples collected from different areas of Thailand. Information obtained from the study provides fundamental data for the epidemiological study as well as the potential of cattle lice as a vector of zoonotic disease in Thailand.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of Lice from Beef Cattle

The study was approved by the animal research ethics committee of Chulalongkorn University Animal Care and Use Protocol (CU-ACUP), Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (No. 005/2562). A total of 109 cattle lice samples consisted of 98 adults and 11 eggs. The collections were conducted in three different areas of Thailand, including Chiang Rai, Chiang Mai, and Nakhon Ratchasima provinces. Lice were manually collected from the hair tail and around the face of each cow. All specimens were preserved and surface decontaminated in 70% ethanol and transported to the Vector Biology and Vector Borne Disease Research Unit, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. They were then classified to the genus level by morphological feature key [16,17].

2.2. DNA Extraction from Cattle Louse

Genomic DNA was extracted from individual cattle louse, as follows. First, the louse was washed once in 1 mL of sterile 1X phosphate-buffer saline (PBS) for 5 min for removing the 70% ethanol, and then an individual cattle louse of each sample was homogenized in 200 μ L of lysis buffer G and 20 μ L of proteinase K. The genomic DNA was extracted using a DNA extraction kit, Invisorb[®] spin tissue mini kit (STRATEC molecular GmbH, Berlin, Germany) following the manufacturer's instructions. Finally, the extracted cattle lice DNA was obtained in 50 μ L of elution buffer. The

genomic DNA was stored for long term at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use in Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification.

2.3. PCR for Cattle Louse Identification

Conventional PCR was used for amplifying *18S rRNA* of the cattle louse. Degenerate oligonucleotide primers were designed based on *18S rRNA* sequences of the cattle lice obtained from GenBank database (GenBank: KJ522491 for *H. quadripertusus*, GU569180 for *H. tuberculatus*, HM171381 for *H. eurysterunus*, and AY077774 for *Linognathus vituli*) as forward primer 5'-CCGCGAAAGGCTCATTAAATCAG-3', and the degenerate reverse primer sequences were 5'-CCTKCAATGGATACTCGTTAAATG-3'. The primers were synthesized by Bioneer Oligo Synthesis Report Company (Bioneer Corporation, Daejeon, Korea). PCR reaction was set up in the final volume of 25 μL containing approximately 50 ng/ μL of extracted DNA, 10 μM of each primer, 10X *Taq* buffer, 2.5 mM of dNTPs, 2.5 mM of MgCl_2 and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Thermo scientific, Waltham, MA, USA); double distilled water was as a negative control. PCR were performed under the following thermal cycling conditions: An initial denaturation step of $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min, followed by 35 cycles of $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, and $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1.30 min, with the final step of $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 min (Figure S1). The PCR amplicons were determined by 1.5% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide. The specific of PCR product were imaged under ultraviolet light with Quantity One Quantification Analysis Software version 4.5.2 (Gel DocEQ System; Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.4. Detection of Bacterial Pathogens in Cattle Louse DNA

The cattle lice DNA were used to detect bacterial pathogens by using the PCR assay. The PCRs were performed using previously reported primers targeting the *gltA* of *Bartonella* spp. [18], the *rpoB* of *Acinetobacter* spp. [19], and the *gltA* of *Rickettsia* spp. [20]. For the PCR reaction, 5 μL of DNA template was used in a total volume of 25 μL ; the reaction mixture contained 10X *Taq* buffer, 2.5 mM of dNTPs, 2.5 mM of MgCl_2 , 10 μM of each primer, and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Thermo scientific, Lithuania, EU). The PCR cycling conditions were as follows: Initial denaturation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min; 35 cycles of $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s, 57, 60, and $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ for *Bartonella* spp., *Acinetobacter* spp., and *Rickettsia* spp., for 30 s respectively, and $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min; and the final extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 min (Figure S2). Positive and negative controls were included in each experiment. The PCR amplicons were confirmed by gel electrophoresis described above for louse. In order to confirm the species of the *Bartonella* bacteria, all DNA samples were detected by using conventional PCR amplification targeting a 406 bp fragment of RNA polymerase (*rpoB*) gene [21].

