



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการเฝ้าระวังเฉพาะพื้นที่ของโรคไลชมาเนียในประชากรที่อาศัยอยู่
ในพื้นที่ที่เคยเกิดการระบาดของประเทศไทย

(Sentinel surveillance of Leishmaniasis among population at previous
outbreak areas in Thailand)

โดย

พันตรีนายแพทย์ธีรยุทธ สุขมี และคณะ

15 มีนาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการเฝ้าระวังเฉพาะพื้นที่ของโรคพิษมาเนียในประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เคย
เกิดการระบาดของประเทศไทย

คณะผู้วิจัย

- | | |
|---------------------------------------|---|
| 1. พันตรี นพ.ธีรยุทธ สุขมี | ภาควิชาจุลชีววิทยา
วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า |
| 2. พันเอกหญิง รศ.ดร.เสาวนีย์ ลีละยูวะ | ภาควิชาปรสิตวิทยา
วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า |
| 3. พันเอก รศ.ดร.นพ.มทิรุทธ มุ่งถิ่น | ภาควิชาปรสิตวิทยา
วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า |
| 4. สัตวแพทย์หญิง ดร.วรพร สุขุมาวาสี | คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 5. จำสับเอกทวินาคลอ | ภาควิชาปรสิตวิทยา
วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า |
| 6. นางสาวรมณีโชษิตนธิกุล | ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์
โรงพยาบาลรามาริบดี |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัยสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยในครั้งนี้ได้รับความร่วมมือในการดำเนินงานวิจัยภาคสนาม จากเจ้าหน้าที่ นักวิชาการกลุ่มงานควบคุมโรค สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดพังงา และจังหวัดนครศรีธรรมราช เป็นอย่างดีเยี่ยม และผลการศึกษาทางห้องปฏิบัติการที่มีความสำคัญอย่างยิ่งจะสำเร็จไม่ได้เลย หากไม่ได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีจากเจ้าหน้าที่ทางห้องปฏิบัติการในภาควิชาปรสิตวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า โดยการควบคุมดูแลและรับผิดชอบโดย พ.อ.หญิง รศ.ดร. เสาวนีย์ ลีละยูวะ หนึ่งในนักวิจัยร่วมและที่ปรึกษาโครงการวิจัย ในฐานะของผู้วิจัยหลัก จึงขอกราบ ขอบพระคุณ นักวิจัยร่วมทุกท่านและเจ้าหน้าที่ทุกภาคส่วนที่ได้เสียสละ ท่วมเทในการดำเนินการ งานทุกๆขั้นตอนเกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5280018

ชื่อโครงการ: การเฝ้าระวังเฉพาะพื้นที่ของโรคลิซมาเนียในประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เคยเกิดการระบาดของประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน:

ธีรยุทธ สุขมี^{1*}, เสาวนีย์ ลีละยูวะ², มติรุทธ มุ่งถิ่น², ทวี นาคล่อ², วรพร สุขุมาวาสี³, รณณีย์ โฆษิตนธิกุล⁴

¹ภาควิชาจุลชีววิทยา, วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า, กรุงเทพมหานคร 10400

²ภาควิชาปรสิตวิทยา, วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า, กรุงเทพมหานคร 10400

³ภาควิชาพยาธิวิทยา, คณะสัตวแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร 10330

⁴ภาควิชาพยาธิวิทยา, คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร 10400

E-mail address: theesukm@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 16 มีนาคม 2552 – 15 มีนาคม 2554

โรคลิซมาเนียถูกรายงานครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อปี 2503 หลังจากนั้นในช่วงปี 2548 – 2553 มีรายงานการเกิดโรคแบบการติดเชื้อภายในประเทศเป็นรายๆ รวมถึงการติดเชื้อสายพันธุ์ใหม่ทางภาคใต้ของประเทศไทย การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความชุก (Prevalence) และปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อลิซมาเนียในประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เคยมีรายงานผู้ป่วย การศึกษาวิจัยได้มีการทบทวนรายงานการเกิดโรคลิซมาเนีย และมีการเก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรในพื้นที่ที่เคยเกิดการระบาดของโรคจำนวนสองแห่ง การตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี direct agglutination test (DAT) ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อลิซมาเนียและมีการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อลิซมาเนียด้วยวิธี PCR-RFLP ของยีน SSU-rRNA ตำแหน่ง ITS1 region และยีน mini-exon. จากการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างประชากรจำนวน 386 ราย รวมสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในพื้นที่จำนวน 100 ตัว ปรากฏว่า มีการตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อลิซมาเนียของวิธี direct agglutination test (DAT) เฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำนวน 48 ตัวอย่างและตรวจพบสารพันธุกรรมที่เข้าได้ต่อเชื้อลิซมาเนียในตัวอย่างเลือดคนและสัตว์จำนวน 170 ตัวอย่างอย่างไรก็ตาม ไม่ปรากฏพบผู้ที่มีอาการและอาการแสดงเข้าได้กับโรคลิซมาเนีย ผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของตัวอย่างเลือดบางตัวอย่างพบว่า เป็นสารพันธุกรรมที่ไม่สามารถเจาะจงว่าเป็นของเชื้อโปรโตซัวประเภท flagellate ตัวใด ทำยที่สุด โรคลิซมาเนียนับว่าเป็นโรคอุบัติใหม่ทางปรสิตวิทยาในประเทศไทย ดังนั้นการเฝ้าระวังเฉพาะพื้นที่ควรดำเนินการอย่างยิ่งเพื่อการศึกษาจำแนกเชื้อโปรโตซัวประเภท flagellate ชนิดใหม่ รวมถึงการพิสูจน์ทราบถึงสัตว์รังโรคและรังฝอยทรายที่สามารถเป็นพาหะของโรคได้

คำสำคัญ: การเฝ้าระวังเฉพาะพื้นที่, การติดเชื้อภายในประเทศ, โรคลิซมาเนีย, ประเทศไทย

Abstract

Project Code: TRG5280018

Project Title: Sentinel surveillance of Leishmaniasis among population at previous outbreak area in Thailand

Investigators:

Sukmee T^{1*}, Leevayoova S², Mungthin M², Naaglor T², Sukhumavasi W³, Khositnithikul R⁴

¹Department of Microbiology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok 10400, Thailand

²Department of Parasitology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok 10400, Thailand

³Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

E-mail address: theesukm@gmail.com

Project Period: 16 March 2009 – 15 March 2011

Leishmaniasis was first notified in Thailand since 1960. During 2005-2010, sporadic autochthonous cases were reported including a novel leishmanial infection in southern Thailand. The objectives of our study were to conduct epidemiological survey of leishmaniasis at previous outbreak areas and to determine risk factors for the disease. Previously reported cases including autochthonous leishmaniasis were reviewed. A blood sample was collected from people at 2 previous outbreak areas. A direct agglutination test (DAT) was performed in all blood samples for detecting antibody against *Leishmania* infection and a combination of PCR-RFLP of ITS1 region of SSU-rRNA, and mini-exon genes were done for species identification of *Leishmania*. For epidemiological survey, the study was carried out among 386 villagers living in two previous outbreak villages including 100 domestic animals. The positive results of DAT and PCR were found 48 cases for animals only and 170 cases for both human and animals, respectively. However, there were no villagers with signs and symptoms of the disease. The results of nucleotide sequencing analysis showed unidentified flagellate protozoa. Leishmaniasis is an emerging parasitic infection in Thailand. Sentinel surveillance should be done including the further research for identification of suspected new flagellate protozoa, animal reservoirs, and proving a sandfly as a potential vector.

Key words: Sentinel surveillance, Autochthonous, Leishmaniasis, Thailand

บทสรุปผู้บริหาร

โรคไลชมาเนียไม่ใช่โรคประจำถิ่นของประเทศไทย แต่ก็มีรายงานพบผู้ป่วย Leishmaniasis ที่เป็นชาวต่างชาติที่เข้ามารักษาในประเทศไทยมีจำนวน 3 ราย ได้แก่ ชาวปากีสถาน ชาวอินเดีย และชาวบังกลาเทศ ในปี พ.ศ.2503, 2520 และ 2527 ตามลำดับ ต่อมาจามีรายงานพบผู้ป่วยที่เป็นคนไทยตั้งแต่ปีพ.ศ.2524-2553 ทั้งที่ติดเชื้อมาในประเทศไทยและสัมผัสโรคมาจากต่างประเทศจำนวน 58 ราย จำแนกเป็นผู้ป่วย Cutaneous leishmaniasis(CL) จำนวนทั้งสิ้น 43 ราย ส่วนใหญ่เป็นคนไทยที่ไปทำงานอยู่ในประเทศที่มีโรคนี้เป็นโรคประจำถิ่น และผู้ป่วย Visceral leishmaniasis(VL) จำนวนทั้งสิ้น 15 ราย ในจำนวนนี้มีอย่างน้อย 6 ใน 15 รายที่เป็นการติดเชื้อมาในประเทศไทย (Autochthonous) และปัจจุบันมีรายงานผู้ป่วย *Leishmania*/HIV co-infection จำนวน 4 ราย (VL 3 ราย และ CL 1 ราย) และเมื่อพิจารณาถึงแหล่งที่รายงานการเกิดโรคแบบ Sporadic case พบว่า มีรายงานผู้ป่วยแล้วใน 9 จังหวัด และพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อการสัมผัสโรคไลชมาเนียในประเทศไทยอยู่ในพื้นที่ภาคใต้

ระบบเฝ้าระวังที่มีอยู่ในระบบปัจจุบันของสำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข เป็นการเฝ้าระวังแบบตั้งรับ ซึ่งไม่ไวพอที่จะตรวจวิเคราะห์ผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการของโรคไลชมาเนียได้ ทำให้พลาดโอกาสในการควบคุมและป้องกันโรคอย่างทันท่วงที ซึ่งคณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นความไม่ครอบคลุมของระบบการเฝ้าระวังโรคไลชมาเนียที่มีอยู่ จึงสนใจศึกษาโดยดำเนินการในลักษณะการเฝ้าระวังเชิงรุก กล่าวคือ เข้าไปค้นหาผู้ป่วยรายใหม่ในชุมชน โดยจะเริ่มต้นศึกษาในพื้นที่ที่เคยมีการระบาดของโรคไลชมาเนียมาก่อน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความชุก (Prevalence) และปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อมาเนียในประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เคยมีการระบาดของโรคมามาก่อน

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional study) ดำเนินการในกลุ่มเป้าหมายคือ ประชากรที่อาศัยในหมู่บ้านที่เคยเกิดการระบาดของโรคไลชมาเนียในจังหวัดพังงา นครศรีธรรมราช ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เคยเกิดการระบาดของโรค โดยไม่มีการสุ่มตัวอย่าง ขอเก็บตัวอย่างเลือดทั้งของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เลี้ยงในบริเวณบ้าน รวมทั้งสิ้น 471 ตัวอย่าง นำมาปั่นแยกซีรัมและ Buffy coat ซึ่งซีรัมถูกนำมาตรวจหาระดับของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไลชมาเนียด้วยวิธี Direct agglutination test (DAT) ในขณะที่ Buffy coat ถูกนำมาตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรม DNA ของเชื้อไลชมาเนียด้วยวิธี PCR รวมถึงการตรวจวิเคราะห์ลำดับคู่เบสของสายพันธุกรรม (PCR sequence) เพื่อพิสูจน์สายพันธุ์ของเชื้อที่ตรวจพบ เฉพาะตัวอย่าง DNA ที่ให้ผลบวก และ PCR product ที่มีปริมาณมากเพียงพอที่จะใช้วิเคราะห์เท่านั้น

ผลการศึกษาพบว่าประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เคยเกิดการระบาดของโรคในทั้งสองจังหวัดส่วนใหญ่เป็นผู้หญิงวัยกลางคน มีอาชีพทำสวนและกรีดยางพารา และสวนผลไม้ มีระดับการศึกษาสูงสุดคือ ระดับ

ประถมศึกษา ส่วนใหญ่สุขภาพร่างกายแข็งแรงดี ไม่มีโรคประจำตัว และไม่มีอาการและอาการแสดงของโรค
ลิชมาเนียในขณะที่ทำการศึกษาในส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ ทำโดยการใช้ผลของการตรวจ
Buffy coat ด้วย PCR ที่ให้ผลบวกพบว่าผู้หญิงที่อาศัยในตำบลทอนหงส์ จังหวัดนครศรีธรรมราชมีโอกาสติด
เชื้อสูงกว่าผู้ชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR 2.37, 95%CI 1.2-4.8, p-value 0.018) เนื่องจากต้องทำงานใน
ตอนเช้ามีดจะพบว่าผู้หญิงมากกว่าครึ่งในพื้นที่ต้องออกไปกรีดยางตอนเช้ามีดจึงมีความเสี่ยงต่อการถูกรังฝอย
ทรายกัดมากกว่าผู้ชาย

ในส่วนของผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่าไม่มีประชากรรายใดตรวจพบระดับของภูมิคุ้มกันต่อ
เชื้อลิชมาเนีย ในขณะที่ผลการตรวจวิเคราะห์ DNA ของเชื้อลิชมาเนียพบว่า ให้ผลบวกร้อยละ 36.5 จาก
ตัวอย่าง Buffy coat ทั้งสิ้นจำนวน 384 ตัวอย่าง และในสัตว์ (สุนัขและแมว) แต่เมื่อพิจารณาตัวอย่างเลือดของ
สัตว์ที่ให้ผลเป็นบวกทั้ง DAT และ PCR มีจำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.69 ของจำนวนตัวอย่างเลือด
ทั้งสิ้น 471 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม เมื่อนำตัวอย่าง PCR product ดังกล่าวไปตรวจวิเคราะห์หา nucleotide
sequence พบว่ายังไม่สามารถระบุว่าการติดเชื้อลิชมาเนียใน species ที่มีรายงานอยู่ใน Genbank ในขณะนี้
แต่พบความเหมือนของ nucleotide sequence อยู่ในกลุ่มของ flagellate protozoa (มากกว่า 85%) จะเห็นว่า
ทั้งคนและสัตว์มีผลบวกจากการตรวจโดย PCR จำนวนมาก มีเพียงบางส่วนเท่านั้นที่สามารถส่งวิเคราะห์หา
nucleotide sequence ทั้งนี้เพราะจำกัดด้วยงบประมาณ และปริมาณ PCR product ที่ต้องมากพอในการนำไป
ตรวจวิเคราะห์

ทั้งนี้การศึกษารั้ครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาแบบภาคตัดขวาง(Cross-sectional study) และแม้ว่าไม่
สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม flagellate protozoa ตัวใด หรือทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ได้หรือไม่ แต่การ
ติดตามคนที่พบเชื้อในเลือดทั้งหมดมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นการทำการศึกษแบบติดตามผลไปข้างหน้า
Cohort study จะมีความเหมาะสมมากกว่า ซึ่งควรมีการดำเนินงานต่อไปในทุกพื้นที่ระบาดของเชื้อ โดยเฉพาะ
สำรวจในบุคคลกลุ่มเสี่ยงทั้งหมด

ท้ายที่สุดนี้ โรคลิชมาเนียในจังหวัดภาคใต้ของประเทศไทยจัดเป็น Emerging Zoonotic disease
ประโยชน์จากการศึกษารั้ครั้งนี้แสดงถึงการนำความรู้ทางด้านระบาดวิทยา ร่วมกับชีวโมเลกุลมาศึกษาข้อมูล
ทางระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อในเชิงลึก เพื่อไม่ให้ประเทศไทยโดยเฉพาะจังหวัดในภาคใต้ซึ่งเป็นสถานที่
ท่องเที่ยวมีการแพร่กระจายโรคไปทุกจังหวัด การควบคุมและป้องกันโดยเฉพาะการเฝ้าระวังโรค การควบคุม
แมลงพาหะ การสำรวจการติดเชื้อในกลุ่มเสี่ยง การศึกษาหาวิธีตรวจที่แม่นยำ และรวดเร็ว สมควรต้องม
ีการศึกษาต่อไปอย่างเร่งด่วน นอกจากนั้นการให้ความรู้แพทย์ บุคลากรในพื้นที่ รวมถึงชาวบ้านในพื้นที่ มี
ความจำเป็นมากเพื่อเตรียมความพร้อม ไม่ให้มีการแพร่กระจายโรคเช่นกับที่เกิดขึ้นในบางประเทศมาแล้ว

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ

บทคัดย่อภาษาไทย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

บทสรุปผู้บริหาร

บทที่ 1 บทนำ.....1

บทที่ 2 โรคติดเชื้ออุบัติใหม่ในประเทศไทย: ลิซมาเนียซิส.....4

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....36

บทที่ 4 ผลการวิจัย.....41

บทที่ 5 สรุปและอภิปราย.....48

เอกสารอ้างอิง.....52

ผลลัพธ์จากโครงการวิจัย.....58

ภาคผนวก

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สถานการณ์โรคติดต่อในช่วงสามทศวรรษที่ผ่านมาของโลก โรคติดต่อในยุคโลกาภิวัตน์ได้กลับมาเป็นภัยคุกคามที่สำคัญของมนุษยชาติในลำดับต้นๆอีกครั้ง โรคติดต่ออุบัติใหม่มีอุบัติการณ์ในมนุษย์เพิ่มสูงขึ้น หรือมีแนวโน้มความเสี่ยงที่จะเพิ่มขึ้นในอนาคตอันใกล้ ทั้งนี้ยังหมายถึง โรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อใหม่ๆ โรคติดต่อที่พบในพื้นที่ใหม่ และโรคติดต่ออุบัติซ้ำ ซึ่งเคยเกิดแพร่ระบาดมาแล้วในอดีตและสงบไปหลายปีแล้ว แต่กลับระบาดขึ้นมาอีก ทั้งนี้มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคติดต่ออุบัติใหม่หลายปัจจัยได้แก่ 1) ปัจจัยด้านชีวภาพ โดยเฉพาะการวิวัฒนาการหรือกลายพันธุ์ของตัวเชื้อโรคเอง จนเกิดเชื้อสาเหตุตัวใหม่ หรือการดื้อยาหลายชนิด หรือการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรที่มีภูมิคุ้มกันต่ำลงจากการติดเชื้อ เช่นโรคเอดส์ เป็นต้น 2) ปัจจัยด้านโครงสร้างประชากรและพฤติกรรมมนุษย์ เช่น การอพยพย้ายถิ่น การเปลี่ยนแปลงวิถีการดำรงชีวิต การเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมทางเพศที่ไม่ปลอดภัย เป็นต้น 3) ปัจจัยด้านการเดินทางและการค้าระหว่างประเทศทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายประชากรข้ามพรมแดน การขนส่งสินค้าที่เป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพระหว่างประเทศ การค้าสัตว์ระหว่างประเทศ การนำเข้าสัตว์ป่าจากต่างแดน เป็นต้น 4) ปัจจัยด้านสังคมและเศรษฐกิจ เช่นความยากจน แรงงานต่างด้าวผิดกฎหมายซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการติดโรคต่างๆ เป็นต้น 5) ปัจจัยด้านโครงสร้างสาธารณสุข เช่นการขาดแคลนทรัพยากรและงบประมาณในระบบสาธารณสุข การไม่ให้ความสำคัญของโรคติดต่อ หรือการละเลยมาตรการการควบคุมป้องกันโรคของประเทศต่างๆ เป็นต้น และ 6) ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การบุกรุกป่าคุกคามระบบนิเวศ ความเกี่ยวพันกันระหว่างคนและสัตว์ การอพยพย้ายถิ่นของสัตว์ และที่สำคัญคือภาวะโลกร้อน ซึ่งส่งผลให้แมลงหรือพาหะนำโรคต่างๆสามารถแพร่พันธุ์ได้มากขึ้น และขยายพื้นที่ที่อาศัยออกไปข้ามประเทศหรือทวีปได้ ขณะเดียวกันจุลชีพก่อโรคต่างๆที่ต้องอาศัยอยู่กับแมลงเหล่านี้ก็พัฒนาเติบโตเร็วขึ้นอีกด้วย¹

สำหรับสถานการณ์ปัจจุบันของโรคติดต่ออุบัติใหม่ที่พบแล้วในประเทศไทยคือ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ โรคไข้หวัดนก โรคมือ เท้า ปาก โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น โรคลีเจียนเนลโลซิส และโรคที่เกิดจากเชื้อปรสิต ได้แก่ โรคลิชมาเนียซิส เป็นต้น ส่วนโรคติดต่ออุบัติใหม่ที่อาจแพร่มาจากต่างประเทศ ได้แก่ โรคไข้หวัดใหญ่ โรคซาร์ส โรคไขสมองอักเสบนิปาห์ ไขสมองอักเสบเวสต์ไนล์ โรคเวบ้า ไข้เลือดออกอีโบลา ไข้เลือดออกมาร์บวร์ก โรคติดเชื้อจากการใช้อาวุธชีวภาพ เป็นต้น สำหรับโรคติดต่ออุบัติซ้ำที่พบในประเทศไทย ได้แก่ โรคไข้กาฬหลังแอ่นสายพันธุ์ W135 โรคตาแดงจากเชื้อไวรัส EV70 เป็นต้น¹ เป็นที่น่าสังเกตว่า โรคส่วนใหญ่ข้างต้นเกิดจากเชื้อไวรัส และบางส่วนเป็นโรคติดต่อนำโดยแมลง ซึ่งประเทศไทยมีโรคติดต่อนำโดย

แมลงที่สำคัญคือ โรคไขเลือดออกแดงก็ โรคมาลาเรีย โรคเท้าช้าง และโรคติดต่อนำโดยแมลงที่พบใหม่คือ โรค ลิชมาเนียซิส เป็นโรคติดเชื้อโปรโตซัว *Leishmania spp.* มีรีนฝอยทรายเป็นแมลงพาหะ² ลักษณะทางคลินิก จะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อ *Leishmania* โดยมนุษย์จะเกิดการติดเชื้อโดยบังเอิญ (Accidental host)

เป็นที่ทราบกันดีว่า โรคลิชมาเนียซิสไม่ใช่โรคประจำถิ่นของประเทศไทย อย่างไรก็ตาม ประเทศไทย เคยมีรายงานผู้ป่วย Visceral Leishmaniasis (Kala azar) ที่เป็นชาวต่างชาติที่เข้ามารักษาในประเทศไทยมี จำนวน 3 ราย ได้แก่ ชาวปากีสถาน³ ชาวอินเดีย และชาวบังคลาเทศ ในปี พ.ศ.2503, 2520 และ 2527 ตามลำดับ และที่เป็นคนไทยจำนวน 5 ราย ในปีพ.ศ.2528 – 2529 ซึ่งเป็นแรงงานไทยที่เดินทางไปทำงานใน ตะวันออกกลาง ซึ่งมีโรค ลิชมาเนียซิสเป็นโรคประจำถิ่น⁴ ในระยะ 10 ปีต่อมา มีรายงานผู้ป่วยที่เป็น คนไทยอีก 6 ราย ลักษณะเป็น sporadic case ระหว่างปีพ.ศ.2539-2550 รวมจำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 11 ราย โดยเฉพาะในปีพ.ศ. 2550 สำนักโรคบาติวิทยาพบผู้ป่วยมากถึง 3 ราย และผลจากการสอบสวนโรคพบว่า ผู้ป่วยจำนวน 6 รายใน 11 รายน่าจะเป็นการติดเชื้อภายในประเทศ และหนึ่งรายมีการติดเชื้อเอชไอวี ร่วมด้วย จะสังเกตได้ว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่ในจังหวัดทางภาคใต้ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีผลการตรวจทางซี โรโลยีพบว่า มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อลิชมาเนียคือ แมวและวัว

