

เปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อทริปาโนโซมา อีแวนชาย
บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) จากกวางรูซ่า (*Cervus timorensis*)
และกระบือแม่น้ำ (*Bubalus bubalis*) ในประเทศไทย

Comparing genetic characteristics of Internal transcribed spacer (ITS) regions
of *Trypanosoma evansi* infecting rusa deer (*Cervus timorensis*)
and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Thailand

รุ่งรัตน์ ไสยสมบัติ*¹ ศศิวิมล สัจจงพงษ์¹ กิ่งดาว หมอแก้ว¹ มณฑกานต์ จิระจันทร์¹ อัญญรัตน์ ทิพย์ธารา²
Rungrat Saiyasombat*¹ Sasiwimon Sajjapongse¹ Kingdao Mohkaew¹
Montakan Jiratanh¹ Anyarat Thiptara²

Abstract

Backgrounds: *Trypanosoma evansi* has a wide host range and spread in many regions. Study of its genetic diversity in each host species from each area is an important consideration for disease control. Aim of this study was to examine genetic characteristics of *T. evansi* found in rusa deer (*Cervus timorensis*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) compared to those found in various hosts and in various areas reported in Genbank database.

Methods: Two blood samples from rusa deer and two blood samples from water buffaloes that *T. evansi* was previously detected by Woo's method and Giemsa-stained blood smears were used in this study. Parasite DNA of Internal Transcribed Spacer (ITS) region were amplified by PCR. The PCR products were cloned and sent for sequencing. Obtained sequences were analyzed and phylogenetic trees were constructed.

Results: All four isolates showed 99-99.5% nucleotide sequence identity and also possessed 99% identity to other *T. evansi* strains reported in GenBank database. Although two isolates from rusa deer possessed 99.1% nucleotide sequence identity to each other, these two isolates showed genetic relationship close to *T. evansi* isolates from various hosts and various geographic locations. Two isolates from water buffaloes possessed a close genetic relationship with 99.5% nucleotide sequence identity. Phylogenetic analysis based on ITS region showed that two isolates from rusa deer seem to be placed in different groups whereas two isolates from water buffaloes were grouped together. Both two isolates from water buffaloes were closely related to *T. evansi* Tansui strain from Taiwan.

Conclusions: This study reports genetic information of ITS region of *T. evansi* found in rusa deer and water buffaloes in Thailand. All isolates from this study and others reported in GenBank database possessed 99% nucleotide sequence identity. Nevertheless, phylogenetic analysis based on ITS regions reveals intra-species genetic diversity.

Keywords: *Trypanosoma evansi*, rusa deer, water buffalo, ITS, phylogenetic analysis

¹ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน ตำบลทิวัง อำเภอยางสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

* ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 0-2579-8911 โทรสาร 0-2579-8918-19 e-mail: rungrat.s@dld.go.th

¹ National Institute of Animal Health, Lamyao, Chatuchak, Bangkok 10900

² Veterinary Research and Development Center (Upper Southern Region), Teewang, Thung Song, Nakorn Si Thammarat 80110

* Corresponding author Tel. 0-2579-8911 Fax. 0-2579-8918-19 e-mail: rungrat.s@dld.go.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: ทริปปาโนโซมา อีแวนซาย (*Trypanosoma evansi*) มีการแพร่กระจายในโฮสต์หลายชนิดและในหลายภูมิภาค การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อในโฮสต์แต่ละชนิดในแต่ละพื้นที่จึงมีส่วนสำคัญในการควบคุมโรค การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของ *T. evansi* ที่พบในกวางรูซ่า (*Cervus timorensis*) และกระบือแม่น้ำ (*Bubalus bubalis*) ในประเทศไทย รวมถึงเชื้อที่พบในโฮสต์และในพื้นที่ต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

วิธีการ: ตัวอย่างเลือดกวางรูซ่า จำนวน 2 ตัวอย่าง และจากกระบือแม่น้ำ จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเชื้อด้วยวิธี Woo's method และวิธี Giemsa-stained blood smears นำมาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ *T. evansi* บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) จากนั้นโคลนผลผลิต PCR ที่ได้และนำไปหาลำดับสารพันธุกรรม วิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

ผล: การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมจากทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน 99-99.5% และมีความคล้ายคลึงกับ *T. evansi* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานใน GenBank สูงถึง 99% และแม้ว่าเชื้อที่พบในกวางรูซ่า 2 ตัวอย่าง จะมีความคล้ายคลึงกันถึง 99.1% แต่พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับ *T. evansi* ที่มาจากต่างโฮสต์และต่างพื้นที่กัน ส่วนเชื้อที่พบในกระบือแม่น้ำ 2 ตัวอย่าง มีความคล้ายคลึงกัน 99.5% แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าตัวอย่างที่พบในกวางรูซ่า 2 ตัวอย่าง มีแนวโน้มถูกจัดอยู่คนละกลุ่มกัน ส่วนเชื้อที่พบในกระบือแม่น้ำ พบว่าถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและทั้งสองเชื้อมีความใกล้เคียงกับ *T. evansi* Tansui จากไต้หวัน

สรุป: จากการศึกษาครั้งนี้รายงานข้อมูลสารพันธุกรรมของ *T. evansi* ที่พบในกวางรูซ่า และกระบือแม่น้ำ พบว่ามีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงถึง 99% ใกล้เคียงกับ *T. evansi* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานใน GenBank อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยข้อมูลสารพันธุกรรมบริเวณ ITS ได้แสดงให้เห็นความถึงหลากหลายทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ของ *T. evansi*