2.5. DNA Cloning and Sequencing

The positive PCR products were ligated into pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) using T4 DNA ligase. The DNA ligation was transformed into *Escherichia coli* DH5 α and screened using the blue-white colony selection system. The suspected positive colonies were cultured, and the plasmid DNA contained with the insert gene was isolated using the Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Kit (STRATEC molecular GmbH, Berlin, Germany) following the manufacturer's instructions. Sequencing was performed by a commercial service in MACROGEN, Korea using a universal forward T7 primer.

2.6. Sequence Analysis and Phylogenetic Tree Construction

The nucleotide sequences were analyzed using the BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 [22]. The consensus sequences were analyzed by comparison with the nucleotide sequence in the GenBank database using BLAST search (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and all the nucleotide sequences from this study were submitted to the GenBank database. The phylogenetic trees were constructed using the maximum-likelihood method with IQ-TREE on the IQ-TREE web server (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) with 1000 ultrafast bootstrap replicates. The best-fit model of

substitution was found using the auto function on the IQ-TREE web server [23]. The phylogenetic tree was finally viewed and edited with the FigTree v1.4.4 software.

3. Results

3.1. Morphology and Molecular Identification of Cattle Lice

A total of 109 (11 eggs, 98 adults) cattle lice samples were collected from Chiang Mai (11 eggs, 88 adults), Chiang Rai (7 adults) and Nakhon Ratchasima (3 adults). The morphological characters to identify the species of adult stage cattle lice, showed *H. quadripertusus* ($n = 95$) and *Haematopinus* spp. ($n = 3$); whereas, the species of cattle louse egg was unable to be morphologically identified. The molecular technique, PCR based on the partial *18S rRNA* was developed to identify the cattle louse in Thailand. The portion of *18S rRNA* sequence was 745–746 bp. The results found 98 (7 eggs, 91 adults) samples clustered together with *H. quadripertusus* and 11 (4 eggs, 7 adults) samples of *Haematopinus* spp. closely related to *H. tuberculatus* with short branch lengths, which were identified by the phylogenetic tree base on the *18S rRNA*. (Table 1 and Figure 1). Sequence divergence was 0.2–2.9% between *H. quadripertusus* and *Haematopinus* spp. closely related to *H. tuberculatus* and 0.8–1.5% between *Haematopinus* spp. closely related to *H. tuberculatus* and *H. tuberculatus*. The nucleotide sequences of *18S rRNA* of cattle lice were submitted to the GenBank database, accession numbers MK734185–MK734293 (Table S1).

Table 1. Cattle lice samples collected from three different areas of Thailand.

Provinces	Sample No. (n)		Molecular identification of Cattle lice (<i>18S rRNA</i>)			
	Egg	Adult	<i>H. quadripertusus</i> (n)		<i>Haematopinus</i> spp. closely related to <i>H. tuberculatus</i> (n)	
			Egg	Adult	Egg	Adult
Chiang Mai	11	88	7	88	4	NA
Chiang Rai	NA	7	NA	NA	NA	7
Nakhon Ratchasima	NA	3	NA	3	NA	NA
Total	11	98	7	91	4	7
	109		98		11	

NA: Not available.