เชื้อลิชมาเนียที่รายงานในไทยได้แก่ *Leishmania donovani*, *Leishmania sp. siamensis* และ *Leishmania infantum* (ค้นพบในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อปีพ.ศ. 2550)⁵⁻⁷ สำหรับการสำรวจสายพันธุ์ของรีน ฝอยทรายในประเทศไทยได้เคยมีการสำรวจสายพันธุ์รีนฝอยทรายมาแล้วในปี พ.ศ.2530⁸ ปรากฏว่าพบรีน ฝอยทรายสายพันธุ์ที่สามารถนำเชื้อได้ และสามารถยืนยันการพบรีนฝอยทรายสายพันธุ์ที่สามารถนำเชื้อได้ เมื่อเร็ว ๆ นี้ (ปีพ.ศ. 2550) อีกครั้งในพื้นที่ภาคใต้โดยเฉพาะที่จังหวัดนครศรีธรรมราช อย่างไรก็ตาม สำนัก โรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค และภาควิชาพยาธิวิทยาทางการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดลได้ดำเนินการสำรวจสายพันธุ์รีนฝอยทรายเพื่อเฝ้าระวังทางกีฏวิทยาอย่างต่อเนื่อง

ดังนั้นการที่จะทราบถึงสถานการณ์ปัจจุบันของโรคลิชมาเนีย การวิเคราะห์ความเสี่ยงต่อการเกิดการ ระบาดของโรคลิชมาเนียในประเทศไทยสามารถกระทำได้โดยการเฝ้าระวังการเกิดโรค อย่างไรก็ตาม ระบบ เฝ้าระวังที่มีอยู่ในระบบปัจจุบันของสำนักโรคบาติวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขเป็นการเฝ้าระวัง แบบตั้งรับ ซึ่งไม่ไวพอที่จะตรวจวิเคราะห์ผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการของโรคลิชมาเนียได้ ทำให้พลาดโอกาสในการ ควบคุมและป้องกันโรคอย่างทันท่วงที ซึ่งคณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นความไม่ครอบคลุมของระบบการเฝ้าระวังโรคลิ ชมาเนียที่มีอยู่ จึงสนใจศึกษาโดยดำเนินการในลักษณะการเฝ้าระวังเชิงรุก กล่าวคือเข้าไปค้นหาผู้ป่วยรายใหม่ ในชุมชน โดยจะเริ่มต้นศึกษาในพื้นที่ที่เคยมีการระบาดของโรคลิชมาเนียมาแล้ว ซึ่งส่วนใหญ่ของพื้นที่ดังกล่าว จะอยู่ในจังหวัดทางภาคใต้ตอนบน เพื่อเป็นการศึกษานำร่อง นอกจากนี้หากผลการศึกษาพบผู้ป่วยรายใหม่ ก็

จะเป็นประเด็นในการพิสูจน์ถึงการเกิดการติดเชื้อภายในประเทศเองว่าจริงหรือไม่ อย่างไร อีกทั้งยังเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการระดับชีวโมเลกุลของเชื้อลิซมาเนียในประเทศไทยต่อไปด้วย

บทที่ 2 โรคติดเชื้ออุบัติใหม่ในประเทศไทย: ลิชมาเนียซิส

โรคลิชมาเนียเป็นโรคติดต่อมาโดยแมลง (Vector-borne disease; VBD) ที่องค์การอนามัยโลกให้ความสำคัญเป็น 1 ใน 5 ของโรคติดต่อที่สำคัญของมนุษย์^{9, 10} เป็นโรคนี้เกิดจากเชื้อชนิด obligate intracellular protozoa ที่เรียกว่า ลิชมาเนีย (*Leishmania* sp.) โดยปกติจะติดต่อกับการกัดของแมลงพาหะคือ ริ้นฝอยทราย (Sandfly) ในตระกูล *Phlebotomus* sp. ซึ่งอยู่ในโลกเก่า (Old world) และตระกูล *Lutzomyia* sp. ซึ่งอยู่ในโลกใหม่ (New world) และแหล่งรังโรคที่สำคัญคือ สัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงภายในบ้าน (Domestic animals) ได้แก่ สุนัข แมว วัว ม้า เป็นต้น ทั้งนี้มนุษย์เป็นโฮสต์โดยบังเอิญ (Accidental host) ของวงจรชีวิตของเชื้อ ลิชมาเนีย¹¹ และแสดงอาการได้ 2 ลักษณะหลักคือ 1) Visceral Leishmaniasis (VL) และ 2) Cutaneous Leishmaniasis¹² การวินิจฉัยโรคนี้ นอกจากการซักประวัติตรวจร่างกายแล้วจำเป็นต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เป็น gold standard คือ การแสดงและคัดแยกเชื้อ (Demonstration & Isolation parasite) อย่างไรก็ตาม Polymerase Chain Reaction (PCR) ก็ให้ความไวและความจำเพาะสูงที่สุด และ Direct Agglutination Test (DAT) และหรือ rk39 strip test เป็นการทดสอบทางซีโรโลยีที่ช่วยคัดกรองการติดเชื้อได้ดีโดยเฉพาะงานภาคสนาม^{13, 14-16}

ระบาดวิทยาของโรคลิชมาเนีย (Epidemiology of Leishmaniasis)

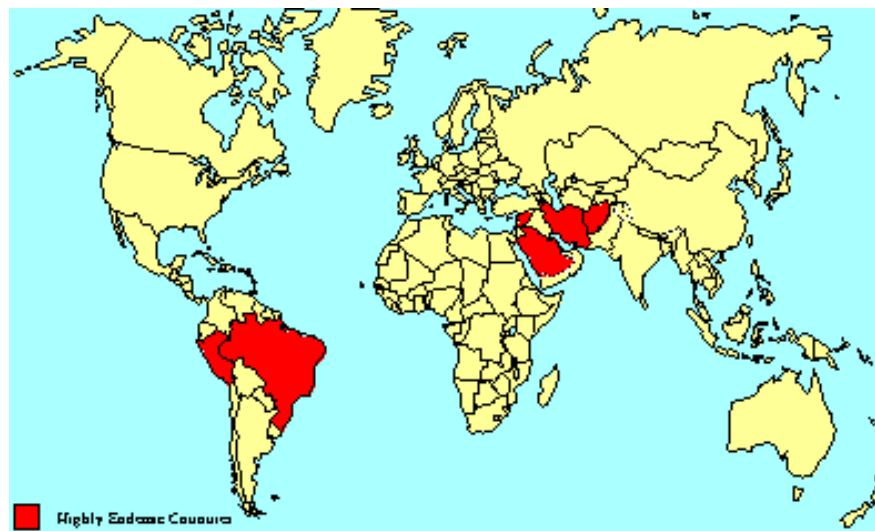
ปัจจุบันมีรายงานว่าพบเชื้อ *Leishmania* sp. อย่างน้อย 21 ชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์ และพบริ้นฝอยทรายกว่า 30 ชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำเชื้อนี้ได้ แหล่งที่มีการระบาดของโรคพบได้ในเขตร้อนชื้น เขตอบอุ่น กระจายตั้งแต่เขตป่าที่มีฝนตกชุกในทวีปอเมริกาไปจนถึงทะเลทรายในตะวันตกของทวีปเอเชีย และเขตชนบทจนถึงชานเมือง^{9, 11} มีรายงานพบผู้ป่วยด้วยโรคลิชมาเนียกว่า 12 ล้านคนทั่วโลก และอุบัติการณ์ของโรค (Incidence) ประมาณ 1.5 - 2 ล้านคน/ปี ใน 88 ประเทศทั่วโลกแบ่งเป็นในประเทศโลกเก่า (Old world) คือ ประเทศในทวีปเอเชีย ยุโรป และแอฟริกาจำนวน 66 ประเทศ และประเทศโลกใหม่ (New world) คือ ประเทศในทวีปอเมริกาจำนวน 22 ประเทศ ทั้งนี้ได้มีการคาดการณ์ว่าจะพบประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูงประมาณ 350 ล้านคน/ปี และเมื่อปีพ.ศ. 2543 ได้มีการคำนวณภาระโรค (Burden of disease) ของโรค Visceral leishmaniasis (VL) นี้เท่ากับ 1.98 ล้าน disability-adjusted life years (DALYs) แบ่งเป็นเพศชายมีภาระโรค VL เท่ากับ 1.67 ล้าน DALYs ในขณะที่เพศหญิงเท่ากับ 0.74 ล้าน DALYs¹⁷

สำหรับผู้ป่วย Cutaneous leishmaniasis (CL) มีรายงานพบใน 82 ประเทศ และพบผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 1.5 ล้านคน/ปี ซึ่งกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยพบในประเทศ Afghanistan Algeria Brazil Iran Iraq

Peru Saudi Arabia และ Syria^{10, 18, 19} (รูปที่ 1) ในขณะที่ผู้ป่วย VL มีรายงานพบใน 70 ประเทศ และพบผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 500,000 คน/ปี ซึ่งกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยพบในประเทศ Bangladesh Ethiopia India Nepal Sudan และ Brazil¹⁹ (รูปที่ 2) ทั้งนี้มีรายงานผู้เสียชีวิตด้วยโรคนี้ทั่วโลกสูงประมาณ 700,000 คน/ปี ทั้งนี้การกระจายของเชื้อลิวมาเนียสายพันธุ์ที่สำคัญในแต่ละภูมิภาคของโลกแตกต่างกัน²⁰ (รูปที่ 3)

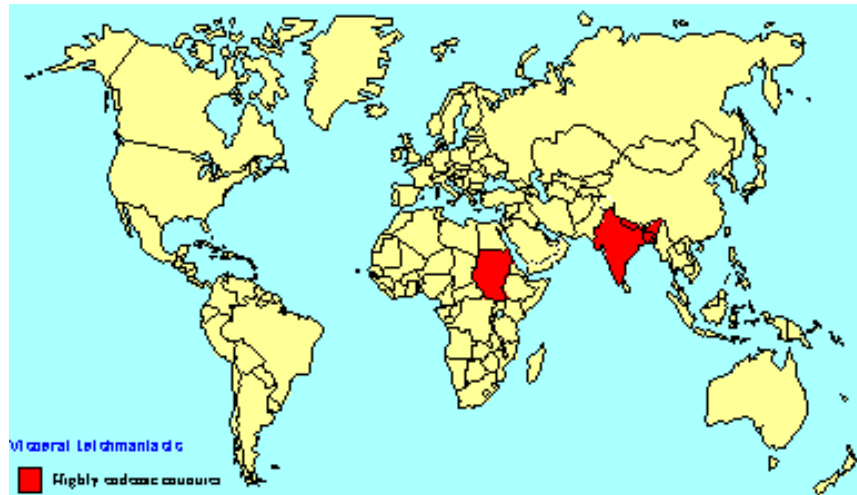
ปัจจัยสำคัญที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ทำให้โรคลิวมาเนียเกิดการระบาดเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน ได้แก่ 1) การอพยพย้ายถิ่น (Migration) 2) การตัดไม้ทำลายป่า (Deforestation) 3) การเป็นชุมชนเมือง (Urbanization) 4) การขาดมาตรการควบคุมโรค 5) การติดเชื้อมาร่วมกับเอชไอวีหรือภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และ 6) การขาดสารอาหาร (Malnutrition) อย่างไรก็ตาม ยังมีปัจจัยของการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้มนุษย์จะติดเชื่อได้ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ในระบบนิเวศระหว่างกิจกรรมของมนุษย์และแหล่งรังโรค ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมนี้จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของการกระจายของเชื้อลิวมาเนียในภูมิภาคนั้นๆด้วย

11



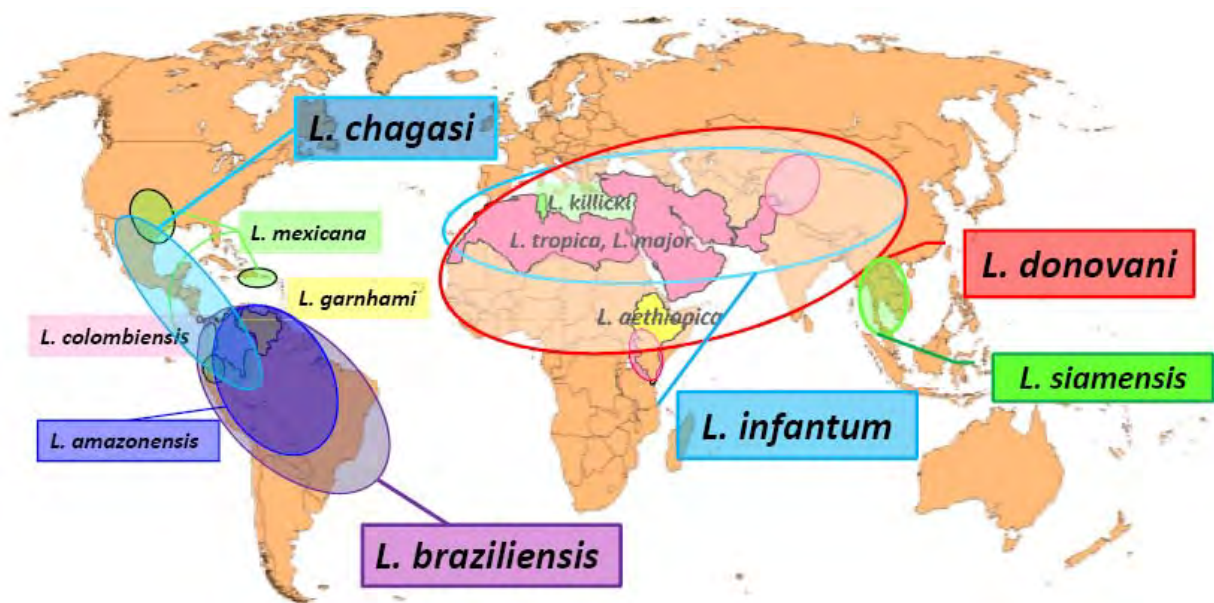
ภาพจาก http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.html

รูปที่ 1 Highly endemic countries of cutaneous leishmaniasis (CL)



ภาพจาก http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.htm

รูปที่ 2 Highly endemic countries of visceral leishmaniasis (VL)



ดัดแปลงจาก Oxford Textbook of Medicine, 4th Edition. Copyright © 2003 Oxford University Press.

รูปที่ 3 การกระจายของเชื้อไลชมาเนียสายพันธุ์ที่สำคัญของโลก

เชื้อลิชมาเนีย (*Leishmania* sp.)

ตามหลักการจัดแบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็นกลุ่ม (Taxonomy) เชื้อชนิดนี้ถูกจัดอยู่ใน **Kingdom; Protista**
Subkingdom; Protozoa **Phylum; Sarcomastigophora** **Subphylum; Mastigophora** **Class;**
Zoomastigophora **Order; Kinetoplastida** **Suborder; Trypanomatina** **Family; Trypanosomatidae** **Genera;**
Leishmania sp. และจากการทบทวนฐานข้อมูลสารพันธุกรรมใน GenBank พบว่า มีเชื้อลิชมาเนียที่ได้ขึ้น
ทะเบียนไว้จำนวนทั้งสิ้น 11 กลุ่มดังตารางที่ 1

วงจรชีวิตของเชื้อลิชมาเนีย (Life cycle of *Leishmania* sp.)

มนุษย์ถือเป็นโฮสต์โดยบังเอิญ (Accidental host) ของโรคลิชมาเนีย เพราะมนุษย์อาจมีกิจกรรมที่เข้าไปอยู่ในวงจรของการแพร่โรคทำให้มีการติดเชื้อโดยบังเอิญ เช่น การพักอาศัยหรือท่องเที่ยวในแหล่งที่มีโรคนี้เป็นโรคประจำถิ่น หรือ การเข้าไปอยู่ในพื้นที่ที่มีความหนาแน่นของรังฝอยทรายและสัตว์รังโรคสูง¹⁴

เมื่อรังฝอยทรายเพศเมียที่ติดเชื้อลิชมาเนียซึ่งจะอยู่ในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของพาหะกระโดดมาเกาะดูดเลือดโฮสต์ และปล่อยเชื้อลิชมาเนียซึ่งอยู่ในรูปของ Promastigotes ออกทางปากดูดทั้งสิ้นและแข็ง เชื้อที่ปล่อยออกนี้จะเข้าสู่ร่างกายโฮสต์ และถูกเม็ดเลือดขาวชนิด Macrophage จับกินเข้าเซลล์ไปเชื้อลิชมาเนียจะมีการเปลี่ยนรูปร่างจาก Promastigotes ซึ่งมีรูปร่างเป็นกระสวย หางยาว กลายเป็น Amastigotes ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม มีนิวเคลียสและ Kinetoplast เด่นชัด และเพิ่มจำนวนแบบแบ่งออกเป็นสองเรื่อย ๆ จนเซลล์เม็ดเลือดขาวนั้นแตกแล้วก็ไปถูกเม็ดเลือดขาวตัวอื่นจับกินต่อไป เมื่อเข้าสู่เซลล์ก็จะเพิ่มจำนวนแบบนี้ไปเรื่อย ๆ ขบวนการที่เม็ดเลือดขาวติดเชื้อนี้จะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กันหลายๆ เซลล์ในร่างกายมนุษย์และเป็นช่วงเดียวกันกับที่มีไข้เรื้อรัง เป็นๆ หายๆ (แต่ไม่มีหนาวสั่นเหมือนไข้มาลาเรีย) ขบวนการทำงานของระบบไขกระดูก ระบบโลหิต ระบบน้ำเหลือง ระบบทางเดินอาหาร รวมถึงตับและม้าม จนเกิดอาการและอาการแสดงที่สำคัญ 5 ประการแรกคือ ไข้ ชีตหน้าหนักลด ม้ามโต และตับโต จนเมื่อผู้ที่ติดเชื้อลิชมาเนียมีอาการของโรค และมีระดับของเชื้อลิชมาเนียเต็มที หากถูกรังฝอยทรายเพศเมียมากัด รังฝอยทรายตัวนี้ก็จะได้รับเชื้อนี้ ผ่านระบบทางเดินอาหารของมัน และเชื้อจะเปลี่ยนรูปร่างตัวเองจาก Amastigotes ไปเป็น Promastigotes อีกครั้งหนึ่ง เชื้อจะเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งออกเป็นสองเช่นกัน และเคลื่อนที่ไปอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง รอการแพร่เชื้อเกิดเป็นวงจรชีวิต²² และการแพร่โรคลิชมาเนียต่อไป (รูปที่ 4)

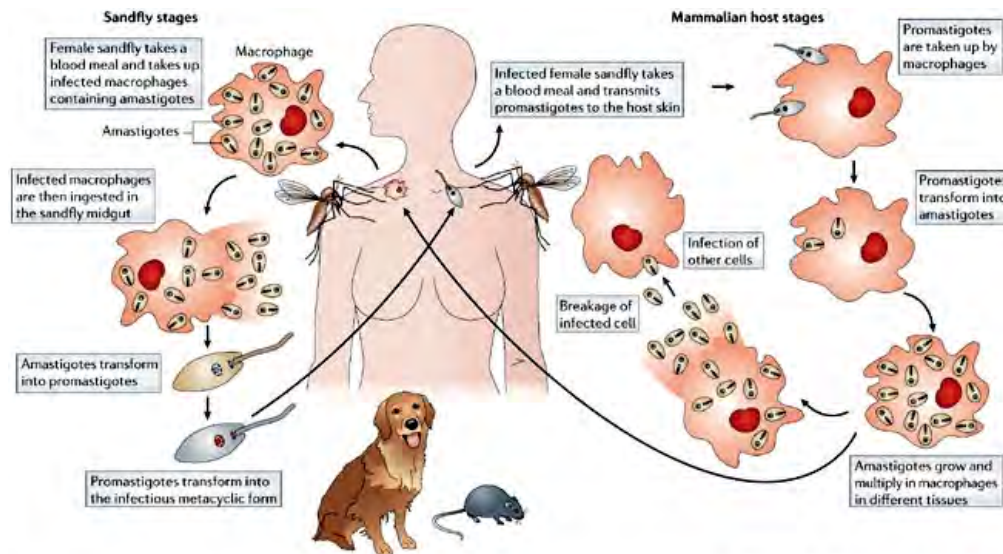
ตารางที่ 1 สายพันธุ์ของเชื้อไลชมาเนียที่ได้ขึ้นทะเบียนไว้ในฐานข้อมูล GenBank

<i>Leishmania</i> species	<i>Leishmania</i> species
1) <i>Leishmania aethiopica</i> species complex (1)	11) Unclassified <i>Leishmania</i> (28)
• <i>Leishmania aethiopica</i>	• <i>Leishmania arabica</i>
2) <i>Leishmania aristidesi</i>	• <i>Leishmania gerbilli</i>
3) <i>Leishmania deanei</i>	• <i>Leishmania guliki</i>
4) <i>Leishmania donovani</i> species complex (3)	• <i>Leishmania herreri</i>
• <i>Leishmania chagasi</i>	• <i>Leishmania killicki</i>
• <i>Leishmania donovani</i>	• <i>Leishmania turanica</i>
• <i>Leishmania infantum</i>	• <i>Leishmania</i> sp.
5) <i>Leishmania hertigi</i>	• <i>Leishmania</i> sp. AM-2004
6) <i>Leishmania major</i> species complex (2)	• <i>Leishmania</i> sp. BK-2007
• <i>Leishmania major</i>	• <i>Leishmania</i> sp. Ghana-2006
• <i>Leishmania</i> cf. <i>major</i>	• <i>Leishmania</i> sp. IMT208
7) <i>Leishmania mexicana</i> species complex (4)	• <i>Leishmania</i> sp. IRN580
• <i>Leishmania amazonensis</i>	• <i>Leishmania</i> sp. MHOM/IN/2003/NAV-122
• <i>Leishmania enriettii</i>	• <i>Leishmania</i> sp. MHOM/IN/2003/NAV-131
• <i>Leishmania mexicana</i>	• <i>Leishmania</i> sp. MHOM/IN/2003/NAV-132
• <i>Leishmania pifanoi</i>	• <i>Leishmania</i> sp. MHOM/IN/2003/NAV-135
8) <i>Leishmania tropica</i> species complex (1)	• <i>Leishmania</i> sp. MHOM/MQ/92/MAR1
• <i>Leishmania tropica</i>	• <i>Leishmania</i> sp. SA-2000
9) Lizard <i>Leishmania</i> (5)	• <i>Leishmania</i> sp. shifai
• <i>Leishmania adleri</i>	• <i>Leishmania</i> sp. siamensis
• <i>Leishmania gymnodactyli</i>	• <i>Leishmania</i> sp. SL/R/1
• <i>Leishmania hoogstraali</i>	• <i>Leishmania</i> sp. SL/R/2
• <i>Leishmania tarentolae</i>	• <i>Leishmania</i> sp. SL/R/3
• <i>Leishmania</i> sp. NC29/Iran/2007	• <i>Leishmania</i> sp. SL/R/4
10) <i>Viannia</i> subgenus group (10)	• <i>Leishmania</i> sp. SL/R/5
10.1) <i>Leishmania braziliensis</i> species complex (4)	• <i>Leishmania</i> sp. SL/R/6
• <i>Leishmania braziliensis</i>	• <i>Leishmania</i> sp. SL/R/7
• <i>Leishmania colombiensis</i>	• <i>Leishmania</i> sp. SL/R/8
• <i>Leishmania equatorensis</i>	• <i>Leishmania</i> sp. SL/R/9
• <i>Leishmania peruviana</i>	• <i>Leishmania</i> sp. SL/R/10
10.2) <i>Leishmania gamhami</i>	
10.3) <i>Leishmania guyanensis</i> species complex (3)	
• <i>Leishmania guyanensis</i>	
• <i>Leishmania panamensis</i>	
• <i>Leishmania shawi</i>	
10.4) <i>Leishmania lainsoni</i> species complex (1)	
• <i>Leishmania lainsoni</i>	
10.5) <i>Leishmania naiffi</i> species complex (1)	

จากวงจรชีวิตของเชื้อไลชมาเนีย จะเห็นว่าเชื้อมี 2 ระยะคือ ระยะ Amastigote และระยะ Promastigote ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ระยะที่ 1 Amastigote stage เป็นระยะที่จะพบเฉพาะในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังเท่านั้น (ได้แก่ มนุษย์ สัตว์เลี้ยงภายในบ้าน สัตว์เลี้ยงคลาน เป็นต้น) รูปร่างของเชื้อเป็นลักษณะ ovoid shape (รูปที่ 5 A; ลูกศรชี้) ขนาดประมาณ 2-4 μm เคลื่อนที่ได้เพราะไม่มีหาง (Non-flagellated form) เป็นเชื้อที่ต้องอาศัยอยู่ภายในเซลล์ (Intracellular parasite) และเพิ่มจำนวนด้วยวิธีการแบบแยกออกเป็นสอง (Binary fission) ในเม็ดเลือดขาวชนิด Macrophage ภายในของเซลล์เชื้อจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่เห็นเด่นชัด¹⁴ และ Kinetoplast ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งตั้งฉากกับนิวเคลียส²³ (รูปที่ 5 B; ลูกศรชี้ Kinetoplast) สามารถตรวจพบได้ในระบบ Reticuloendothelial system (ไขกระดูก ม้าม) และต่อมน้ำเหลือง