คำสำคัญ: ทริปปาโนโซมา อีแวนซาย, กวางรูซ่า, กระบือแม่น้ำ, ITS, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

บทนำ

ทริปปาโนโซมา อีแวนซาย (*Trypanosoma evansi*) เป็นเชื้อปรสิตในเลือด เป็นสาเหตุของโรคเซอร์รา (Surra) เชื้อถ่ายทอดสู่โฮสต์ผ่านแมลงดูดเลือด เช่น เหลือบและแมลงวันคอก โดยที่เชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงและเพิ่มจำนวนภายในตัวแมลงพาหะ (mechanical transmission) *T. evansi* พบได้แพร่หลายในแอฟริกา ลาตินอเมริกา และเอเชีย ในโฮสต์หลายชนิดทั้งสัตว์ป่าและปศุสัตว์ (Hoare, 1972; Desquesnes *et al.*, 2013) และมีรายงานการพบเชื้อในคนในประเทศอินเดียและเวียดนาม (Joshi *et al.*, 2005; Powar *et al.*, 2006; Chau *et al.*, 2016) ในประเทศไทย *T. evansi* ก่อความสูญเสียในม้า โคเนื้อ โคนม กระบือ สุกร และช้าง (Boonyawong, 1975; Indrakamhang, 1998; Hin-On *et al.*, 2004) สัตว์ป่าหลายชนิดเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อได้ หนึ่งในนั้นคือกวางรูซ่า (*Cervus timorensis*) (Reid *et al.*, 1999) อาการที่พบ ได้แก่ ชูบพอม โลหิตจาง หายใจลำบาก แห้ง และชักร่อนตาย (Thiptara *et al.*, 2016) นอกจากนี้ในประเทศไทยยังมีรายงานการพบ *T. evansi* ในกวางแฉมบาร์ (*Cervus unicolor*) และเนื้อทราย (*Axis porcinus*) (Indrakamhang, 1998; Tuntasuvan *et al.*, 2000) สัตว์ตระกูลกวางจึงสามารถเป็นสัตว์รังโรคก่อให้เกิดการติดเชื้อข้ามไปมา ระหว่างสัตว์ตระกูลกวางและปศุสัตว์ที่อยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกันและก่อความสูญเสียต่อสัตว์ทั้งสองกลุ่มนี้ได้ สำหรับในกระบือ (*Bubalus bubalis*) พบว่าส่วนใหญ่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังและไม่แสดงอาการ แต่ก็มีรายงานอาการที่พบในกระบือในประเทศไทย ได้แก่ มีไข้ ขาแข็ง เยื่อตาขาวอักเสบ โลหิตจาง แห้ง และตาย (Indrakamhang, 1998)

ถึงแม้ว่าเซอร์ราจะเป็นโรคประจำถิ่นของประเทศไทย แต่การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ *T. evansi* ยังมีจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกวาง มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank จากกวาง ซึ่งไม่ได้อยู่ในเขตในประเทศไทย และมีรายงานข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมจากกวางซีกา (*Cervus nippon yessoensis*) ในประเทศญี่ปุ่น สำหรับกระบือในประเทศไทย Khuchareontaworn *et al.* (2007) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไว้เนื่องจาก

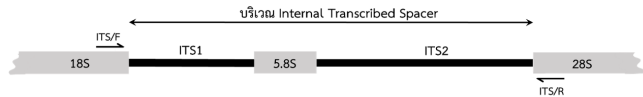
T. evansi มีการแพร่กระจายในโฮสต์หลายชนิดและในหลายภูมิภาค การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อในโฮสต์แต่ละชนิดในแต่ละพื้นที่จึงมีความสำคัญ โดยตัวอย่าง *T. evansi* จากกวางรูซ่าและกระบือแม่น้ำที่ทำการศึกษานี้เป็นเชื้อที่พบในประเทศไทย จากโฮสต์ที่เป็นสัตว์ป่าและปศุสัตว์ตามลำดับ

สายพันธุ์กรรมของเชื้อ *T. evansi* บริเวณ ribosomal RNA (rRNA) มีตำแหน่งจาก 5' ไป 3' คือ 18S rRNA, Internal Transcribed Spacer (ITS) 1, 5.8S rRNA, ITS2 และ 28S rRNA ตามลำดับ (Lodish *et al.*, 2001) (รูปที่ 1) สายพันธุ์กรรมบริเวณ ITS เป็นส่วน noncoding spacer DNA ที่ไม่มีการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนพบว่าการกลายพันธุ์โดยธรรมชาติได้รวดเร็วกว่าส่วน coding DNA ซึ่งมีการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน จึงมีประโยชน์ในการนำมาใช้วิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ศึกษาวิวัฒนาการและการจำแนกเชื้อตามอนุกรมวิธาน (Powers *et al.*, 1997) การศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณ ITS ของ *T. evansi* จากกวางรูซ่าและกระบือแม่น้ำ ซึ่งพบในเวลาใกล้เคียงกัน แต่ต่างพื้นที่ ตลอดจนเปรียบเทียบกับเชื้อที่พบในสัตว์ป่าและปศุสัตว์ในพื้นที่ต่าง ๆ ที่รายงานในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งจะเป็ประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล การศึกษาความเชื่อมโยงของการติดเชื้อข้ามระหว่างสัตว์ป่าและปศุสัตว์ เพื่อนำไปประกอบการวางแผนในการควบคุมและป้องกันโรคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ทำการศึกษา