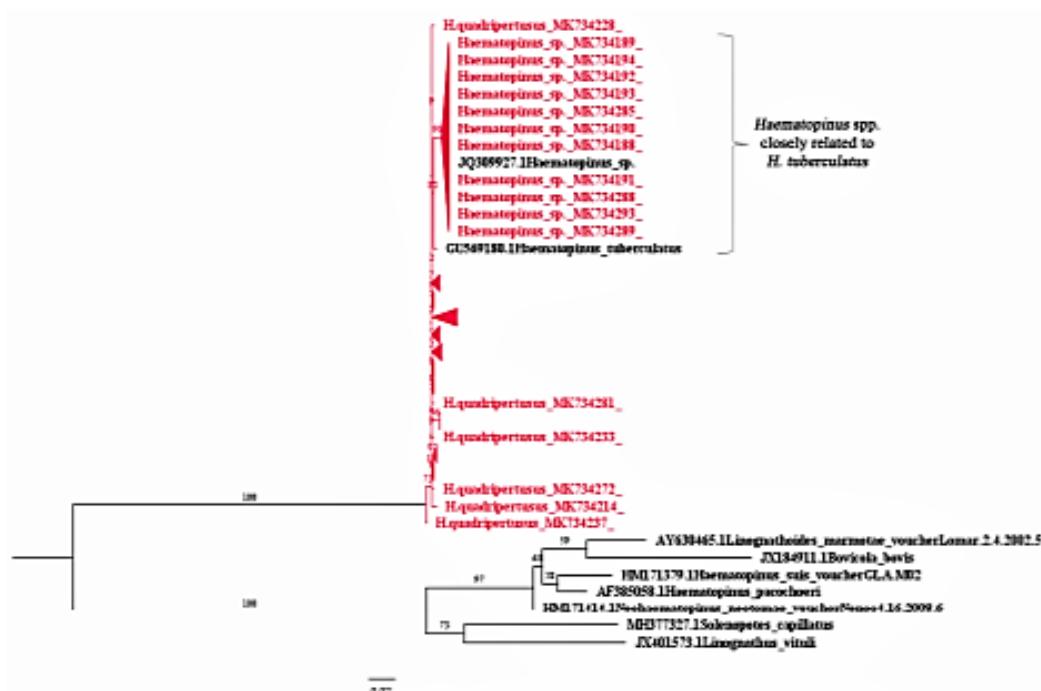


Figure 1. Phylogenetic tree of cattle lice constructed from partial 18S rRNA sequences. The maximum likelihood was constructed with IQ-TREE by using the maximum-likelihood method with 1000 ultrafast bootstrap replicates. The best-fit model of substitution was found using the auto function on the IQ-TREE web server. The sequences from this study are indicated with a red color.

3.2. Detection of Bacterial Pathogen in Eggs and Adults Cattle Louse

In this study, we investigated the PCR of all 109 cattle lice DNA for *Bartonella* spp., *Acinetobacter* spp. and *Rickettsia* spp. Only *Bartonella* spp. DNA was detected in 25 of 109 (22.93%) samples. The positive samples including three egg samples and 22 adult samples. *Bartonella* spp. DNA was detected by PCR targeting the *gltA* in 22 of 98 (22.45%) of *H. quadripertusus* collected from Chiang Mai (2 eggs, 17 adults) and Nakhon Ratchasima (3 adults). The *Haematopinus* spp. closely related to *H. tuberculatus* was detected in three of 11 (27.27%) *Bartonella* spp. DNA from Chiang Mai (one egg) and Chiang Rai (two adults). One hundred and nine of cattle lice were also confirmed by PCR using primers targeting a 406 bp fragment of the *rpoB*. The results showed 25 samples were positive for the *Bartonella* spp. DNA, which were the same samples positive for *gltA* (Table 2). The phylogenetic of *Bartonella* spp. of *gltA* (Figure 2A) and *rpoB* (Figure 2B) from cattle louse were closely related to the *B. bovis*. The partial nucleotide sequence of the *gltA* and *rpoB* obtained in this study was deposited in the GenBank under accession number: MK748474-MK748498 and MK762880-MK762904, respectively (Table S2).

Table 2. Molecular detection of *Bartonella* spp. DNA of *gltA* and *rpoB* from cattle lice samples collected from three different areas of Thailand.

Provinces	<i>H. quadripertusus</i> (n)		<i>Haematopinus</i> spp. closely related to <i>H. tuberculatus</i> (n)	
	Egg	Adult	Egg	Adult
Chiang Mai	2/7	17/88	1/4	NA
Chiang Rai	NA	NA	NA	2/7
Nakhon Ratchasima	NA	3/3	NA	NA
Total	2/7	20/91	1/4	2/7

Number: Positive/Total sample tested; NA: Not available.