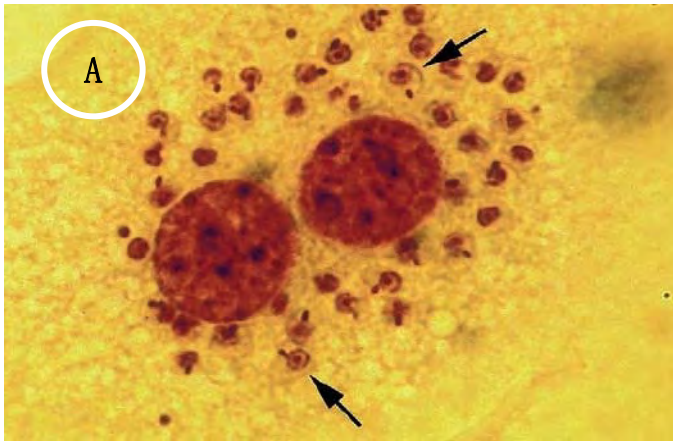
ระยะที่ 2 Promastigote stage เป็นระยะที่จะพบเฉพาะในรีนฟลอยทราเยเท่านั้น รูปร่างของเชื้อเป็นรูปกระสวย Spindle shape (รูปที่ 6) ขนาดประมาณ 15 - 20 x 1.5-3.5 μm เคลื่อนที่ได้เพราะมีหาง (Flagellated form) เชื้อจะอยู่นอกเซลล์ (Extracellular parasite) และสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยวิธีการแบบแยกออกเป็นสอง (Binary fission) เช่นกัน เชื้อจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่เห็นเด่นชัด และ Kinetoplast จะกลายไปเป็นหางเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ สามารถตรวจพบได้ในทางเดินอาหารส่วนกลาง (Middle gut) ของรีนฟลอยทราเย หรือจากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่เตรียมเป็นการเฉพาะ^{14, 24} (รูปที่ 6)



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Genetics

ภาพจาก Nature review Genetics; 2006 (7); 294-305

รูปที่ 4 วงจรชีวิตของเชื้อลิวมาเนีย



A: *Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366: 1561-77* **B:** *Visceral leishmaniasis: a trip to the Greek Islands is not always idyllic. MJA 2004; 181 (8): 446-447*

รูปที่ 5 เชื้อลิวมาเนียในระยะ Amastigotes



ภาพจาก http://www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=37&id=13038008

รูปที่ 6 เชื้อลิวมาเนียในระยะ Promastigotes

ริ้นฝอยทราย (Sandfly)

ริ้นฝอยทรายที่ค้นพบแล้วมี 6 genus กว่า 1,000 ชนิด ซึ่งในจำนวนนี้มีจำนวน 70 ชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำเชื้อลิชมาเนียก่อโรคในมนุษย์ อย่างไรก็ตาม มีริ้นฝอยทราย 3 genus ที่ชอบดูดเลือดสัตว์มีกระดูกสันหลังเป็นอาหารคือ

- 1) *Phlebotomus* sp. (Old world); พบในประเทศแถบ Mediterranean และ tropical Africa
- 2) *Lutzomyia* sp. (New world); พบในประเทศแถบ Central America และ South America
- 3) *Sergentomyia* sp. (Old world); พบในประเทศแถบ Central และ South Asia และ Africa

ซึ่งหมายความว่า ริ้นฝอยทรายเหล่านี้มีโอกาสที่จะเป็นพาหะนำเชื้อได้ ทั้งนี้ได้มีการศึกษาธรรมชาติของโรคลิชมาเนียในมนุษย์ว่า เกิดจากเชื้อลิชมาเนียชนิดใด และมีริ้นฝอยทรายชนิดใดเป็นพาหะดังตัวอย่างโรค Cutaneous Leishmaniasis (CL) ที่เกิดจากเชื้อ *L. aethiopica* มี Phlebotomine sandfly ชนิด *P. longipes*, และ *P. pedifer* เป็นพาหะนำเชื้อโดยเฉพาะ ในขณะที่เชื้อ *L. major* มี Phlebotomine sandfly ชนิด *P. alexandri*, *P. duboscqi*, และ *P. papatasi* เป็นต้น

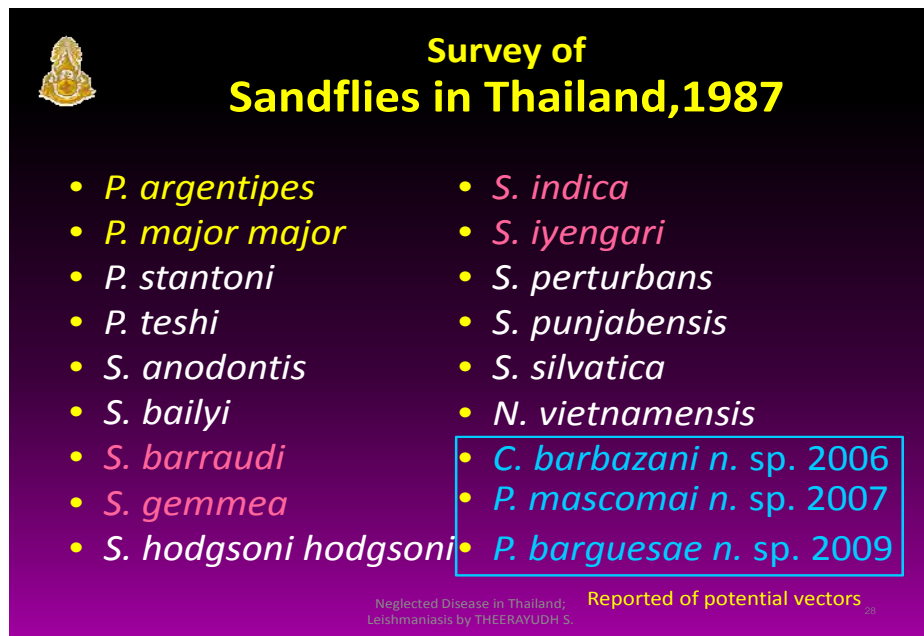
สำหรับโรค Visceral leishmaniasis (VL) ที่เกิดจากเชื้อ *L. donovani* มี Phlebotomine sandfly ชนิด *P. alexandri*, *P. argentipes*, *P. celiac*, *P. martini*, และ *P. orientalis* ส่วนเชื้อ *L. infantum* มี Phlebotomine sandfly ชนิด *P. ariari*, *P. chinensis*, *P. langeroni*, *P. longicuspis*, *P. longiductus*, *P. major major*, *P. neglectus*, *P. perfilliewi*, *P. perniciosus*, *P. sichuanensis*, *P. smirnovi*, และ *P. tobbi*

สำหรับประเทศไทยได้มีการสำรวจและรายงานพบริ้นฝอยทรายแล้วจำนวน 5 genus^{8, 25-27} ได้แก่

- 1) *Phlebotomus* sp.
- 2) *Sergentomyia* sp.
- 3) *Nemopalpus* sp. (เป็น subgenus ของ *Sergentomyia* sp.)
- 4) *Chinius* sp.
- 5) *Euphlebotomus* sp. (เป็น subgenus ของ *Phlebotomus* sp.)

เป็นจากการสำรวจชนิดของริ้นฝอยทรายครอบคลุมทุกภาคทั่วประเทศโดยคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีพ.ศ. 2537 พบว่า ประเทศไทยมีริ้นฝอยทรายชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำเชื้อได้จำนวน 2 ชนิด (ณ องค์ความรู้ปัจจุบัน) คือ *P. argentipes* และ *P. major major* (รูปที่ 7) ตลอดระยะเวลา 16 ปี

ที่ผ่านมามีคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ก็ยังมีการศึกษาวิจัยรื้อฟื้นฝอยทรายมาตลอดอย่างต่อเนื่อง พบว่าแหล่งเพาะพันธุ์ของรื้อฟื้นฝอยทรายที่สำคัญคือ ถ้ำค้างคาว เพราะมีระบบนิเวศเหมาะสมในการเพาะพันธุ์



รูปที่ 7 ผลการสำรวจชนิดของรื้อฟื้นฝอยทรายในประเทศไทย

จากผลการสอบสวนโรคเลชมาเนียในหลาย ๆ กรณี ของสำนักระบาดวิทยา และสำนักโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ตลอด 6 ปีที่ผ่านมา (2548-2553) พบว่าผลการจำแนกชนิดรื้อฟื้นฝอยทรายส่วนใหญ่คือ *P. stantoni*, *S. barraudi*, *S. iyengari*, *S. gemmea*, *S. perturbans*, และ *S. indica* ซึ่งเป็นรื้อฟื้นฝอยทรายที่ยังไม่มีการพิสูจน์ว่าจะสามารถนำเชื้อเลชมาเนียได้หรือไม่ โดยเฉพาะชนิด *Sergentomyia* sp. ซึ่งเป็นที่ทราบแล้วว่าไม่สามารถนำเชื้อเลชมาเนียได้ อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาในประเทศจีนพบว่า นอกจาก Phlebotomine sandfly ชนิด *P. alexandri*, *P. chinensis*, *P. longiductus*, *P. smirnovi* และ *P. sichuanensis* ที่สามารถนำเชื้อเลชมาเนียก่อโรคในมนุษย์และ *P. alexandri*, *P. caucasicus*, *P. andrejevi*, *P. mongolensis* และ *P. smirnovi* นำเชื้อก่อโรคใน great gerbil (สัตว์คล้ายหนูจำพวก *Gerbillus*) แล้ว ยังพบว่า รื้อฟื้นฝอยทรายชนิด *Sergentomyia sinkiangensis* สามารถนำเชื้อเลชมาเนียในสัตว์จำพวกจิ้งเหลน (Lizards) ได้

ลักษณะรูปร่างของริ้นฝอยทราย

ริ้นฝอยทรายมีขนาดเล็กกว่ายุง 3 เท่า (รูปที่ 8 และ 9) มีความยาวลำตัวเพียง 1.3 - 3.5 mm ตาเป็นจุดสีดำเห็นชัดเจน ปากสั้นและแข็ง มีปีกหนึ่งคู่แต่บินไม่ได้ ลำตัวและปีกปกคลุมด้วยขนค่อนข้างยาว มีขายาวเป็นข้อปล้อง 2 คู่ เคลื่อนที่ด้วยการกระโดดได้สูงไม่เกิน 1 เมตรจากพื้นดิน^{2, 29}



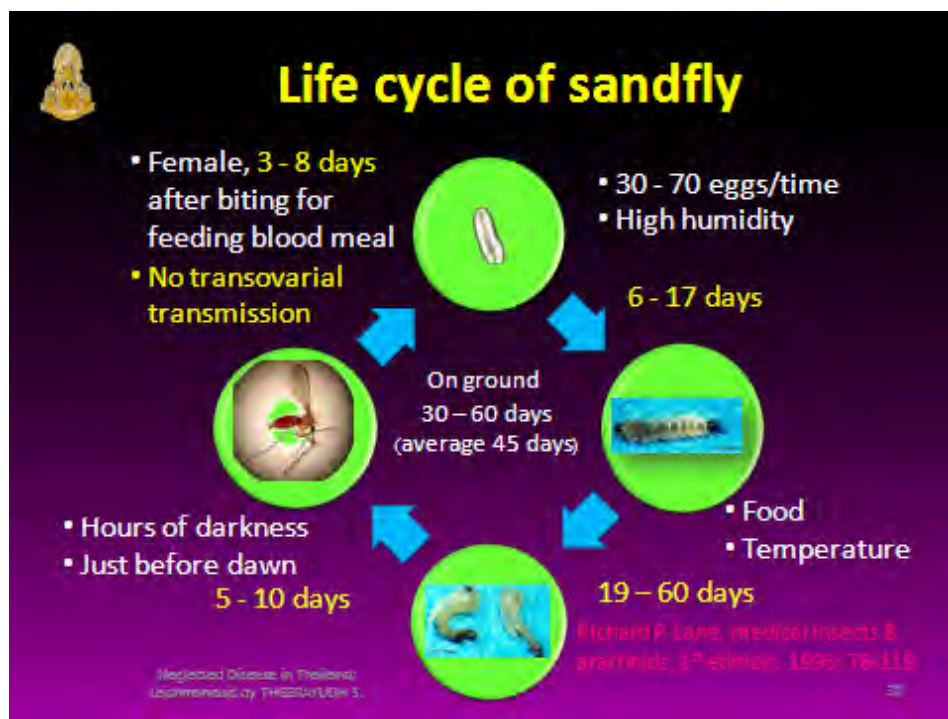
ภาพจาก <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2003/Leishmania/Vector%20and%20Reservoirs.html>

รูปที่ 8 ตัวเต็มวัยของริ้นฝอยทราย (Sandfly)



รูปที่ 9 การเปรียบเทียบขนาดระหว่างริ้นฝอยทรายกับยุง

วงจรชีวิตของริ้นฝอยทราย



ดัดแปลงจาก *Medical insects & Arachnids*, 1st edition. 1993; 78-119.

รูปที่ 10 วงจรชีวิตของริ้นฝอยทราย

วงจรชีวิตของริ้นฝอยทรายทุกระยะเกิดขึ้นบนดิน โดยเฉลี่ยใช้เวลานาน 30-60 วันต่อวงจรชีวิตหนึ่งรอบ (รูปที่ 10) เริ่มตั้งแต่ริ้นฝอยทรายเพศเมียเกาะดูดเลือดจากสัตว์มีกระดูกสันหลังประมาณ 3-8 วันก็จะวางไข่ (Eggs) ในดินบริเวณที่มีความชื้น อับแสงแดด สามารถวางไข่ได้ครั้งละประมาณ 30-70 ฟอง ใช้เวลาประมาณ 6-17 วันก็จะฟักออกเป็นตัวอ่อน (Larva) อาศัยและหากินจำพวกสารอินทรีย์ในดิน ซึ่งมีระยะการเจริญเติบโตในช่วงนี้ 4 ระยะใช้เวลานานประมาณ 19-60 วัน จนพัฒนาเป็นตัวมด (Pupae) จำศีลอยู่ในดินใช้เวลาประมาณ 5-10 วันพัฒนาอวัยวะส่วนต่างๆจนครบกลายเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งถ้าเป็นเพศเมียก็จะดูดเลือดสัตว์เพื่อพัฒนาไข่และวางไข่เป็นวงจรเรื่อยไป ทั้งนี้วงจรชีวิตของริ้นฝอยทรายจะสั้นลงหรือยาวนานขึ้นนั้นจะขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ความชื้น และอาหารในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ

กรณีที่รึ้นฝอยทรายเพศเมียมีเชื้ออยู่ หากมีการวางไข่ เชื้อลึขมาเนียจะไม่สามารถติดต่อสู่ไข่ได้ (No transovarial transmission) ดังนั้นรึ้นฝอยทรายที่เกิดมาในรึ้นถัดไปจากตัวแม่ที่มีเชื้อก็จะมีเชื้อลึขมาเนียที่จะไปแพร่โรคได้²

แหล่งเพาะพันธุ์ของรึ้นฝอยทราย

พื้นที่หรือบริเวณที่ความชื้น อับแสงแดด และมีอาหารเป็นสารอินทรีย์สำหรับตัวอ่อนของรึ้นฝอยทราย เพื่อดำรงชีพหลังฟักออกจากไข่ และน้ำท่วมไม่ถึง หรือไม่เปียกชุ่มถึงมีน้ำขัง จึงจะเป็นที่อยู่ที่เหมาะสมของรึ้นฝอยทราย³⁰ ข้อสังเกตที่สำคัญคือ แหล่งเพาะพันธุ์และที่อยู่อาศัยของรึ้นฝอยทรายนี้มักใกล้เคียงกับแหล่งอาหารหรือที่อยู่ของสัตว์ที่มันชอบดูดเลือดด้วย แหล่งเพาะพันธุ์และที่อยู่สำคัญได้แก่

- 1) โรงเลี้ยงสัตว์ หรือคอก หรือเล้าเลี้ยงสัตว์ ได้แก่ สัตว์จำพวกวัว ควาย เป็ด ไก่ กระต่าย เป็นต้น
- 2) รูที่อยู่อาศัยของสัตว์ เช่น รุหนู รุจ และรูของสัตว์เลื้อยคลานอื่นๆ
- 3) แขนงรากของต้นไม้ โคนต้นไม้ เปลือกไม้
- 4) รอยแตกร้างของสิ่งปลูกสร้าง เช่น ผนังบ้าน เสาไม้ เสาปูน โบราณสถาน
- 5) จอมปลวกเก่า (ไม่มีปลวกอาศัยอยู่แล้ว)
- 6) ก้อนอิฐ กองหิน กองทราย กองไม้ผืน
- 7) เรือนกล้วยไม้ เรือนปลูกต้นไม้
- 8) กอดันกล้วย หรือ กอไม้ประดับ พุ่มไม้เตี้ย
- 9) กองปุ๋ยหมัก ที่ที่มีการทับถมของขยะ ใบไม้
- 10) รุบนพื้นดิน
- 11) ถ้ำ หรืออุโมงค์
- 12) ใต้ท่อนซุงเก่า

พฤติกรรมของรึ้นฝอยทรายตัวเต็มวัย³¹⁻³³

เมื่อรึ้นฝอยทรายโตเต็มวัยจะมีพฤติกรรมในการดำรงชีพกล่าวคือ จะเคลื่อนที่ด้วยการกระโดดกึ่งบิน (โผ) เกาะพักไปเรื่อยๆจนพบแหล่งอาหาร ก็จะกระโดดเกาะกับสัตว์ที่ต้องการดูดเลือดนั้น ส่วนใหญ่มักออกหากินในเวลาตอนเย็นใกล้ตะวันตกดิน หรือพล้พล้ หรือกลางคืน และจะกัดภายนอกบ้าน (Outdoor) ในเวลากลางวันรึ้นฝอยทรายจะเกาะพักในที่ที่ปลอดภัย มีด อับแสง อุณหภูมิต่ำหรือมีความเย็นและชื้น ทั้งนี้จะหากิน

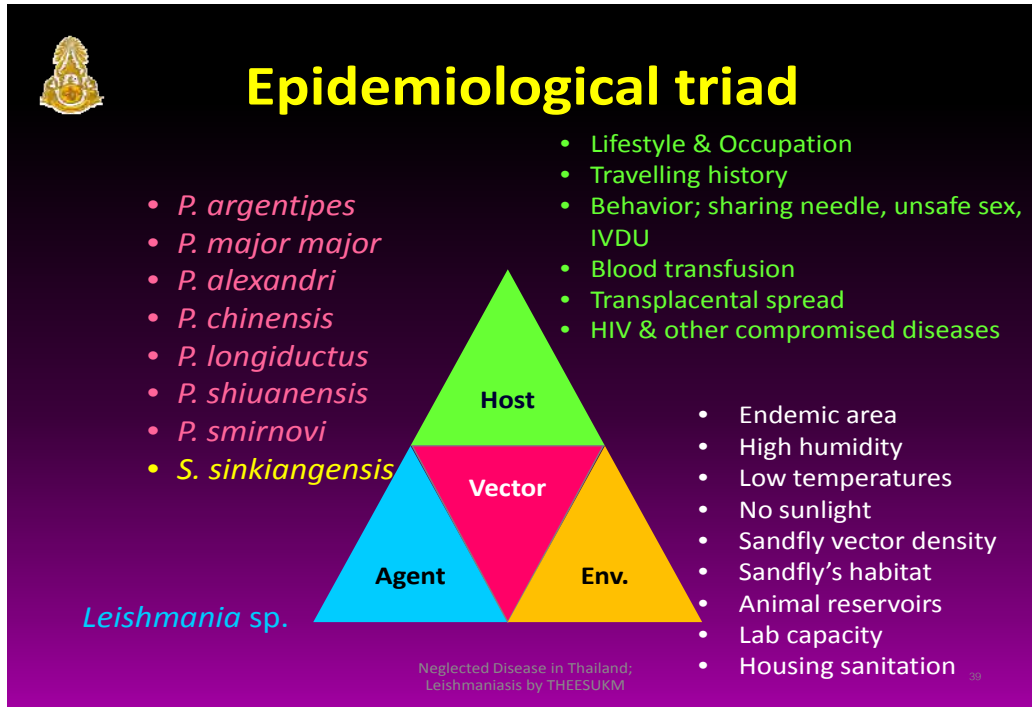
เวลากลางวันก็ต่อเมื่อ รื่นฝอยทรายหิว และเกาะพักภายในบ้านของโฮสต์แล้วก็จะกัดในเวลากลางวันรวมถึง การพักอาศัยอยู่ภายในป่า หรือพื้นที่ที่คล้ายคลึงป่าเช่น สวนยางพารา พื้นที่ที่มีต้นไม้รกทึบ เป็นต้น

โดยปกติรื่นฝอยทรายจะอาศัยและออกหากินภายในรัศมี 200-300 เมตรจากแหล่งเพาะพันธุ์ (Breeding places) อย่างไรก็ตาม มันสามารถเคลื่อนที่ได้ไกลถึง 2.2 กิโลเมตร แต่ใช้เวลานาน 2-3 วัน กรณีที่ ย้ายหรือหาแหล่งอาหาร

รื่นฝอยทรายเพศเมียเท่านั้นที่จะดูดเลือดเพื่อการวางไข่ สำหรับรื่นฝอยทรายเพศผู้จะดูดน้ำหวาน สาร น้ำจากพืชและดอกไม้เท่านั้น ดังนั้นการจับรื่นฝอยทรายเพศเมียจึงเป็นวิธีการสำคัญในการจำแนกชนิดเพื่อ พิสูจน์ถึงความเป็นไปได้ในการนำเชื้อลิชมาเนียจากสัตว์รังโรคไปแพร่ให้กับมนุษย์หรือสัตว์อื่นๆต่อไป

องค์ประกอบสามเส้าทางระบาดวิทยาของโรคลิชมาเนีย (Epidemiological triad of Leishmaniasis)

การติดเชื้อลิชมาเนียจะเกิดขึ้นได้ ก็ต่อเมื่อมีการปฏิสัมพันธ์กันของโฮสต์ (มนุษย์) ตัวเชื้อลิชมาเนีย (กว่า 21 species) รื่นฝอยทราย (กว่า 30 species) และสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะมนุษย์ นอกจากปัจจัยเรื่องวิถีชีวิต อาชีพ ประวัติการเดินทางไปยังพื้นที่ที่มีโรคนี้เป็นโรคประจำถิ่น โรคประจำตัวแล้ว ยังมีปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ ได้แก่ ความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันเช่นการติดเชื้อ HIV/AIDS หรือการเป็นโรคอื่น ๆ ที่มีผลต่อระบบ ภูมิคุ้มกัน การมีพฤติกรรมเสี่ยงเช่น การใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน การมีเพศสัมพันธ์ที่ไม่ปลอดภัย รวมถึงการมี ประวัติการได้รับเลือด เป็นต้นปัจจัยเหล่านี้ทำให้มีโอกาสได้รับหรือสัมผัสเชื้อได้ อีกทั้งการอาศัยอยู่ใน สิ่งแวดล้อมที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตขยายพันธุ์ของแมลงพาหะเช่น มีความชื้นและค่อนข้างอับแสง อุณหภูมิไม่ สูง (ไม่ร้อน) เป็นต้น ส่งผลให้ความหนาแน่นของรื่นฝอยทรายมากขึ้น และการมีความหนาแน่นของสัตว์รังโรค ในพื้นที่สูง³⁴ (รูปที่11)



ดัดแปลงจาก Clin Microbiol Rev. 2004 Jan;17(1):136-73.