ตัวอย่างเลือดกวางรูซ่า จากจังหวัดกระบี่ ซึ่งเก็บตัวอย่างในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2559 จำนวน 2 ตัวอย่าง รหัสตัวอย่าง R001 และ R002 จากฝูงเดียวกัน ที่ตรวจพบ *T. evansi* ด้วยวิธี Woo's method และ Giemsa-stained blood smears โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน จังหวัดนครศรีธรรมราช และตัวอย่างเลือดกระบือแม่น้ำ จากจังหวัดบุรีรัมย์ ที่เก็บตัวอย่างในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2559 จำนวน 2 ตัวอย่าง รหัสตัวอย่าง B19 และ B20 จากฝูงเดียวกัน ที่ตรวจพบ *T. evansi* ด้วยวิธี Woo's method และ Giemsa-stained blood smears โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างสายพันธุ์กรรมของเชื้อ *T. evansi* บริเวณ Internal Transcribed Spacer และตำแหน่งของ ITS/F และ ITS/R primers ที่ใช้ในการศึกษานี้ (Khuchareontaworn *et al.*, 2007)

การสกัด DNA และการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณ ITS

สกัด DNA จากตัวอย่างเลือดกวางรูซ่าและกระบือแม่น้ำที่เก็บในหลอดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว EDTA ตัวอย่างละ 200 μ l โดยใช้ Genomic DNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตระบุไว้ เก็บรักษา DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -30°C จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR โดยใช้ forward primer ITS/F (5'-GGTGATCGGAC-CGTCGCTCGTCT-3') และ reverse primer ITS/R (5'-CCTCTTCGCTCGCCGCTGACTG-3') ซึ่งครอบคลุมบางส่วนของ 18S rRNA ส่วนทั้งหมดของ ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 และบางส่วนของ 28S rRNA (รูปที่ 1) ตามวิธีการของ Khuchareontaworn *et al.* (2007) โดยดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้ ปฏิบัติ PCR ปริมาตรสุทธิ 25 μ l ประกอบด้วย 10X PCR buffer (Invitrogen, USA), dNTP (New England Biolabs, USA) ชนิดละ 0.2 mM, MgCl_2 1.5 mM, forward และ reverse primers ชนิดละ 0.2 μ M, Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, USA) 0.5 units และตัวอย่างสารสกัด DNA ต้นแบบ 1 μ l โดยใช้ Dnase/Rnase-free water (Invitrogen, USA) ในการปรับปริมาตร ขั้นตอนของ PCR ประกอบด้วย initial denaturation ที่ 94°C 2 นาที ตามด้วยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมจำนวน 35 รอบ โดย denaturation ที่ 94°C 30 วินาที annealing ที่ 60°C 1 นาที extension ที่ 72°C 1 นาที 30 วินาที ตามด้วย final extension ที่ 72°C 15 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,300 bp ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย RedSafe nucleic acid solution (iNtRON Biotechnology, South Korea) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้ DNA ของเชื้อ *T. evansi* ซึ่งเก็บรักษาไว้อย่างห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เป็นตัวควบคุมบวกและ Dnase/Rnase-free water เป็นตัว

ควบคุมลบ ทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany)

การโคลนผลผลิต PCR และการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

โคลนผลผลิต PCR ที่เป็นสารพันธุกรรมเป้าหมาย เข้าในพลาสมิดโดยใช้ TOPO TA cloning kit (Invitrogen, USA) และเพิ่มจำนวนพลาสมิดด้วย TOP 10 *Escherichia coli* ตามขั้นตอนที่ผู้ผลิตระบุไว้ ตรวจหาพลาสมิดที่มีสารพันธุกรรมเป้าหมายด้วยวิธี PCR โดยใช้ forward primer M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') และ reverse primer M13R (5'-CAGGAACAGCTATGAC-3') ตรวจสอบผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 bp ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย RedSafe nucleic acid solution (iNtRON Biotechnology, South Korea) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, USA) ตามขั้นตอนที่ผู้ผลิตระบุไว้ นำไปตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมด้วยวิธี Sanger sequencing (Macrogen, South Korea)

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมและการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่ได้ในแต่ละส่วนมาประกอบรวมกันโดยใช้โปรแกรม SEQMAN ใน DNASTar Lasergene software version 7.1.0 (DNASTAR Inc., USA) นำข้อมูลบริเวณ ITS ซึ่งประกอบด้วยบริเวณ ITS1, 5.8S rDNA และ ITS2 มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) วิเคราะห์ % nucleotide identity ด้วยโปรแกรม MegAlign ใน DNASTar Lasergene software version 7.1.0 จัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่พบในการศึกษาครั้งนี้ และเชื้ออื่นในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม MUSCLE ใน MEGA software, version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) ทดสอบหาโมเดลที่ดีที่สุดเพื่อใช้ประกอบการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood และวิเคราะห์ bootstrap 1,000 รอบ ด้วย MEGA software, version 7.0 โดยมี *Trypanosoma vivax* เป็น outgroup