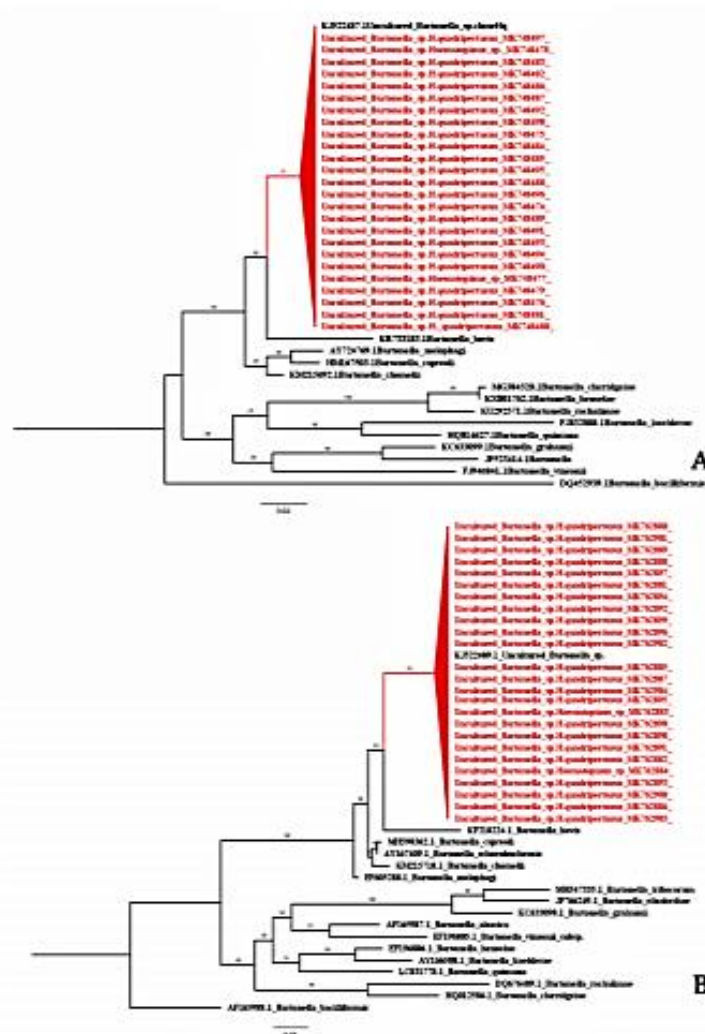


Figure 2. Phylogenetic tree of *Bartonella* spp. from cattle lice based on partial *gltA* (A) and *rpoB* (B) regions. The maximum likelihood was constructed with IQ-TREE by using the maximum-likelihood method with 1000 ultrafast bootstrap replicates. The best-fit model of substitution was found using the auto function on the IQ-TREE web server. The sequences from this study are indicated with a red color.

4. Discussion

In Thailand, the identification of cattle louse is based on morphological characters. The precise identification depends on various factors such as stage of the louse samples and the experience of entomologist. Adult stages can be identified more accurately by morphology. However, it may lead to misidentification in case of immature stages such as eggs and nymphs of the cattle lice. As previously mentioned, the identification of cattle lice in Thailand has been based only on morphological characters which could be quite problematic. In order to solve this problem, we demonstrated the use of *18S rRNA*-PCR to identify the cattle lice species. To the best of our knowledge, this is the first molecular identification of cattle lice in Thailand. The phylogenetic analysis of *18S rRNA* sequence of cattle louse revealed that *H. quadripertusus* was similar to the *H. quadripertusus* from Israel (Accession no. KJ522491) [12]. The *Haematopinus* spp. in this study showed similar to *Haematopinus* sp. NKU-011 from China (Accession no. JQ309927) [24] and clustered together with *H. tuberculatus* from Japan (Accession no. GU569180) [25]. Thereby, we assumed that the *Haematopinus* spp. in this study were *Haematopinus* spp. closely related to *H. tuberculatus*. The previous studies of domestic cattle and buffaloes lice in Thailand reported that *H. eurysternus*, *H. quadripertusus*, *L. vituli*, and *S. capillatus* were found by using taxonomic identification [5,6]. This preliminary study of phylogenetic tree of 109 cattle louse samples in three regions of Thailand revealed the genetic diversity among the louse samples. However, according to the limitation of information on the molecular evolution as well as sequences data for cattle lice in Thailand, we are not able to compare our results with other studies within the country. Several studies described that both mitochondrial (Cytochrome C oxidase subunit I: *COI*) [26] and nuclear genes (*18S rRNA* and *EF-1 α*) [10,26] have been used to study the genetic diversity among cattle lice species. In this present study, the *18S rRNA* was selected because this gene has been previously used as an effective tool to demonstrate the evolution [26] and phylogeny of sucking lice [27]. Moreover, there are *18S rRNA* reference sequences of cattle lice available in GenBank more than other gene regions, which are also used for designing new primers in our study. As a result of this study, data of the *18S rRNA* sequences of the 109 cattle louse samples from Thailand are already deposited in the GenBank.