รูปที่ 11 องค์ประกอบสามเส้าทางระบาดวิทยาของโรคไลชมาเนีย

อาการและอาการแสดงของโรคไลชมาเนีย^{10, 14}

อาการและอาการแสดงของโรคมีตั้งแต่ไม่มีอาการใดๆ (Asymptomatic) จนถึงมีการติดเชื้อของอวัยวะภายใน (Visceral leishmaniasis; VL) อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางคลินิกของโรคจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อ *Leishmania sp.* (ตารางที่ 2) ซึ่งลักษณะทางคลินิกของโรคหลัก 2 ลักษณะคือ

1) **Cutaneous Leishmaniasis (CL)** เป็นแผลเรื้อรังตามผิวหนังในบริเวณที่ถูกริ้นฝอยทรายกัดซึ่งเกิดจากเชื้อ *L. donovani* *L. infantum* *L. tropica* *L. major* *L. aethiopica* และ *L. killicki* มีระยะพักตัวปกตินานเป็นสัปดาห์ไปจนถึงเป็นเดือน ซึ่งรอยโรคอาจจะปรากฏให้เห็นบนผิวหนังภายใน 2-3 วัน หรือหลังจากออกจากพื้นที่ที่มีการระบาดนานเป็นปีก็ได้ พยาธิสภาพของโรคที่สำคัญ คือ ผู้ป่วยจะมีตุ่มหรือแผลเกิดขึ้นเพียงแห่งเดียว หรือหลายแห่งขึ้นอยู่กับว่า Promastigotes จะอยู่ ณ บริเวณใด นั่นหมายความว่า ริ้นฝอยทรายกัดในบริเวณใดมากน้อยแค่ไหน รอยโรคเริ่มต้นจากมีตุ่มเล็กแดงกลมแข็ง ต่อมาตุ่มนี้มีขนาดใหญ่ขึ้น มีสะเก็ดน้ำเหลืองปกคลุมแตกออกเป็นแผลที่ขยายขนาดอย่างช้าๆ แผลแดง ตื้น ขอบเขตชัดเจน ขอบแผลยก ตรงกลางแผลมี granulation tissue ปรากฏให้เห็น ทั้งนี้เพราะการดำเนินโรคเป็นไปในลักษณะของภาวะภูมิไวเกินประเภทที่ 4 (Hypersensitivity type IV) หรือที่เรียกว่า Delayed type hypersensitivity (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 รอยโรคของลิชมาเนียที่ผิวหนังแบบต่าง ๆ ในทหารอเมริกัน
ระหว่างปฏิบัติหน้าที่ในประเทศอิรัก

สำหรับ Mucocutaneous leishmaniasis (MCL) นั้นจะมีลักษณะคล้ายกับ CL เพียงแต่จะเกิดแผลลูกกลมในอวัยวะที่มีเยื่อเมือก เช่น จมูก ปาก เป็นต้น ซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อ *L. braziliensis* *L. amazonensis* มักพบในแถบประเทศในอเมริกากลางและอเมริกาใต้

2) **Visceral Leishmaniasis (VL)** เป็นการติดเชื้อของอวัยวะภายในร่างกายโดยเฉพาะที่ไขกระดูก ม้าม ต่อม้ำเหลือง และตับ เป็นต้น ถือว่าเป็นลักษณะโรคที่รุนแรงที่สุด หากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสมอาจทำให้เสียชีวิตได้ภายใน 2 ปี เกิดจากการติดเชื้อในกลุ่มของ *Leishmania donovani* complex ซึ่งได้แก่ *L. donovani* *L. infantum* และ *L. chagasi* มีระยะฟักตัวของเชือนี้นานตั้งแต่ 10 วัน – 2 ปี โดยเฉลี่ยประมาณ 2-3 เดือน ลักษณะของอาการและอาการแสดง (รูปที่ 13) คือ

- 1) มีไข้เรื้อรังเป็น ๆ หาย ๆ (Intermittent fever; chronically)
- 2) น้ำหนักลดอย่างต่อเนื่อง; ผอมโซ (Progressive weight loss; Cachexia)
- 3) ซีด (Pale)
- 4) ท้องอืดและโตขึ้นจาก ม้ามโต (Splenomegaly) และ ตับโต (Hepatomegaly)
- 5) มีเลือดออกได้ง่าย (Bleeding tendency) เช่น เลือดกำเดาไหล เลือดออกตามไรฟัน
- 6) ต่อม้ำเหลืองโต (Lymphadenopathy)
- 7) ผิวหนังสีคล้ำขึ้น (Hyperpigmented skin)
- 8) อ่อนเพลีย (Fatigue)



Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366: 1561–77

รูปที่ 13 ลักษณะผู้ป่วยโรคไลชมาเนียแบบ VL

ตารางที่ 2 ลักษณะทางคลินิกของโรคจำแนกตามชนิดของเชื้อ *Leishmania* sp.

Cutaneous Leishmaniasis	Mucocutaneous Leishmaniasis	Visceral Leishmaniasis
<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. donovani</i> * <i>L. Infantum</i> * <i>L. mexicana</i> complex; <i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>Viannia</i> subgenus; <i>L. [V] brazillensis</i> <i>L. [V] panamensis</i> <i>L. [V] guyanensis</i> <i>L. [V] peruviana</i>	<i>L. [V] brazillensis</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. donovani</i> complex; <i>L. donovani</i>* <i>L. infantum</i>* in Mediterranean <i>L. chagasi</i> in America

นอกจากสปีชีส์ของเชื้อจะทำให้เกิดความแตกต่างของอาการทางคลินิกแล้ว ยังสามารถบ่งชี้ถึงสปีชีส์ของริ้นฝอยทราย รวมถึงระบาดวิทยาในพื้นที่ต่างๆของโลกด้วย ตัวอย่างเช่น *L. donovani* มีริ้นฝอยทรายที่สำคัญที่สำคัญเป็นพาหะคือ 1) *P. argentipes* ซึ่งพบว่าริ้นฝอยทรายชนิดนี้จะมีการกระจายตัวในประเทศ Bangladesh, India และ Nepal และ 2) *P. alexandri* จะพบการกระจายตัวทางตอนเหนือของประเทศแอฟริกา ไปจนถึงตะวันตกของประเทศจีน ในขณะที่ *L. tropica* ซึ่งทำให้เกิด Cutaneous Leishmaniasis (CL) มีริ้นฝอยทรายที่สำคัญเป็นพาหะคือ *P. sergenti* พบการกระจายตัวในกลุ่มประเทศตะวันออกกลางเป็นต้น

การตรวจวินิจฉัยโรคไลชมาเนีย

การวินิจฉัยผู้ป่วยโรคไลชมาเนียจำเป็นต้องอาศัยระบาดวิทยาของโรค (Epidemiology of disease) การซักประวัติการดำเนินของโรค อาการที่ผู้ป่วยบอก (Symptoms) รวมถึงพฤติกรรมและปัจจัยเสี่ยงต่อการสัมผัส

โรค (Behaviors & Risk factors) และการตรวจร่างกายเพื่อค้นหาอาการแสดง (Signs) จะทำให้แพทย์นึกถึงโรคนี้เมื่อผู้ป่วยอยู่ในพื้นที่ที่เคยมีการระบาดของโรคมาก่อน มีอาการและอาการแสดงเข้าได้กับโรคลิซมาเนีย ซีส อย่างไรก็ตาม การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อคัดกรองหรือเพื่อตรวจยืนยันก็จำเป็นในการวินิจฉัยโรคนี้ให้ได้อย่างถูกต้อง ซึ่งการตรวจทางห้องปฏิบัติที่สำคัญได้แก่

1. การแสดงและคัดแยกเชื้อลิซมาเนีย (**Demonstration & Isolation parasites**) โดยการดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) ยังคงเป็น gold standard ของการวินิจฉัยโรคนี้³⁵⁻³⁶ กรณีผู้ป่วยเป็นโรค CL สามารถตรวจได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับ ความสามารถหรือความถนัดของแพทย์ ความสามารถ และความพร้อมของห้องปฏิบัติการ ความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจ และความยินยอมของผู้ป่วยในการตรวจ วิธีการตรวจได้แก่

- 1) การเจาะดูดตัวอย่างชิ้นเนื้อผิวหนังรอยโรค (Skin aspiration) หรือ
- 2) การตัดชิ้นเนื้อผิวหนังรอยโรค (Skin biopsy)
- 3) การขูดผิวหนังรอยโรค (Skin scraping)

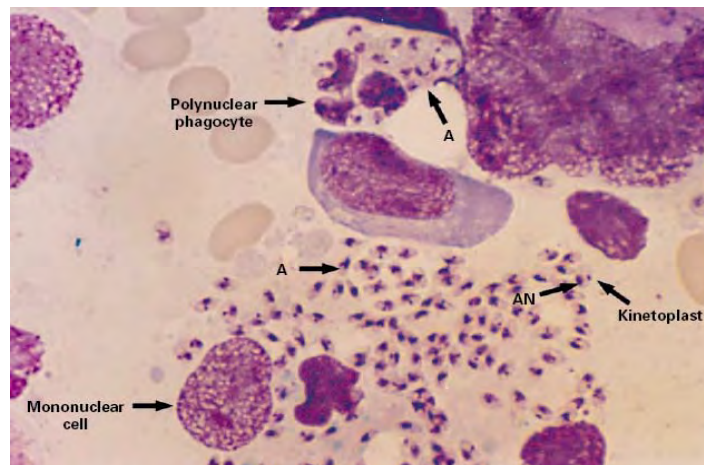
รอยโรคที่ผิวหนัง (ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่นอกर्मผ้า) ซึ่งเป็นมานานกว่า 3 สัปดาห์ขึ้นไป แม้ว่าจะรักษาด้วยยาปฏิชีวนะถูกต้องตามมาตรฐานแล้วแต่รอยโรคที่ผิวหนังนั้นยังไม่ดีขึ้นหรือยังไม่หาย ก็สามารถพิจารณาตรวจด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น โดยเฉพาะการทำ Skin biopsy ตำแหน่งที่ควรจะต้องอยู่ตรงขอบรอยโรคหรือขอบแผลโดยให้ได้เนื้อผิวหนังที่ดี (2/3) ให้มากกว่าผิวหนังที่เป็นแผล (1/3) ดังรูปที่ 14 และให้ได้ชิ้นเนื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร และลึกประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร นำไปแช่ใน 90-95% แอลกอฮอล์ นำส่งพยาธิแพทย์เพื่อทำการตัดชิ้นเนื้อทำสไลด์เนื้อเยื่อตรวจพิสูจน์ต่อไป



รูปที่ 14 ตำแหน่งที่เหมาะสมในการตัดชิ้นเนื้อผิวหนังรอยโรค (Skin biopsy)

ในกรณีผู้ป่วยเป็นโรค VL มีปัจจัยที่กำหนดวิธีการตรวจเช่นเดียวกันกับกรณีของ CL ซึ่งสามารถวิธีการตรวจได้แก่

1) การเจาะดูดหรือตัดเนื้อเยื่อไขกระดูก (Bone marrow aspiration & biopsy) พบว่า ให้ความไวเพียง (Sensitivity) ร้อยละ 60-85 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ endemic area ของโรคด้วยซึ่งในแต่ละประเทศก็จะแตกต่างกัน¹⁸ อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้แพทย์ในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิเช่น โรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไป โรงเรียนแพทย์ นิยมใช้ในการช่วยการวินิจฉัยและติดตามการรักษาผู้ป่วย เพราะสามารถทำได้โดยง่าย เนื่องจากมีแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางอายุรกรรมทั่วไป หรือโลหิตวิทยา พยาธิแพทย์ และรวดเร็วในการวินิจฉัยสามารถดำเนินการได้ภายในอย่างน้อย 1 วัน



N engl j med;1034 www.nejm.org October 3, 1996

รูปที่ 15 Bone marrow smear จากการเจาะไขกระดูก (Bone marrow aspiration)

2) การเจาะดูดหรือตัดเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง (Lymph node aspiration & biopsy) มีความไวเพียงแค่ร้อยละ 53-65 เท่านั้น ใช้ในกรณีที่พบว่าผู้ป่วยมีต่อมน้ำเหลืองโตในที่ต่างๆ ของร่างกาย ร่วมกันกับมีอาการเข้าได้กับโรคนี้ ก็ช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคโดยเฉพาะจาก วัณโรค หรือมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น เป็นวิธีที่สามารถดำเนินการได้ในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิเช่นเดียวกับการเจาะดูดหรือตัดเนื้อเยื่อไขกระดูก

3) การเจาะดูดเนื้อเยื่อม้าม (Spleen aspiration) ให้ความไวมากกว่าร้อยละ 95 (ร้อยละ 93-99) ทำในกรณีที่จำเป็นเท่านั้น เพราะเป็นหัตถการที่มีความเสี่ยงสูง และไม่นิยมทำโดยทั่วไป

4) การย้อมสีเม็ดเลือดขาว (Buffy coat staining) ที่ได้จากการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ (peripheral blood) จะมีประโยชน์ในกรณีที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Leishmania* และ HIV/AIDS (*Leishmania*/HIV co-infection) เพราะผู้ป่วยในภาวะนี้จะมีโอกาสพบเชื้อลิซมาเนียในกระแสเลือดประมาณ

ร้อยละ 50 สำหรับกรณีผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อลิชมาเนียอย่างเดิwmักนิยมทำวิธีการเจาะดูดหรือตัดเนื้อเยื่อไขกระดูกมากกว่าเพราะให้การวินิจฉัยที่ชัดเจนกว่า

5) การเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture) ซึ่งมีวัตถุประสงค์หลักคือ ช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยในกรณีที่ต้องการตรวจด้วยวิธีการข้างต้นไม่ประสบความสำเร็จ รวมถึงความต้องการในการใช้ antigen เพื่อการจำแนกสปีชีส์ และการวินิจฉัยทางอิมมูโนโลยี หรือนำมาทดสอบในสัตว์ดูลูกก่อโรค หรือ ศึกษาเกี่ยวกับยาที่ใช้ในการรักษา ทั้งนี้จะช่วยเพิ่มความไว (sensitivity) ในการคัดแยกเชื้อ อย่างไรก็ตาม การเพาะเชื้อจะใช้เวลาอย่างน้อย 1 เดือนในการเฝ้าดูการเจริญเติบโต และมีราคาแพง เพราะต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสูตรในการเตรียมเป็นการเฉพาะ จึงนิยมใช้ในการศึกษาวิจัยในเชิงลึกมากกว่านำมาใช้ในทางคลินิก และสามารถทำได้เฉพาะโรงพยาบาลที่เป็นโรงเรียนแพทย์ที่มีความพร้อมเท่านั้น

ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเชื้อลิชมาเนีย และการตรวจวิเคราะห์ทางสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) จะให้ความไว (sensitivity) มากกว่าการแสดงและคัดแยกเชื้อลิชมาเนียโดยการดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination)

2. การตรวจวิเคราะห์ทางสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนีย (Genetic detection) ที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification ซึ่งต้องทำการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างที่ส่งตรวจก่อนนำมาเข้ากระบวนการทำ PCR ซึ่งต้องใช้เวลาในการดำเนินงานอย่างน้อย 5-7 วัน ในกรณีส่งตรวจเป็น peripheral blood การตรวจด้วย PCR จะให้ความไวร้อยละ 72-100 ถ้าส่งตรวจเป็นไขกระดูก PCR จะให้ความไวสูงถึงร้อยละ 82-100³⁵⁻³⁶ ทั้งนี้การประสบความสำเร็จในการตรวจนี้มีปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของสิ่งส่งตรวจ คุณภาพของสิ่งส่งตรวจ ความชำนาญของผู้ตรวจ ความพร้อมของเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ เป็นต้น

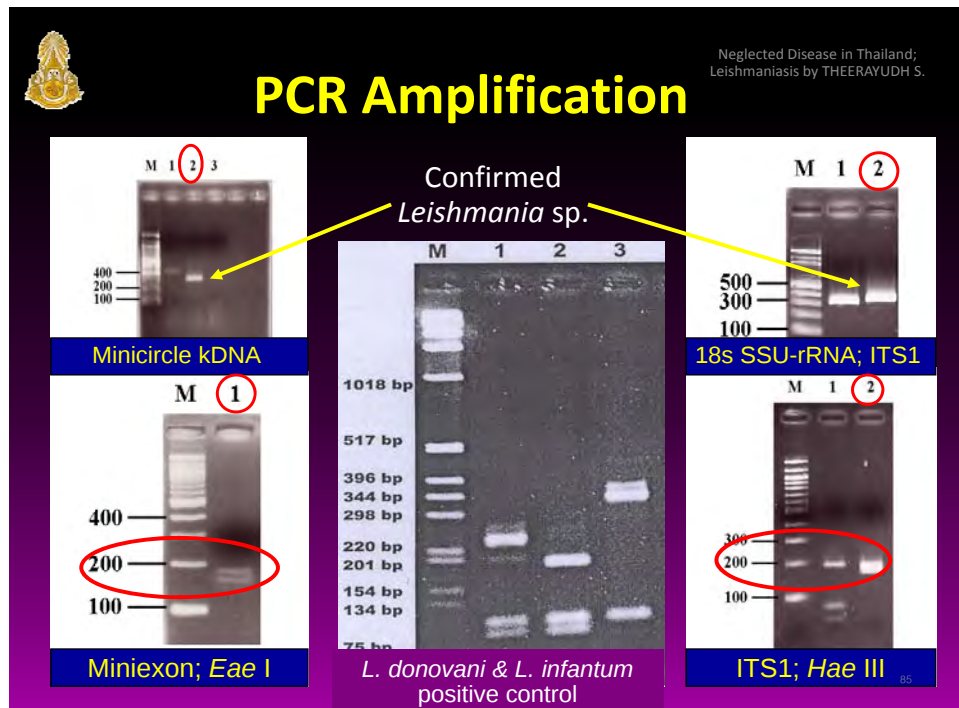
การตรวจ PCR ของเชื้อ *Leishmania* sp. กระทำใน 2 gene ดังนี้

1) PCR amplification ของ Minicircle kDNA เป็นการทำ PCR ในบริเวณ minicircle gene ซึ่งเป็นตำแหน่งบนสายพันธุกรรมของเชื้อ *Leishmania* sp. วิธีนี้ใช้ยืนยันว่าสิ่งส่งตรวจมีเชื้อ *Leishmania* sp. หรืออีกนัยหนึ่งคือ เป็นการยืนยันการติดเชื้อ *Leishmania* sp. ว่ามีหรือไม่

2) PCR amplification ของ 18S SSU-rRNA gene เป็นการทำ PCR ในบริเวณ ITS1 ซึ่งเป็นตำแหน่งบนสายพันธุกรรมของ small subunit ribosomal DNA ของเชื้อลิชมาเนียเพื่อยืนยันสปีชีส์ของเชื้อ *Leishmania* sp. เช่นกัน

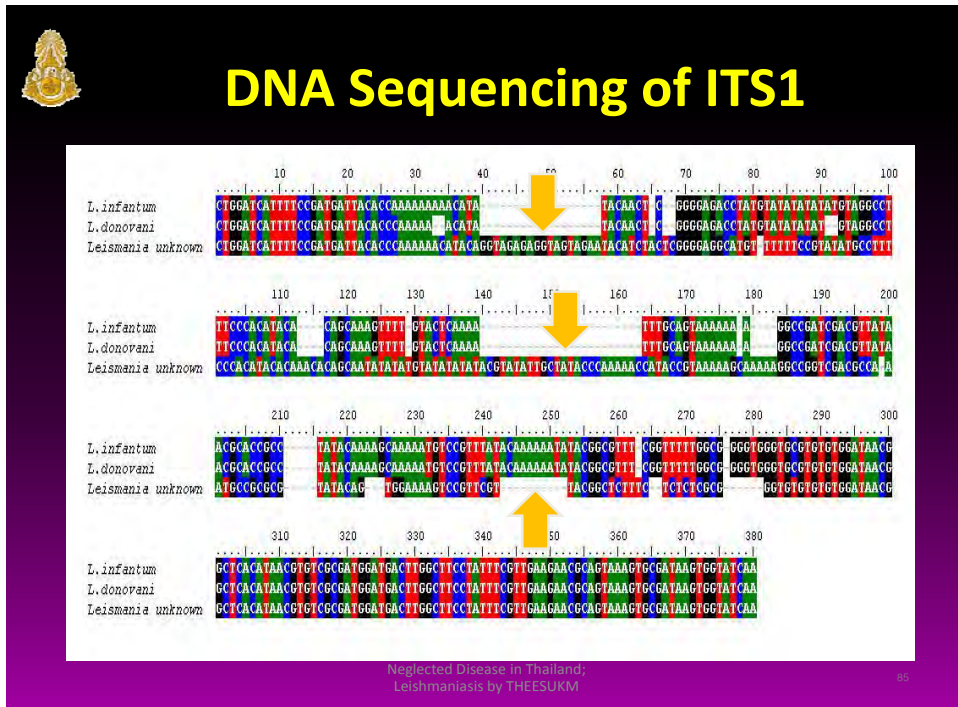
ซึ่งการตรวจ PCR amplification ทั้ง 2 gene จะแตกต่างกันเพียงตำแหน่งที่มีการวิเคราะห์สายพันธุกรรม ทั้งนี้เพื่อพิสูจน์การติดเชื้อลิชมาเนียซึ่งกันและกัน อย่างไรก็ตามตัวอย่างสารพันธุกรรมจากทั้งสอง

วิธีจะเข้าสู่การวิเคราะห์ด้วยวิธี Restrict Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นขั้นตอนที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ Eae I และ Hae III ในการวิเคราะห์สารพันธุกรรมจากแบบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ⁷ (รูปที่ 16)

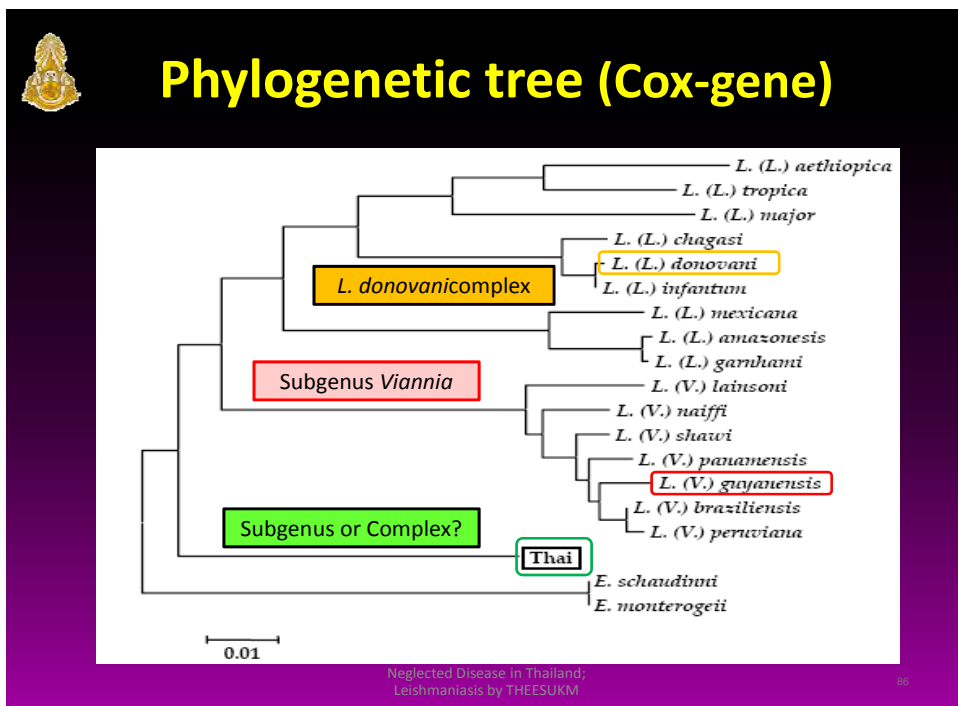


รูปที่ 16 การตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมที่ Minicircle kDNA ตรงตำแหน่ง Miniexon gene และที่ 18s SSU-rRNA ตรงตำแหน่ง ITS1 ของ small subunit ribosomal DNA ของเชื้อไลชมาเนีย

สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาลำดับคู่เบสของสายพันธุกรรม (DNA Sequencing) เป็นการนำตัวอย่างสารพันธุกรรมที่ได้มาจากวิธีที่ 2 ตรงตำแหน่ง ITS1 มาวิเคราะห์หาลำดับคู่เบสของสายพันธุกรรม โดยการนำลำดับคู่เบสมาเปรียบเทียบกับลำดับคู่เบสของเชื้อไลชมาเนียที่รายงานในฐานข้อมูลพันธุกรรม (GenBank) อยู่แล้วแต่เดิม ทั้งนี้เพื่อพิสูจน์ทราบสปีชีส์ของเชื้อ *Leishmania* sp. ที่ต้องการพิสูจน์ (รูปที่ 17) หลังจากนั้นก็จะนำลำดับคู่เบสนี้ไปวิเคราะห์หาลำดับการวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) และจะเป็นการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างของลำดับคู่เบสของไลชมาเนียที่กำลังตรวจกับเชื้อไลชมาเนียที่ทราบกันอยู่แล้วหลายสปีชีส์พร้อมๆกัน (รูปที่ 18)



รูปที่ 17 การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อลิซมาเนีย (DNA sequencing)



รูปที่ 18 การตรวจวิเคราะห์ลำดับวิวัฒนาการของเชื้อลิซมาเนีย (Phylogenetic tree)

1) **Direct Agglutination Test (DAT)** เป็นการตรวจทางซีโรโลยีแบบ Semi-quantitative test ใช้ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อลิชมาเนีย โดยมีเกณฑ์ในการแปลผลคือ Anti-*Leishmania* Antibodies titer > 1:100 ขึ้นไป และจากการวิเคราะห์ค่าความไวและความจำเพาะของ DAT จากหลายๆการวิจัย (Meta-analysis) พบว่าให้ความไว (Sensitivity) ร้อยละ 94.8 และให้ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 97.1 การตรวจด้วยวิธีนี้แสดงดังรูปที่ 19 และ 21



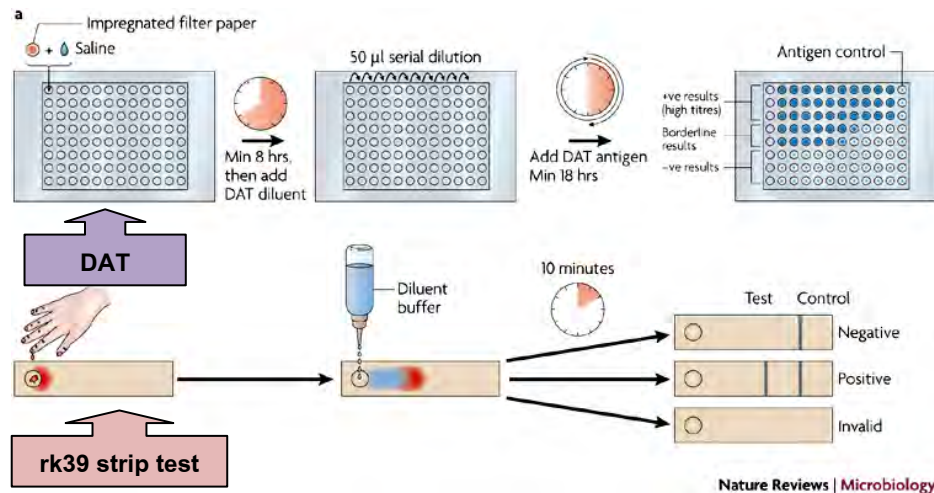
โครงการการเฝ้าระวังเฉพาะพื้นที่ของโรคลิซมาเนียในประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เคยเกิดการระบาดของประเทศไทย โดย พ.ต.นพ.ธีรยุทธ สุขมี และคณะ

2) rk39 strip test เป็นการตรวจในลักษณะของ ELISA โดยใช้โปรตีนส่วน kinesin-related protein ของเชื้อ *L. chagasi* ซึ่งมันเป็นโปรตีนส่วนที่ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง (Conserved) ของเชื้อลิซมาเนีย ในตระกูล *L. donovani* complex (รูปที่ 20) มาผลิตในรูปของ strip หรือ kit test โดยการใช้ซีรัมมาหยดลงบน ตำแหน่งที่ใส่ตัวอย่างซีรัมและหยด dilution buffer รอเวลา 10 นาที ก็สามารถอ่านผลการตรวจโดยผลบวกจะให้ขีดสีแดงจำนวน 2 ขีดปรากฏในตำแหน่งที่ต่างกันกล่าวคือ ด้านบน คือ control ด้านล่างคือ ผลบวก หากปรากฏเฉพาะขีดสีแดงด้านบนเพียงตำแหน่งเดียวแสดงว่า ให้ผลเป็นลบ ดังรูปที่ 21 ไม่สามารถระบุถึงค่า titer ของระดับแอนติบอดีได้ และจากการวิเคราะห์ค่าความไวและความจำเพาะของ DAT จากหลายๆการวิจัย (Meta-analysis) พบว่าให้ความไว (Sensitivity) ร้อยละ 93.9 และให้ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 95.3¹⁸⁻

19



รูปที่ 20 การตรวจด้วย rk39 strip test



ภาพจาก Nature review Microbiology; 2007 (5); 873-882.

รูปที่ 21 การตรวจวิเคราะห์ทางซีโรโลยีด้วย Direct Agglutination Test (DAT) และ การตรวจด้วย rk39 strip test

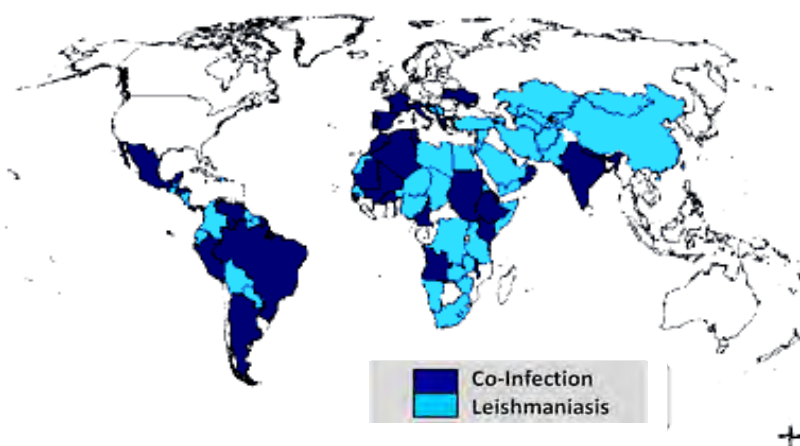
สำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางซีโรโลยีในภาคสนามเพื่อการคัดกรองการติดเชื้อลิซมาเนียเช่น การสอบสวนโรค และงานวิจัยภาคสนาม การใช้ rk39 strip test จะสะดวกและรวดเร็วเพราะมีลักษณะเป็น kit test ใช้ง่าย แต่ประสิทธิภาพของ rk39 strip test นี้ขึ้นอยู่กับความชุกของเชื้อลิซมาเนียในกลุ่มสปิชีส์ที่นำมาใช้ ชดทดสอบ และมักจะใช้ในประเทศที่มีความชุกของโรคนี้โดยเฉพาะกับเชื้อในกลุ่ม *L. donovani* complex คือ *L. donovani* *L. infantum* *L. chagasi* เท่านั้นและที่สำคัญคือมีราคาแพง หาซื้อยาก และน้ำยา diluents buffer ต้องเก็บในอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อรักษาคุณภาพ (cold chain)

ในประเทศไทยมีการนำ rk39 strip test มาใช้ในการสอบสวนโรคในจังหวัดพังงาและนครศรีธรรมราช เพียงสองกรณีนี้พบว่า เมื่อใช้ตรวจในผู้ป่วยยืนยันโรคลิซมาเนียให้ผลเป็นลบทั้งสองกรณี และยังไม่มีการนำมาใช้ในวงกว้าง สำหรับการสอบสวนโรคลิซมาเนียของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขในทุกกรณีจะตรวจด้วย DAT เนื่องจากสามารถจัดหาได้ง่าย ไม่ต้องอาศัย cold chain เพื่อการรักษาคุณภาพ และถึงแม้จะมีขั้นตอนในการตรวจมากและใช้เวลาในการตรวจนานอย่างน้อย 2-3 วัน แต่ให้ค่าความไวและความจำเพาะที่สูงกว่า rk39 strip test อีกประการหนึ่งคือ DAT สามารถบอกระดับ titer ของแอนติบอดีได้เช่น 1: 100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 เป็นต้น ในขณะที่ rk39 strip test บอกเพียงแค่ผลเป็นบวกหรือลบเท่านั้น

การติดเชื้อลิชมาเนียร่วมกับเชื้อเอชไอวี (*Leishmania* /HIV co-infection)

ผู้ป่วยโรคลิชมาเนียที่ติดเชื้อ HIV ร่วมด้วย (*Leishmania*/HIV co-infection) ถูกรายงานพบเป็นรายแรก ในปีพ.ศ.2528 ถือว่าเป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญของผู้ติดเชื้อ HIV-1 ในปัจจุบัน ซึ่งเชื้อ HIV-1 จะเปลี่ยนธรรมชาติโรค (Natural history of disease) และระบาดวิทยาของโรคลิชมาเนีย กล่าวคือ ส่งผลให้เกิดการระบาดของโรค ลิชมาเนียจากเดิมที่มีรายงานผู้ป่วยเป็นราย ๆ กลายเป็นการระบาดในวงกว้าง เพราะผู้ป่วย HIV/AIDS ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีโรคลิชมาเนียเป็นโรคประจำถิ่นจะเสี่ยงต่อการเกิดโรคลิชมาเนีย 100 – 2,320 เท่า ลดการตอบสนองต่อการรักษา และเพิ่มโอกาสการกลับเป็นซ้ำของโรคลิชมาเนีย ในขณะเดียวกัน Visceral leishmaniasis (VL) จะทำให้ผลของการติดเชื้อ HIV รุนแรงขึ้นจนเกิดอาการของโรคเอดส์ (AIDS) ซึ่งทั้งสองโรคนี้จะร่วมส่งเสริมให้เกิดอันตรายต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดฟิงเซลล์ (Cellular-mediated immune response; CMIR) เพราะเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีเซลล์เป้าหมายเดียวกันคือ CD₄ T-cell^{10, 18}

ปัจจุบันมีรายงานการติดเชื้อ *Leishmania*/HIV co-infection โดยศูนย์การเฝ้าระวังการติดเชื้อร่วมกัน 28 แห่งจาก 35 ประเทศทั่วโลกมีรายงานการติดเชื้อ *Leishmania*/HIV co-infection พบผู้ป่วย VL/HIV co-infection ร้อยละ 2–12 ของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อร่วมทั้งหมดทั่วโลก (รูปที่ 22) และหากพิจารณาเฉพาะประเทศที่อยู่ทางตอนใต้ของทวีปยุโรป (Southern Europe) ซึ่งปัจจุบันมีรายงานจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะใน 4 ประเทศได้แก่ ประเทศฝรั่งเศส โปรตุเกส สเปน และอิตาลี มีรายงานผู้ป่วยร้อยละ 25-70 ของผู้ป่วย VL/HIV co-infection และร้อยละ 1.5–9 ของผู้ป่วยเอดส์ที่มีการติดเชื้อลิชมาเนียร่วมด้วย (AIDS/Leishmaniasis)³⁷⁻³⁸



ภาพจาก http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index1.html

รูปที่ 22 Distribution of *Leishmania*/HIV co-infection in the world

1.1 Visceral leishmaniasis/HIV co-infection

มีรายงานผู้ป่วย VL/HIV co-infection มากในยุโรปตอนใต้คือ ประเทศฝรั่งเศส โปรตุเกส สเปน และ อิตาลี ซึ่งลักษณะผู้ป่วยที่พบมักจะเป็นเพศชาย วัยหนุ่ม มีประวัติการใช้สารเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น และมีการติดเชื้อ *L. infantum* (เพราะยุโรปตอนใต้เป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของ *L. infantum*) และการระบาดของ HIV/AIDS ทำให้เกิดการกระจายของโรค leishmaniasis ด้วย โดยมีปัจจัยเสี่ยงร่วมกันของทั้งสองโรคคือ การใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน

การติดเชื้อ HIV ของผู้ป่วยโรค Leishmaniasis ทำให้ผู้ป่วยที่ยังไม่แสดงอาการของโรคเอดส์ (Asymptomatic) เกิดอาการและอาการแสดงของโรคเอดส์ (Symptomatic) ได้เร็วขึ้น เนื่องจากทั้งสองโรคนี้จะสนับสนุนซึ่งกันและกันในการทำลายระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (Cumulative Immunosuppression) โดยที่เชื้อ *Leishmania* sp. จะกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเชื้อ HIV จากการศึกษพบว่า Lipophosphoglycan ของเชื้อ *L. donovani* จะช่วยทำให้เชื้อ HIV (Transcription of HIV) เพิ่มมากขึ้นในเม็ดเลือดขาวชนิด CD₄ cells ในขณะเดียวกันตัวเชื้อ HIV เองจะช่วยเพิ่มโอกาสการแบ่งตัวของเชื้อ *Leishmania* ในเม็ดเลือดขาว Macrophage ได้มากขึ้นเช่นกัน ซึ่งส่วนใหญ่กว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วย VL/HIV co-infection มักพบว่ามีจำนวน CD₄ cell น้อยกว่า 200/ μ L อีกทั้งมีการแพร่กระจายของเชื้อลิซมาเนียได้มากทั่วร่างกาย³⁹ เพิ่มโอกาสการปรากฏของเชื้อลิซมาเนียตามอวัยวะต่างๆที่ไม่คุ้นเคยทางคลินิกเช่น ปอด อวัยวะในระบบทางเดินอาหาร กล้องเสียง ลำไส้ใหญ่ ส่วน rectum น้ำไขสันหลัง เป็นต้น และลดโอกาสการให้ผลบวกของการตรวจทางซีโรโลยีของผู้ป่วย ทำให้การตรวจวิเคราะห์ทางซีโรโลยีไม่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วย VL/HIV co-infection⁴⁰⁻⁴¹

1.2 Cutaneous leishmaniasis /HIV co-infection

กรณีของการติดเชื้อ CL/HIV co-infection จะมีการดำเนินโรคเหมือนกับ VL/HIV co-infection เพียงแต่มีอาการแสดงปรากฏที่ผิวหนังเท่านั้น ที่สำคัญคือ การติดเชื้อร่วมกันแบบนี้จะลดโอกาสการเกิดแผล ซึ่งเป็นรอยโรคปกติที่จะพบในผู้ป่วย CL ดังนั้นอาการทางคลินิกของผู้ป่วย CL/HIV co-infection ที่สำคัญมี 3 ลักษณะคือ

- 1) รอยโรคที่ผิวหนังสามารถปรากฏได้หลายรูปแบบเช่น Papulonodular, Ulcerative, Infiltrative, Lepromatous, และ Diffuse Psoriasis-like, Keloid, Histioid หรือ Kaposi-like lesion
- 2) รอยโรคที่ผิวหนังสามารถปรากฏได้มากกว่า 1 รูปแบบในผู้ป่วยแต่ละราย
- 3) เชื้อลิซมาเนียที่ก่อโรคทางผิวหนังเช่น *L. infantum* *L. braziliensis* *L. mexicana* และ *L. amazonensis* จะสามารถตรวจพบได้ในอวัยวะภายใน (Visceral organs) ในทำนองเดียวกันกับ *L.*

donovani และ *L. infantum* หรือ *L. chagasi* ซึ่งก่อโรคในอวัยวะภายใน ก็สามารถพบอาการแสดงที่ผิวหนังได้เช่นกัน⁴⁰⁻⁴¹

1.3 การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วย *Leishmania* / HIV co-infection

โดยปกติการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยติดเชื้อลิซมาเนียจะประกอบด้วย

1) การตรวจหาตัวเชื้อ *Leishmania* sp. ได้แก่ การเจาะตรวจและหรือการตัดชิ้นเนื้อของไขกระดูก (Bone marrow aspiration & biopsy) หรือต่อมน้ำเหลือง (Lymph node aspiration & biopsy) การเจาะตรวจม้าม (Splenic aspiration) การย้อมติดสีของ Buffy coat และการเพาะเชื้อ (Culture)

2) การตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) รวมไปถึงการตรวจวิเคราะห์ลำดับคู่เบสของสารพันธุกรรม (DNA sequencing)

3) การตรวจทางซีโรโลยี เช่น Direct agglutination test (DAT) หรือ rK39 strip test เป็นต้น

ทั้งนี้ขึ้นกับความพร้อมและความสามารถของห้องปฏิบัติการในการตรวจวิเคราะห์ในแต่ละแห่งอย่างไรก็ตาม สำหรับการสอบสวนโรค ซึ่งดำเนินการในภาคสนามเหมาะกับการใช้การตรวจทางซีโรโลยีด้วยวิธี Direct agglutination test (DAT) เพราะให้ความไวและความเจาะจงสูง มีความน่าเชื่อถือดี³⁷

สำหรับผู้ป่วย *Leishmania* / HIV co-infection อาจจะจำเป็นต้องทำการตรวจหาการติดเชื้อในอวัยวะต่างๆตามอาการแสดงที่ตรวจพบและพิจารณาตามความเหมาะสม เช่น น้ำไขสันหลัง กล่องเสียง ปอด อวัยวะในระบบทางเดินอาหาร ลำไส้ใหญ่ส่วน rectum และอีกประการหนึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มีโอกาสตรวจพบเชื้อในรูปของ amastigotes ในเลือด peripheral blood ลักษณะดำรงชีพแบบอิสระ (Free living) ได้ประมาณร้อยละ 50 ของผู้ป่วย HIV/AIDS (ขณะยังไม่ได้รับยารักษา) ด้วยเหตุนี้ การเก็บตัวอย่างเลือดมาปั่นแยก Buffy coat แล้วนำไปเพาะเชื้อก็จะช่วยในการวินิจฉัยได้ พบว่ามีความไว (Sensitivity) เพียงร้อยละ 64-67 อย่างไรก็ตาม การเจาะไขกระดูกและหรือม้ามแล้วนำตัวอย่างเลือดมาเพาะเชื้อจะให้ความไวสูงกว่าคือ ร้อยละ 63-100³⁷

ในกรณีที่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาล จะมีข้อพิจารณาในการให้ผู้ป่วยออกจากโรงพยาบาลโดยการตรวจยืนยันให้แพทย์แน่ใจว่าผู้ป่วยหายขาดจากโรคลิซมาเนีย ซึ่งเรียกว่า Test of Cure (TOC) และช่วยในการติดตามการดื้อยาของเชื้อลิซมาเนียโดยการตรวจทดสอบทางปาราสิตวิทยาเช่น การเจาะตรวจหาเชื้อในไขกระดูก หรือในต่อมน้ำเหลือง หรือการเพาะเลี้ยงเชื้อ หรือการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อลิซมาเนียจาก Buffy coats ด้วยวิธี PCR ที่ระยะเวลา 1 และ 6 เดือนหลังการรักษา หากผลการตรวจข้างต้นให้ผลเป็นบวก ก็พิจารณาให้การรักษาซ้ำและติดตามการรักษาตามแนวทางที่เหมาะสมต่อไป³⁷

โดยสรุปการมีภาวะ *Leishmania*/HIV co-infection จะส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยโรคลิซมาเนียในทางลบ กล่าวคือ เชื้อ HIV จะทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยถูกทำลายทั้งหมด เพิ่มโอกาสการเกิด

โรคไลชมาเนียเมื่อได้รับเชื้อได้เร็วขึ้น มีปริมาณของเชื้อ *Leishmania* sp. ในเลือดและไขกระดูกมากขึ้น เพิ่มโอกาสการติดเชื้อฉวยโอกาสอื่นๆตามมา โอกาสการตรวจวิเคราะห์ทางซีโรโลยีให้ผลเป็นบวกต่ำ และมีอัตราการรักษาล้มเหลวสูงขึ้น ตลอดจนเพิ่มโอกาสการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคไลชมาเนียมากขึ้น

สถานการณ์โรคไลชมาเนียในประเทศไทย (Situation of Leishmaniasis in Thailand)

สำหรับประเทศไทยมีรายงานผู้ป่วย Leishmaniasis ครั้งแรกเป็น visceral leishmaniasis (Kala azar) ทั้งหมดเป็นชาวต่างชาติที่เข้ามารักษาตัวในประเทศ มีจำนวน 3 รายคือ ชาวปากีสถาน ชาวอินเดีย และชาวบังคลาเทศ ในปี พ.ศ. 2503, 2520 และ 2527 ตามลำดับ⁶ ต่อมาจามีรายงานพบผู้ป่วยที่เป็นคนไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2524-2553 ทั้งที่ติดเชื้อภายในประเทศและสัมผัสโรคมาจากต่างประเทศจำนวน 58 ราย^{4-7, 42-48} จำแนกเป็นผู้ป่วย Cutaneous leishmaniasis (CL) จำนวนทั้งสิ้น 43 ราย ส่วนใหญ่เป็นคนไทยที่ไปทำงานอยู่ในประเทศที่มีโรคนี้เป็นโรคประจำถิ่น และผู้ป่วย Visceral leishmaniasis (VL) จำนวนทั้งสิ้น 15 ราย ในจำนวนนี้มีอย่างน้อย 6 ใน 15 รายที่เป็นการติดเชื้อภายในประเทศ (Autochthonous) และปัจจุบันมีรายงานผู้ป่วย *Leishmania*/HIV co-infection จำนวน 4 ราย (VL 3 ราย และ CL 1 ราย) และเมื่อพิจารณาถึงแหล่งที่รายงานการเกิดโรคแบบ Sporadic case พบว่า มีรายงานผู้ป่วยแล้วใน 9 จังหวัด และพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อการสัมผัสโรคไลชมาเนียในประเทศไทยอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ (รูปที่ 23และตารางที่ 3)



รูปที่ 23 จังหวัดที่มีรายงานพบผู้ป่วยโรคไลชมาเนียชนิดทั้ง VL และ CL ตั้งแต่ปี 2539-2553

ตารางที่ 3 สรุปผลการสอบสวนผู้ป่วยโรคไลชมาเนียที่มีรายงานในประเทศไทย ตั้งแต่ปีพ.ศ.2539 – 2553