ผลและวิจารณ์

จากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในตัวอย่างเลือด กวางรูซ่า รหัส R001 และ R002 และตัวอย่างเลือดกระบือ แม่น้ำ รหัส B19 และ B20 ได้ผลิตผล PCR ขนาดประมาณ 1,300 bp (รูปที่ 2) ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้รายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วย accession number MN121257-MN121260 ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมโดยการ BLAST พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *T. evansi* isolates ต่าง ๆ ที่มีรายงานใน GenBank สูงถึง 99% เมื่อวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมเฉพาะบริเวณ ITS ซึ่งประกอบด้วยบริเวณ ITS1, 5.8S rDNA และ ITS2 พบว่าสารพันธุกรรมของ *T. evansi* ในตัวอย่างเลือดกวางรูซ่า รหัส R001 และ R002 มีความยาวเท่ากันคือ 1,100 bp และคล้ายคลึงกัน 99.1% (ตารางที่ 1) ส่วนตัวอย่างเลือดกระบือ รหัส B19 และ B20 มีความยาว 1,098 และ 1,100 bp ตามลำดับ และคล้ายคลึงกัน 99.5% (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมของ *T. evansi* จากกวางรูซ่า กับเชื้อที่พบจากกระบือแม่น้ำ พบว่าเชื้อมีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างสูง โดยมีความคล้ายคลึงกัน 99-99.4% (ตารางที่ 1)

ทั้งนี้ ลำดับสารพันธุกรรมของ *T. evansi* บริเวณ ITS ที่พบในกวางรูซ่า รหัส R001 มีความคล้ายคลึงที่สุดกับ *T. evansi* สายพันธุ์ Tansui จากไต้หวัน 99.7% ในขณะที่เชื้อที่พบในกวางรูซ่า รหัส R002 มีความคล้ายคลึงที่สุด (99.5%) กับ *T. evansi* ที่พบในโฮสต์หลายชนิดและจากต่างพื้นที่ ได้แก่ *T. evansi* Sam2 ที่พบในกวางในประเทศไทย *T. evansi* KAI.1 ที่พบในโคในประเทศไทย และ *T. evansi* Egy.3 ที่พบในอูฐในประเทศอียิปต์ เป็นต้น ส่วนเชื้อที่พบในกระบือแม่น้ำ รหัส B19 และ B20 คล้ายคลึงกับ *T. evansi* สายพันธุ์ Tansui จากไต้หวัน 99.5% และ 99.6% ตามลำดับ และมีความใกล้เคียงอย่างมากกับ *T. evansi* 014 ที่พบในกระบือแม่น้ำในประเทศฟิลิปปินส์ (99.5%) (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า *T. evansi* มีความใกล้เคียงกันสูงแม้ว่าจะมีการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์อย่างกว้างขวางและพบในโฮสต์หลากหลายชนิด (de Oliveira Lima *et al.*, 2008; Villareal *et al.*, 2013)

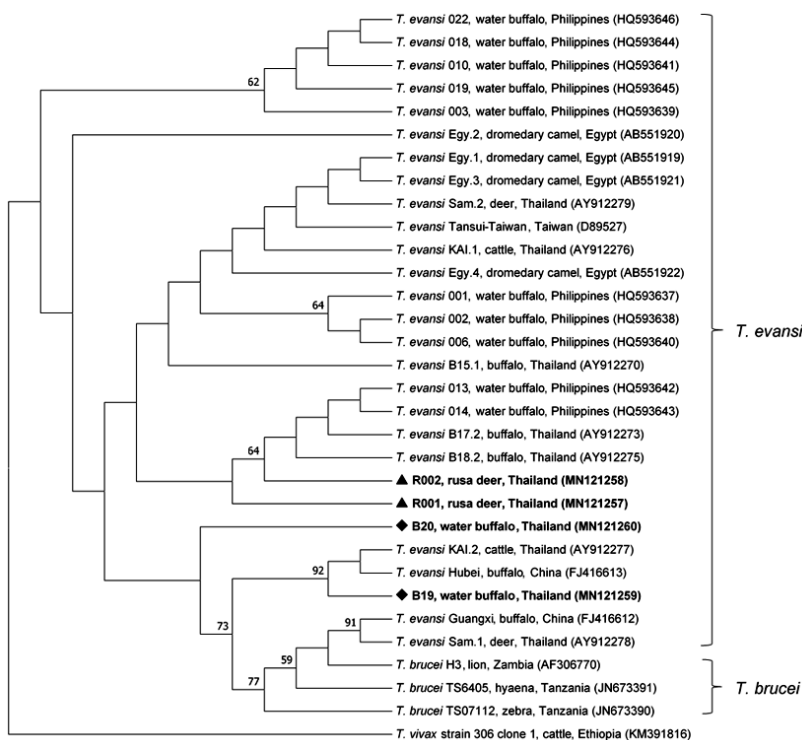
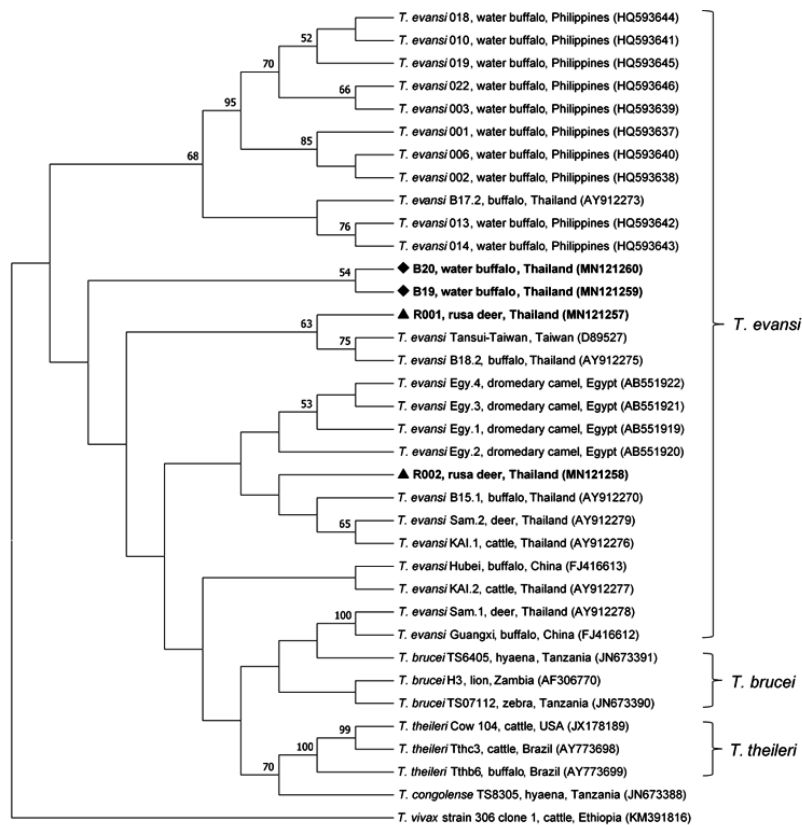
3,000 bp
1,500 bp
1,000 bp