In order to determine whether pathogenic bacteria could be found in the cattle lice, we performed the PCR assays for *Bartonella* spp., *Acinetobacter* spp., and *Rickettsia* spp. detections. The results showed that *Acinetobacter* spp. and *Rickettsia* spp. DNA were not detected in this study. Interestingly, 25 of 109 *Bartonella* spp. DNA was detected by both primer sets which annealed specially to the *gltA* and *rpoB* genes. *Bartonella* spp. DNA was found in both *H. quadripertusus* and closely related to *H. tuberculatus*. The *gltA* and *rpoB* sequences of *Bartonella* spp. are closely related to uncultured *Bartonella* spp. clone Hq in the cattle tail louse, *H. quadripertusus* Accession no. KJ522487 and KJ522489 from Israeli dairy farms, respectively [12]. In addition, *gltA* and *rpoB* sequences of *Bartonella* spp. closely relate to the *B. bovis* strain I724598 from cattle blood in Malaysia (Accession no. KR733183) [28] and water buffalo blood in Thailand (Accession no. KF218224) [29]. The *Bartonella* bacteria are facultative intracellular bacteria that can be found in a wide range of mammalian and arthropods such as ticks, lice, fleas, and sand flies [30]. Cattle are currently claimed to be reservoirs of three *Bartonella* species including *B. bovis*, *B. schoenbuchensis*, and *B. chomelii*, however, none of these has been reported as causative agent in humans [31]. There are some reports that the infected arthropods could transmit *Bartonella* bacteria to human and other mammalian hosts such as *B. henselae* from cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and *B. quintana* from human body lice (*Pediculus humanus*) [32,33]. The prevalence of *Bartonella* spp. isolated from a large number of rodents and shrews blood were found in several countries in Southeast Asia including Lao PDR (11.9%), followed by Thailand (11%) and Cambodia (9.6%) [34]. In Thailand, many studies suggested the *Bartonella* spp. were detected in a febrile illness as well as endocarditis in patients and their potential animal reservoirs [35,36]. Bai et al. (2013) revealed that the *Bartonella* spp. was isolated from 10% (4/40) of the healthy cattle and *B. bovis* were cultured in 6.8% (7/103) from water buffaloes blood in Thailand [29]. However, data on cattle associated with the *Bartonella* infection in humans is still limited in Thailand. In the literature, high prevalence of *Bartonella* DNA and genotype diversity have been detected among arthropod vectors around the world. For example, the prevalence of *B. bovis* in cattle has

shown variability, with reports from Italy (24.2%) [37], France (59%) [38], and Poland (6.8%) [39]. In the United States, the *B. bovis* infection rates in cattle varied across the regions studied, being as high as 81–96% in California [7], 87.4% in North Carolina [40] and less pronounced in Georgia (47%) [41].

In terms of how these arthropods got infected with the bacterial pathogens remains unknown. Some authors suggested the possibility of either acquired infection from animal reservoirs or environmental contamination [10]. The bacterial pathogens could be transmitted among the arthropods through vertical transmission, mating, co-feeding, and fecal exposure. The finding of *Bartonella* spp. in both eggs and adult cattle lice in our study emphasized the possibility of vertical transmission of bacterial pathogen among these arthropods.

This is the first evidence of the discovery of the *Bartonella* spp. DNA in cattle lice in Thailand and detection of the *Bartonella* spp. DNA in eggs of the lice suggested that the vertical transmission of the bacteria in arthropods may occur. Despite the previous negative relation of cattle-associated *Bartonella* spp. causing diseases in human, there is still the feasibility that these bacteria might play a role in zoonotic infection among humans through the bite of blood-sucking insects in the ranch, or accidental contact with infected animals blood via skin abrasion. Further studies are needed to confirm the aforementioned hypothesis. Other blood-sucking arthropods in dairy farms should be targeted in future studies to clarify the potential role of these arthropods as the vectors in the life cycle of the cattle-associated *Bartonella* spp. Regarding the limitations of the study, the number of collected cattle lice were quite low in some regions of Thailand. This could be due to the increased use of insecticides in modern dairy farms to get rid of the cattle lice in order to keep the cattle healthy and hygienic.