ปีพ.ศ.	จังหวัด/ อำเภอ	ข้อมูลผู้ป่วยจากการทบทวนประวัติการรักษา						ผลการสอบสวนโรค		
		อายุ (ปี) /เพศ	อาชีพ	โรคประจำตัว	อาการสำคัญ	ผลตรวจทาง ห้องปฏิบัติการ	การวินิจฉัย/ โรงพยาบาล/ ผลการรักษา	ผลการค้นหาผู้ป่วยราย ใหม่/สัตว์รังโรค	Leishmania sp. (DNA sequencing)	สปีชีส์ รังโรค
2539	สุราษฎร์ธานี อ.ชัยบุรี	3 หญิง	-	HIV negative	ไข้ ชีต ตัวเหลือง ตับม้ามโต	Pancytopenia, BM biopsy +ve IFA 1:10,000	VL รพ.จุฬาลงกรณ์	ไม่พบผู้ป่วยรายใหม่และ สัตว์รังโรค	ไม่มีการพิสูจน์	<i>P. stantoni</i> <i>S. pertusis</i>
2548	น่าน อ.เมือง	40 ชาย	รับจ้างก่อสร้าง	Amphetamine abuse, Alcoholism, HIV negative	ไข้ ชีต ตับม้ามโต Bleeding tendency Mediastinal mass	Pancytopenia, BM biopsy +ve Mass biopsy +ve No DAT	VL รพ.มหาราชนคร เชียงใหม่ กลับเป็นซ้ำหลังการ รักษาครั้งแรก	ไม่พบผู้ป่วยรายใหม่ 3 cows & 1 cat with positive DAT	<i>L. donovani</i>	<i>P. stantoni</i> <i>S. gemmifer</i> <i>S. barrales</i>
2549	พังงา อ.ตะกั่วทุ่ง	54 ชาย	เกษตรกรทำ สวนยางพารา	ไม่มี HIV negative	ไข้ ชีต ตับม้ามโต น้ำหนักลด Bleeding tendency	Pancytopenia, BM biopsy +ve DAT 1:200 (post treatment)	VL รพ.สงขลานครินทร์ กลับเป็นซ้ำหลังการ รักษาครั้งแรก	ไม่พบผู้ป่วยรายใหม่ 9 Cats with positive DAT	<i>L. siamensis</i>	<i>P. stantoni</i> <i>S. gemmifer</i> <i>S. barrales</i> <i>S. indicus</i>
2549	สงขลา อ.รัตภูมิ	62 หญิง	-	AIHA HIV negative	Febrile neutropenia รับ refer จาก รพ. หาดใหญ่	BM aspiration +ve	VL เสียชีวิตจาก Septic shock รพ.สงขลานครินทร์	ไม่มีการสอบสวนโรค เนื่องจากไม่ได้รับรายงาน	ไม่มีการพิสูจน์	ไม่มีการ ระบุโร
2550	นครศรีธรรม ราช อ.พรหมคีรี	44 ชาย	เกษตรกรทำ สวนยางพารา	Type 2 DM & Acute Renal Failure & blindness HIV negative	ไข้ ชีต น้ำหนักลด ต่อมน้ำเหลืองที่คอ และขาหนีบโต	Pancytopenia, BM aspiration +ve LN biopsy +ve No DAT	VL รพ.สงขลานครินทร์	ไม่พบผู้ป่วยรายใหม่ 1 Cow & 1 Cat with positive DAT แต่ PCR ให้ผลเป็น <i>Trypanosome</i> sp.	ไม่มีการพิสูจน์	<i>P. argente</i> <i>S. gemmifer</i> <i>S. barrales</i> <i>S. iyengara</i> <i>S. pertusis</i>
2550	สงขลา อ.สะเดา	81 ชาย	รับจ้างทำพิธี ทางไสย ศาสตร์	HIV/AIDS (Dx 2548)	ไข้เรื้อรัง เป็นๆ หายๆ อ่อนเพลีย ทานอาหารได้น้อย	Pancytopenia, BM biopsy +ve No DAT	VL เสียชีวิตจาก Septic shock รพ.สงขลานครินทร์	ไม่มีการสอบสวนโรค	ไม่มีการพิสูจน์	ไม่มีการ ระบุโร

ปีพ.ศ.	จังหวัด/ อำเภอ	ข้อมูลผู้ป่วยจากการทบทวนประวัติการรักษา						ผลการสอบสวนโรค		
		อายุ (ปี) /เพศ	อาชีพ	โรคประจำตัว	อาการสำคัญ	ผลตรวจทาง ห้องปฏิบัติการ	การวินิจฉัย/ โรงพยาบาล/ ผลการรักษา	ผลการค้นหาผู้ป่วยราย ใหม่/สัตว์รังโรค	Leishmania sp. (DNA sequencing)	สปีชีส์ รายนาม
2550	กรุงเทพ มหานคร เขตคลองสาน	66 ชาย	พนักงานขับ รถบรรทุกของ องค์การ อุตสาหกรรม ป่าไม้	Type 2 DM, HT HIV negative	ตัวเหลือง ตับม้ามโต น้ำหนักลด	Bicytopenia (Plt adequate), BM biopsy +ve DAT 1:3,200	VL รพ.พระนั่งเกล้า	ไม่พบผู้ป่วยรายใหม่และ สัตว์รังโรค	<i>L. infantum</i>	ดักจับ เนื่องจาก
2551	นครศรีธรรม ราช อ.ชะอวด	71 ชาย	-	Psoriasis vulgaris HIV negative	แผลที่หัวไหล่ขวา	-	CL รพ.สงขลานครินทร์	ไม่มีการสอบสวนโรค เนื่องจากไม่ได้รับรายงาน	ไม่มีการพิสูจน์	ไม่มีการส โร
2551	เชียงราย อ.เมือง	36 ชาย	รับจ้าง	HIV/AIDS 2549 PCP, CMV retinitis	ตุ่มนูนขึ้นบริเวณ ข้อนิ้วมือ แผลเป็น หน้าอกและหลัง	Skin biopsy +ve DAT -ve	CL รพ.เชียงรายประชานุ เคราะห์	ไม่พบผู้ป่วยรายใหม่และ สัตว์รังโรค	ไม่มีการพิสูจน์	<i>P. argenti</i> <i>S. barrau</i> <i>S. indica</i> , <i>S. iyenga</i>
2551	จันทบุรี อ.ท่าใหม่	37 ชาย	รับจ้างทำ ประมง	HIV/AIDS (Dx 2548) TB, HCV	ไข้ ซีด ตับม้ามโต ชาวม nephritonephr- otic syndrome	BM & Kidney biopsy +ve DAT > 1:1,600 (post treatment)	VL รพ.จุฬาลงกรณ์ กลับเป็นซ้ำหลังการ รักษาครั้งแรก	ไม่พบผู้ป่วยรายใหม่และ สัตว์รังโรค	<i>L. siamensis</i>	<i>P. philipp</i> <i>gouldi</i> , <i>S. barrau</i> <i>S. iyenga</i>
2551	สงขลา อ.สะเดา	52 หญิง	-	ไม่ปรากฏข้อมูล	แผลและผื่นที่หลัง	Skin biopsy +ve	CL รพ.สงขลานครินทร์	ไม่มีการสอบสวนโรค เนื่องจากไม่ได้รับรายงาน	ไม่มีการพิสูจน์	ไม่มีการส โร
2552	สงขลา อ.นาทวี	44 ชาย	-	HIV/AIDS (Dx 2544)	ไข้ ต่อมน้ำเหลือง คอโต Bleeding tendency	Pancytopenia, No DAT LN biopsy +ve BM biopsy +ve	VL รพ.สงขลานครินทร์	ไม่มีการสอบสวนโรค เนื่องจากไม่ได้รับรายงาน	ไม่มีการพิสูจน์	ไม่มีการส โร
2553	สตูล อ.ควนกาหลง	5 หญิง	-	β -thalassemia trait HIV negative	ซีด ตับม้ามโต	Pancytopenia, BM biopsy +ve DAT 1:800 (post treatment)	VL รพ.สงขลานครินทร์ กลับเป็นซ้ำหลังการ รักษาครั้งแรก	ไม่พบผู้ป่วยรายใหม่ 9 dogs, 3 Cows, 2 Rats, 1 Cat with positive DAT	<i>L. siamensis</i>	<i>P. argenti</i> <i>S. barrau</i> <i>S. iyenga</i> <i>S. gamme</i> <i>S. indica</i>

เชื้อไลชมาเนียที่มีรายงานในประเทศไทยขณะนี้ส่วนใหญ่ยังไม่ทราบสปีชีส์ที่ชัดเจน (ตารางที่ 3) กล่าวคือ บางกรณีไม่ได้มีการพิสูจน์ทราบชนิดของเชื้อว่าเป็นเชื้อไลชมาเนียสปีชีส์ใด เนื่องจากผู้ป่วยมักจะได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อไลชมาเนียจากอาการทางคลินิกและดำเนินการรักษาในทันที ปัจจุบันเชื้อไลชมาเนียที่พบแล้วในประเทศไทยมีจำนวน 3 สปีชีส์คือ 1) *Leishmania donovani* ในผู้ป่วยจังหวัดน่านเมื่อปีพ.ศ. 2548 2) *Leishmania sp. siamensis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ของโลก ซึ่งขณะนี้ยังอยู่ในกลุ่ม unclassified *leishmania* sp. ใน GenBank database ซึ่ง ณ ปัจจุบัน (พ.ศ.2553) มีรายงานพบการติดเชื้อสปีชีส์นี้ในมนุษย์ของประเทศไทยที่เป็น VL แล้วจำนวน 3 ราย (พังงา จันทบุรี และสตูล) และมีรายงานการติดเชื้อชนิดนี้ในสัตว์จำพวกวัว และม้าซึ่งเป็น CL ในประเทศสวิตเซอร์แลนด์และประเทศเยอรมัน (ปีพ.ศ. 2552-2553) และ 3) *Leishmania infantum* ในผู้ป่วยกรุงเทพมหานครเมื่อปีพ.ศ. 2550 ซึ่งเป็นการรายงานการติดเชื้อนี้ครั้งแรกในประเทศไทย

ผลการสอบสวนโรคทุกกรณีพบว่า ไม่พบผู้ป่วยรายใหม่ แต่พบหลักฐานการติดเชื้อจากการตรวจทาง ซีโรโลยีด้วยวิธี Direct agglutination test (DAT) ในสัตว์ได้แก่ วัว แมว หนู และสุนัข อย่างไรก็ตาม อาจเกิดจากปฏิกิริยาข้ามระหว่างเชื้อไลชมาเนียกับปรสิตตัวอื่นของสัตว์ได้เช่น *Trypanosome* sp. อย่างไรก็ตาม ได้พยายามตรวจพิสูจน์ด้วย PCR เพื่อหาสารพันธุกรรมของเชื้อไลชมาเนียในการสอบสวนโรคแต่ไม่พบการติดเชื้อไลชมาเนียในสัตว์เหล่านี้แต่อย่างใด ในขณะที่ต่างประเทศพบว่า สุนัข เป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญ⁴⁹⁻⁵⁰

จากการศึกษาถึงการกระจายตัวของริ้นฝอยทรายในประเทศไทยพบว่า ประเทศไทยมีริ้นฝอยทรายอยู่ในทั่วทุกภาคของประเทศ ยิ่งไปกว่านั้นประเทศไทยยังมีรายงานริ้นฝอยทรายชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำเชื้อได้ด้วยคือ *Phlebotomus argentipes* (เจาะจงกับเชื้อ *L. donovani*) และ *P. major major* (เจาะจงกับเชื้อ *L. infantum*) เป็นพาหะนำเชื้อไลชมาเนียที่สำคัญในประเทศอินเดีย ซึ่งในการสอบสวนโรคนั้นจะมีการสำรวจชนิดของริ้นฝอยทรายด้วยทุกครั้ง และมีรายงานการสำรวจพบ *P. argentipes* ในจังหวัดนครศรีธรรมราช สตูล และเชียงราย ร่วมกับริ้นฝอยชนิดอื่นๆคือ *Sergentomyia gemmea* *S. barraudi* *S. iyengari* *S. perturbans* และ *S. indica* ซึ่งจากความรู้เดิมที่ว่าริ้นฝอยทรายชนิด *Sergentomyia* sp. ไม่สามารถนำเชื้อ ไลชมาเนียได้ แต่ในปัจจุบันประเทศจีนมีรายงานพบริ้นฝอยทรายชนิด *S. sinkiangensis* สามารถนำเชื้อไลชมาเนียในสัตว์จำพวกจิ้งเหลน (Lizards) ได้²⁸

ดังนั้นริ้นฝอยทรายตระกูล *Sergentomyia* sp. ที่พบบ่อยๆในประเทศไทยไม่แน่ว่าอาจจะเป็นพาหะนำเชื้อหรือไม่ก็ได้ เนื่องจากยังไม่มี การทดลองหรือการศึกษาวิจัยถึงความเป็นไปได้ในการนำเชื้อไลชมาเนียของริ้นฝอยทราย สปีชีส์เหล่านี้ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อพิสูจน์ถึงความเป็นพาหะนำเชื้อไลชมาเนียของริ้นฝอยทรายในประเทศไทย และจะเป็นการศึกษาประวัติศาสตร์ชาติของโรคไลชมาเนียด้วย

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาความชุก (Prevalence) ของการติดเชื้อลิซมาเนียในประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เคยมีรายงานผู้ป่วย
2. เพื่อค้นหาปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคลิซมาเนียซีสของประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เคยมีรายงานผู้ป่วย

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ประชากรเป้าหมาย

ประชากรที่อาศัยในหมู่บ้านที่เคยเกิดการระบาดของโรคลิซมาเนียในจังหวัดพังงา นครศรีธรรมราช โดยมีเกณฑ์พิจารณากลุ่มตัวอย่างดังนี้

- เกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มประชากรมาทำการศึกษา (Inclusion criteria)

ประชากรที่อาศัยในหมู่บ้านที่เคยเกิดการระบาดของโรคลิซมาเนีย ภายในรัศมีบ้านผู้ป่วยอย่างน้อย 200 เมตร

- เกณฑ์ในการคัดกลุ่มประชากรออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

ผู้ที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการ

ทั้งนี้ จะพิจารณาสัตว์เลี้ยงในความดูแลของประชากรในพื้นที่เป้าหมายร่วมด้วยซึ่ง เกณฑ์การพิจารณาคือ

- เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น แมว สุนัข วัว กระต่าย เป็นต้น
- เจ้าของ/ผู้เลี้ยงอนุญาตให้เจาะเลือดไปตรวจวิเคราะห์

2. วิธีการสุ่มตัวอย่าง

เนื่องจากการศึกษาหาความชุกของการติดเชื้อลิซมาเนียในพื้นที่ที่เคยมีรายงานผู้ป่วยมาแล้ว จำเป็นต้องสำรวจให้ครอบคลุมประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เสี่ยงให้ได้มากที่สุด ซึ่งประชากรกลุ่มเสี่ยงในแต่ละหมู่บ้านเฉลี่ยประมาณ 200 คน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมกันทุกประเภทในความดูแลเฉลี่ยประมาณ 100 ตัว รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 600 ตัวอย่าง ทั้งนี้ไม่มีการสุ่มและกำหนดขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

3. สถานที่ทำการวิจัย / เก็บข้อมูล

- 1) ภาควิชาปรสิตวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า
- 2) ศูนย์บริการทางการแพทย์ปฐมภูมิ (สถานีนอนมัย) ในพื้นที่

- 3) โรงพยาบาลชุมชน/โรงพยาบาลในพื้นที่ทั้ง 2 จังหวัด
- 4) สถานที่ที่จะดำเนินการเก็บข้อมูลและเจาะเลือดในประชากรและสัตว์เลี้ยงที่อาศัยอยู่ในพื้นที่
ดังนี้
 - ตำบลหล่อยูง อำเภอตะกั่วทุ่ง จังหวัดพังงา
 - ตำบลทอนหงส์ อำเภอพรหมคีรี จังหวัดนครศรีธรรมราช

4. ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

- 1) ผู้วิจัยและคณะลงพื้นที่เพื่อประสานงานหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทุกหน่วยในพื้นที่และเตรียมพื้นที่ (ชุมชน) เป้าหมายของการวิจัยก่อนเข้าดำเนินการสำรวจเก็บข้อมูล ในประเด็นที่เกี่ยวข้อง
 - ผู้ประสานงานในพื้นที่ของแต่ละหน่วยงานต่างๆที่เกี่ยวข้อง
 - ขั้นตอนการปฏิบัติในการเก็บข้อมูลภาคสนาม
 - การเจาะเลือดและการปฏิบัติในการนำส่งเลือดมาตรวจวิเคราะห์มายังห้องปฏิบัติการ
 - การประชาสัมพันธ์ให้ประชากรเพื่อขอความร่วมมือในการมารับบริการเจาะเลือดตรวจหาเชื้อลิซมาเนียโดยไม่คิดค่าใช้จ่าย และบริการแจ้งผลการตรวจเลือดผ่านศูนย์บริการทางการแพทย์ปฐมภูมิในพื้นที่
- 2) จัดพิมพ์แบบสอบถาม และเตรียมชุดแบบสอบถามเพื่อการเก็บข้อมูลภาคสนาม ซึ่ง 1 ชุดแบบสอบถามจะประกอบด้วย หนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมการวิจัย และแบบสอบถาม ทั้งหมดบรรจุไว้ในซองขนาด เอ 4 ปิดผนึก ซึ่งผู้วิจัยจะออกรหัสชุดแบบสอบถามหลังจากที่ทำการสำรวจแล้ว
- 3) การดำเนินการสำรวจเก็บข้อมูล โดยผู้วิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยและทีมในพื้นที่จะลงพื้นที่เป้าหมายเพื่อชี้แจงและขอความยินยอมเข้าร่วมโครงการ สัมภาษณ์เก็บข้อมูลโดยใช้แบบสอบถาม และขอเจาะเลือดตรวจทั้งคนและสัตว์ เมื่อสัมภาษณ์และเจาะเลือดเรียบร้อยแล้ว แบบสอบถามจะถูกกำหนดรหัสเพื่อการตรวจสอบและเรียงลำดับข้อมูล ทั้งนี้จะได้ติดตามผู้ป่วยที่เคยเป็นโรคลิซมาเนียในพื้นที่เป้าหมายด้วย
- 4) ผู้ที่มีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในความดูแล ผู้วิจัยและทีมจะขออนุญาตเจาะเก็บตัวอย่างเลือดไปตรวจวิเคราะห์หาเชื้อลิซมาเนียจากผู้เลี้ยงหรือเจ้าของไปในคราวเดียวกัน
- 5) แบบสอบถามถูกรวบรวมส่งไปยังศูนย์วิจัยเวชศาสตร์ทหาร วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้าทางไปรษณีย์
- 6) สำหรับตัวอย่างเลือดทั้งมนุษย์และสัตว์จะถูกบรรจุในภาชนะตามมาตรฐานการนำส่งส่งตรวจมายังห้องปฏิบัติการที่ภาควิชาปรสิตวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า เพื่อตรวจวิเคราะห์ระดับแอนติบอดี และสารพันธุกรรมของเชื้อลิซมาเนียคู่ขนานกันไป

7) ตัวอย่างเลือดที่เจาะมาประมาณ 5 ซีซี นำไปปั่นแยก Serum และ Buffy coat ที่ความเร็ว 1000g นาน 15 นาที เก็บ serum และ Buffy coat ที่ -20°C ณ โรงพยาบาลชุมชนในพื้นที่เป้าหมายนั้นๆ และบรรจุในภาชนะที่เหมาะสมเพื่อการรักษาคุณภาพตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อลิวมาเนียต่อไป (รูปที่ 1)

8) นำตัวอย่าง Serum นำมาตรวจหาระดับ Ab ต่อเชื้อลิวมาเนียด้วยวิธี Direct Agglutination Test

9) นำตัวอย่าง Buffy coat มาสกัด DNA ด้วย QIAMP blood kit แล้วมาตรวจวิเคราะห์หา DNA ของเชื้อลิวมาเนียด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) หากให้ผลบวก จะส่งวิเคราะห์เพื่อหาลำดับคู่เบส (DNA sequencing) เพื่อพิสูจน์สายพันธุ์ของเชื้อลิวมาเนีย

10) บันทึกข้อมูลจากแบบสอบถามและผลการตรวจเลือด วิเคราะห์ข้อมูล ประมวลผล และแปลผล

11) แจ้งผลการตรวจเลือดและข้อมูลที่เกี่ยวข้องอื่นๆกลับไปยังผู้ประสานงานในพื้นที่ของแต่ละหน่วยงานเพื่อให้แจ้งกลับอาสาสมัครของโครงการ

5. วิธีการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดทางห้องปฏิบัติการ

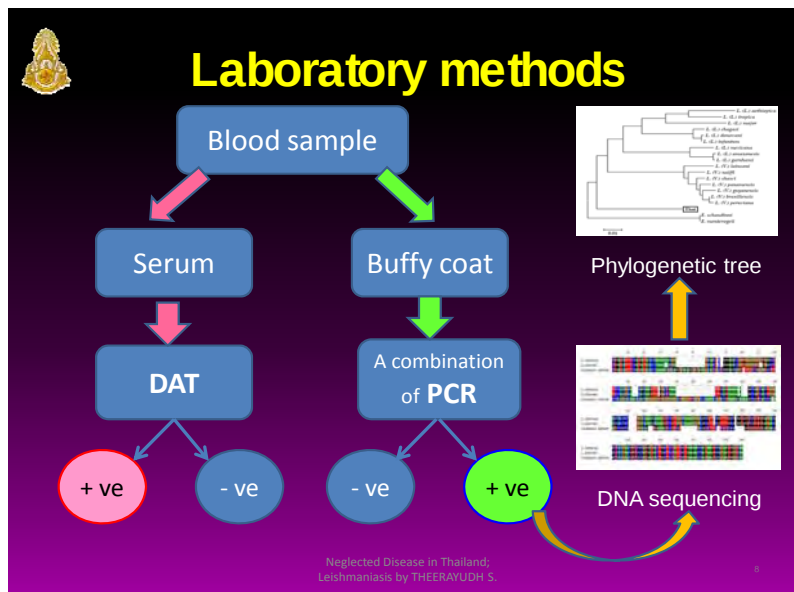
1) การตรวจวิเคราะห์ระดับ Ab ด้วยวิธี Direct Agglutination Test โดยการทำให้ 2 fold serial dilution จากตัวอย่าง serum ด้วย PBS โดยเริ่มต้น dilution ที่ 1:100 ต่อจากนั้นนำ diluted serum มาทำปฏิกิริยากับ Ag ที่เตรียมจาก *Leishmania donovani* 1S promastigotes (KIT, Biomedical Research, Amsterdam) จากนั้นอ่านปฏิกิริยา direct agglutination ใน microtiter plate เพื่อหา titer ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งจะใช้ known positive serum และ negative serum ในการทำเป็น control ทุกครั้ง ทั้งนี้ positive sample หมายถึงการเกิด agglutination ที่ titer เท่ากับหรือสูงกว่า 1:100

2) การตรวจวิเคราะห์หา DNA ของเชื้อลิวมาเนียด้วยวิธี PCR โดยใช้ buffy จากคนและสัตว์ จะถูกนำมาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp blood kit (QIAGEN, ประเทศเยอรมัน) ก่อนจะนำไปใช้เป็น DNA template ในการเพิ่มจำนวน ITS1 region ของ rRNA gene โดยวิธี PCR ต่อไป (แสดงในตาราง) และวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยวิธี Gel electrophoresis

ตารางที่ 1 แสดงปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction

	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
ช่วงเริ่มปฏิกิริยา	94	5
ช่วงปฏิกิริยา (25 รอบ)	94	1
	54	1
	72	1.30
ช่วงสิ้นสุดปฏิกิริยา	72	5
	10	hold

3) การพิสูจน์สายพันธุ์ของเชื้อลิชมาเนียด้วยวิธีการตรวจหาลำดับคู่เบส (DNA sequencing) จาก PCR product ของ ITS1 region ของ rRNA gene ซึ่งจะถูกล้างด้วยน้ำยาสำเร็จรูป QIAGEN DNA Purification Kit (QIAGEN, ประเทศเยอรมัน) ก่อนส่งไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (bi-directional sequencing) ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1 region ของ rRNA gene จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกจาก PCR จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของ GenBank



รูปที่ 1 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดทางห้องปฏิบัติการ

6. การเก็บรวบรวมข้อมูล

- 1) ข้อมูลจากการสำรวจจากแบบสอบถาม มีรายละเอียดดังต่อไปนี้
ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป ซึ่งประกอบด้วย

- เพศ อายุ และการนับถือศาสนา
- อาชีพ
- ระดับการศึกษาสูงสุด
- ที่ตั้งของบ้านพักอาศัย

ส่วนที่ 2 ข้อมูลสถานะภาพทางสุขภาพ

- โรคประจำตัว
- ปัจจัย/พฤติกรรมเสี่ยงต่อการติดเชื้อลิซมาเนีย
- อาการและอาการแสดงของโรคลิซมาเนีย

- 2) การตรวจวิเคราะห์ Ab ต่อเชื้อลิซมาเนียในตัวอย่าง serum คนและสัตว์
- 3) การตรวจวิเคราะห์ DNA ของเชื้อลิซมาเนียในตัวอย่างเลือดคนและสัตว์
 - ผลการตรวจหา DNA ของเชื้อลิซมาเนียด้วยวิธี PCR
 - ผลการตรวจลำดับ nucleotide ในกรณีที่ PCR ให้ผลเป็นบวก

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- 1) อธิบายเชิงพรรณนาลักษณะทั่วไปของประชากร, สถานะภาพทางสุขภาพ และผลการตรวจตัวอย่างเลือดทางห้องปฏิบัติการ โดยการใช้สถิติ จำนวน ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และ มัธยฐาน
- 2) การหาความสัมพันธ์ univariate analysis ระหว่างผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อลิซมาเนียกับลักษณะทั่วไปของประชากร และสถานะภาพทางสุขภาพของประชากร ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์โดย Odds ratio และ 95% confident interval และ p-value < 0.05