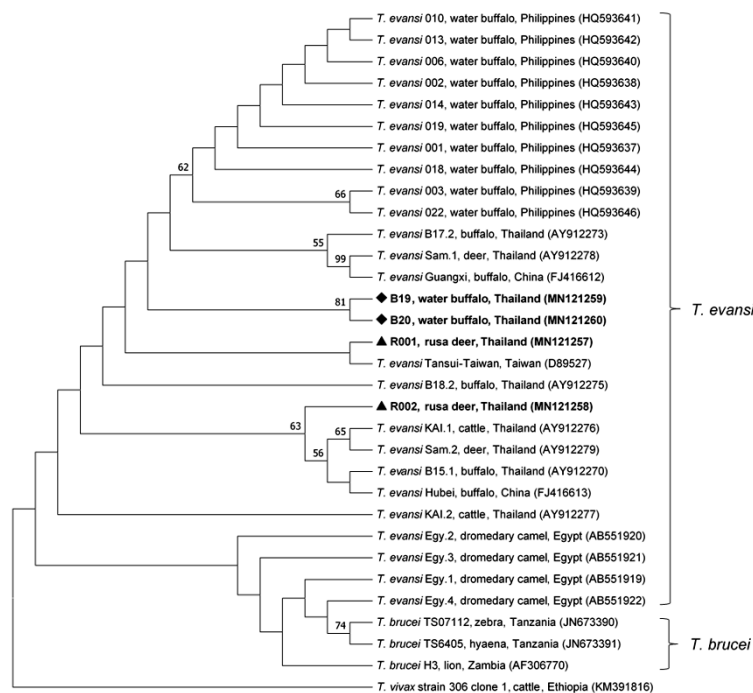
1 2 3 4 5 6 7

~1,300 bp

อย่างไรก็ตามแม้ว่าลำดับสารพันธุกรรมของ *T. evansi* บริเวณ ITS จะมีความคล้ายคลึงกันสูงจากการวิเคราะห์ % nucleotide identity (ตารางที่ 1) แต่ผลการเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมบริเวณ ITS ของเชื้อทั้ง 4 ตัวอย่าง ที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้ และ *T. evansi* จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 24 เชื้อ ด้วยวิธี multiple sequence alignment พบว่ามีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ถึง 79 ตำแหน่ง ซึ่งประกอบด้วย single nucleotide polymorphism ที่มีการแทนที่การแทรกเข้า และการหายไป โดยพบที่บริเวณ ITS2 มากที่สุดคือ 52 ตำแหน่ง พบที่บริเวณ ITS1 จำนวน 21 ตำแหน่ง และพบที่บริเวณ 5.8S rDNA 6 ตำแหน่ง (ไม่แสดงข้อมูลการทดสอบ)

จากการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมบริเวณ ITS1 ของเชื้อที่พบในตัวอย่างรหัส R001, R002 และ B20 พบว่า มีขนาดเท่ากันคือ 341 bp ส่วนตัวอย่างรหัส B19 มีขนาด 339 bp โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไปคือตำแหน่ง 291 และ 292 ซึ่งพบได้เช่นเดียวกันใน *T. evansi* สายพันธุ์อื่น (ไม่แสดงข้อมูลการทดสอบ) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณ ITS1 (รูปที่ 4) พบว่าเชื้อที่พบในตัวอย่างรหัส R002 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *T. evansi* B18.2 และ B17.2 ที่พบในกระบือในประเทศไทย และ *T. evansi* 014 และ 013 ที่พบในกระบือแม่น้ำประเทศฟิลิปปินส์ ส่วนเชื้อที่พบในกวางรक्षा รหัส R001