5. Conclusions

Our findings demonstrated the first use of molecular techniques for the identification of cattle lice species and also showed that *Bartonella* species can be found in cattle lice collected from three regions of Thailand. Both *H. quadripertusus* and *Haematopinus* spp. closely related to *H. tuberculatus* could be the vectors of *Bartonella* spp. Further studies including extensive surveys and more precise studies of cattle lice covering more areas and larger sample sizes must be performed in order to understand the geographical distribution of cattle lice in the country. Moreover, the *Bartonella* spp. prevalence from cattle lice and cattle blood in other locations in Thailand should be investigated to determine the role of domestic animals as the potential sources for human and animal bartonellosis in Thailand.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1. Figure S1: 18S rRNA-PCRs for cattle louse identification; Figure S2: PCRs for *Bartonella* spp. Detection; Table S1: Accession numbers of DNA sequences deposited in GenBank for the 18S rRNA of cattle lice detected in this study; Table S2: Accession numbers of DNA sequences deposited in GenBank for the *gltA* and *rpoB* of *Bartonella* sp. detected in this study

Author Contributions: Conceptualization, P.S.; Methodology, C.P.; Software, C.P. and S.S.; Validation, P.S., C.P. and S.S.; Formal analysis, P.S.; Investigation, P.K., P.S.W., and A.T.; Resources, P.S.; Data curation, P.S., and K.P.; Writing—original draft preparation, C.P. and S.S.; Writing—review and editing, P.S., N.B. and A.P.; Visualization, P.S.; Supervision, P.S.; Project administration, C.P.; Funding acquisition, P.S.

Funding: This study was supported by the Rachadapisaek Sompote Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University (Grant No. RA 62/067).