บทที่ 4 ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาเชิงพรรณนา (Demographic data)

ประชากรที่เข้าร่วมในการศึกษาส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง (ร้อยละ 65.5) ค่ามัธยฐานของอายุคือ 49 ปี (5-85) ทั้งหมดมีสัญชาติไทย ค่ามัธยฐานของจำนวนสมาชิกในครอบครัว 4 คน (1-10) ประชากรส่วนใหญ่มีอาชีพทำสวนยาง ก่อสร้าง และสวนผลไม้ (ร้อยละ 47.5) มีการศึกษาจบชั้นสูงสุดคือ ระดับประถมศึกษา (ร้อยละ 63.8) (ตารางที่ 1) สำหรับอาการและอาการแสดงต่อการติดเชื้อในประชากรพบว่า ประชากรส่วนใหญ่ (ร้อยละ 93.5) ไม่มีอาการและอาการแสดงอย่างหนึ่งอย่างใดที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อลิชมาเนียในขณะทำการศึกษา (ตารางที่ 2)

2. ผลการศึกษาเชิงวิเคราะห์

ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการได้รับเชื้อ เมื่อวิเคราะห์ด้วย univariate analysis พบว่าปัจจัยเสี่ยงของประชากรในพื้นที่ที่เคยมีการรายงานการติดเชื้อ *Leishmania* ในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช และ พังงามีความแตกต่างกัน โดยในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช เพศหญิง มีความเสี่ยงมากกว่าเพศชายในการได้รับเชื้อ 2.37 เท่า (95% CI= 1.2-4.8) และการเลี้ยงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมภายในบริเวณบ้านมีความเสี่ยงมากกว่าบ้านที่ไม่ได้เลี้ยงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมภายในบริเวณบ้าน 1.98 เท่า (95% CI= 1.1-3.7) แต่ในพื้นที่รายงานโรคของจังหวัดพังงา เพศหญิง และ การเลี้ยงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมภายในบริเวณบ้านไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ ส่วนปัจจัยอื่นๆ เช่น อายุ อาชีพกรีดยาง ทำสวน การป้องกันตนเองโดยการสวมเสื้อผ้า การการมุงการทายากันยุง หรือฉีดยุง ไม่มีความสัมพันธ์กับการได้รับเชื้อ (ตารางที่ 3)

3. ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ผลการตรวจทางซีโรโลยีหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อลิชมาเนียด้วยวิธี Direct agglutination test (DAT) ในคนให้ผลเป็นลบทั้งหมด (ร้อยละ 100.0) แต่ในสัตว์ให้ผลเป็นบวกเฉพาะสุนัขและแมวจำนวน 48 ตัว (ร้อยละ 50.0) (ตารางที่ 4)

ส่วนผลการตรวจวิเคราะห์ DNA จากตัวอย่าง Buffy coat พบว่า ในคนให้ผลบวกจำนวน 140 ราย (ร้อยละ 36.8) และในสัตว์ให้ผลบวกเฉพาะสุนัขและแมวจำนวน 30 ตัว (ร้อยละ 31.3) (ตารางที่ 5) ทั้งนี้ขนาดของ PCR Product เท่ากับ 350 bp ซึ่งมีขนาดเช่นเดียวกับ positive control ของเชื้อ *Leishmania* (รูปที่ 2)

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของสัตว์จะพบว่า จากตัวอย่างเลือดสัตว์จำนวนทั้งสิ้น 96 ตัวอย่าง มีจำนวน 8 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้ง PCR และ DAT (ตารางที่ 6) ซึ่งตัวอย่าง Buffy coat ของสัตว์เหล่านี้ได้นำไปทำ DNA sequencing เพื่อวิเคราะห์หาลำดับ nucleotide

ผล DNA sequencing ของ PCR product จาก buffy coat ของคนจำนวน 4 ตัวอย่าง(ทั้งหมดจาก นครศรีธรรมราช) และจากสัตว์จำนวน 6 ตัวอย่าง (จากพังงา 1 ตัวอย่าง และนครศรีธรรมราช 5 ตัวอย่าง) ผลการตรวจวิเคราะห์หาลำดับ nucleotide sequence ของ ITS1 region (rDNA gene) เพื่อยืนยันว่ามีการติดเชื้อลิซมาเนียจริงและพิสูจน์ชนิดของเชื้อ (species) ทั้ง 10 ตัวอย่างพบว่า nucleotide sequence จากทั้ง 10 ตัวอย่างเหมือนกัน (100% identity) ทั้งใน คน สุนัข และ แมวซึ่งแต่ไม่ตรงกับ nucleotide sequence ของเชื้อลิซมาเนียที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ nucleotide sequence แสดงในรูปที่ 3

ตารางที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของประชากรกลุ่มเสี่ยงจำแนกตามพื้นที่การวิจัย

ข้อมูลทั่วไป	พังงา (n=215)		นครศรีธรรมราช (n=170)		Total (n=385)	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
อายุ Median(Min-Max))		46(5-83)		53(8-85)		49(5-85)
เพศ						
ชาย	81	37.7	52	30.6	133	34.6
หญิง	134	62.3	118	69.4	252	65.5
สัญชาติ						
ไทย	215	100.0	170	100.0	385	100.0
จำนวนสมาชิกในบ้าน						
Mean±SD	3.69±1.34		3.82±1.66		3.75±1.49	
อาชีพ						
ทำนา, ทำไร่	-	-	1	0.6	1	0.3
ทำสวนยาง, กรีดยาง, สวนผลไม้	82	38.1	101	59.4	183	47.5
เลี้ยงสัตว์	-	-	-	-	-	-
พนักงานบริษัท โรงงาน						
โรงแรม	1	0.5	2	1.2	3	0.8
รับจ้าง	42	19.5	10	5.9	52	13.5
อยู่บ้านเฉยๆ, แม่บ้าน	48	22.3	17	10.0	65	16.9
ข้าราชการ	-	-	8	4.7	8	2.1
ค้าขาย	18	8.4	22	12.9	40	10.4
นักเรียน, นักศึกษา	21	9.8	5	2.9	26	6.8
อื่นๆ*	3	1.4	4	2.4	7	1.8
การศึกษา						
ไม่ได้เรียนหนังสือ	8	3.7	-	-	8	2.1
ประถม	148	69.2	97	57.1	245	63.8
มัธยม	39	18.2	42	24.7	81	21.1
อาชีว (ปวช. ปวส.)	16	7.5	10	5.9	26	6.8
อนุปริญญา	1	0.5	3	1.8	4	1.0
ปริญญาตรี	2	0.9	17	10.0	19	5.0
สูงกว่าปริญญาตรี	-	-	1	0.6	1	0.3

*เก็บขยะเทศบาล, ธุรกิจส่วนตัว, พนักงาน อบต., และลูกจ้างประจำ

ตารางที่ 2 อาการแสดงของประชากรกลุ่มเสี่ยงจำแนกตามพื้นที่การวิจัย

โรคประจำตัวและอาการแสดง	พังงา		นครศรีธรรมราช		รวม	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
โรคประจำตัว						
โรคไขกระดูกฝ่อ	-	-	-	-	-	-
โรคตับอักเสบ	1	0.5	-	-	1	0.3
โรคหลอดเลือดอักเสบเรื้อรัง ถุงลมโป่งพอง	-	-	-	-	-	-
วัณโรค	1	0.5	-	-	1	0.3
โรคไตวายเรื้อรัง	-	-	-	-	-	-
โรคโลหิตจาง เลือดจาง/โรคซีด						
ธาลัสซีเมีย	-	-	-	-	-	-
โรคเอดส์	1	0.5	-	-	1	0.3
โรคมะเร็ง	1	0.5	-	-	1	0.3
โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น SLE	-	-	2	1.2	2	0.5
ไม่มี	152	70.7	95	55.9	247	64.2
โรคอื่นๆ ระบุ	59	27.4	73	42.9	132	34.3
โรคประจำตัวอื่นๆ						
ความดันโลหิตสูง	23	10.7	21	12.4	44	11.4
เบาหวาน	13	6.1	12	7.1	25	6.5
ไขมันในเลือด	15	7.0	4	2.4	19	4.9
ภูมิแพ้	6	2.8	8	4.7	14	3.6
อาการแสดงที่อาจจะบ่งชี้ถึงการติดเชื้อในช่วง 24 เดือนที่ผ่านมา						
ไข้ (เป็นๆ หายๆ เรื้อรัง)	-	-	2	1.2	2	0.5
ซีด	4	1.9	-	-	4	1.0
ท้องอืด (ตับ/ม้ามโต)	-	-	1	0.6	1	0.3
ต่อมน้ำเหลืองโต	-	-	-	-	-	-
น้ำหนักลด (ผอมโซ)	-	-	6	3.5	6	1.6
	น้ำหนักที่ลด (n=6)		5.00±3.69	4(1-12)		
ตาเหลือง ตัวเหลือง	-	-	-	-	-	-
อ่อนแรงมาก	-	-	5	2.9	5	1.3
เบื่ออาหาร	1	0.5	4	2.4	5	1.3
หายใจไม่สะดวก	-	-	1	0.6	1	0.3
ผิวหนังคล้ำขึ้น	-	-	-	-	-	-
มีแผลเปื่อยเรื้อรัง	1	0.5	-	-	1	0.3
ไม่มีอาการและอาการแสดงตามข้างต้นนี้	209	97.2	151	88.8	360	93.5

ตารางที่ 3 แสดงปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในคนในพื้นที่เสี่ยงในจังหวัดพังงาและ นครศรีธรรมราช*

ปัจจัยเสี่ยง	พังงา				นครศรีธรรมราช			
	จำนวน (%)	PCR ให้ผลบวก (%)	Odds ratio (95% CI)	P-value	จำนวน (%)	PCR ให้ผลบวก (%)	Odds ratio (95% CI)	P-value
เพศ								
ชาย	81 (36.7)	24 (29.6)	1		52 (30.6)	14 (26.9)	1	
หญิง	134 (62.3)	47 (35.1)	1.28 (0.7-2.3)	0.456	118 (69.4)	55 (46.6)	2.37 (1.2-4.8)	0.018**
อายุ								
<30	42 (24.3)	12 (28.6)	1		21 (12.4)	11 (52.4)	1	
≥30	173 (75.7)	59 (34.1)	0.77 (0.4-1.6)	0.585	149 (87.6)	58 (38.9)	1.73 (0.7-4.3)	0.247
อาชีพทำสวนยาง หรือสวนผลไม้								
ใช่	82 (38.1)	30 (36.6)	1		101 (59.4)	37 (36.6)	1	
ไม่ใช่	133 (61.9)	41 (30.8)	1.3 (0.7-2.3)	0.456	69 (40.6)	32 (46.4)	0.67 (0.4-1.4)	0.209
เลี้ยงสัตว์ชนิดเลี้ยงลูกด้วยนมบริเวณบ้าน [§]								
ใช่	82 (38.1)	28(33.7)	1		79 (46.5)	39 (11.4)	1	
ไม่ใช่	133 (61.9)	43(32.6)	1.054 (0.6-1.9)	0.882	91 (54.5)	30 (32.96)	1.98 (1.1-3.7)	0.041**
นอนกางมุ้ง								
ใช่	71 (33.0)	43 (35.8)	1		130 (42.9)	51 (39.2)	1	
ไม่ใช่	144 (67.0)	77 (64.2)	1.34 (0.8-3.4)	0.382	40 (57.1)	18 (45)	0.79 (0.4-1.6)	0.582
สวมเสื้อแขนยาว กางเกงขายาวเวลาพลบค่ำ								
ใช่	103 (47.9)	36 (35.0)	1		70 (41.2)	27 (38.6)	1	
ไม่ใช่	112 (52.1)	35 (31.3)	1.18 (0.67-2.1)	0.663	100 (58.8)	42 (42.0)	0.867 (0.5-1.6)	0.751
ทายากันยุง								
ใช่	68 (31.6)	16 (23.5)	1		34 (20.0)	11 (32.4)	1	
ไม่ใช่	147 (68.4)	52 (37.4)	0.52 (0.27-0.99)	0.061	136 (80.0)	58 (42.6)	0.643 (0.3-1.4)	0.331
ฉีดยาหรือจุดยากันยุง								
ใช่	130 (60.5)	47 (36.2)	1		84 (49.4)	39 (46.4)	1	
ไม่ใช่	85 (39.5)	24 (28.2)	1.44 (0.79-2.6)	0.239	86 (50.6)	30 (34.9)	1.62 (0.87-2.9)	0.160

หมายเหตุ

*การวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Univariate analysis คำนวณหาค่า odds ratio ที่ 95% confidence interval (CI)

** Significant difference ที่ค่า P-value < 0.05

§ เลี้ยงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ แมว สุนัข วัว กระบือ กระต่าย

**ตารางที่ 4 ผลการตรวจทางซีโรโลยีหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อลิซมาเนียด้วยวิธี
Direct Agglutination Test (DAT) จำแนกตามพื้นที่การวิจัย**

DAT	พังงา		นครศรีธรรมราช		รวม	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
คน	215	100.0	171	100.0	386	100.0
ผลบวก	0	0.0	0	0.0	0	0.0
ผลลบ	215	100.0	171	100.0	386	100.0
สัตว์เลี้ยง	62	100.0	34	100.0	96	100.0
ผลบวก	14	22.6	34	100.0	48*	50.0
ผลลบ	48	77.4	0	0.0	48	50.0

* ผลบวกที่ได้พบเฉพาะสุนัขและแมว

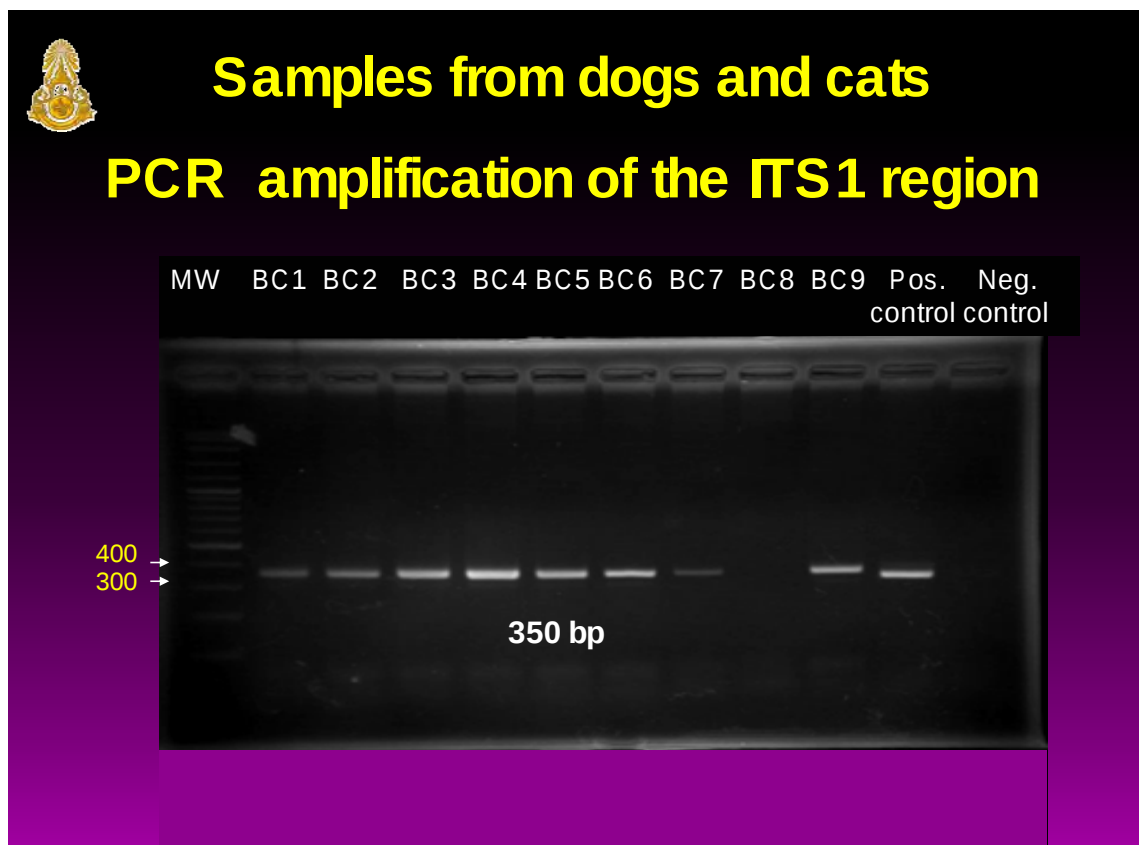
**ตารางที่ 5 ผลการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อลิซมาเนียจากตัวอย่าง Buffy coat
จำแนกตามพื้นที่การวิจัย**

PCR	พังงา		นครศรีธรรมราช		รวม	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
คน	215	100.0	165	100.0	380	100.0
ผลบวก	71	33.0	69	41.8	140	36.8
ผลลบ	144	67.0	96	58.2	240	63.2
สัตว์เลี้ยง	62	100.0	34	100.0	96	100.0
ผลบวก	29	46.8	1	2.9	30*	31.3
ผลลบ	33	53.2	33	97.1	66	68.8

* ผลบวกที่ได้พบเฉพาะสุนัขและแมว

ตารางที่ 6 ความของผลการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม (PCR) ของเชื้อลิซมาเนียจากตัวอย่าง Buffy coat กับผลการตรวจทางซีโรโลยีหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อลิซมาเนียด้วยวิธี DAT ในสัตว์

Screening test	Gold standard		Total
	PCR	PCR	
	positive	negative	
DAT positive	8	40	48
DAT negative	22	26	48
Total	30	66	96



รูปที่ 2 แสดงผล PCR product ที่ประมาณ 350 bp ของ ITS1 region (rRNA gene) จาก buffy coat ของคน สุนัข และ แมว

	10	20	30	40	50	60
Human.nakor						
Human.nakor	-----	---GCGCAT	CGCACTTTGT	GGTGTGTGTG	CGCATATGAG	AAAACACGGG
A101121_dog	---	TTTCAGAGA	ATATGCGCAT	CGCACTTTGT	GGTGTGTGTG	CGCATATGAG
A116812_cat	-	CTTCAGAGA	ATATGCGCAT	CGCACTTTGT	GGTGTGTGTG	CGCATATGAG
A107311_cat	-	CTTCAGAGA	ATATGCGCAT	CGCACTTTGT	GGTGTGTGTG	CGCATATGAG
A101711_cat	-	TTTCAGAGA	ATATGCGCAT	CGCACTTTGT	GGTGTGTGTG	CGCATATGAG
	70	80	90	100	110	120
Human.nakor	GGCGTTCTTC	TCGTGCGCCT	TCCGACATAA	TACTTCCTCC	GATCCCTGCG	TGTGCGGTTT
Human.nakor	GGCGTTCTTC	TCGTGCGCCT	TCCGACATAA	TACTTCCTCC	GATCCCTGCG	TGTGCGGTTT
A101121_dog	GGCGTTCTTC	TCGTGCGCCT	TCCGACATAA	TACTTCCTCC	GATCCCTGCG	TGTGCGGTTT
A116812_cat	GGCGTTCTTC	TCGTGCGCCT	TCCGACATAA	TACTTCCTCC	GATCCCTGCG	TGTGCGGTTT
A107311_cat	GGCGTTCTTC	TCGTGCGCCT	TCCGACATAA	TACTTCCTCC	GATCCCTGCG	TGTGCGGTTT
A101711_cat	GGCGTTCTTC	TCGTGCGCCT	TCCGACATAA	TACTTCCTCC	GATCCCTGCG	TGTGCGGTTT
	130	140	150	160	170	180
Human.nakor	TGTCTGCTGC	GCGGGCGAGA	GAGAGAGAGG	AGAAATCCAC	ATGCCGCTTG	ACGCAAACAA
Human.nakor	TGTCTGCTGC	GCGGGCGAGA	GAGAGAGAGG	AGAAATCCAC	ATGCCGCTTG	ACGCAAACAA
A101121_dog	TGTCTGCTGC	GCGGGCGAGA	GAGAGAGAGG	AGAAATCCAC	ATGCCGCTTG	ACGCAAACAA
A116812_cat	TGTCTGCTGC	GCGGGCGAGA	GAGAGAGAGG	AGAAATCCAC	ATGCCGCTTG	ACGCAAACAA
A107311_cat	TGTCTGCTGC	GCGGGCGAGA	GAGAGAGAGG	AGAAATCCAC	ATGCCGCTTG	ACGCAAACAA
A101711_cat	TGTCTGCTGC	GCGGGCGAGA	GAGAGAGAGG	AGAAATCCAC	ATGCCGCTTG	ACGCAAACAA
	190	200	210	220	230	240
Human.nakor	ACACACATGC	GCTATTTTTTA	TGATATGTGT	GTGCTGTGTT	GTGTGCGTGG	AGCACGGCCC
Human.nakor	ACACACATGC	GCTATTTTTTA	TGATATGTGT	GTGCTGTGTT	GTGTGCGTGG	AGCACGGCCC
A101121_dog	ACACACATGC	GCTATTTTTTA	TGATATGTGT	GTGCTGTGTT	GTGTGCGTGG	AGCACGGCCC
A116812_cat	ACACACATGC	GCTATTTTTTA	TGATATGTGT	GTGCTGTGTT	GTGTGCGTGG	AGCACGGCCC
A107311_cat	ACACACATGC	GCTATTTTTTA	TGATATGTGT	GTGCTGTGTT	GTGTGCGTGG	AGCACGGCCC
A101711_cat	ACACACATGC	GCTATTTTTTA	TGATATGTGT	GTGCTGTGTT	GTGTGCGTGG	AGCACGGCCC
	250	260	270	280	290	300
Human.nakor	CAACAACGTG	TCGCGATGGA	TGACTTGGCT	TCCTATTTTCG	TTGAAGAACG	CAGCAAAGTG
Human.nakor	CAACAACGTG	TCGCGATGGA	TGACTTGGCT	TCCTATTTTCG	TTGAAGAACG	CAGCAAAGTG
A101121_dog	CAACAACGTG	TCGCGATGGA	TGACTTGGCT	TCCTATTTTCG	TTGAAGAACG	CAGCAAAGTG
A116812_cat	CAACAACGTG	TCGCGATGGA	TGACTTGGCT	TCCTATTTTCG	TTGAAGAACG	CAGCAAAGTG
A107311_cat	CAACAACGTG	TCGCGATGGA	TGACTTGGCT	TCCTATTTTCG	TTGAAGAACG	CAGCAAAGTG
A101711_cat	CAACAACGTG	TCGCGATGGA	TGACTTGGCT	TCCTATTTTCG	TTGAAGAACG	CAGCAAAGTG
	310					
Human.nakor						
Human.nakor	CGATAAGTGG	TATCAA				
A101121_dog	CGATAAGTGG	TATCAA				
A116812_cat	CGATAAGTGG	TATCAA				
A107311_cat	CGATAAGTGG	TATCAA				
A101711_cat	CGATAAGTGG	TATCAA				

รูปที่ 3 ผลการวิเคราะห์ nucleotide sequence ของตัวอย่างเลือดมนุษย์ สุนัข และแมว

บทที่ 5 สรุป และอภิปรายผล

การศึกษาวิจัยในโครงการการเฝ้าระวังเฉพาะพื้นที่ของโรคไลชมาเนียในประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เคยเกิดการระบาดของประเทศไทย เป็นการวิจัยชนิด Cross-sectional study ในห้วง พ.ศ. 2552 เพื่อติดตามสถานการณ์หลังการเกิดการระบาดของโรคไลชมาเนียในพื้นที่จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์ที่สำคัญคือ ค้นหาความชุก (prevalence) ของการติดเชื้อไลชมาเนีย และปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดการสัมผัสโรค โดยการเก็บข้อมูลลักษณะของประชากร ปัจจัยเสี่ยง ลักษณะอาการและอาการแสดง และเจาะเลือดตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไลชมาเนียทางซีโรโลยี และค้นหาสารพันธุกรรมของเชื้อไลชมาเนีย ซึ่งดำเนินการในพื้นที่ (หมู่บ้าน) ที่เคยมีการระบาดของโรคไลชมาเนียในสองจังหวัดคือ จังหวัดพังงา (มีการระบาดของโรคในปี พ.ศ.2549) และจังหวัดนครศรีธรรมราช (มีการระบาดของโรคในปี พ.ศ.2550)

จากการศึกษาพบว่าประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เคยเกิดการระบาดของในทั้งสองจังหวัดดังกล่าวสมัครใจเข้าร่วมในการศึกษาส่วนใหญ่เป็นผู้หญิงวัยกลางคน มีอาชีพทำสวนและกรีดยางพารา และสวนผลไม้ มีระดับการศึกษาสูงสุดคือ ระดับประถมศึกษา ส่วนใหญ่สุขภาพร่างกายแข็งแรงดี ไม่มีโรคประจำตัว และไม่มีอาการและอาการแสดงของโรคไลชมาเนียในขณะที่ทำการศึกษา

การศึกษาความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ ทำโดยการใช้ผลของการตรวจ Buff coat ด้วย PCR แล้วให้ผลบวกและนำมาวิเคราะห์ในเบื้องต้นกับปัจจัยต่างๆเรื่อง เพศ อายุ อาชีพ การเลี้ยงสัตว์ และการป้องกันตนเองจากการถูกรังฝอยทรายกัดของคณในพื้นที่พบว่า สภาพพื้นที่ของทั้งสองแห่งไม่มีความแตกต่างกันมากนัก (ตำบลทอนหงส์ อำเภอพรหมคีรี จังหวัดนครศรีธรรมราช และอำเภอตำบลหล่อลุง อำเภอดงแก้วทุ่ง จังหวัดพังงา) แต่ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์ในการได้รับเชื้อมีความแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าอาชีพหลักของคณในพื้นที่คือการกรีดยางพารา และสวนผลไม้ ของจังหวัดพังงา (ร้อยละ 38.1) น้อยกว่าเมื่อเทียบกับคณในตำบลทอนหงส์ จังหวัดนครศรีธรรมราช (ร้อยละ 59.4) ผู้หญิงที่อาศัยในตำบลทอนหงส์ จังหวัดนครศรีธรรมราชมีโอกาสติดเชื้อสูงกว่าผู้ชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR 2.37, 95%CI 1.2-4.8, p-value 0.018) เนื่องจากต้องทำงานในตอนเช้ามืด จะพบว่าผู้หญิงมากกว่าครึ่งในพื้นที่ต้องออกไปกรีดยางตอนเช้ามืดจึงมีความเสี่ยงต่อการถูกรังฝอยทรายกัดมากกว่าผู้ชาย และเนื่องจากในพื้นที่ทางตอนใต้ของประเทศไทยพบว่า ไลชมาเนียซิส (Leishmaniasis) เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน⁵¹⁻⁵² ดังนั้นจึงพบว่าการไม่เลี้ยงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมภายในครัวเรือน มีความสัมพันธ์กับการได้รับเชื้อ ดังจะเห็นว่ามีบ้านในตำบลทอนหงส์ จังหวัดนครศรีธรรมราชที่ไม่เลี้ยงสัตว์ เช่น สุนัข แมว โค กระบือ มีความเสี่ยงสูงเป็น 1.98 เท่า (95%CI 1.1-3.7, p-value 0.041) ในการได้รับเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับบ้านที่มีการเลี้ยงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมภายในครัวเรือน อาจเป็นไปได้ว่า สัตว์พาหะอาจจะไม่ใช่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เลี้ยงภายในครัวเรือน

ในส่วนของการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งสองส่วนคือ การตรวจทางซีโรโลยีเพื่อตรวจหาระดับของ ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อลิซมาเนียด้วยวิธี Direct agglutination test (DAT) และการตรวจวิเคราะห์หา DNA ของเชื้อ ลิซมาเนียด้วยวิธี PCR จาก Buffy coat รวมถึงการตรวจวิเคราะห์หา nucleotide sequence เพื่อพิสูจน์สาย พันธุ์ของเชื้อที่ตรวจพบ ไม่มีประชากรรายใดตรวจพบระดับของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อลิซมาเนีย แต่ผลการตรวจ วิเคราะห์ DNA ของเชื้อลิซมาเนียโดยใช้ specific primer พบว่า ให้ผลบวกร้อยละ 36.5 จากตัวอย่าง Buffy coat ทั้งสิ้นจำนวน 384 ตัวอย่าง และในสัตว์ (สุนัขและแมว) ผลการตรวจหาระดับของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อลิ ซมาเนียเป็นบวกร้อยละ 50 จากตัวอย่าง Buffy coat ทั้งสิ้น 96 ตัวอย่าง และประมาณ 1 ใน 4 ของ 96 ตัวอย่างนี้ การตรวจวิเคราะห์ DNA ด้วยวิธี PCR ให้เป็นผลบวก ซึ่งเมื่อพิจารณาตัวอย่างเลือดของสัตว์ที่ ให้ผลเป็นบวกทั้ง DAT และ PCR มีจำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.69 ของจำนวนตัวอย่างเลือดทั้งสิ้น 471 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม เมื่อนำตัวอย่าง PCR product ดังกล่าวไปตรวจวิเคราะห์หา nucleotide sequence พบว่ายังไม่สามารถระบุว่าการติดเชื้อลิซมาเนียใน species ที่มีรายงานอยู่ใน Genbank ในขณะ นี้ แต่พบความเหมือนของ nucleotide sequence อยู่ในกลุ่มของ flagellate protozoa (มากกว่า 85%)

จากการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากมีคนและสัตว์ที่ให้ผลบวกจากการตรวจโดย PCR จำนวนมาก มีเพียง บางส่วนเท่านั้นที่สามารถส่งวิเคราะห์หา nucleotide sequence เนื่องจากจำกัดด้วยงบประมาณ อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ต่อไปนี้มีความน่าสนใจอย่างยิ่งคือ nucleotide sequence ตัวอย่างที่พบในคน สุนัข และ แมว มี sequence identity เหมือนกัน 100% นอกจากนั้นผลการสำรวจจีนฝอยทรายของสำนักโรคติดต่อ นำ โดยแมลงในเบื้องต้นในพื้นที่จังหวัดพังงา (ไม่ได้แสดง data) พบเชื้อในรีนฝอยทรายที่มี nucleotide sequence เช่นเดียวกับคนและสัตว์ที่รายงานในการศึกษาครั้งนี้ 100% เมื่อนำมาเชื่อมโยงกันทำให้เห็นภาพ ของวงจรชีวิตที่สมบูรณ์ของเชื้อชนิดใหม่ที่เป็นกลุ่ม flagellate ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศไทย ซึ่ง ต้องการทำการศึกษายืนยันอื่น ๆ เพิ่มขึ้น เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อชนิดใหม่ต่อไป และที่สำคัญเชื่อนี้สามารถ กระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ นอกจากนั้นการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาแบบ ภาคตัดขวาง (Cross-sectional study) ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเชื้อชนิดนี้ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ได้หรือไม่ ถึงแม้ว่าขณะที่ทำการศึกษาจะไม่พบว่าคนหรือสัตว์แสดงอาการใดๆ ดังนั้นการติดตามคนที่พบเชื้อในเลือด ทั้งหมดมีความจำเป็นมาก เนื่องจากไม่ทราบว่าคนกลุ่มนี้จะมีอาการ และอาการแสดงหรือไม่ อย่างไร ในระยะ ยาว เพราะอาจเป็นการติดเชื้อเริ่มต้นในขณะที่ทำการศึกษา ทำให้ยังไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดี (Antibodies) ในคน การตรวจด้วยวิธี PCR มีความไวสูงกว่าเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธี DAT ¹³ ทำให้ผล การตรวจหา DNA ในคนได้ผลบวกถึงร้อยละ 36.5 อาจเนื่องจากการเป็นระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อในเลือดคน อาการและอาการแสดงจึงยังไม่ปรากฏ พร้อมกับแอนติบอดียังไม่สามารถถูกจำแนกได้ขณะที่ทำการศึกษา

ดังนั้นโอกาสที่จะพบผู้ติดเชื้อรายใหม่ (new case) มีแนวโน้มสูงมาก ซึ่งการศึกษาแบบภาคตัดขวาง Cross-sectional มีข้อจำกัด ไม่สามารถให้คำตอบเหล่านี้ได้ ดังนั้นการศึกษาแบบติดตามผลไปข้างหน้า Cohort study จึงมีความเหมาะสมมากกว่า ซึ่งควรมีการดำเนินงานต่อไปในทุกพื้นที่ระบาดของเชื้อ โดยเฉพาะสำรวจในบุคคลกลุ่มเสี่ยงทั้งหมด

การศึกษารังนี้ทำเพียงใน 2 พื้นที่ที่เคยมีการรายงานโรค ซึ่งข้อมูลทีวิเคราะห์ในเบื้องต้นมีความแตกต่างกัน และมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ควรต้องศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึกอย่างเร่งด่วนเพิ่มเติมในพื้นที่ที่มีการรายงานโรคทั้งหมด ในขณะนี้พื้นที่การกระจายของโรคมีเพิ่มมากขึ้น มีรายงานผู้ป่วยเพิ่มขึ้นใน 6 จังหวัด (นครศรีธรรมราช พังงา สงขลา สุราษฎร์ธานี ตรัง สตูล)^{5, 7, 53-56} และผู้ป่วยทุกรายมีอาการเจ็บป่วยเรื้อรัง มีอาการรุนแรงจึงต้องมาพบแพทย์ที่โรงพยาบาล โดยเฉพาะกลุ่มเสี่ยงที่มีโอกาสสูงที่จะมีอาการรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต คือ กลุ่มติดเชื้อ HIV/AIDS มีรายงานผู้ป่วย AIDS จากจังหวัดตรัง 1 รายเสียชีวิตก่อนเริ่มให้การรักษา⁵³ รวมทั้งกลุ่มเสี่ยงอื่นๆ เช่น กลุ่มที่จำเป็นต้องใช้ยากดภูมิคุ้มกัน และกลุ่มเด็กเล็ก เนื่องจากภูมิคุ้มกันไม่ดีพอ เชื่อว่ามีผู้ที่ได้รับเชื้อแล้วจำนวนหนึ่งที่ยังไม่แสดงอาการ หรือมีอาการเล็กน้อย บางส่วนอาจยังอยู่ในระยะฟักตัว ซึ่งต่อไปคาดว่าจะมีรายงานเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ไปสู่จังหวัดอื่นๆ ข้างเคียง เพราะพื้นที่ ภูมิอากาศ อาชีพ พฤติกรรม มีความคล้ายคลึงกัน

อนึ่งการศึกษาทางซีโรโลยีอาจพบปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ได้ เนื่องจากลิซมาเนียเป็น flagellate protozoa ดังนั้นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น วัว ควาย ที่มีการติดเชื้อ *Trypanosome* sp. ในเลือด อาจทำให้พบแอนติบอดีในเลือดได้ในกรณีที่ใช้วิธี DAT ผู้วิจัยได้ยืนยันผลโดยการทำ specific PCR เพื่อตรวจสอบหาเชื้อ *Trypanosoma evansi* ใน Buffy coat ซึ่งให้ผลลบ รวมทั้งตรวจหาโปรโตซัวในเลือดอื่นๆ เช่น *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Theileria* sp., *Anaplasma marginale* ซึ่งให้ผลลบเช่นกัน

ลิซมาเนียในจังหวัดภาคใต้ของประเทศไทยจัดเป็น Emerging Zoonotic disease ประโยชน์จากการศึกษารังนี้แสดงถึงการนำความรู้ทางด้านระบาดวิทยา ร่วมกับชีวโมเลกุลมาศึกษาข้อมูลทางระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อในเชิงลึก เพื่อไม่ให้ประเทศไทยโดยเฉพาะจังหวัดในภาคใต้ซึ่งเป็นสถานที่ท่องเที่ยวมีการแพร่กระจายโรคไปทุกจังหวัด การควบคุมและป้องกันโดยเฉพาะการเฝ้าระวังโรค การควบคุมแมลงพาหะ การสำรวจการติดเชื้อในกลุ่มเสี่ยง การรักษาผู้ป่วยอย่างทันท่วงที การศึกษาหาวิธีตรวจที่แม่นยำ และรวดเร็วสมควรต้องมีการศึกษาต่อไปอย่างเร่งด่วน การให้ข้อมูลข่าวสารต้องกระทำอย่างระมัดระวัง เพราะเกี่ยวข้องกับสัตว์เลี้ยงและสัตว์เศรษฐกิจ นอกจากนั้นการให้ความรู้แพทย์ บุคลากรในพื้นที่ รวมถึงชาวบ้านในพื้นที่ มีความจำเป็นมากเพื่อเตรียมความพร้อม ไม่ให้มีการแพร่กระจายโรคเช่นกันที่เกิดขึ้นในบางประเทศมาแล้ว

เอกสารอ้างอิง

- 1) ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ, ศูนย์คาดการณ์เทคโนโลยีเอเปค, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. องค์ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำหรับการจัดการกับโรคติดต่ออุบัติใหม่. พิมพ์โดย ฝ่ายวิจัยกลยุทธ์และดัชนีอุตสาหกรรม ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ: 2550; 1-16
- 2) Richard P. Lane, Roger W. Crosskey. Medical insects and Arachnids 1st edition. Published by Chapman and Hall: 1993; 78-119.
- 3) P. Laohapaibul, S. Siampakdi. Kala-azar: Report of one imported case. Siriraj Hospital Gazette. 1960; 12: 561-9.
- 4) Suttinont P, Thammanichanont C, Chantarakul N. Visceral Leishmaniasis: A Case Report. Journal of Infectious Disease and Antimicrobial Agents: 1991; 8: 161-163.
- 5) Thisyakorn U, Jongwutiwes S, Vanichsetakul P, Lertsapcharoen P. Visceral Leishmaniasis: the first indigenous case report in Thailand. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene: 1999; 93:23-24.
- 6) Kongkaew W, Siriarayaporn P, Leelayoova S, Supparatpinyo K, Areechokchai D, Duang-ngern P, Chanachai K, Sukmee T, Samung Y, Sridurongkathum P. Autochthonous Visceral Leishmaniasis: A Report of a Second Case in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health: 2007; 38(1): 8-12.
- 7) Sukmee T, Siripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y, Kongkaew W, et al. A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. Int J Parasitol. 2008 Jan 15; 38(6): 617-622.
- 8) Apiwathnasorn C, Sucharit S, Rongsriyam Y, Leemingsawat S, Kerdpibule V, Deesin T, Surathin K, Vutikes S, Punavuthi N. A brief survey of phlebotomine sandflies in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1989 Sep; 20(3):429-32.
- 9) Herwaldt B L. Leishmaniasis. Lancet 1999;354(9185):1191-99.
- 10) Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis.Lancet. 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77.
- 11) Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide.Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001 May-Jun;95(3):239-43.
- 12) Henry W. Murray. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. Am. J. Trop. Med. Hyg;71(6);2004, 787–794.
- 13) Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis.2003;49(1):55-60.

- 14) Marleen Boelaert, Sujit Bhattacharya, François Chappuis, Sayda H. El Safi, Asrat Hailu, Dinesh Mondal, Suman Rijal, Shyam Sundar, Monique Wasunna, Rosanna W. Peeling. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Nov;5(11):873-82
- 15) Francis Chappuis, Suman Rijal, Alonso Soto, Joris Menten, Marleen Boelaert. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ* 2006;333;723
- 16) Francis Chappuis, Shyam Sundar, Asrat Hailu, Hashim Ghalib, Suman Rijal, Rosanna W. Peeling, Jorge Alvar, Marleen Boelaert. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature review Microbiology*; 2007 (5); 873-882
- 17) Philippe J Guerin, Piero Olliaro, Shyam Sundar, Marleen Boelaert, Simon L Croft, Philippe Desjeux, Monique K Wasunna, Anthony D M Bryceson. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002;2:494–501
- 18) Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, 1996;14, 417-423.
- 19) World Health Organization, 2010. Leishmaniasis. Available at: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.html. Accessed December 20, 2010.
- 20) Warrell, David A. Cox, Timothy M. Firth, John D. Benz, Edward J. Oxford Textbook of Medicine, 4th Edition. Copyright © 2003 Oxford University Press.
- 21) National Center for Biotechnology Information, 2010. Leishmania taxonomy. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=5658&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>. Accessed October 15, 2010.
- 22) Marie Lipoldová, Peter Demant. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature review Genetics*; 2006 (7); 294-305
- 23) Oui Ju, David I Grove, Wilfrid J Jaksic and Geoffrey W Dart. Visceral leishmaniasis: a trip to the Greek Islands is not always idyllic. *MJA* 2004; 181 (8): 446-447
- 24) Dfarmacia pharmacy professional, 2010. Leishmaniasis. Available at: <http://www.dfarmacia.com/ficheros/images/4/4v21n09/grande/4v21n09-13038008tab05.gif>. Accessed December 20, 2010.

- 25) Depaquit J, Léger N, Beales P. *Chiniusbarbazani* n. sp. from Thailand (Diptera: Psychodidae) Parasite. 2006 Jun;13(2):151-8. French.
- 26) Muller F, Depaquit J, Léger N. *Phlebotomus* (*Euphlebotomus*) *mascomai* n. sp. (Diptera-Psychodidae). Parasitol Res. 2007 Nov;101(6):1597-602.
- 27) Depaquit J, Muller F, Léger N. *Phlebotomus* (*Euphlebotomus*) *barguesae* n. sp. from Thailand (Diptera - Psychodidae). Parasit Vectors. 2009 Jan 8;2(1):5.
- 28) Zhang LM, Leng YJ. Eighty-year research of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in China (1915-1995). II. Phlebotomine vectors of leishmaniasis in China.Parasite. 1997 Dec;4(4):299-306
- 29) Stanford University, 2010. Vector and Reservoirs of *Leishmania*.Available at: <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2003/Leishmania/Vector%20and%20Reservoirs.html>. AccessedNovember10, 2010.
- 30) Jam A. Rozendaal. Vector control; method for use by individuals and communities. WHO. Geneva, 1997; 20-21, 45-51.
- 31) Mike W. Service, Medical entomology for student 2nd edition;2000. Chapter 5: Phlebotomine sandfiles (Phlebotominae). Cambridge university press. 91-100.
- 32) Richard P. Lane, Roger W. Crosskey. Medical insects and arachnids 1st edition;1993. Chapter 4: Sandfiles (Phlebotominae). Published by Chapman and Hall. 78-119.
- 33) Bruce F. Eldridge and John D. Edman. Medical entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropod;2000. Chapter 8: Leishmaniasis and Trypanosomiasis. Published by Kluwer Academic Publishers. 231-273.
- 34) Sutherst RW. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. Clin Microbiol Rev. 2004 Jan;17(1):136-73.
- 35) Richard R, Jean-Claude D. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. Journal of clinical microbiology;2007;45(1):21–25
- 36) Shyam Sundar, M. Rai. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clinical and diagnostic laboratory immunology;2002;9(5):951–958.
- 37) World Health Organization, 2010. Report of the fifth consultative meeting on *Leishmania*/HIV co-infection, 2007. Available at: http://www.afro.who.int/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=1500. Accessed December 20, 2010.

- 38) World Health Organization, 2010. Leishmaniasis. Available at: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index1.html. Accessed December 20, 2010.
- 39) Bernier R, Barbeau B, Tremblay MJ, Olivier M. The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements. *J Immunol*. 1998 Mar 15;160(6):2881-8.
- 40) Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Apr;10(2):298-319.
- 41) Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Apr;21(2):334-59.
- 42) Puawilai S, *et al*, Ramathibodi Med J. 1981
- 43) Prakitrithanont V. Siriraj Hospital. 1981
- 44) Piamphongsant T. *J ParasitTrop Med Assoc Thai*. 1982; 5:1
- 45) Nakjang, *et al*, *Bull Dept Med Serv*.1987; 12: 109-14
- 46) Viriyavejakul P, Viravan C, Riganti M, Punpoowong B. Imported cutaneous leishmaniasis in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997 Sep;28(3):558-62.
- 47) Maharom P, Siripattanapipong S, Mungthin M, Naaglor T, Sukkawee R, Pudkorn R, Wattana W, Wanachiwanawin D, Areechokchai D, Leelayoova S. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2008 Nov;39(6):988-90.
- 48) Suankratay C, Suwanpimolkul G, Wilde H, Siriyasatien P. Autochthonous visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus (HIV)-infected patient: the first in thailand and review of the literature. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Jan;82(1):4-8.
- 49) Adel A, Saegerman C, Speybroeck N, Praet N, Victor B, De Deken R, Soukehal A, Berkvens D. Canine leishmaniasis in Algeria: True prevalence and diagnostic test characteristics in groups of dogs of different functional type. *Vet Parasitol*. 2010 May 19.

- 50) Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis.* 2006 Mar;12(3):440-6.
- 51) Sukra K, Kanjanopas K, Amsakul S, Rittatton V, Mungthin M, Leelayoova S. A survey of sandflies in the affected areas of leishmaniasis, southern Thailand. *Parasitol Res*:2013 January; 112(1):297-302
- 52) Reuss SM, Dunbar MD, Calderwood Mays MB, Owen JL, Mallicote MF, Archer LL, Wellehan JF Jr. Autochthonous *Leishmania siamensis* in horse, Florida, USA. *Emerg Infect Dis.* 2012 Sep;18(9):1545-7
- 53) Bualert L, Charungkiattikul W, Thongsuksai P, Mungthin M, Siripattanapipong S, Khositnithikul R, Naaglor T, Ravel C, El Baidouri F, Leelayoova S. Autochthonous disseminated dermal and visceral leishmaniasis in an AIDS patient, southern Thailand, caused by *Leishmania siamensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 May;86(5):821-4.
- 54) Chusri S, Hortiwakul T, Silpapojakul K, Siriyasatien P. Consecutive cutaneous and visceral leishmaniasis manifestations involving a novel *Leishmania* species in two HIV patients in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Jul;87(1):76-80.
- 55) Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand, 2010. Annual reports of opportunistic infection in Thai HIV infected-patient (Thai). Available at: http://www.boe.moph.go.th/files/report/20110401_19956923.pdf. Accessed November 1, 2011.
- 56) Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand, 2010. Weekly Epidemiological Surveillance Report Vol. 39 No. 19: May 16, 2008. The First Autochthonous Visceral Leishmaniasis case in Thailand: Case report (Thai). Available at: <http://203.157.15.4/wesr/file/y51/F51191.pdf>. Accessed January 4, 2013.
- 57) Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand, 2010. Weekly Epidemiological Surveillance Report Vol. 41 No. 3S: August 2010. Leishmaniasis (Thai). Available at: <http://203.157.15.4/wesr/file/y53/Fs5332.pdf>. Accessed January 4, 2013.
- 58) Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand, 2010. Weekly Epidemiological Surveillance Report Vol. 42 No. 17: May 6, 2011. Situation of

Leishmaniasis in Thailand (Thai). Available at: <http://203.157.15.4/wesr/file/y54/F54172.pdf>.
Accessed January 4, 2013.

ผลลัพธ์จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า)

ไม่มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

ผลการศึกษาและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องในรายงานวิจัยฉบับนี้สามารถนำไปพัฒนาการเรียนการสอนในกระบวนการของวิชาระบาดวิทยาโรคติดเชื้อ ประเด็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ แก่นักศึกษาแพทย์และแพทย์ประจำบ้าน รวมถึงเจ้าหน้าที่ นักวิชาการสาธารณสุขที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาวิจัยต่อเนื่องทางระบาดวิทยาโมเลกุล (Molecular Epidemiology) ของเชื้อลิซมาเนีย หรือเชื้อในกลุ่ม flagellate protozoa ที่ใกล้เคียงกับเชื้อลิซมาเนีย ที่อาจจะกำลังเป็นปัญหาสาธารณสุขในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย อันจะเป็นโอกาสให้เกิดการพัฒนาหน้ระบาดวิทยาในการสอบสวนโรค นักวิจัยทางห้องปฏิบัติการทางโมเลกุลโรคติดเชื้อ ต่อไปในอนาคต

3. อื่น ๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุม วิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

ไม่มีผลการศึกษาจากการวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ หรือนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