รูปที่ 5 แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณ ITS2 ของเชื้อที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้กับเชื้อที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้โมเดล Kimura 2-parameter ร่วมกับการใช้การกระจายแบบมาแบบไม่ต่อเนื่องเพื่อจำลองความแตกต่างของอัตราการวิวัฒนาการระหว่างไซต์ต่างๆ (+G) และวิเคราะห์ bootstrap 1,000 รอบ โดยค่า bootstrap ที่มีค่า 50 ขึ้นไป แสดงไว้ในแต่ละกิ่ง เชื้อที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงเป็นตัวหนา, “▲” คือเชื้อที่พบในตัวอย่างเลือดควารูซ่า และ “◆” คือเชื้อที่พบในตัวอย่างเลือดกระบือแม่ม้า

ถูกจัดแยกออกมา แต่ก็ด้วยค่า bootstrap ที่ต่ำ แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณ ITS1 ยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่พบในกระบือแม่ม้า รหัส B19 ถูกจัดกลุ่มอยู่กับ *T. evansi* KAI.2 ที่พบจากโคในประเทศไทยและ *T. evansi* Hubei ที่พบในกระบือในสาธารณรัฐประชาชนจีน ด้วยค่า bootstrap ที่ 92% สอดคล้องกับการศึกษาโดย Sarkhel *et al.* (2017) และ Tian *et al.* (2011) ในประเทศอินเดีย และสาธารณรัฐประชาชนจีนตามลำดับ ที่พบว่าข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมบริเวณ ITS1 สามารถแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อที่พบในโฮสต์ต่าง ๆ แต่การศึกษารุ่นนี้เชื้อที่พบในกระบือแม่ม้า รหัส B20 ถูกแยกออกมาจากเชื้อที่พบในกระบือแม่ม้า รหัส B19 ด้วยค่า % bootstrap ที่ต่ำ ซึ่งอาจเป็นผลจากสารพันธุกรรมบริเวณ ITS1 มีขนาดที่สั้นเกินไปที่จะแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อบางสายพันธุ์ได้ (Areekit *et al.*, 2008)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเฉพาะบริเวณ ITS2 ซึ่งมีขนาดเท่ากันทั้ง 4 ตัวอย่างที่พบในการศึกษารุ่นนี้คือ 589 bp พบว่าเชื้อที่พบในกระบือแม่ม้า รหัส B19 และ B20 ถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันเช่นเดียวกันกับเมื่อวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลบริเวณ ITS ส่วนเชื้อที่พบในควารูซ่า รหัส R001 และ R002 อยู่คนละกลุ่มกัน

เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อบริเวณ ITS และ ITS1 และพบว่าเชื้อที่พบในตัวอย่างรหัส R002 ถูกจัดกลุ่มอยู่กับ *T. evansi* KAI.1, *T. evansi* Sam.2, *T. evansi* B15.1 และ *T. evansi* Hubei ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ % nucleotide identity (ตารางที่ 1) ที่พบว่าเชื้อที่พบในตัวอย่าง R002 มีความคล้ายคลึงสูงสุด (99.5%) กับ *T. evansi* KAI.1, *T. evansi* Sam.2 และ *T. evansi* B15.1 (รูปที่ 5) และสอดคล้องกับการศึกษาโดย Amer *et al.* (2011) ที่พบว่ารูปแบบที่ได้จากการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมบริเวณ ITS2 สามารถอธิบายความแตกต่างที่มีเพียงเล็กน้อยระหว่างชนิดและสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิดของเชื้อได้ จากการศึกษาโดย Khuchareontaworn *et al.* (2007) ก็พบว่า ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมบริเวณ ITS2 ให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์และจัดกลุ่ม *T. evansi* มากกว่าข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมบริเวณ ITS1 ดังนั้นการศึกษาข้อมูลสารพันธุกรรมบริเวณ ITS2 น่าจะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของเชื้อในการศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการป้องกันและควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าลำดับสารพันธุกรรมบริเวณ 5.8S rDNA ของ *T. evansi* จากทั้ง 4 ตัวอย่างที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีความยาวเท่ากันคือ 170 bp จากการทำ multiple sequence alignment พบว่าลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อที่พบในตัวอย่างรหัส R001 และ R002 มีความแตกต่างกันที่ตำแหน่งที่ 43 เพียงตำแหน่งเดียว คือ T และ G ตามลำดับ และส่งผลให้การถอดมีโนแตกต่างกัน 1 ตัว คือ asparagine และ lysine ตามลำดับ แต่เชื้อที่พบในตัวอย่าง B19 และ B20 ไม่มีความแตกต่างกัน เนื่องจากลำดับสารพันธุกรรมบริเวณ 5.8S rDNA จะค่อนข้างเป็นบริเวณที่คงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และจากการศึกษาของ Khuchareontaworn *et al.* (2007) ไม่พบความแตกต่างของลำดับสารพันธุกรรมบริเวณ 5.8S rDNA ในแต่ละโคลนที่มาจากโฮสต์คือกระปือตัวเดียวกันอีกด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นเชื้อที่พบในโฮสต์แต่ละตัว และพบความแตกต่างของสารพันธุกรรมในบริเวณนี้ในตัวอย่างจากกวารูชา 2 ตัว ในฝูงเดียวกัน พื้นที่เดียวกัน ดังนั้นการวิเคราะห์สารพันธุกรรมบริเวณ ITS ที่รวม 5.8S rDNA จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อที่มีความใกล้เคียงกันมาก

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *T. evansi* บริเวณ ITS และแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณ ITS2 ให้ผลสอดคล้องไปในทางเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *T. evansi* ที่พบเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่าไม่ขึ้นกับโฮสต์และต้นกำเนิดทางภูมิศาสตร์ โดยเชื้อที่พบในโฮสต์ชนิดเดียวกันไม่ได้ถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันหรือเชื้อที่พบในพื้นที่เดียวกันไม่ได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันอย่างชัดเจน และเป็นที่น่าสนใจว่า *T. evansi* ที่พบในตัวอย่างรหัส R001 และ R002 ถูกจัดแยกออกจากกัน (รูปที่ 3 และ รูปที่ 5) ทั้งที่เป็นเชื้อที่พบจากกวารูชาในฝูงเดียวกัน อาจเป็นไปได้ว่าเป็นเชื้อคนละสายพันธุ์หรือเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อผ่านโฮสต์ และแม้ว่าเชื้อที่พบในกวารูชาและกระปือแม่น้ำจากการศึกษาในครั้งนี้ที่วิเคราะห์สารพันธุกรรมบริเวณ ITS จะมีความใกล้เคียงกันสูง แต่พบว่าเชื้อที่พบในกวารูชามีความใกล้เคียงกับเชื้อที่พบในโค กระบือ และกวารูชาในประเทศไทยที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้มากกว่า มีรายงานว่าสายพันธุ์กรรมบริเวณ ITS

มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงโมเลกุลในชนิดของเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันสูง แต่การศึกษาจากยีนบริเวณเดียวอาจให้ข้อมูลไม่เพียงพอสำหรับการแสดงความแตกต่างของเชื้อที่มีความเกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิดโดยเฉพาะเชื้อในชนิดเดียวกัน ที่ผ่านมามีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่ายีน ESAG6 มีประโยชน์ในการใช้ เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic markers) ในการจัดกลุ่มของ *T. evansi* ได้ดีเช่นเดียวกัน (Witola *et al.*, 2005; Mekata *et al.*, 2009) รวมถึงการศึกษา minicircle kinetoplast DNA เพื่อจำแนก *T. evansi* Type A และ Type B (Borst *et al.*, 1987) และความสัมพันธ์ของ *T. evansi* กับเชื้ออื่น ๆ ในสกุลย่อย *Trypanozoon* ในอนาคตจึงควรพิจารณาศึกษาข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของยีนจากหลายบริเวณประกอบกันเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนเพียงพอและเป็นประโยชน์มากยิ่งขึ้น

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

ผลการวิเคราะห์สารพันธุกรรม *T. evansi* บริเวณ ITS ที่พบจากกวารูชาและกระปือแม่น้ำ พบว่ามีความใกล้เคียงกันสูงถึง 99% อย่างไรก็ตามเชื้อที่พบในกวารูชา 2 ตัวอย่าง มีความใกล้เคียงกับ *T. evansi* ที่มาจากต่างโฮสต์ และต่างพื้นที่กัน และพบว่ามีค่าใกล้เคียงสูงกับเชื้อที่พบในกวารูชา โคและกระปือที่มีรายงานในประเทศไทยไว้ก่อนหน้านี้มากกว่าเชื้อที่พบในกระปือแม่น้ำในการศึกษานี้ และแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าเชื้อในกวารูชาทั้งสองตัวอย่างมีแนวโน้มถูกจัดอยู่คนละกลุ่มกัน ส่วนเชื้อที่พบในกระปือแม่น้ำ 2 ตัวอย่างถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกัน และพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับ *T. evansi* Tansui จากไต้หวัน แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณ ITS แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *T. evansi* ที่พบโดยไม่ขึ้นกับโฮสต์ และพื้นที่ที่พบเชื้อ เชื้อที่พบทั้งในสัตว์ป่าและปศุสัตว์มีความหลากหลายทางพันธุกรรม การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณ ITS และ ITS2 ให้ผลที่สอดคล้องกัน สายพันธุ์กรรมบริเวณ ITS2 จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และใช้เฝ้าระวังเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของ *T. evansi* เนื่องจากเชอร์ราเป็นโรคประจำถิ่น

ในประเทศไทย การเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล ทั้งในสัตว์รังโรคและสัตว์ที่ไวต่อการรับเชื้อ ทั้งโฮสต์ที่เป็น สัตว์ป่าและปศุสัตว์ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงลักษณะ ทางพันธุกรรมของเชื้อ จะเป็นประโยชน์ในการมีส่วนร่วมช่วย ให้การป้องกันและควบคุมโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์พิชิต ปุยะติ และเจ้าหน้าที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตอนล่าง จังหวัดสุรินทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บ ตัวอย่างเลือดกระบือแม่น้ำ ขอขอบคุณ คุณอุบลรัตน์ แทนกลาง ที่ช่วยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสำหรับการ โคลนยีนเป้าหมาย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ช่วยเตรียมอุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215 (3): 403-410.
- Amer, S., Ryu, O., Tada, C., Fukuda, Y., Inoue, N. and Nakai, Y. 2011. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Egypt, a pilot study. *Acta Trop.* 117 (1): 39-46.
- Areekit, S., Singhapahan, P., Kanjanavas, P., Khuchareontaworn, S., Sriyapai, T., Pakpitcharoen, A. and Chansiri, K. 2008. Genetic diversity of *Trypanosoma evansi* in beef cattle based on internal transcribed spacer region. *Infect Genet Evol.* 8: 484-488.
- Boonyawong, T., Chantaraprateep, P. and Muangyai, M. 1975. Surra in Horse. *Thai J Vet Med.* 5: 665-672.
- Borst, P., Fase-Fowler, F. and Gibson, W.C. 1987. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Mol Biochem Parasitol.* 23: 31-38.
- Chau, N.V.V., Chau, L.B., Desquesnes, M., Herder, M., Lan, N.P.H.L., Campbell, J.I. and Baker, S. 2016. A clinical and epidemiological investigation of the first reported human infection with the zoonotic parasite *Trypanosoma evansi* in southeast Asia. *Clin Infect Dis.* 62: 1002-1008.
- De Oliveira Lima, A.N., da Silva Santos, S., Herrera, H.M., Gama, C., Cupolillo, E., Jansen A.M. and Fernandes, O. 2008. *Trypanosoma evansi*: molecular homogeneity as inferred by phenetical analysis of ribosomal internal transcribed spacers DNA of an eclectic parasite. *Exp Parasitol.* 118 (3): 402-407.
- Desquesnes, M., Holzmüller, P., Lai, D.H., Dargantes, A., Lun, Z.R. and Jittaplaong, S. 2013. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *Biomed Res Int.* 194176.
- Hin-On, W., Rodtian, P., Nuangmek, A., Uthaiwan, V. and Muangyai, M. 2004. Surra in timber elephant from Northern Thailand, diagnosis and treatment, A case study. *Proceedings of the 30th Annual Conference of the Thai Veterinary Medical Association.* Bangkok, Thailand. pp. 373-385.
- Hoare, C.A. 1972. The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Blackwell scientific publications, Oxford, UK. pp. 555-593.
- Indrakamhang, P. 1998. *Trypanosoma evansi* infection in livestock in Thailand. *J Protozool Res.* 8: 153-161.
- Joshi, P.P., Shegokar, V.R., Powar, R.M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H.R., Dani, V.S., Bhargava, A. Jannin, J. and Truc, P. 2005. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *Am J Trop Med Hyg.* 73: 491-495.
- Khuchareontaworn, S., Singhapahan, P., Viseshakul, N. and Chansiri, K. 2007. Genetic diversity of *Trypanosoma evansi* in buffalo based on internal transcribed spacer regions. *J Vet Med Sci.* 69 (5): 487-493.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33: 1870-1874.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. 2001. Molecular cell biology. 4th edition. W.H. Freeman and Company, New York, USA. 1184 p.
- Mekata, H., Konnai, S., Witola, W.H., Inoue, N., Onuma, M. and Ohashi, K. 2009. Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. *Infect Genet Evol.* 9 (6): 1301-1305.
- Powar, R.M., Shegokar, V.R., Joshi, P.P., Dani, V.S., Tankhiwale, N.S., Truc, P., Jannin, J. and Bhargava A. 2006. A rare case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. *Indian J Med Microbiol.* 24 (1): 72-74.
- Powers, T.O., Todd, T.C., Burnell, A.M., Murray, P.C.B., Fleming,

- C.C., Szalanski, A.L., Harris, T.S. 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *J Nematol.* 29 (4): 441-450.
- Reid, S., Husein, A., Hutchinson, G. and Copeman, D. 1999. A possible role for rusa deer (*Cervus timorensis russa*) and wild pigs in spread of *Trypanosoma evansi* from Indonesia to Papua New Guinea. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 (2): 195-197.
- Sarkhel, S.P., Gupta, S.K., Kaushik, J., Singh, J., Gaur, D.K., Kumar, S. and Kumar, R. 2017. Molecular characterization of internal transcribed spacer 1 (ITS 1) region of different *Trypanosoma evansi* isolates of India. *J Parasit Dis.* 41 (2): 527-533.
- Tian, Z., Liu, G., Xie, J., Shen, H., Zhang, L., Zhang, P. and Luo, J. 2011. The internal transcribed spacer 1 (ITS-1), a controversial marker for the genetic diversity of *Trypanosoma evansi*. *Exp Parasitol.* 129 (3): 303-306.
- Thiptara, A., Jeenpun, A., Suknao, K.H., Kongkaew, W., Worasing, R., Anan, S. and Khong-O, P. 2016. Epidemiological investigation on outbreaks of cervine trypanosomosis (surra) in rusa deer (*Cervus timorensis*) in Krabi Province of Southern Thailand. *Proceedings of 54th Kasetsart University Annual Conference: Plants, Animals, Veterinary Medicine, Fisheries, Agricultural Extension and Home Economics.* pp. 586-593.
- Tuntasuvan, D., Mimapan, S., Sarataphan, N., Trongwongsa, L., Intraksa, R. and Luckins, A.G. 2000. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. *Vet Parasitol.* 87 (2-3): 223-230.
- Witola, W.H., Sarataphan, N., Inoue, N., Ohashi, K. and Onuma, M. 2005. Genetic variability in ESAG6 genes among *Trypanosoma evansi* isolates and in comparison to other Trypanozoon members. *Acta Trop.* 93 (1): 63-73.
- Villareal, M.V., Mingala, C.N. and Rivera, W.L. 2013. Molecular characterization of *Trypanosoma evansi* isolates from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Philippines. *Acta Parasitol.* 58 (1): 6-12.