Acknowledgments: We appreciated the staff of Vector Biology and Vector Borne Disease Research Unit, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand and School of Medicine, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Byford, R.L.; Craig, M.E.; Crosby, B.L. A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *J. Anim. Sci.* **1992**, *70*, 597–602.
2. Kumsa, B.; Bekele, S. Lice Infestation on Cattle in Endegagn District, Southern Ethiopia: Species Composition, Prevalence and Seasonal Pattern. *Bull. Anim. Health Prod. Afr.* **2008**, *56*, 213–222.
3. Durden, L.A.; Loyd, J.E. Lice (Phthiraptera). In *Medical and Veterinary Entomology*, 2nd ed.; Mullen, G.R., Durden, L.A., Eds.; Academic Press Ltd.: London, UK, 2009; pp. 59–82.
4. Taylor, M.A.; Coop, R.L.; Wall, R.L. Parasites of horses. In *Veterinary Parasitology*, 3rd ed.; Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., Eds.; Blackwell Publishing: Oxford, UK, 2007; pp. 259–315.
5. Sangvaranond, A. Studies on lice of domesticated cattle and buffaloes in Thailand. *J. Thai. Vet. Med. Assoc.* **1988**, *39*, 165–174.
6. Changbunjong, T.; Buddhirongawatr, R.; Suwanpakdee, S.; Siengsanana, J.; Yongyuttawichai, P.; Cheewajorn, K.; Jangjaras, J.; Sangloun, C.; Ratanakorn, P. A survey of ectoparasitic arthropods on domestic animals in Tak Province, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **2009**, *40*, 435–442.
7. Chang, C.C.; Chomel, B.B.; Kasten, R.W.; Heller, R.M.; Ueno, H.; Yamamoto, K.; Bleich, V.C.; Pierce, B.M.; Gonzales, B.J.; Swift, P.K.; et al. *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. *Emerg. Infect. Dis.* **2000**, *6*, 306–311.
8. Maillard, R.; Riegel, P.; Barrat, F.; Bouillin, C.; Thibault, D.; Gandoin, C.; Halos, L.; Demanche, C.; Alliot, A.; Guillot, J.; et al. *Bartonella chomelii* sp. nov., isolated from French domestic cattle (*Bos taurus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, *54*, 215–220.
9. Rolain, J.M.; Rousset, E.; La Scola, B.; Duquesnel, R.; Raoult, D. *Bartonella schoenbuchensis* isolated from the blood of a French cow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *990*, 236–238.
10. Kumsa, B.; Socolovschi, C.; Parola, P.; Rolain, J.M.; Raoult, D. Molecular detection of *Acinetobacter* species in lice and keds of domestic animals in Oromia Regional State, Ethiopia. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52377, doi:10.1371/journal.pone.0052377.
11. Reeves, W.K.; Szumlas, D.E.; Moriarity, J.R.; Loftis, A.D.; Abbassy, M.M.; Helmy, I.M.; Dasch, G.A. Louse-borne bacterial pathogens in lice (Phthiraptera) of rodents and cattle from Egypt. *J. Parasitol.* **2006**, *92*, 313–318.
12. Gutiérrez, R.; Cohen, L.; Morick, D.; Mumcuoglu, K.Y.; Harrus, S.; Gottlieb, Y. Identification of different *Bartonella* species in the cattle tail louse (*Haematopinus quadripertusus*) and in cattle blood. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 5477–5483.
13. Hornok, S.; de la Fuente, J.; Biro, N.; Fernandez de Mera, I.G.; Meli, M.L.; Elek, V.; Gönczi, E.; Meili, T.; Tánzos, B.; Farkas, R.; et al. First molecular evidence of *Anaplasma ovis* and *Rickettsia* spp. in keds (Diptera: Hippoboscidae) of sheep and wild ruminants. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* **2011**, *11*, 1319–1321.
14. Hornok, S.; Hofmann-Lehmann, R.; de Mera, I.G.; Meli, M.L.; Elek, V.; Hajtós, I.; Répási, A.; Gönczi, E.; Tánzos, B.; Farkas, R.; et al. Survey on blood-sucking lice (Phthiraptera: Anoplura) of ruminants and pigs with molecular detection of *Anaplasma* and *Rickettsia* spp. *Vet. Parasitol.* **2010**, *174*, 355–358.
15. Sunantaraporn, S.; Sanprasert, V.; Pengsakul, T.; Phumee, A.; Boonserm, R.; Tawatsin, A.; Thavara, U.; Siriyasatien, P. Molecular survey of the head louse *Pediculus humanus capitis* in Thailand and its potential role for transmitting *Acinetobacter* spp. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 127, doi:10.1186/s13071-015-0742-4.
16. Furman, D.P.; Catts, E.P. *Manual of Medical Entomology*, 4th ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1982.
17. Price, M.A.; Graham, O.H. *Cheewing and Sucking Lice as Parasites of Mammals and Birds*; U.S. Dept. of Agriculture, Agricultural Research Service: 1997; Volume 1849.
18. Norman, A.F.; Regnery, R.; Jameson, P.; Greene, C.; Krause, D.C. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33*, 1797–1803.
19. Kempf, M.; Abdissa, A.; Diatta, G.; Trape, J.F.; Angelakis, E.; Mediannikov, O.; La Scola, B.; Raoult, D. Detection of *Acinetobacter baumannii* in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *Int. J. Infect. Dis.* **2012**, *16*, e680–3.
20. Rolain, J.M.; Stuhl, L.; Maurin, M.; Raoult, D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by a quantitative PCR DNA assay. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2002**, *46*, 2747–2751.

21. Oksi, J.; Rantala, S.; Kilpinen, S.; Silvennoinen, R.; Vornanen, M.; Veikkolainen, V.; Eerola, E.; Pulliainen, A.T. Cat scratch disease caused by *Bartonella grahamii* in an immunocompromised patient. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 2781–2784.
22. Hall, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
23. Trifinopoulos, J.; Nguyen, L.T.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W232–W235, doi:10.1093/nar/gkw256.
24. Wang, Y.; Engel, M.S.; Rafael, J.A.; Dang, K.; Wu, H.; Wang, Y.; Xie, Q.; Bu, W. Correction: A Unique Box in 28S rRNA Is Shared by the Enigmatic Insect Order Zoraptera and Dictyoptera. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e53679, doi:10.1371/journal.pone.0053679.
25. Yoshizawa, K.; Johnson, K.P. How stable is the “Polyphyly of Lice” hypothesis (Insecta: Psocodea)? A comparison of phylogenetic signal in multiple genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2010**, *55*, 939–951, doi:10.1016/j.ympev.2010.02.026.
26. Light, J.E.; Smith, V.S.; Allen, J.M.; Durden, L.A.; Reed, D.L. Evolutionary history of mammalian sucking lice (Phthiraptera: Anoplura). *BMC Evol. Biol.* **2010**, *10*, 292, doi:10.1186/1471-2148-10-292.
27. Barker, S.C.; Whiting, M.; Johnson, K.P.; Murrell, A. Phylogeny of the lice (Insecta, Phthiraptera) inferred from small subunit rRNA. *Zool. Scripta* **2003**, *32*, 407–414.
28. Kho, K.L.; Koh, F.X.; Jaafar, T.; Nizam, Q.N.; Tay, S.T. Prevalence and molecular heterogeneity of *Bartonella bovis* in cattle and *Haemaphysalis bispinosa* ticks in Peninsular Malaysia. *BMC Vet. Res.* **2015**, *11*, 153, doi:10.1186/s12917-015-0470-1.
29. Bai, Y.; Malania, L.; Alvarez Castillo, D.; Moran, D.; Boonmar, S.; Chanlun, A.; Suksawat, F.; Maruyama, S.; Knobel, D.; Kosoy, M. Global distribution of *Bartonella* infections in domestic bovine and characterization of *Bartonella bovis* strains using multilocus sequence typing. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80894.
30. Kosoy, M.; Hayman, D.T.; Chan, K.S. *Bartonella* bacteria in nature: Where does population variability end and a species start? *Infect. Genet. Evol.* **2012**, *12*, 894–904.
31. Cheslock, M.A.; Embers, M.E. Human Bartonellosis: An Underappreciated Public Health Problem? *Trop. Med. Infect. Dis.* **2019**, *4*, 69.
32. Pulliainen, A.T.; Dehio, C. Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: From subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 563–599, doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00324.x.
33. Seki, N.; Kasai, S.; Saito, N.; Komagata, O.; Mihara, M.; Sasaki, T.; Tomita, T.; Sasaki, T.; Kobayashi, M. Quantitative analysis of proliferation and excretion of *Bartonella quintana* in body lice, *Pediculus humanus* L. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 562–566.
34. Jiyipong, T.; Jittapalpong, S.; Morand, S.; Raoult, D.; Rolain, J.M. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* spp. in small mammals from Southeastern Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 8463–8466, doi:10.1128/AEM.02008-12.
35. Watt, G.; Pachirat, O.; Baggett, H.; Maloney, S.; Lulitanond, V.; Raoult, D.; Bhengsi, S.; Thamthitawat, S.; Paupairoj, A.; Kosoy, M.; et al. Infective Endocarditis in Northeastern Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 473–476, doi:10.3201/eid2003.131059.
36. Kosoy, M.; Bai, Y.; Sheff, K.; Morway, C.; Baggett, H.; Maloney, S.A.; Boonmar, S.; Bhengsi, S.; Dowell, S.F.; Sittthirasdr, A.; et al. Identification of *Bartonella* infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *82*, 1140–1145, doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0778.
37. Martini, M.; Menandro, M.L.; Mondin, A.; Pasotto, D.; Mazzariol, S.; Lauzi, S.; Stelletta, C. Detection of *Bartonella bovis* in a cattle herd in Italy. *Vet. Rec.* **2008**, *162*, 58–59.
38. Maillard, R.; Grimard, B.; Chastant-Maillard, S.; Chomel, B.; Delcroix, T.; Gandoin, C.; Bouillin, C.; Halos, L.; Vayssier-Taussat, M.; Boulouis, H.J. Effects of cow age and pregnancy on *Bartonella* infection in a herd of dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 42–46.
39. Welc-Faleciak, R.; Grono, K. The first cases of *Bartonella bovis* infection in cattle from Central Europe. *Vet. Microbiol.* **2013**, *162*, 954–956.

40. Cherry, N.A.; Maggi, R.G.; Cannedy, A.L.; Breitschwerdt, E.B. PCR detection of *Bartonella bovis* and *Bartonella henselae* in the blood of beef cattle. *Vet. Microbiol.* **2009**, *135*, 308–312.
41. Diaz, M.H.; Bai, Y.; Malania, L.; Winchell, J.M.; Kosoy, M.Y. Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1645–1649.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	น.ส. จุฬาลักษณ์ พนมรังษี
วัน เดือน ปี เกิด	16 พฤษภาคม 2537
สถานที่เกิด	นครราชสีมา
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	205/32 หมู่ที่ 9 ไอคอนโดงามวงศ์วาน 2 ตึก A ซอยดวงมณี ต.บางเขน อ. เมือง จ.นนทบุรี 11000



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY