ความหลากหลายและความชุกของ *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) ในแมลงริ้นดำ (Diptera: Simuliidae) จากประเทศไทย

วิทยานิพนธ์

ของ

วราภรณ์ จำปาโท

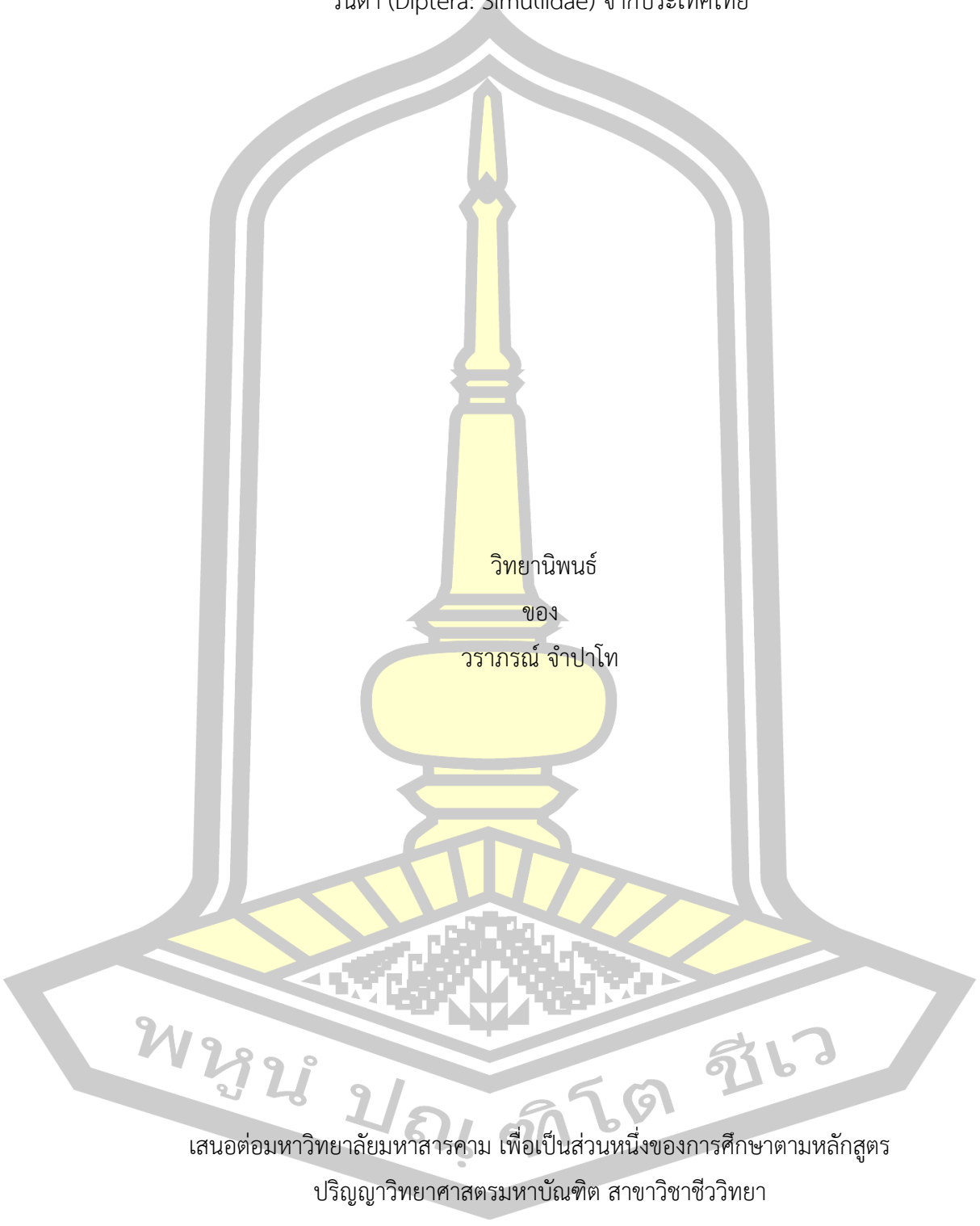
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

กรกฎาคม 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ความหลากหลายและความชุกของ *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) ในแมลงริ้นดำ (Diptera: Simuliidae) จากประเทศไทย



วิทยานิพนธ์

ของ

วราภรณ์ จำปาโท

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

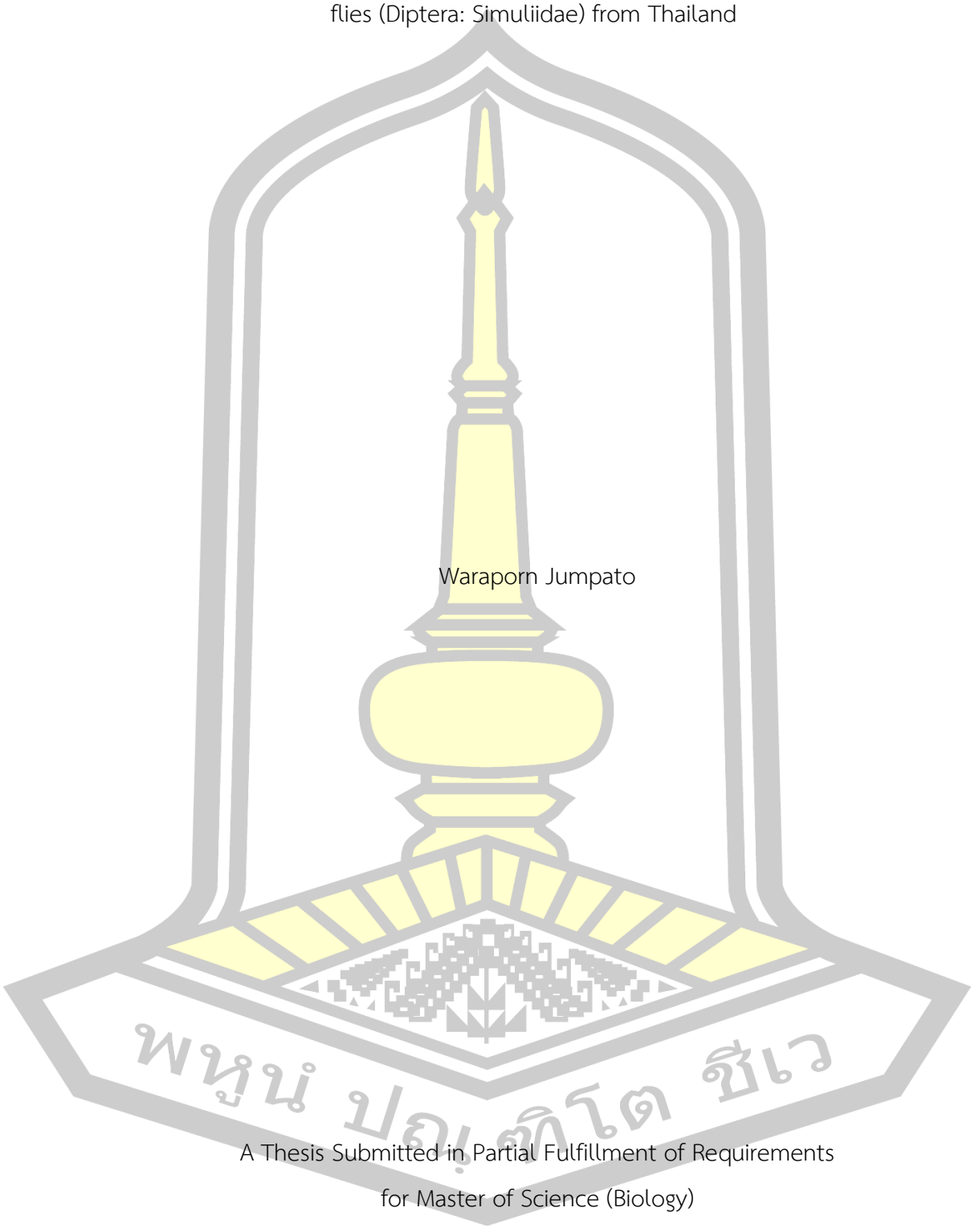
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

กรกฎาคม 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Diversity and prevalence of *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) in black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand

Waraporn Jumpato



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (Biology)

July 2019

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาววราภรณ์ จำปาโท แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศ. ดร. อลงกลด แทนออมทอง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

.....กรรมการ
(รศ. ดร. วีระชัย สายจันทา)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....

(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล) (ผศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

พหุน ปณฺ ฑิโต ลิเว

ชื่อเรื่อง ความหลากหลายและความชุกของ *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) ในแมลงริ้นดำ (Diptera: Simuliidae) จากประเทศไทย

ผู้วิจัย วราภรณ์ จำปาโท

อาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. ไพโรจน์ ประมวล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** ชีววิทยา

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2562

บทคัดย่อ

ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างพาหะกับปรสิตมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการทำความเข้าใจการระบาดของโรค Leucocytozoonosis เป็นโรคระบาดที่เกิดจากโปรโทซัวในสกุล *Leucocytozoon* มีอัตราการพบสูงในภูมิภาคเอเชียตะวันนออกเฉียงใต้ แต่ข้อมูลพาหะของโรคยังมีน้อยมาก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้วิธีพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome *b* (cyt *b*) ในไมโทคอนเดรียเพื่อตรวจสอบความหลากหลายและความชุกของ *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำ จากประเทศไทย ศึกษาแมลงริ้นดำจำนวน 404 ตัวอย่าง จัดจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยาได้ 6 สปีชีส์ ใน 2 สกุลย่อยได้แก่ สกุลย่อย *Gomphostilbia* (*Simulium asakoae* complex, *S. chumpornense*) และสกุลย่อย *Simulium* (*S. chamlongi*, *S. doipuiense* complex, *S. nigrogilvum*, *S. nodosum*) ตรวจสอบพบ *Leucocytozoon* ตัวอย่างแมลงริ้นดำ 44 ตัวอย่าง จากแมลงริ้นดำสกุลย่อย *Gomphostilbia* ทั้ง 2 สปีชีส์ พบ *Leucocytozoon* มากที่สุด (35 ตัวอย่าง) ในแมลงริ้นดำที่เก็บจากพื้นที่ชุมชน ซึ่งมีการเลี้ยงไก่พื้นเมืองจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าไก่พื้นเมืองเหล่านี้จะเป็นโฮสต์ของ *Leucocytozoon* ที่พบในแมลงริ้นดำ จากจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cyt *b* 44 ตัวอย่าง จำแนกได้ 16 haplotypes เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า 11 haplotypes เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันมากกับ *Leucocytozoon* ที่ยังไม่ทราบ สปีชีส์ซึ่งพบในไก่พื้นเมือง อีก 4 haplotypes มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมกับ *L. schoutedeni* และ 1 haplotype มีความแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ อย่างมาก ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าแมลงริ้นดำ 2 สปีชีส์ (*Simulium asakoae* complex, *S. chumpornense*) ในสกุลย่อย *Gomphostilbia* ในประเทศไทยอาจเป็นพาหะของ *Leucocytozoon* ที่พบในไก่พื้นเมือง

คำสำคัญ : Leucocytozoon, Gomphostilbia, Simulium, ประเทศไทย

TITLE Diversity and prevalence of *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) in black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand

AUTHOR Waraporn Jumpato

ADVISORS Professor Pairot Pramual , Ph.D.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Biology

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2019

ABSTRACT

Information regarding vector-parasite association is necessary for fully understanding epidemiology of the vector borne disease. This information is lacking in the case of Leucocytozoonosis in Oriental region despite high incidence of the disease. In this study, molecular approach based on mitochondrial cytochrome *b* (cyt *b*) sequence was used to examine the diversity and prevalence of the parasite, *Leucocytozoon* in black flies from Thailand. A total of 404 wild caught black flies represented six morphological species of the two subgenera including *Gomphostilbia* (*Simulium asakoae* complex, *S. chumpornense*) and *Simulium* (*S. chamlongi*, *S. doipuiense* complex, *S. nodosum*, *S. nigrogilvum*) were examined. Forty-four black fly specimens from two species of the *Gomphostilbia* were positive for *Leucocytozoon*. Most (35) of these are found in village where high numbers of domestic chicken are keeping suggest the possibility that they are host of *Leucocytozoon* species found in black flies. Sixteen haplotypes were identified among 44 cyt *b* sequences. Comparisons of the sequences with previously reports in GenBank database revealed that 11 haplotypes obtained in this study is identical or very similar to an unknown *Leucocytozoon* that found infected domestic chickens. Four haplotypes are genetically similar to *L. schoutedeni* and one haplotype is genetically very different from others. The results indicated that two black fly species of the subgenus *Gomphostilbia* in Thailand is possible vectors of *Leucocytozoon* transmitted among domestic chickens and wild birds in the country.

Keyword : Leucocytozoon, Gomphostilbia, Simulium, Thailand

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านความหลากหลายทางชีวภาพ (Center of Excellence on Biodiversity) และความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร.ไพรโรจน์ ประมวล ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อลงกลด แทนออมทอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระชัย สายจันทา สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอบพระคุณ Dr. Adrian Plant กองส่งเสริมการวิจัยและบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ช่วยแก้ไขภาษาอังกฤษของบทความวิจัยเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ ขอบคุณคุณคมกริช วงศ์ภาคำ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สัน นามตะคุ ดร. จิราพร ไทยเจริญ ดร. ชลธิชา ขุนพรม และคุณปัญญา จอมคำสิงห์ ที่ให้การช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและการทำงานหลายด้าน ๆ ขอขอบคุณบุพการี พี่น้อง และนิสิตภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่มอบมิตรภาพ และกำลังใจในการศึกษา ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ข้อมูลภาคสนาม และทำงานในห้องปฏิบัติการในการศึกษา และวิจัย

วราภรณ์ จำปาโท

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 หลักการและเหตุผล 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 ความสำคัญของการวิจัย 3

1.4 ขอบเขตของการวิจัย 3

บทที่ 2 ปริทัศน์เอกสารข้อมูล 4

2.1 ชีววิทยาของ *Leucocytozoon* 4

2.2 ความสำคัญของเชื้อ *Leucocytozoon* 8

2.3 แมลงริ้นดำ 9

2.4 ความสำคัญของแมลงริ้นดำ 12

2.5 แมลงริ้นดำในประเทศไทย 14

2.6 ความสัมพันธ์ระหว่างแมลงริ้นดำกับ *Leucocytozoon* 14

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 17

3.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดแมลงริ้นดำ 17

3.2 การศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุล 19

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล 20
บทที่ 4 ผลการศึกษา 26
4.1 ความชุกของ *Lecocytozoon* ในแมลงริ้นดำ 26
4.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Leucocytozoon* 28
บทที่ 5 อภิปรายผล 33
5.1 ความชุกของ *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำในประเทศไทย 33
5.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำในประเทศไทย 34
5.3 สรุปผลการศึกษา 36
บรรณานุกรม 37
ภาคผนวก 44
ภาคผนวก ก ผลงานตีพิมพ์ บทความวิจัยในวารสารวิชาการ 45
ภาคผนวก ข ใบรับรองจริยธรรมสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ 53
ประวัติผู้เขียน 56

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สปีชีส์แมลงริ้นดำที่เป็นพาหะของ *Leucocytozoon* 16

ตารางที่ 2 สปีชีส์ของแมลงริ้นดำ สถานที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนตัวอย่าง แมลงริ้นดำในประเทศไทยที่ใช้ในการศึกษา 21

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างแมลงริ้นดำที่ศึกษาและร้อยละการพบของ *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำ 27

ตารางที่ 4 ผลของ NCBI BLAST ของ *Leucocytozoon* และ host ที่มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุดกับ *Leucocytozoon* ที่พบในแมลงริ้นดำจากประเทศไทย 30

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 วงชีวิตของ Leucocytozoon.....5

ภาพที่ 2 ชีวิตของแมลงริ้นดำ 9

ภาพที่ 3 แมลงริ้นดำ *Simulium asakoae* complex ระยะตัวเต็มวัย (ภาพถ่ายโดย Dr. Adrian Plant).....11

ภาพที่ 4 ลักษณะของแผลที่โดนแมลงริ้นดำกัด.....13

ภาพที่ 5 แหล่งอาศัยตามธรรมชาติของแมลงริ้นดำตัวเต็มวัยในประเทศไทย 17

ภาพที่ 6 สถานที่เก็บตัวอย่างแมลงริ้นดำตัวเต็มวัยในประเทศไทย.....18

ภาพที่ 7 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสร้างด้วยวิธี neighbor – joining (NJ).....32

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 1
บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

Leucocytozoon เป็นโปรโตซัวในเลือด จัดอยู่ในไฟลัม (Phylum) Apicomplexa อันดับ (order) Haemosporida รายงานการพบครั้งแรกในเลือดนกฮูก (owl) โดย Vasily Danilewsky ในปี ค.ศ. 1884 ซึ่งขณะนั้นยังไม่ได้ระบุเป็นสกุล (genus) *Leucocytozoon* (Valkiunas, 1999) ปัจจุบันมีรายงานการพบ *Leucocytozoon* อย่างน้อย 41 สปีชีส์ (species) แต่การศึกษาด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลพบว่ามีความหลายหลายของสปีชีส์มากกว่าที่รายงานไว้มาก (Valkiunas et al., 2010; Freund et al., 2016; Galen et al., 2018) สกุล *Leucocytozoon* แบ่งเป็น 2 สกุลย่อย (subgenus) คือ *Leucocytozoon* และ *Akiba* ซึ่งแตกต่างกันจากลักษณะการรวมตัวของ exo-erythrocytic และพาหะ (vector) โดยเชื้อในสกุลย่อย *Leucocytozoon* มีแมลงริ้นดำ (Diptera: Simuliidae) เป็นพาหะ และสกุลย่อย *Akiba* มีแมลงในสกุล *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) เป็นพาหะ ซึ่งสามารถนำเชื้อได้เพียงสปีชีส์เดียว คือ *Leucocytozoon* (*Akiba*) *caulleryi* (Valkiunas, 2005)

Leucocytozoon เป็นโปรโตซัวที่ก่อโรค Leucocytozoonosis ซึ่งพบในสัตว์ปีกหลายชนิด เช่น ไก่ เป็ด ไก่งวง ห่าน และนก เมื่อเชื้อนี้เข้าสู่กระแสเลือด เชื้อจะเจริญในเม็ดเลือดแดงหรือเม็ดเลือดขาว ทำให้การทำหน้าที่ของเม็ดเลือดเสียไป และเม็ดเลือดถูกทำลาย ทำให้ไก่ที่ติดเชื้อแสดงอาการโลหิตจาง มีไข้ อุจจาระเหลวเป็นสีเขียว ขาไม่มีแรง มีน้ำลักษณะเหนียวออกมาจากปาก และอาจตายในที่สุด (Fallis and Desser, 1977; Kaufmann, 1996; Springer, 1997) ในประเทศไทย โรค Leucocytozoonosis ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่อย่างมาก โดยไก่เนื้อจะแสดงอาการป่วย และมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 25 (สมใจ และคณะ, 2518) ขณะที่ไก่พื้นเมืองมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 40 (Prasittirat et al., 1997) และส่งผลกระทบทางเศรษฐกิจในฟาร์มไก่ไข่ โดยอัตราการผลิตไข่ลดลงร้อยละ 40 อัตราการป่วยร้อยละ 10 และอัตราการตายร้อยละ 1.5 (Worasing et al., 2000) โรคนี้มักพบระบาดในช่วงฤดูฝน (Kaufmann, 1996) ในประเทศไทยมีรายงานการพบ *Leucocytozoon* จำนวน 2 สปีชีส์ โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนก ได้แก่ *L. sabrazesi* และ *L. caulleryi* (สมใจและคณะ, 2518; Wongwatcharadamrong

et al., 1980; Nakamura et al., 1990) อย่างไรก็ตามจนถึงขณะนี้ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับพาหะของเชื้อ *Leucocytozoon* ชนิดดังกล่าวในประเทศไทยรวมถึงเขตร้อนชื้นของทวีปเอเชีย

แมลงริ้นดำ (black flies) เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางด้านการแพทย์มากที่สุดชนิดหนึ่ง เนื่องจากเป็นพาหะของโรค Onchocerciasis หรือ River blindness (Adler et al., 2010) ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากพยาธิตัวกลม filarial nematode สปีชีส์ *Onchocerca volvulus* โดยมีแมลงริ้นดำเพศเมียบางสปีชีส์เป็นพาหะ เช่น *Simulium damnosum* complex, *S. naveavie, S. exiguum* (Crosskey, 1990) โรค Onchocerciasis พบในทวีปแอฟริกา อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ โดยคาดการณ์ว่าจะมีคนไม่ต่ำกว่า 100 ล้านคนมีความเสี่ยงที่จะเกิดโรค Onchocerciasis และในจำนวนนี้ประมาณ
18 ล้านคนติดเชื้อ โดย 500,000 คน สายตาเสียและ 270,000 คน ตาบอดจากการติดเชื้อ *Onchocerca volvulus* (Richards et al., 2000) นอกจากการเป็นพาหะของโรค Onchocerciasis แมลงริ้นดำยังถ่ายทอดโปรโตซัวในสกุล *Trypanosoma* และ *Leucocytozoon* นอกจากนี้แมลงริ้นดำยังสามารถถ่ายทอดไวรัสบางชนิด และอะโบไวรัส (aboviruses) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ในสัตว์หลายชนิด เช่นโรค myxomatosis ในกระต่าย (Richards et al., 2000; Mead et al., 1999)

ปัจจุบันมีการศึกษาการเป็นพาหะนำโรคของ *Leucocytozoon* จากแมลงริ้นดำ (Diptera: Simuliidae) ด้วยวิธีทางพันธุศาสตร์โมเลกุลซึ่งพบความหลากหลายของโปรโตซัวในเลือดที่ก่อโรคในสัตว์ปีกได้ เช่น การศึกษาแมลงริ้นดำในเทือกเขาร็อคกี้ ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน cytochrome *b* (cyt *b*) พบว่าแมลงริ้นดำ *S. silvestre* และ *S. exulatum* เป็นพาหะของ *Leucocytozoon* (Murdock et al., 2015) ในประเทศญี่ปุ่นมีการรายงานพบแมลงริ้นดำเป็นพาหะของ *L. lovati* ในแมลงริ้นดำ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *S. japonicum, S. uchidai* และ *Prosimulium hirtipes* (Sato et al., 2009) และในสาธารณรัฐเช็ก พบว่าแมลงริ้นดำ *S. securiforme* เป็นพาหะของ *Leucocytozoon* (Synek et al., 2013) และแมลงริ้นดำ *S. vernum* เป็นพาหะของ *Leucocytozoon* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคโลหิตจางในนกฮูก (Synek et al., 2016)

ในประเทศไทยยังไม่มีการรายงานการศึกษาบทบาท และศักยภาพของแมลงริ้นดำในการเป็นพาหะนำโรคของ *Leucocytozoon* แต่มีการรายงานการพบ *Leucocytozoon* ในสัตว์ปีกอย่างต่อเนื่อง การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานแรกเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง *Leucocytozoon* กับแมลงริ้นดำในประเทศไทยรวมถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อใช้วิธีทางพันธุศาสตร์โมเลกุลตรวจสอบความหลากหลายและความชุกของ *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำจากประเทศไทย

1.3 ความสำคัญของการวิจัย

ทราบความหลากหลายและความชุก ของ *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำจากประเทศไทย

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างแมลงริ้นดำในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย โดยใช้สวิงจับแมลง เก็บตัวอย่างในเอทานอลความเข้มข้น 80 % หลังจากนั้นนำมาแช่ในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพก่อนนำไปทำการศึกษา

ระบุสปีชีส์ของแมลงริ้นดำด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากนั้นสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ตามวิธีของ Hellgren et al. (2004) โดยใช้ยีน cytochrome *b* (cyt *b*) ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของโปรโตซัว *Leucocytozoon* วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป โดยเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI GenBank

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

บทที่ 2
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 ชีววิทยาของ *Leucocytozoon*

Leucocytozoon เป็นโปรโตซัวในเลือดกลุ่ม Haemosporozoa จัดอยู่ใน Phylum Apicomplexa พบเชื้อครั้งแรกในนกฮูก (owl) โดย Vasily Danilewsky ในปี ค.ศ.1884 (Valkiunas, 1999) *Leucocytozoon* ในปัจจุบันมีรายงานอย่างน้อย 41 สปีชีส์ แต่การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลพบว่ามีความหลายหลายของชนิดมากกว่าที่รายงานด้วยการศึกษาสัณฐานวิทยา (Valkiunas et al., 2010; Freund et al., 2016; Galen et al., 2018)

ลำดับขั้นทางอนุกรมวิธานของ *Leucocytozoon* สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

Domain: Eukaryota

Phylum: Apicomplexa

Class: Aconoidasida

Subclass: Haemosporidiasina

Order: Haemosporida

Suborder: Theileriina

Family: Leucocytozoidae

Genus: *Leucocytozoon*

(Valkiunas, 1999)

2.1.1วงชีวิตของ *Leucocytozoon*

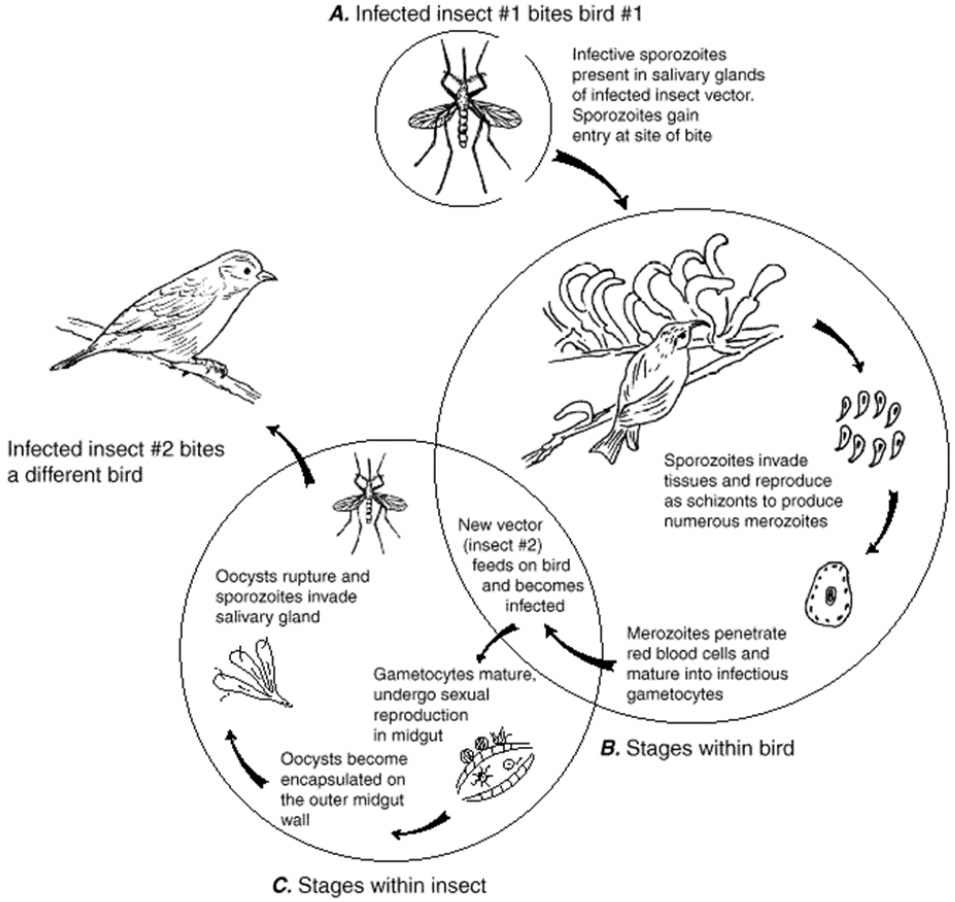
วงชีวิตของ *Leucocytozoon* (ภาพที่ 1) แบ่งเป็น 2 ระยะ ดังนี้

1. วงจรชีวิตในแมลงพาหะ มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือ sporogony

2. วงจรชีวิตในสัตว์ปีก มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ หรือ schizogony ซึ่งแบ่งเป็น

2.1 ระยะที่อยู่ในอวัยวะ หรือ exo-erythrocytic schizogony

2.2 ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือด หรือ erythrocytic schizogony



ภาพที่ 1 วงชีวิตของ *Leucocytozoon*

(A) แมลงที่ติดเชื้อ ได้รับเชื้อจากการกัดนกที่มีเชื้อ (B) ระยะเชื้อพัฒนาในนก (C) ระยะเชื้อพัฒนาในแมลง

(ที่มา: Atkinson, 1999)

1. วงชีวิตในแมลงพาหะ

เมื่อแมลงพาหะกัดสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ *Leucocytozoon* แมลงจะดูดเลือดที่มีเซลล์เพศผู้ (microgametocyte) และเซลล์เพศเมีย (macrogametocyte) เข้าไป โดยส่วนใหญ่ *Leucocytozoon* มีพาหะเป็นแมลงริ้นดำสกุล *Simulium* ยกเว้น *L. caulleryi* มีพาหะ คือแมลงสกุล *Culicoides* ระยะ gamont ที่เข้าสู่แมลงดูดเลือด (midgut) ของพาหะจะมีรูปร่างกลมขึ้น และออกจากเซลล์เม็ดเลือดโดยการกระตุ้นจากความเข้มข้นของออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ในสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป โดยระยะ microgamont แบ่งเซลล์ได้ 8 microgametes ซึ่งแต่ละเซลล์จะมีแฟลเจลลัม (flagellum) 1 เส้น ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ไปหา macrogamete ได้ โดยที่ macrogamete 1 เซลล์มาจากการเปลี่ยนแปลงของ macrogamont เมื่อผสมกันจะได้ zygote ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (ookinete) ระยะ zygote จากเดิมที่มีรูปร่างกลมจะเปลี่ยนแปลงให้มีรูปร่างรีและยาวขึ้นซึ่งจะไชเข้าสู่ผนังของ midgut และเปลี่ยนแปลงไปเป็น oocyst ที่ผนังชั้นนอกของ midgut ซึ่ง oocyst จะอยู่ใต้ชั้น basal lamina โดย oocyst มีขนาดมากกว่า 25 ไมครอน แต่สำหรับ *L. simondi* oocyst มีขนาด 10 – 12 ไมโครเมตร sporogony ภายใน oocyst จะเกิดกระบวนการ sporogony ขึ้น ทำให้ภายใน oocyst มี sporozoite อยู่จำนวนมาก และต่อมาผนัง oocyst จะแตกออกและปล่อย sporozoite เข้าสู่ช่องว่างลำตัว (hemocoel) ของพาหะ ซึ่งจะเคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำลายโดยเข้าไปอยู่ในต่อมน้ำลายและพร้อมที่จะเข้าสู่สัตว์ปีกตัวอื่นเมื่อแมลงพาหะดูดเลือดสัตว์ปีกตัวอื่น เวลาที่ใช้สร้าง sporozoite จะใช้เวลาประมาณ 6 – 7 วัน sporozoite ในต่อมน้ำลายจะมีการพัฒนาของ apical complex เจริญดีกว่าใน oocyst และมีรูปร่างเรียวกว่า เมื่อพาหะของเชื้อเข้ากัดสัตว์ปีก sporozoite ที่อยู่ในต่อมน้ำลายจะเข้าสู่สัตว์ปีกพร้อมกับน้ำลายของแมลงพาหะที่ฉีดเข้าสู่ผิวหนัง

2. วงชีวิตในสัตว์ปีก

2.1 ระยะที่อยู่ในอวัยวะ เมื่อแมลงพาหะกัดสัตว์ปีกจะปล่อย sporozoite เข้ากระแสเลือด จากนั้น sporozoite จะกระจายไปยังอวัยวะ ได้แก่ ไต ม้าม ตับ ตับอ่อน กล้ามเนื้อ ลำไส้ รังไข่ ต่อมหมวกไต หลอดลม และสมอง โดยเซลล์ที่พบว่ามักจะติดเชื้อ ได้แก่ hepatic parenchymal cell, renal epithelial cell และ reticuloendothelial cell โดยเฉพาะในม้ามและต่อมน้ำเหลือง ยกเว้น *L. caulleryi* ที่ sporozoite มักเข้าสู่ endothelial cell ของ visceral organ และ merogony เมื่อเข้าสู่เซลล์ดังกล่าวจะเกิดกระบวนการ primary merogony ซึ่งทำให้ได้ meront ที่มีขนาดตั้งแต่ 20 – 40 ไมครอน (4 – 5 วันหลังติดเชื้อ) ภายในมี merozoite ที่มีขนาด 1 ไมครอนประมาณ 1,000 เซลล์ นอกจากนี้ใน primary meront ของ *L. simondi* จะมีชิ้นส่วนเล็ก ๆ

(syncytia) ที่มีนิวเคลียสตั้งแต่สองอันขึ้นไป อยู่ร่วมกับ merozoite เมื่อผนัง meront แตกออกจะปล่อย merozoite และ syncytia (กรณีของ *L. simondi*) ออกมา primary merozoite ของ *L. caulleryi* จะเข้าสู่ endothelial cell และกลายเป็น secondary meront และ megalomeront ที่สร้าง merozoite ที่พร้อมจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงต่อไปส่วนกรณี primary meront ของ *L. simondi* นั้นเมื่อผนัง meront แตกออก merozoite จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงเพื่อเปลี่ยนแปลงไปเป็น gametocyte ทันที แต่ syncytia ที่ออกมาจะมีการสร้าง secondary meront ใน hepatic parenchymal cell หรือ vascular endothelial cell ต่อไป ซึ่ง meront ที่มาจาก syncytia จะมีการขยายขนาดค่อนข้างเร็ว มีขนาด 100 – 200 ไมโครเมตร เรียกว่า megalomeront หรือ megaloschizont ซึ่งภายในมี merozoite ที่มีขนาด 1 ไมครอนจำนวนมากกว่า 1 ล้านเซลล์ ระยะ merozoite จาก megaloschizont จะเข้าสู่เม็ดเลือดขาวและกลายเป็น elongate gametocyte ต่อไป

2.2 ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือด เมื่อ merozoite ที่เข้าสู่เม็ดเลือดจะมีขนาด 1 – 2 ไมโครเมตร โดยจะอยู่ชิดติดกับนิวเคลียสของเม็ดเลือด primary merozoite ของ *L. simondi* และ secondary merozoite ของ *L. caulleryi* จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงทั้งชนิด erythrocyte และ erythroblast โดยจะกลายเป็น round gametocyte ต่อไประยะ prepatent peroid ของเชื้อ *L. caulleryi* ประมาณ 14 วัน ส่วนระยะเวลาที่มี parasitemia ประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะพบ gamont ลดลงเรื่อย ๆ จนหายไปจากกระแสเลือด (รวมทั้งหมดประมาณ 14 วัน) ในกรณีของนกที่ติดเชื้อ *Leucocytozoon* ที่ไม่ก่อโรครุนแรง ลักษณะของโรคจะเป็นแบบ chronic infection ที่มีระดับ parasitemia ค่อนข้างต่ำและมักจะพบเป็นเวลาสั้น ๆ นอกจากนี้ในไก่หรือเป็ดที่มีชีวิตรอดจากการติดเชื้อจะสามารถกลับมามีเชื้อในกระแสเลือดใหม่อีกได้ โดยเป็นเชื้อที่มาจากระยะ meront ใน visceral organ (recurrence) ซึ่งเป็นการปลดปล่อย merozoite จาก megalomeront ลักษณะรูปแบบของ parasitemia ในระยะ chronic stage มักเป็นแบบ irregular parasitemia คือ จะมีรูปแบบการปรากฏของเชื้อในกระแสเลือดแบบไม่แน่นอนทั้งจำนวนเชื้อและระยะเวลา อันเป็นผลมาจากความไม่แน่นอนของ host immunity โดยมักพบได้ในช่วง การออกไข่ การสร้างรัง การแย่งพื้นที่อาศัยและการอพยพ ซึ่งทั้งหมดจะก่อให้เกิดความเครียดส่งผลให้ระดับภูมิคุ้มกันในร่างกายลดลง

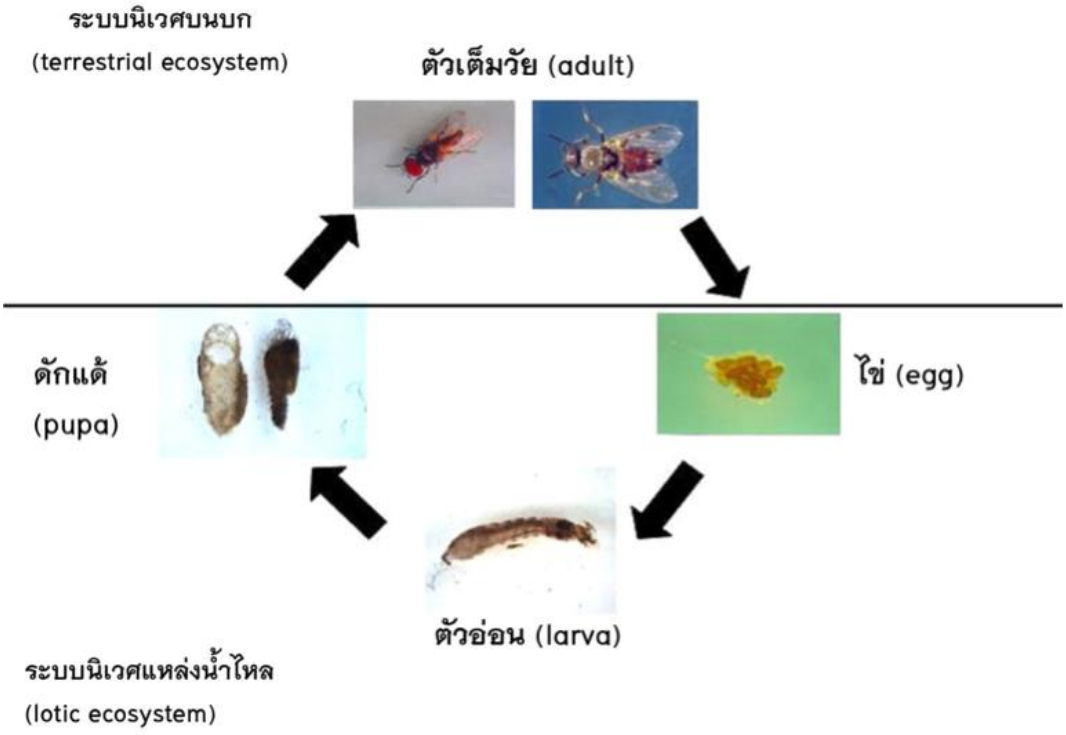
2.2 ความสำคัญของเชื้อ *Leucocytozoon*

Leucocytozoon เป็นสาเหตุของโรค Leucocytozoonosis เป็นโรคพยาธิในเลือดที่สำคัญของไก่และสัตว์ปีก ซึ่งทำให้ไก่ป่วยและตายได้ หากไม่ได้ทำการรักษา ใน สัตว์ปีกที่ติดเชื้อ *Leucocytozoon* จะไม่แสดงอาการป่วยชัดเจนหรือแสดงอาการแบบเฉียบพลัน เช่น โลหิตจาง ซึม ท้องเสีย อุจจาระเป็นสีเขียว หงอนและเหนียงซีด อาจแสดงอาการทางระบบประสาท (Krimahakim et al., 1975; Nakamura et al., 1990; Wongwatcharadamrong et al.,1980) ลักษณะของไก่ที่แสดงอาการใบหน้า หงอนเหนียงซีด อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ แต่สิ่งหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้อง คือ ปัญหาเกี่ยวกับการทำงานของระบบการสร้างเม็ดเลือดแดง หรือปัญหาที่ก่อให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะผิดปกติเพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งก่อให้เกิด ภาวะเลือดจาง ซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดมีปริมาณลดลง ไก่จึงแสดงอาการซีด โดยเฉพาะในส่วนของอวัยวะที่สังเกตเห็นได้ง่าย เช่น ใบหน้า หงอนและเหนียง เป็นต้น เม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะความผิดปกติของไก่พบว่าสาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มักเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง คือ การติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือด (Wongwatcharadamrong et al., 1980)

ประเทศไทยมีรายงานการพบโรค Leucocytozoonosis ครั้งแรกโดย Campbell (1954) โรค Leucocytozoonosis ในประเทศไทยเกิดจากเชื้อ 2 ชนิดคือ *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* มีริ้น (midge) และ แมลงริ้นดำ (back fly) (*Culicoides* sp., *Simulium* sp.) เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ อาการของโรค Leucocytozoonosis คือ เกิดภาวะโลหิตจาง ซึม อุจจาระเหลว มีสีเขียวปนขาว หงอนและเหนียงซีด อัตราไข่ลดลง อัตราการตายอาจจะสูง ถึง 25% (สมใจ และคณะ, 2518) ในไก่พื้นเมืองมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 40 (Prasittirat et al., 1997) และส่งผลกระทบทางเศรษฐกิจในฟาร์มไก่ไข่โดยอัตราการผลิตไข่ลดลงร้อยละ 40 อัตราการ และอัตราการตายร้อยละ 1.5 ซึ่งเป็นการเกิดโรคร่วมกับเชื้อมาลาเรียในไก่ (Worasing et al.,2000) ไก่พื้นเมืองในจังหวัดเชียงใหม่พบติดเชื้อ *L. sabrazesi* สูงถึง 73% และ *L. caulleryi* 0.47% (Takang et al., 2017) ไก่พื้นเมืองในจังหวัดน่าน ติดเชื้อ *Leucocytozoon* สูงถึง 74% (Jaijan et al., 2012) ในปี พ.ศ. 2554 พบนกป่าที่สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเข้าค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ติดเชื้อ *Leucocytozoon* 29% (Singjam and Ruksachat, 2011) และในภาคใต้ของไทย พบการระบาดของโรค Leucocytozoonosis สูงถึง 60% ในจังหวัดนครศรีธรรมราช (Worasing et al., 2001)

2.3 แมลงริ้นดำ

แมลงริ้นดำเป็นแมลงขนาดเล็กจัดอยู่ในไฟลัม (phylum) Arthropoda ชั้น (class) Insecta อันดับ (order) Diptera อันดับย่อย (suborder) Nemathocera Infraorder Culicomorpha Superfamily Chironomidae วงศ์ Simulidae ทั่วโลกมีรายงานพบทั้งสิ้น 2,328 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นสปีชีส์ที่สูญพันธุ์ไปแล้ว 18 สปีชีส์ (Adler, 2019)



ภาพที่ 2 ชีวิตของแมลงริ้นดำ
ระยะไข่ (egg) ระยะตัวอ่อน (larva) ระยะดักแด้ (pupa) อาศัยในแหล่งน้ำไหล (lotic ecosystem)
ระยะตัวเต็มวัย (adult) อาศัยบนบก (terrestrial ecosystem)
(**ที่มา**: ไพโรจน์ ประมวล, 2557)

แมลงริ้นดำมีวงชีวิต ประกอบด้วย 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ (egg) ระยะตัวอ่อน (larva) ระยะดักแด้ (pupa) และระยะตัวเต็มวัย (adult) (ภาพที่ 2) ซึ่งระยะไข่ ตัวอ่อน และดักแด้ อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำไหล ระยะเวลาในการเจริญพัฒนาจากไข่ไปจนถึงตัวเต็มวัยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสปีชีส์ และอุณหภูมิของน้ำ ตัวอ่อนจับยึดเกาะกับเศษใบไม้โขดหินตามแหล่งน้ำไหลเป็นแหล่งอาศัยโดยใช้โครงสร้างที่อยู่ส่วนท้ายของลำตัวที่เรียกว่า posterior circlet มีระยะการกินอาหารแบบกรอง

(filter- feeding) โดยใช้โครงสร้างที่เรียกว่า cephalic fan หรือ labral fan ซึ่งอยู่บนส่วนของตัวอ่อนตัวเต็มวัยอาศัยอยู่บนบก

ระยะไข่ (egg) หลังจากที่ตัวเมียได้รับการผสมพันธุ์แล้วจะวางไข่ไว้ตามโขดหิน เศษวัสดุต่าง ๆ ตามลำต้นหรือใบของพืชน้ำที่อยู่ในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติโดยแต่ละกลุ่มของไข่ประกอบด้วยไข่ประมาณ 150 - 600 ฟอง โดยการที่ไข่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มนี้เกิดเนื่องจากอิทธิพลของฟีโรโมนของตัวเมียที่หลั่งออกมาขณะวางไข่ ซึ่งไข่มีขนาดเล็กมาก และมีความยาวตั้งแต่ 0.18 - 0.46 มิลลิเมตร ลักษณะของไข่เป็นรูปสามเหลี่ยมรี มีลักษณะ คล้ายรูปไตที่ด้านหนึ่งโป่งนูนออกมาเล็กน้อยเปลือกหุ้มไข่ค่อนข้างเรียบสีของไข่ที่ตัวเมียวางใหม่ๆเป็นสีขาวต่อมาสีจะค่อยค่อยเข้มเป็นสีน้ำตาลระยะเวลาที่ไข่ของแต่ละสปีชีส์ฟักเป็นตัวอ่อนนั้นแตกต่างกันตั้งแต่ 4-30 วัน ขึ้นกับสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิของน้ำ และอากาศแต่อาจจะใช้เวลานานกว่านี้ใน สปีชีส์ที่ไข่ต้องผ่านระยะพัก (diapauses) ในเขตอากาศร้อน ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนภายใน1 หรือ 2 วันเท่านั้น เช่น ไข่ของริ้นดำกลุ่ม สปีชีส์ซับซ้อน *S. damnosum* ในแอฟริกา ใช้เวลา 1-3 วัน แต่ไข่ของแมลงริ้นดำกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. damnosum* ในแอฟริกากลาง ใช้เวลา 3-20 วัน (Davies and Crosskey, 1991)

ระยะตัวอ่อน (larva) ตัวอ่อนมีลักษณะเรียวยาว และมีด้านล่างของลำตัวกว้างด้านบนตัวอ่อนของแมลงริ้นดำแต่ละชนิดมีความยาวแตกต่างกัน ตั้งแต่ 5-15 มิลลิเมตร ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลดำ ส่วนหัวมีปลอกหุ้ม มีตา 1 คู่ และมี cephalic fan 1 คู่ ซึ่งมีเส้นแกนจำนวนหลายหลายเส้น และมีเส้นเล็ก ๆ สั้น ๆ แตกออกจากเส้นแกนเป็นจำนวนมาก เส้นแกนสามารถขยายออกเป็นรูปครึ่งวงกลมคล้ายพัด ทำหน้าที่กรองอาหารขนาดเล็ก ๆ จากน้ำไหลเข้าสู่ปากตัวอ่อนของแมลงริ้นดำ มีอวัยวะยึดเกาะ 2 ตำแหน่ง คือ proleg เป็นส่วนที่ยื่นออกมาจากปล้องแรกของส่วนอกบริเวณส่วนปลายของ proleg ประกอบด้วยเส้นเล็กๆ ที่มีลักษณะคล้ายตะขอ (hook) เรียงเป็นวงกลมเรียกว่า anterior circlet ทำหน้าที่ ในการยึดเกาะกับก้อนหินหรือพืชน้ำเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ นอกจากนี้ภายสุดของลำตัว ยังมี posterior circlet ที่มีเส้นเล็ก ๆ คล้ายตะขอเรียงเป็นวงกลม ช่วยยึดเกาะการเคลื่อนที่เช่นกัน ตัวอ่อนอาศัยและเจริญเติบโตในน้ำไหล จะปล่อยเส้นใยเหนียวที่ผลิตจากต่อมน้ำลายออกมาเป็นตาข่าย ติดกับก้อนหินหรือพืชน้ำเพื่อให้ posterior circlet ยึดเกาะ ซึ่งทำให้ตัวอ่อนยึดติดไม่ไหลไปกับกระแสน้ำ ตัวอ่อนมีระยะการเจริญเติบโต 6- 9 ระยะ แล้วแต่สปีชีส์ และในแต่ละสปีชีส์อาจจะมีระยะการเจริญของตัวอ่อนแตกต่างกันบางครั้งตัวอ่อนที่เจริญ เต็มที่แล้วจะสามารถเห็น gill spot 1 คู่ มีจุดสีดำได้อย่างชัดเจนที่บริเวณด้านข้างระหว่าง ปล้องที่ 1 และ 2 ภายใน gill spot จะเป็น histoblasts ของขาและปีกที่กำลังเจริญบนตัว สองข้างของส่วนอก และเป็น histoblasts สีเข้มของ pupal gill ซึ่งเป็นอวัยวะช่วยในการหายใจ ช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เช่น แมลงริ้นดำกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. damnosum* ใน

แอฟริกาตะวันออกที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศา อาจใช้เวลาเพียง 4 วันเท่านั้น โดยการลอกคราบทุกวันในช่วงที่มีการเจริญเติบโต

ระยะดักแด้ (pupa) ตัวอ่อนที่เจริญเติบโตในระยะสุดท้าย ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงในการสร้างปลอกหุ้มดักแด้ (cocoon) ที่จะลอกคราบเปลี่ยนเป็นตัวดักแด้อยู่ภายในปลอกหุ้มนั้น ลักษณะรูปร่างของปลอกหุ้มดักแด้สามารถใช้วินิจฉัยแยกสปีชีส์ของแมลงริ้นดำได้ ส่วนหัว และอกของดักแด้รวมเป็นหนึ่งเดียวกันเรียก cephalothorax ซึ่งจะมี pupal gills 1 คู่ ที่ประกอบด้วยเส้นเล็ก ๆ ใช้เป็นอวัยวะช่วยหายใจ มีจำนวนตั้งแต่ 2 เส้นขึ้นไป ขนาด ลักษณะ จำนวน และแบบแผนการเรียงตัวของ pupal gills สามารถใช้แยกกลุ่ม และชนิดของแมลงริ้นดำได้อย่างแม่นยำ ช่วงชีวิตของดักแด้มีระยะประมาณ 2-17 วัน

ภาพที่ 3 แมลงริ้นดำ *Simulium asakoae* complex ระยะตัวเต็มวัย (ภาพถ่ายโดย Dr. Adrian Plant)

ตัวเต็มวัย (adult) หลังจากตัวดักแด้เจริญเต็มที่จะออกจากปลอกหุ้ม เป็นตัวเต็มวัยในช่วงเวลากลางวัน ซึ่งระยะเวลาขึ้นกับแสงสว่างและอุณหภูมิ ตัวเต็มวัยของแมลงริ้นดำมีขนาดเล็ก รูปร่างอ้วนสั้น ลำตัวมีความยาวตั้งแต่ 1.2 - 5.5 มิลลิเมตร ตัวเต็มวัย เพศเมียสามารถแยกออกจากเพศผู้ได้โดยสังเกตลักษณะของตาที่มีขนาดใหญ่ ตาใหญ่ 2 ข้างของตัวเมียจะอยู่แยกไม่เรียงชิดติดกันเหมือนในตัวผู้ และตาเล็ก (facets) ที่มีจำนวนมากซึ่งประกอบกันเป็นตาใหญ่ของตัวเมียมีขนาดเท่ากัน ในขณะที่ตาเล็กซึ่งอยู่ ด้านครึ่งบนของตาใหญ่ของตัวผู้นั้นจะมีขนาดใหญ่กว่าตาเล็กที่อยู่ทางครึ่งล่าง หนวดของตัวเต็มวัยมีลักษณะอ้วน และตรง แมลงริ้นดำตัวผู้จะกินเฉพาะน้ำหวานของดอกไม้

เป็นอาหารส่วนแมลงริ้นดำตัวเมียบางชนิดจะดูดเลือดคน และสัตว์เลือดอุ่นเพื่อใช้โปรตีนจากเลือดในการเจริญเติบพัฒนาของไข่ อวัยวะดูด (proboscis) ของตัวเมียค่อนข้างสั้น นอกจากนี้ส่วนต่าง ๆ ของปากที่ประกอบด้วยขากรรไกรบน และขากรรไกรล่างที่มีลักษณะเหมือนฟันเลื่อยเพื่อใช้สำหรับตัดผิวหนัง และดูดเลือดค่อนข้างแข็งแรงในขณะที่ส่วนต่าง ๆ ของปากของแมลงริ้นดำชนิดที่ไม่ดูดเลือดและแมลงริ้นดำตัวผู้จะดัดแปลงสำหรับดูดน้ำหวานแมลงริ้นดำจะกัด และดูดเลือดคน และสัตว์ในช่วงเช้า และเย็นเท่านั้น

2.4 ความสำคัญของแมลงริ้นดำ

แมลงแมลงริ้นดำเพศเมียมีความสำคัญทางด้านการแพทย์และเศรษฐกิจ ทางด้านการแพทย์ แมลงริ้นดำเพศเมียเป็นพาหะสำคัญของพยาธิ *Onchocerca volvulus* สาเหตุของโรค Onchoerciasis หรือโรค River Blindness ซึ่งพบแพร่ระบาดในทวีปแอฟริกา อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ คาดว่าประชากรมากกว่า 100 ล้านคน เสี่ยงต่อโรค Onchoerciasis นอกจากนี้ประชากรประมาณ 18 ล้านคน มีพยาธินี้อยู่ในร่างกาย ประชากรประมาณ 800,000 คนมีสายตาเสีย และ 270,000 คนตาบอด (Richards et al., 2000) ซึ่งเป็นผลมาจากการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณตาของตัวอ่อนของพยาธิ ตัวอ่อนของพยาธิยังมีผลทำให้ต่อมน้ำเหลืองบวม อักเสบ อุดตัน และอาจเกิดเป็นโรคเท้าช้างประเภทหนึ่ง ถ้าตัวอ่อนของพยาธิ ตายจะมีผลทำให้เกิดพิษบริเวณผิวหนัง โดยเกิดอาการคันมาก และรงควัตถุสีที่ผิวหนังจะลดลง ควบคู่กับการขาดวิตามินเอ ผิวหนังสูญเสียการยืดหยุ่นทำให้มีลักษณะคล้ายโรคเรื้อน คนที่ถูกแมลงริ้นดำกัดมาก ๆ จะเกิดอาการแพ้ เป็นไข้ ปวดหัวคลื่นไส้ และมีอาการหอบหืด เรียกว่า ไข้ริ้นดำ (black fly fever) ผิวหนัง ของคนที่ถูกแมลงริ้นดำกัดจะมีลักษณะบวมแดง อักเสบ และคัน ในรายของคนที่มีอาการแพ้แมลงริ้นดำ ผิวหนังจะบวมแดง และอักเสบมาก ต้องไปพบแพทย์ทำการรักษา

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ภาพที่ 4 ลักษณะของแผลที่โดนแมลงริ้นดำกัด

แมลงริ้นดำยังถ่ายทอดพยาธิ *Onchoecerca* ชนิดอื่น ๆ ไปสู่สัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า เช่น วัว ควาย เป็ด ไก่ เก้ง กวาง และหมูป่า และถ่ายทอดโปรโตซัวสกุล *Trypanosoma* และ *Leucocytozoon* ระหว่างสัตว์ปีก เช่น นก และไก่ ทำให้เกิดโรค Leucocytozoonosis ในสัตว์ปีก และเป็นตัวถ่ายทอดไวรัส และอาโบไวรัส (Aboviruses) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ในสัตว์หลายชนิด เช่น โรค Myxomatosis ในกระต่าย (Kettle,1990)

ประเทศไทยแม้ยังไม่มีรายงานการเกิดโรค Onchoerciasis แต่จากการศึกษาในแมลงริ้นดำชนิด *Simulium nodosum, S. asakoae* และ *S. nigrogilvum* ในจังหวัดเชียงใหม่ตรวจสอบพบเชื้อ *Onchoecerca* sp. ในตัวเมียของแมลงริ้นดำทั้ง 3 ชนิดแต่ยังไม่สามารถระบุชนิดของพยาธิดังกล่าวได้ (Fukuda et al., 2003;Takaoka et al., 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าแมลงริ้นดำก่อความรำคาญให้นักท่องเที่ยวในแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญหลายแห่ง เช่น บริเวณดอยอินทนนท์จังหวัดเชียงใหม่ บริเวณช่องเย็นอุทยานแห่งชาติแม่วงก์จังหวัดนครสวรรค์ และอุทยานแห่งชาติภูสอยดาวจังหวัดอุตรดิตถ์ โดยการกัดของแมลงริ้นดำอาจทำให้เกิดอาการบวมแดงและมีอาการคันอยู่หลายวันถึงอาทิตย์ แต่คนที่แพ้อาจทำให้เกิดอาการบวมแดงอย่างรุนแรง (ภาพที่ 4) และอาจเกิดอาการไข้ นอกจากความสำคัญในการเป็นพาหะของโรค แมลงริ้นดำยังมีความสำคัญต่อระบบนิเวศเนื่องจากแมลงริ้นดำจะเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างผู้บริโภคลำดับที่ 2 กับผู้ผลิตจัดเป็นผู้บริโภคลำดับที่หนึ่ง ใน

แหล่งน้ำไหลเนื่องจากแมลงริ้นดำมีปริมาณมากในระบบนิเวศแหล่งน้ำไหลดังนั้นจึงเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของระบบนิเวศของแหล่งน้ำไหล

ความสำคัญของแมลงริ้นดำด้านเศรษฐกิจ ได้มีการรายงานโจมตีสัตว์เลี้ยงโดยฝูงแมลงริ้นดำในภูมิภาคต่าง ๆ ของโลกก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก เช่นไก่งวง และเป็ดเกิดเป็นโรค Leucocytozoonosis ล้มตายเป็นจำนวนมากในสหรัฐอเมริกาและแคนาดา (Adler et al.,2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานเมื่อปี 1974 ในประเทศออสเตรเลีย ที่การโจมตีของแมลงแมลงริ้นดำมีผลทำให้น้ำหนักวัว และการผลิตน้ำนมลดลง (Kettle, 1990)

2.5 แมลงริ้นดำในประเทศไทย

การศึกษาแมลงริ้นดำในประเทศไทยเริ่มมีตั้งแต่ปี ค.ศ. 1911 โดย Summer (1911) ได้รายงานการพบแมลงริ้นดำชนิด *Simulium nigrogilvum* ในประเทศไทย ต่อมาในปี ค.ศ. 1928 Edwards (1984) ได้รายงานการพบ *S .hackeri* และ *S. digramicum* การศึกษาแมลงริ้นดำในประเทศไทยได้หยุดชะงักจนกระทั่งในปี ค.ศ. 1984 รายงานการพบแมลงริ้นดำเพิ่มเติมเป็น 19 สปีชีส์ (Takaoka and Suzuki, 1984) ต่อมาได้มี มีการรายงานการพบเพิ่มเติมอีก 7 สปีชีส์ (Takaoka and Saito, 1996)

ปัจจุบันในประเทศไทยมีการรายงานพบแมลงริ้นดำทั้งหมด 107 สปีชีส์ จำแนกอยู่ใน 6 สกุลย่อย ได้แก่ *Asiosimulium* จำนวน 3 สปีชีส์ *Daviesellum* จำนวน 2 สปีชีส์ *Gomphostilbia* จำนวน 34 สปีชีส์ *Nevermannia* จำนวน 11 สปีชีส์ *Montisimulium* จำนวน 6 สปีชีส์ และ *Simulium* จำนวน 51 สปีชีส์ ทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Simulium* (Adler, 2019)

2.6 ความสัมพันธ์ระหว่างแมลงริ้นดำกับ *Leucocytozoon*

ปัจจุบันการศึกษาการเป็นพาหะนำโรคของ *Leucocytozoon* จากแมลงริ้นดำด้วยวิธีทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ทำให้พบความหลากหลายของโปรโตซัวในเลือดที่ก่อโรคในสัตว์ปีกได้ และสามารถทราบสปีชีส์แมลงริ้นดำที่เป็นพาหะของ *Leucocytozoon* (ตารางที่ 1)

ในประเทศสวีเดนการศึกษาพบว่าแมลงริ้นดำ 5 สปีชีส์ คือ *S. transiens Metacnephia lyra*, *S. usovae, S. annulus* และ *S. silvestre* เป็นพาหะของ *Leucocytozoon* โดยพบอัตราการติดเชื้อดังกล่าวในแมลงริ้นดำสูงถึง 62% (Hellgren et al., 2008) ในญี่ปุ่นมีการรายงานการศึกษาโดยวิธีพันธุศาสตร์โมเลกุล พบว่าแมลงริ้นดำ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *S. bicolotatum*, *S. muiscorum* และ *Gigantodax misitu* เป็นพาหะของ *Leucocytozoon* (Sato et al., 2009)

การศึกษาในสาธารณรัฐเช็กพบว่าแมลงริ้นดำ 2 สปีชีส์ *S. vernum* และ *S. securiforme* เป็นพาหะของ *Leucocytozoon* และ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้นกฮูกเป็นโรคโลหิตจาง จากการศึกษาสามารถระบุชนิด (Synek et al., 2016; Synek et al., 2013)

การศึกษา ในเทือกเขาร็อคกี้ ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าแมลงริ้นดำ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *S. silvestre S. exulatum* และ *Greniera denaria* เป็นพาหะ ของ *Leucocytozoon* (Murdock et al., 2015)ในประเทศโคลัมเบีย พบว่าแมลงริ้นดำเป็นหนึ่งในแมลงพาหะนำเชื้อ *Leucocytozoon* สามารถระบุชนิดแมลงริ้นดำที่เป็นพาหะได้ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *S. bicolotatum*, *S. muiscorum* และ *Gigantodax misitu* (Lotta et al., 2016)

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 1 สปีชีส์แมลงริ้นดำที่เป็นพาหะของ *Leucocytozoon*

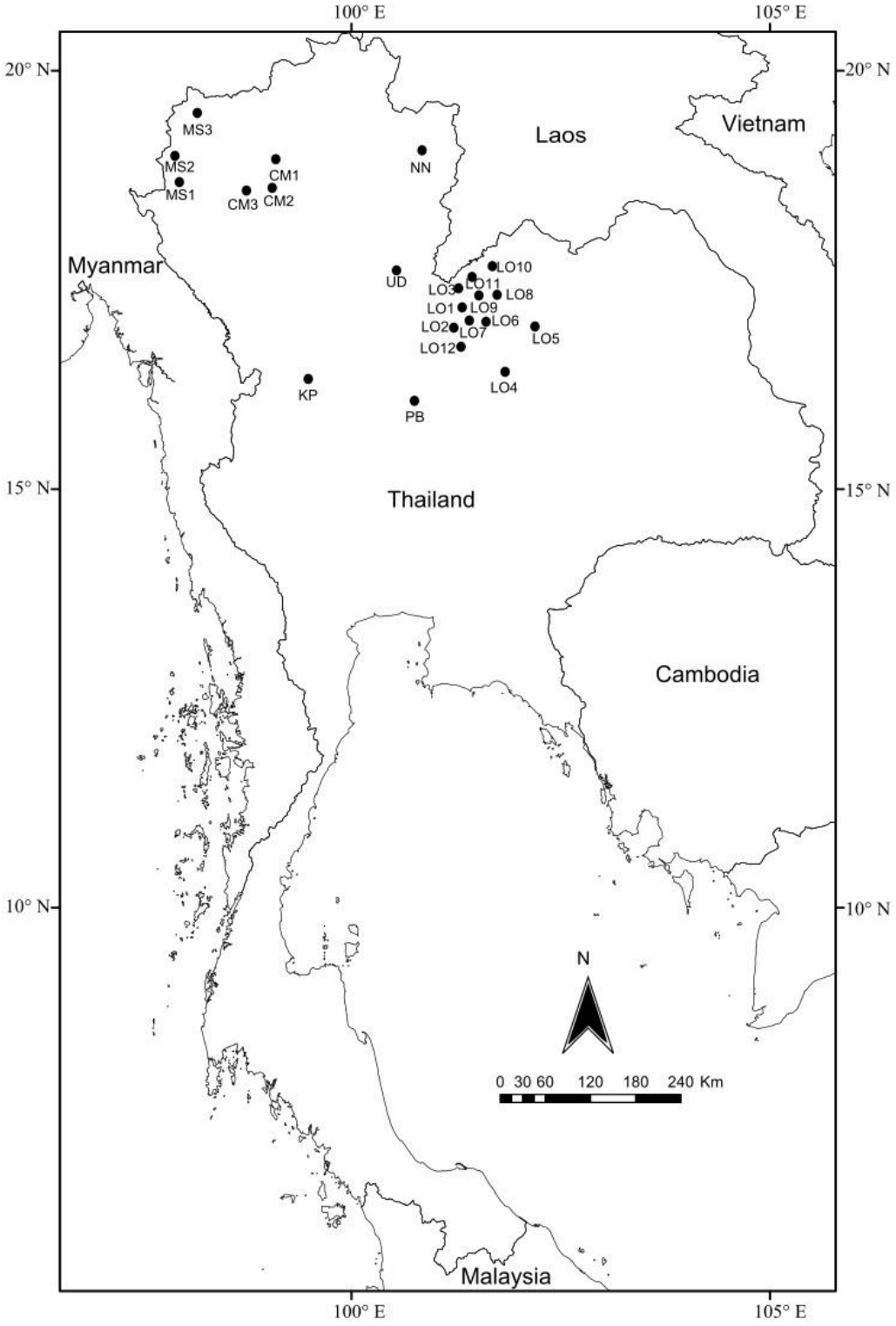
สปีชีส์แมลงริ้นดำ	**สปีชีส์** *Leucocytozoon*	**ประเทศ**	**อ้างอิง**
S. vernum	*Leucocytozoon* sp.	สาธารณรัฐเช็ก	Synek et al., 2016
S. securiforme	*Leucocytozoon* sp.	สาธารณรัฐเช็ก	Synek et al., 2013
S. uchidai	*Leucocytozoon lovati*	ญี่ปุ่น	Sato et al., 2009
S. japonicum	*Leucocytozoon lovati*	ญี่ปุ่น	Sato et al., 2009
Prosimulium hirtipes	*Leucocytozoon lovati*	ญี่ปุ่น	Sato et al., 2009
S. bicolotatum	*Leucocytozoon* sp.	โคลัมเบีย	Lotta et al., 2016
S. muiscorum	*Leucocytozoon* sp.	โคลัมเบีย	Lotta et al., 2016
Gigantodax misitu	*Leucocytozoon* sp.	โคลัมเบีย	Lotta et al., 2016
S. silvestre	*Leucocytozoon* sp.	สหรัฐอเมริกา	Murdock et al., 2015
S. exulatum	*Leucocytozoon* sp.	สหรัฐอเมริกา	Murdock et al.,2015
Greniera denaria	*Leucocytozoon* sp.	สหรัฐอเมริกา	Murdock et al., 2015
S. transiens	*Leucocytozoon* sp.	สวีเดน	Hellgren et al., 2008
Metacnephia lyra	*Leucocytozoon* sp.	สวีเดน	Hellgren et al., 2008
S. usovae	*Leucocytozoon* sp.	สวีเดน	Hellgren et al., 2008
S. annulus	*Leucocytozoon* sp.	สวีเดน	Hellgren et al., 2008
S. silvestre	*Leucocytozoon* sp.	สวีเดน	Hellgren et al., 2008

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดแมลงริ้นดำ

สำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงริ้นดำตัวเต็มวัยจากแหล่งอาศัยตามธรรมชาติในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย จำนวน 28 พื้นที่ ระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2560 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2561 (ตารางที่ 1 และภาพที่ 5 - 6) ตัวอย่างบางส่วนได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้แล้ว ในช่วงเวลาระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 (Pramual et al. 2016) เก็บตัวอย่างโดย 3 วิธี (1) เก็บตัวอย่างแมลงริ้นดำขณะตอมมนุษย์ (2) ใช้สวิงจับแมลงริ้นดำจากธรรมชาติ (3) เก็บตัวอย่างแมลงริ้นดำขณะที่เกาะอยู่กับพืช จำนวนตัวอย่าง และวิธีการเก็บตัวอย่างแสดงใน ตารางที่ 2 จากนั้นดองตัวอย่างใน 80% ethanol แล้วเก็บรักษาในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จำแนกชนิดของแมลงริ้นดำโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา รวมถึงคำอธิบายลักษณะของแมลงริ้นดำในประเทศไทย และในภูมิภาคเอเชีย (Takaoka and Suzuki,1984; Takaoka and Choochote,2004; Tangkawanit et al., 2009)

ภาพที่ 5 แหล่งอาศัยตามธรรมชาติของแมลงริ้นดำตัวเต็มวัยในประเทศไทย



ภาพที่ 6 สถานที่เก็บตัวอย่างแมลงริ้นดำตัวเต็มวัยในประเทศไทย

3.2 การศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุล

สกัดดีเอ็นเอจากตัวเต็มวัยโดยใช้ GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค nested PCR ของยีน mitochondrial cytochrome *b* (cyt *b*) ด้วยไพรเมอร์จำเพาะสำหรับ *Leucocytozoon* ตามวิธีการของ Hellgren et al. (2004) สำหรับการศึกษายีน cyt *b* มีความยาวประมาณ 478 bp ใช้ไพรเมอร์สองคู่ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยการดัดแปลงวิธีการของ Hellgren et al. (2004) ไพรเมอร์คู่แรก คือ HaemNFI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') และ HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ในปริมาตรรวม 15 µl มีองค์ประกอบได้แก่ 10× PCR buffer 1.5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (50 mM) 0.36 ไมโครลิตร, dNTP mixture (2.5 mM) 0.75 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (10 µM) อย่างละ 0.9 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase 0.066 ไมโครลิตร (TaKaRa, Ohtsu, Japan) เติมดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) 1.5 ไมโครลิตร และเติม ddH_2O ให้ครบปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใช้โปรแกรมอุณหภูมิดังต่อไปนี้ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วย 20 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 53 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที และขั้นตอนสุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

นำผลผลิต PCR ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรอบแรกด้วยไพรเมอร์คู่แรก (HaemNFI-HaemNR3) มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์คู่ที่สองคือ HaemFL (5'-ATGGTGTTTTA GATACTTACATT-3') และ HaemR2L (5'-CATTATCTGGATGAGATAAT GGIGC-3') (Hellgren et al., 2004) ด้วยเทคนิค PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบได้แก่ 10× PCR buffer 5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (50 mM) 1 ไมโครลิตร, dNTP mixture (2.5 mM) 3 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (10 µM) อย่างละ 2 µl, *Taq* DNA polymerase 0.25 ไมโครลิตร (TaKaRa, Ohtsu, Japan) เติมดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) 5 ไมโครลิตร และเติม ddH_2O ให้ครบปริมาตร 50 ไมโครลิตร .ใช้โปรแกรมอุณหภูมิเหมือนการทำปฏิกิริยา PCR รอบแรก แต่เพิ่มจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาจาก 20 รอบเป็น 36 รอบ ตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1% จากนั้นทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield Gel/PCR DNA Fragmets Extraction Kit (RBC BIOSCIENCE) นำ PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ HaemFL-HaemR2L ในการทำปฏิกิริยารอบสองของ PCR วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยหน่วย sequencing service ของบริษัท 1st BASE (Malaysia)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* ทั้งหมด 44 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากตัวอย่างแมลงริ้นดำ 404 ตัวอย่าง ที่ตรวจสอบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* ในการศึกษาครั้งนี้ส่งไปยังฐานข้อมูล NCBI GenBank ภายใต้เลข accession numbers: MK066336 - MK066379

วิเคราะห์ haplotype diversity (*h*) ของ *Leucocytozoon* ด้วยโปรแกรม Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้โมเดล Kimura's 2-parameter model (K2P) ด้วยโปรแกรม MEGA 6 (Tamura et al., 2013) วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* จากการศึกษาครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจสอบเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* ทั้ง 44 ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ที่พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงสูงสุดโดยวิธี NCBI BLAST และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* (accession no. KT290929 – KT290935) ซึ่งเป็น Leucocytozoon ที่มีรายงานการพบในประเทศไทย สร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้ 3 วิธีการ ได้แก่ (1) วิธี Neighbor-joining (NJ) โดยใช้ Kimura's 2-parameter model (K2P) ด้วยโปรแกรม MEGA 6 (Tamura et al. 2013) คำนวณค่าสนับสนุนของแขนสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ (2) วิธี Maximum likelihood (ML) วิเคราะห์สายวิวัฒนาการด้วย โปรแกรม RAxML (https://embnet.vital-it.ch/raxml-bb/) (Stamatakis et al., 2008) (3) วิธี Bayesian analysis (BA) ด้วยโปรแกรม MrBayes 3.04b (Huelsenbeck and Ronquist 2001) โดยใช้ 2,000,000 generations และ sampling tree ทุก ๆ 100 generations การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Haemoproteus* sp. (accession no. KT290922 – KT290924) เป็น outgroup

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

ตารางที่ 2 สปีชีส์ของแมลงริ้นดำ สถานที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนตัวอย่าง แมลงริ้นดำในประเทศไทยที่ใช้ในการศึกษา

แมลงริ้นดำ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Code	Latitude/ Longitude	Elevation (m)	วันที่	จำนวนตัวอย่าง
S. asakoae complex	บ้านสองคอน อ.ภูเรือ จ.เลย	LO1	17°21′38″N / 101°23′50″E	681	22/03/2560	2
	น้ำตกเลิศพบ อ.ภูเรือ จ.เลย	LO2	17°29′59″N / 101°20′10″E	1134	23/03/2560	3
	น้ำตกสองคอน อ.ภูเรือ จ.เลย	L03	17°21′13″N / 101°24′23″E	773	27/05/2560	25
	บ้านปางบง (1) อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	CM1	18°59′03″N / 99°20′07″E	990	22/01/2561	10
	บ้านปางบง (2) อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	CM2	18°59′03″N / 99°20′07″E	990	22/01/2561	70
	ทางเข้าบ้านปางบง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	CM3	18°59′20″N / 99°20′23″E	1,050	22/01/2561	8
	อ.สองแคว จ.ลำปาง	NN	19°21′11″N / 100°33′44″E	722	21/01/2561	3
	ไร่จันทร์แรมรีสอร์ท อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์	PB	16°39′44″N / 101°01′26″E	920	24/03/2561	1
	น้ำตกสวนห้อม อ.หนองหิน จ.เลย	LO4	17°02′49″N / 101°45′42″E	671	31/03/2561	4
รวมตัวอย่างทั้งหมดของสปีชีส์ *S. asakoae* complex						**126**

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แมลงริ้นดำ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Code	Latitude/ Longitude	Elevation (m)	วันที่	จำนวนตัวอย่าง
S. chamlongi	บ้านปางบง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	CM2	18°59′03″N / 99°20′07″E	990	22/01/2561	17
	ทางเข้าบ้านปางบง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	CM3	18°59′03″N / 99°20′07″E	990	22/01/2561	2
	รวมตัวอย่างทั้งหมดของสปีชีส์ *S. chamlongi*					**19**
S. chumpornense	บ้านกบก อ.วังสะพุง จ.เลย	LO5	17°23'34" N / 101°34′17″ E	247	29/10/2559	5
					22/03/2560	12
					27/03/2560	1
					01/04/2560	10
	บ้านห้วยลาด อ.ภูเรือ จ.เลย	LO6	17°27'01" N / 101°25'48" E	747	22/03/2560	6

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แมลงริ้นดำ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Code	Latitude/ Longitude	Elevation (m)	วันที่	จำนวนตัวอย่าง
	น้ำตกปลาบ่า อ.ภูเรือ จ.เลย	LO7	17°23'18" N / 101°22'10" E	649	22/03/2560	2
	บ้านสองคอน อ.ภูเรือ จ.เลย	LO8	17°21'38" N / 101°23′50" E	681	22/03/2560	9
	ภูเรือ (1) อ. ภูเรือ จ.เลย	LO9	17°30'10"N / 101°20′59″E	1,214	23/03/2560	15
	ภูเรือ (2) อ. ภูเรือ จ.เลย	L010	17°30'03" N / 101°20′16″E	1,151	23/03/2560	3
	น้ำตกสวนห้อม อ.หนองหิน จ.เลย	LO4	17°02′49″N / 101°45′42″E	671	14/10/2560	2
					21/03/2561	2
	น้ำตกสองคอน อ.ภูเรือ จ.เลย	LO3	17°21′13″ N / 101°24′23″E	773	24/03/2561	1
					31/03/2561	15
					01/04/2561	4
	บ้านแม่สุยะ อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน	MS1	19°31′17″N / 98°05′32″E	379	14/10/2560	
	ไร่จันทร์แรมรีสอร์ท อ.เขาค้อ จ.เพชบูรณ์	PB	16°39'44"N / 101°01′26″E	920	24/03/2561	2

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แมลงริ้นดำ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Code	Latitude/ Longitude	Elevation (m)	วันที่	จำนวนตัวอย่าง
	อ. ภูเรือ จ.เลย	LO11	17°26′53″N / 101°24′23″E	624	01/04/2561	12
	สถานีทดลองเกษตรที่สูงภูเรือ อ. ภูเรือ จ.เลย	LO12	17°27'24"N / 101°20′11″ E	920	01/04/2561	2
	รวมตัวอย่างทั้งหมดของสปีชีส์ *S. chumpornense*					**105**
***S. doipuiense* complex**	ภูสอยดาว อ. น้ำปาด จ. อุตรดิตถ์	UD	17°44′12″N / 100°59′18″E	1,589	27/10/2558	31*
	รวมตัวอย่างทั้งหมดของสปีชีส์ *S. doipuiense* complex					31
S. nigrogilvum	ช่องเย็น จ. กำแพงเพชร	KP	16°05′53″N / 99°06′24″E	1,276	20/2/2557	4*
	ภูสอยดาว อ. น้ำปาด จ. อุตรดิตถ์	UD	17°44′12″N / 100°59′18″E	1,589	27/10/2558	26*
	บ้านปางบง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	CM1	18°59′03″N / 99°20′07″E	990	22/1/2561	30
	รวมตัวอย่างทั้งหมดของสปีชีส์ *S. nigrogilvum*					60

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แมลงริ้นดำ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Code	Latitude/ Longitude	Elevation (m)	วันที่	จำนวนตัวอย่าง
S. nodosum	บ้านแม่สุยะ อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน	MS1	19°31′17″N / 98°05′32″E	379	17/1/2558	13*
	บ้านปางแปก อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน	MS2	19°26′12″N / 98°29′17″E	849	17/1/2558	17*
	ต.แม่นาเติง อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน	MS3	19°25′13″N / 98°24′13″E	548	17/1/2558	33*
	รวมตัวอย่างทั้งหมดของสปีชีส์ *S. nodosum*					**63**
	รวมทั้งหมด					**404**

* ตัวอย่างดีเอ็นเอจาก Pramual et al. (2016)

บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 ความชุกของ *Lecocytozoon* ในแมลงริ้นดำ

ตัวอย่างแมลงริ้นดำตัวเต็มวัยที่ศึกษาครั้งนี้ จำนวนทั้งหมด 404 ตัวอย่าง จำแนกชนิดของแมลงริ้นดำได้ จำนวน 6 สปีชีส์ ใน 2 สกุลย่อย คือ *Gomphostilbia* และ *Simulium* ประกอบด้วย *Simulium asakoae* complex (สกุลย่อย *Gomphostilbia*) จำนวน 126 ตัวอย่าง (31.2%) *S. chamlongi* (สกุลย่อย *Simulium*) จำนวน 19 ตัวอย่าง (4.7%) *S. chumpornense* (สกุลย่อย *Gomphostilbia*) จำนวน 105 ตัวอย่าง (26%) *S. doipuiense* complex (สกุลย่อย *Simulium*) จำนวน 31 ตัวอย่าง (7.7%) *S. nigrogilvum* (สกุลย่อย *Simulium*) จำนวน 60 ตัวอย่าง (14.8%) และ *S. nodosum* (สกุลย่อย *Simulium*) จำนวน 63 ตัวอย่าง (15.6%) (ตารางที่ 3)

จากการตรวจสอบหา *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำจำนวน 404 ตัวอย่าง โดยใช้ยีน mitochondrial cytochrome *b* (cyt *b*) ตรวจพบ *Leucocytozoon* จำนวน 44 ตัวอย่าง (10.89%) (ตารางที่ 3) ในแมลงริ้นดำสปีชีส์ *S. asakoae* complex จำนวน 37 ตัวอย่าง และตรวจพบในสปีชีส์ *S. chumpornense* จำนวน 7 ตัวอย่าง ซึ่งแมลงริ้นดำทั้ง 2 สปีชีส์นี้จัดอยู่ในสกุลย่อย *Gomphostilbia* แมลงริ้นดำสปีชีส์ *S. asakoae* complex ที่เป็นพาหะนำเชื้อ *Leucocytozoon* เกือบทั้งหมด (35 จาก 37 ตัวอย่าง) เก็บตัวอย่างแมลงริ้นดำจากบ้านปางบง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ และ *S. asakoae* complex อีกจำนวน 2 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างในขณะแมลงริ้นดำกำลังบินตอมมนุษย์ ในจังหวัดเลย และตัวอย่างแมลงริ้นดำสปีชีส์ *S. chumpornense* จำนวน 7 ตัวอย่าง แยกเป็น 5 ตัวอย่าง เก็บในขณะที่กำลังบินตอมมนุษย์ และอีก 2 ตัวอย่าง เก็บขณะแมลงริ้นดำเกาะบนต้นไม้ ไม่พบ *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำสกุลย่อย *Simulium*

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างแมลงริ้นดำที่ศึกษาและร้อยละการพบของ *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำ

แมลงริ้นดำ	สถานที่เก็บตัวอย่าง (Code)	จำนวนตัวอย่าง	No. of PCR positive	Positive rate (%)
S. asakoae complex	บ้านสองคอน อ.ภูเรือ จ.เลย (LO1)		1	
	น้ำตกสองคอน อ.ภูเรือ จ.เลย (L03)		1	
	บ้านปางบง (2) อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (CM2)		35	
	รวมตัวอย่างทั้งหมดของสปีชีส์ *S. asakoae* complex	126	37	29.36
S. chamlongi		19	0	
S. chumpornense	บ้านกกบก อ.วังสะพุง จ.เลย (LO5)		3	
	น้ำตกปลาบ่า อ.ภูเรือ จ.เลย (LO7)		2	
	ภูเรือ (1) อ. ภูเรือ จ.เลย (LO9)		2	
	รวมตัวอย่างทั้งหมดของสปีชีส์ *S. chumpornense*	105	7	6.67
S. doipuiense complex		31	0	
S. nigrogilvum		60	0	
S. nodosum		63	0	
	รวม	404	44	10.89

4.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Leucocytozoon*

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน cyt *b* ของ *Leucocytozoon* จำนวน 44 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่พบในแมลงริ้นดำ 2 สปีชีส์ จำแนกได้ 16 haplotypes (ตารางที่ 4) ประกอบด้วย 11 haplotypes (จากทั้งหมด 37 ลำดับนิวคลีโอไทด์) ในแมลงริ้นดำ *S. asakoae* complex และ 5 haplotypes (จากทั้งหมด 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์) ในแมลงริ้นดำ *S. chumpornense* อย่างไรก็ตามไม่พบการมี haplotypes ร่วมกันของ *Leucocytozoon* ระหว่างตัวอย่างแมลงริ้นดำ 2 สปีชีส์

การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) (ภาพที่ 7) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cyt *b* จำนวน 44 ลำดับนิวคลีโอไทด์ แยกจากแมลงริ้นดำที่เป็นพาหะวิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* ที่มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุด (10 ตัวอย่าง) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *L. sabrazesi* กับ *L. caulleryi* ที่พบในไก่พื้นเมืองในประเทศไทย (7 ตัวอย่าง) พบว่าแบ่งออกเป็น 2 clades (clade I, II) Clade I แบ่งเป็น 4 subclades (I-1–4) โดย subclade I-1 ประกอบด้วย 11 haplotypes ของ *Leucocytozoon* ได้แก่ LEUCOTH 2, LEUCOTH 3, LEUCOTH 4, LEUCOTH 6, LEUCOTH 7, LEUCOTH 8, LEUCOTH 9, LEUCOTH 10, LEUCOTH 11, LEUCOTH 12 และ LEUCOTH 15 ซึ่งตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* ส่วนใหญ่ใน subclade I-1 พบในแมลงริ้นดำ *S. asakoae* complex (33 ตัวอย่าง) และ *S. chumpornense* (5 ตัวอย่าง) จากผลของ NCBI BLAST พบว่าลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน cyt *b* ที่อยู่ใน subclade I-1 มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสูง (99%) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* sp. ที่พบได้ในไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*) ในประเทศมาเลเซีย และไก่พื้นเมือง (*Gallus gallus*) ในประเทศไทย ยกเว้นลำดับนิวคลีโอไทด์ LEUCOTH 7 มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมต่ำ (96%) (ตารางที่ 4)

ใน subclade I-2 ประกอบด้วย 4 haplotypes ของ *Leucocytozoon* คือ LEUCOTH 1, LEUCOTH 5, LEUCOTH 14 และ LEUCOTH 16 พบในแมลงริ้นดำ *S. asakoae* complex (3 ตัวอย่าง) และ *S. chumpornense* (2 ตัวอย่าง) จากผลของ NCBI BLAST ของ subclade I-2 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *L. schoutendeni* ที่พบได้ในไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*) ในประเทศมาเลเซีย และไก่พื้นเมือง (*Gallus Gallus*) สาธารณรัฐยูกันดา ในภูมิภาคแอฟริกาตะวันออก โดยมีช่วงความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 98- 100% (ตารางที่ 4)

subclade I-3 ประกอบด้วย 1 haplotype ของ *Leucocytozoon* คือ LEUCOTH 13 พบในแมลงริ้นดำ *S. asakoae* complex (1 ตัวอย่าง) ผลของ NCBI BLAST ของ subclade I-3 พบว่าคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* sp. ที่พบในนกแว่นตาขาว (*Zosterops senegalensis*) จากเกาะบีโอโก ประเทศอิเควทอเรียลกินี ในภูมิภาคแอฟริกาตะวันออก แม้ว่าจะมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมต่ำ (93%) ใน subclade I-4 ประกอบด้วย 2 ลำดับนิวลีโอไทด์ของ *L. sabrazesi* Clade II ประกอบด้วย 5 ลำดับดับนิวคลีโอไทด์ของ *L. caullery*

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 4 ผลของ NCBI BLAST ของ *Leucocytozoon* และ host ที่มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุดกับ *Leucocytozoon* ที่พบในแมลงริ้นดำจากประเทศไทย

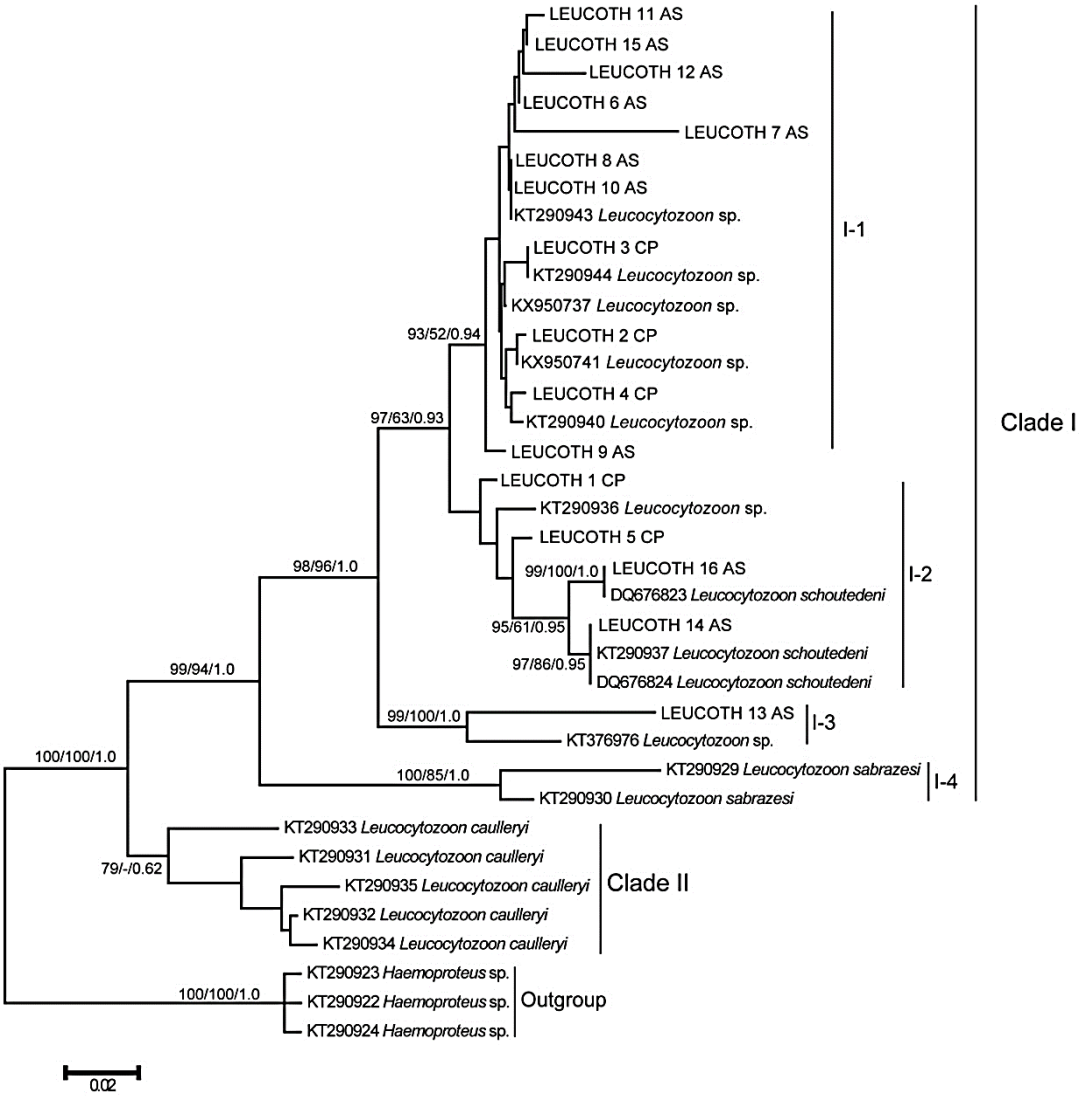
Haplotype (*n*)	**Black fly species**	**Sequence NCBI GenBank (% ความคล้ายคลึง)**	**Host / ประเทศ**	**NCBI GenBank Accession**
LEUCOTH1 (1)	*S. chumpornense*	*Leucocytozoon schoutedeni* (98%)	ไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*)/มาเลเซีย	KT290936
		Leucocytozoon sp. (98%)	ไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*)/มาเลเซีย	KT290944
LEUCOTH2 (1)	*S. chumpornense*	*Leucocytozoon* sp. (99%)	ไก่ป่า (*Gallus gallus*)/ไทย	KX950741
LEUCOTH3 (3)	*S. chumpornense*	*Leucocytozoon* sp. (100%)	ไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*)/มาเลเซีย	KT290944
LEUCOTH4 (1)	*S. chumpornense*	*Leucocytozoon* sp. (99%)	ไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*)/มาเลเซีย	KT290940
LEUCOTH5 (1)	*S. chumpornense*	*Leucocytozoon schoutedeni* (98%)	ไก่ป่า (*Gallus gallus*)/ยูกันดา	DQ676824
LEUCOTH6 (22)	*S. asakoae* complex	*Leucocytozoon* sp. (99%)	ไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*)/มาเลเซีย	KT290943
		Leucocytozoon sp. (99%)	ไก่ป่า (*Gallus gallus*)/ไทย	KX950737

n คือ จำนวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ *Leucocytozoon* ของแต่ละ haplotype

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Haplotype (*n*)	Black fly species	Sequence NCBI GenBank (% ความคล้ายคลึง)	Host / ประเทศ	NCBI GenBank Accession
LEUCOTH8 (3)	*S. asakoae* complex	*Leucocytozoon* sp. (100%)	ไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*)/มาเลเซีย	KT290943
		Leucocytozoon sp. (99%)	ไก่ป่า (*Gallus gallus*)/ไทย	KX950737
LEUCOTH9 (1)	*S. asakoae* complex	*Leucocytozoon* sp. (99%)	ไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*)/มาเลเซีย	KT290943
		Leucocytozoon sp. (99%)	ไก่ป่า (*Gallus gallus*)/ไทย	KX950737
LEUCOTH10 (3)	*S. asakoae* complex	*Leucocytozoon* sp. (100%)	ไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*)/มาเลเซีย	KT290943
LEUCOTH15 (1)	*S. asakoae* complex	*Leucocytozoon* sp. (99%)	ไก่ป่า (*Gallus gallus*)/ไทย	KX950737
		Leucocytozoon sp. (99%)	ไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*)/มาเลเซีย	KT290943
LEUCOTH16 (1)	*S. asakoae* complex	*Leucocytozoon schoutedeni* (100%)	ไก่ป่า (*Gallus gallus*)/ยูกันดา	DQ676823

n คือ จำนวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ *Leucocytozoon* ของแต่ละ haplotype



ภาพที่ 7 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสร้างด้วยวิธี neighbor – joining (NJ) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ *Leucocytozoon* ของยีน cyt *b* ที่พบในแมลงริ้นดำในประเทศไทย (กำหนดเป็น LEUCOTH) วิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทโทด์ของ *Leucocytozoon* ที่มีความคล้ายคลึงมากที่สุดจาก NCBI BLAST และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* 2 สปีชีส์ (*Leucocytozoon caulleryi* และ *L. sabrazesi*) ค่า bootstrap ของ neighbor-joining (NJ) maximum likelihood (ML) และ bayesian analysis (BA) แสดงบนแขนของสายวิวัฒนาการตามลำดับ (AS คือ *Simulium asaokae* complex, CP คือ *S. chumpornense*)

บทที่ 5
อภิปรายผล

5.1 ความชุกของ *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำในประเทศไทย

Leucocytozoon มีความถี่การตรวจพบสูงมากในไก่พื้นเมืองในประเทศไทย และภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Morii et al., 1981; Paperna et al., 2005) อย่างไรก็ตามมีเพียงข้อสันนิษฐานตามรายงานการศึกษาในภูมิภาคอื่น ๆ ว่าแมลงริ้นดำ และริ้นดูดเลือดอาจเป็นพาหะของ *Leucocytozoon* ซึ่งผลการศึกษานี้พบว่าแมลงริ้นดำในสกุลย่อย *Gomphostilbia* ที่พบในประเทศไทย อย่างน้อย 2 สปีชีส์ คือ *S. asakoae* complex และ *S. chumpornense* เป็นพาหะของเชื้อ *Leucocytozoon* ผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่พบว่าแมลงริ้นดำอาจเป็นพาหะของ *Leucocytozoon* อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีแมลงริ้นดำบางสปีชีส์ที่มีความคล้ายคลึงกันมากกับแมลงริ้นดำ *S. asakoae* complex ในระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย เช่น *S. udomi*, *S. myanmarense* และ *S. monglaense* (Saeung et al., 2017 ; Takaoka et al., 2017) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างบางส่วนที่จำแนกด้วยสัณฐานวิทยาเป็น S. asakoae complex อาจเป็นสปีชีส์เหล่านี้ที่มีความคล้ายคลึงของลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนั้นในอนาคตควรมีการตรวจสอบระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อตรวจสอบสปีชีส์เหล่านี้

ผลการศึกษาที่พบว่ามีเพียงแมลงริ้นดำสกุลย่อย *Gomphostilbia* ซึ่งเป็นแมลงริ้นดำสกุลที่ดูดเลือดจากสัตว์ปีก (ornithophilic black fly) เป็นพาหะของ *Leucocytozoon* สอดคล้องกับการศึกษาในภูมิภาคอื่น ๆ ที่พบว่าแมลงริ้นดำมีการปรับตัวโดยมี basal tooth บริเวณ claw ซึ่งเชื่อว่าเป็นลักษณะสัณฐานที่ช่วยในการแหวกขนของสัตว์ปีกเพื่อเข้าดูดเลือด (Adler et al., 2004) อย่างไรก็ตามแมลงริ้นดำสปีชีส์ *S. asakoae* complex ไม่ใช่แมลงริ้นดำที่ดูดเลือดจากสัตว์ปีกเพียงอย่างเดียว แต่พบว่า *S. asakoae* complex ยังดูดเลือดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม รวมถึงมนุษย์ (Choochote et al., 2005) แม้ว่าการศึกษาครั้งนี้ยังไม่พบหลักฐานโดยตรงที่แสดงให้เห็นว่าแมลงริ้นดำทั้งสองสปีชีส์ที่ตรวจพบ *Leucocytozoon* ดูดเลือดไก่พื้นเมืองในประเทศไทย แต่มีรายงานในภูมิภาคอื่นๆ ของโลกจำนวนมากที่พบว่าแมลงริ้นดำดูดเลือดสัตว์ปีก (El Bashir et al., 1976; Adler et al., 2004) นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน cyt *b* ของ *Leucocytozoon* ที่พบในแมลงริ้นดำจำนวนมากกว่า 30 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความคล้ายคลึงสูงมาก (มากกว่า 99%) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* ที่พบในไก่พื้นเมืองในประเทศไทย บ่งชี้ว่ามี

ความเป็นไปได้สูงมากที่แมลงริ้นดำทั้ง 2 สปีชีส์นี้จะเป็นพาหะของ Leucocytozoon ที่พบในไก่พื้นเมืองในประเทศไทย

จากตัวอย่างแมลงริ้นดำทั้งหมด 44 ตัวอย่างที่พบ *Leucocytozoon* มีจำนวน 35 ตัวอย่าง ที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งเดียวในอำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ โดยพื้นที่เก็บตัวอย่างเก็บจากแหล่งชุมชน ผลการศึกษาที่พบว่ามีอัตราการพบ *Leucocytozoon* ในพื้นที่ชุมชนสูงกว่าในพื้นที่ป่า สนับสนุนแนวคิดว่า *Leucocytozoon* ที่ตรวจพบในแมลงริ้นดำในประเทศไทยเป็นชนิดเดียวกันกับที่พบในไก่พื้นเมือง เนื่องจากในหมู่บ้านในพื้นที่ชนบทของประเทศไทยนิยมเลี้ยงไก่บ้าน (*Gallus gallus domesticus*) มีการประเมินว่าในประเทศไทยมีไก่พื้นเมืองประมาณ 100 - 120 ล้านตัว ที่ผลิตได้ทุกปี (Choprakarn and Wongpichet, 2008) ดังนั้นไก่พื้นเมืองเหล่านี้สามารถเป็นโฮสต์สำหรับ *Leucocytozoon* เนื่องจากหมู่บ้านที่เก็บตัวอย่างแมลงริ้นดำตั้งอยู่ในพื้นที่ภูเขาที่มีแหล่งน้ำไหลซึ่งเป็นแหล่งอาศัยที่เหมาะสมของตัวอ่อนแมลงริ้นดำ จึงมีตัวอ่อนแมลงริ้นดำ และแมลงริ้นดำตัวเต็มวัยจำนวนมาก ดังนั้นในพื้นที่นี้มีทั้งพาหะ (แมลงริ้นดำ) ปรสิต (*Leucocytozoon*) และโฮสต์ (ไก่พื้นเมือง) ซึ่งสามารถอธิบายความถี่ของการตรวจพบ *Leucocytozoon* ที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่อื่น ๆ

5.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำในประเทศไทย

ผลการศึกษาครั้งนี้จำแนก haplotyps จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cyt *b* ของ *Leucocytozoon* ได้ทั้งหมด 16 haplotypes จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 44 ตัวอย่าง ที่พบในแมลงริ้นดำ
2 สปีชีส์ ในจำนวนนี้ 11 haplotypes พบในแมลงริ้นดำ *S. asakoae* complex (37 ตัวอย่าง) และ 5 haplotypes พบใน *S. chumpornense* (7 ตัวอย่าง) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า haplotypes ของ *Leucocytozoon* ที่พบในแมลงริ้นดำทั้ง 2 สปีชีส์ ไม่แบ่งแยกทางพันธุกรรม และรวมกลุ่มอยู่ภายใน clade เดียวกันและมีค่าระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ (0.9 -11.5 %) สอดคล้องกับการศึกษาในภูมิภาคอื่นๆ เช่น ในเขตอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ พบว่า *Leucocytozoon* ไม่มีความจำเพาะกับสปีชีส์ของแมลงริ้นดำ (Murdock et al., 2015; Lotta et al., 2016)

ในประเทศไทยมีรายงานการพบ *Leucocytozoon* 2 สปีชีส์ โดยจัดจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ประกอบด้วย *L. sabrazesi* และ *L. caulleryi* (Morii et al., 1981; Takang et

al., 2017) มีรายงานการติดเชื้อ *Leucocytozoon* ทั้ง 2 สปีชีส์นี้ในไก่พื้นเมืองในจังหวัดเชียงใหม่ อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cyt *b* ของ *Leucocytozoon* ทั้ง 2 สปีชีส์ในประเทศไทย ดังนั้นเพื่อเปรียบเทียบว่า *Leucocytozoon* ที่พบในแมลงริ้นดำจากการศึกษาครั้งนี้เป็นสปีชีส์เดียวกันกับ *L. sabrazesi* และ *L. caulleryi* ที่มีรายงานในไก่พื้นเมืองในประเทศไทยหรือไม่ จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *L. sabrazesi* และ *L. caulleryi* ที่มีรายงานในไก่พื้นเมืองในประเทศมาเลเซียมาวิเคราะห์เปรียบเทียบ ผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ cyt *b* ของ *L. sabrazesi* และ *L. caulleryi* แตกต่างจาก *Leucocytozoon* ที่พบในแมลงริ้นดำในประเทศไทยในการศึกษานี้ในครั้งนี้มาก และแยกออกจากกันจากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอย่างชัดเจน โดยระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* ในการศึกษาในครั้งนี้ กับ *L. sabrazesi* และ *L. caulleryi* มีค่าระหว่าง 13.28 ถึง 23.23% ในขณะที่ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ของ *Leucocytozoon* ที่มีรายงานสำหรับยีน cyt *b* มีค่าระหว่าง 0.89 -7.90% (Outlaw and Ricklefs, 2014) ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สูงมาก รวมทั้งผลจากการวิเคราะห์ทางสายวิวัฒนาการบ่งชี้ว่า *Leucocytozoon* ที่ตรวจพบในแมลงริ้นดำจากประเทศไทยไม่น่าจะเป็นสปีชีส์ *L. sabrazesi* และ *L. caulleryi*

ผล NCBI BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cyt *b* ของ *Leucocytozoon* ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามี 2 haplotypes เหมือนกับ *L. schoutedeni* (ความคล้ายคลึง 100%) ซึ่งพบในไก่พื้นเมือง (*Gallus gallus*) จากประเทศยูกันดา (Sehgal et al., 2006) และอีก 2 haplotypes มีความคล้ายคลึงกันอย่างมาก (ความเหมือน 98%) กับ *L. schoutedeni* ที่พบในไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*) ในประเทศมาเลเซีย และในไก่พื้นเมือง (*Gallus gallus*) จากประเทศยูกันดา

จากการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) พบว่าตัวอย่างเหล่านี้จัดอยู่ใน subclade I-2 ของ clade I ด้วยกันทั้งหมด ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ *Leucocytozoon* กลุ่มนี้ที่พบในแมลงริ้นดำ *S. asakoae* complex และ *S. chumpornense* ในประเทศไทยอาจเป็น *L. schoutedeni* อย่างไรก็ตามยังขาดหลักฐานเพิ่มเติม เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Leucocytozoon* เป็นต้น เพื่อตรวจสอบสมมติฐานนี้

จากลำดับนิวคลีโอไทด์เกือบทั้งหมด (ยกเว้นหนึ่งลับดับนิวคลีโอไทด์) มีความคล้ายคลึงกันมาก (ความคล้ายคลึง 99%) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leucocytozoon* ที่พบในไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*) จากประเทศมาเลเซีย และไก่พื้นเมือง (*Gallus gallus*) ในประเทศไทย ส่วนอีกหนึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล NCBI BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียง (ความคล้ายคลึง 93%) กับ *Leucocytozoon* ที่พบในนกนกแว่นตาขาว (*Zosterops senegalensis*) จากเกาะบีโอโก ประเทศอิเควทอเรียลกินี (Loiseau et al., 2017)

5.3 สรุปผลการศึกษา

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าแมลงริ้นดำในประเทศไทย อย่างน้อย 2 สปีชีส์ ได้แก่ *S. asakoae* complex และ *S. chumpornense* ในสกุลย่อย *Gomphostilbia* อาจเป็นพาหะของ *Leucocytozoon* ในประเทศไทย แม้ว่าจะไม่มีหลักฐานโดยตรงว่า *Leucocytozoon* ที่พบในแมลงริ้นดำเป็นสปีชีส์เดียวกับที่พบในไก่ รวมถึงหลักฐานโดยตรงที่แสดงว่าแมลงริ้นดำทั้ง 2 สปีชีส์ดังกล่าวดูดเลือดไก่ แต่ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cyt *b* ของ *Leucocytozoon* ที่พบในแมลงริ้นดำ และในไก่พื้นเมืองในประเทศไทย รวมถึงการพบ *Leucocytozoon* ในแมลงริ้นดำที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่ชุมชนที่มีการเลี้ยงไก่พื้นเมือง บ่งชี้ว่าแมลงริ้นดำอาจเป็นพาหะนำเชื้อ *Leucocytozoon* ที่พบการแพร่ระบาดในไก่พื้นเมืองในประเทศไทย

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ไพโรจน์ ประมวล (2557). *แมลงริ้นดำในประเทศไทย: ความหลากหลายทางชีวภาพและวิวัฒนาการ.*ตักสิลาการพิมพ์, มหาสารคาม, 305 หน้า

สมใจ ศรีหาคิม, เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และปรีชา คล้ายนิล (2518). การศึกษาพยาธิวิทยาของโรคลิวโคไซโตซูโนซิสในไก่. *เวชชสารสัตวแพทย์, 5*(30), 746-760.

Adler, P. H., Cheke, R. A., & Post, R. J. (2010). Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). *Infection, Genetics and Evolution*, *10*(7), 846-865.

Adler, P. H., Currie, D. C., & Wood, D. M. (2004). *The black flies (simuliidae) of North America*. Cornell University Press.

Adler, P.H., Crosskey, R. (2019). *World blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensiverevision of the taxonomic and geographical inventory [2019]*. Retrieved from https://biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.4455.1.2

Atkinson, C.T. (1999). *Hemosporidiosis: Field Manual of Wildlife Diseases*. Biological Resources Division Information and Technology Report, 193-200.

Choprakarn, K., Wongpichet, K. (2008) Village chicken production systems in Thailand, in: Thieme, O. and Pilling, D. (Eds.), Poultry in the 21st Century: avian influenza and beyond, Proceedings of the International Poultry Conference, held 5–7 November 2007, Bangkok, Thailand, pp. 569-582.

Crosskey, R.W. (1990). *The Natural History of Blackflies*. John Wiley & Sons, London.

Davies, J. B., Crosskey, R. W., & World Health Organization. (1991). *Simulium-vectors of onchocerciasis* (No. WHO/VBC/91.992. Unpublished). Geneva: World Health Organization.

El Bashir, S., El Jack, M. H., El Hadi, H. M. (1976). The diurnal activity of the chicken-biting black fly, *Simulium griseicolle* Becker (Diptera, Simuliidae) in northern Sudan. *Bulletin of Entomological Research*, *66*(3), 48–487.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, *10*(3), 564-567.

Fallis, A. M., & Desser, S. S. (1977). On Species of *Leucocytozoon, Haemoprateus,* and *Hepatocystis.* In: Julius P.K, (Eds.), *Parasitic protozoa. Volume III. Gregarines Haemogregarines, Coccidia, Plasmodia, and Haemoproteids*. New York, Academic Press. pp. 239-264.

Forrester, D. J., Greiner, E. C. 2008. Leucocytozoonosis, in: Atkinson, C. T., Thomas, N. J. Hunter, D. B. (Eds.), Parasitic diseases of wild birds, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, p. 54–107.

Freund, D., Wheeler, S. S., Townsend, A. K., Boyce, W. M., Ernest, H. B., Cicero, C., & Sehgal, R.N. (2016). Genetic sequence data reveals widespread sharing of *Leucocytozoon* lineages in corvids. *Parasitology Research*, *115*(9), 3557-3565.

Galen, S. C., Nunes, R., Sweet, P. R., & Perkins, S. L. (2018). Integrating coalescent species delimitation with analysis of host specificity reveals extensive cryptic diversity despite minimal mitochondrial divergence in the malaria parasite genus *Leucocytozoon*. *BMC Evolutionary Biology*, *18*(1), 128.

Hellgren, O., Bensch, S., & Malmqvist, B. (2008). Bird hosts, blood parasites and their vectors—associations uncovered by molecular analyses of blackfly blood meals. *Molecular Ecology*, *17*(6), 1605-1613.

Hellgren, O., Waldenström, J., & Bensch, S. (2004). A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology*, *90*(4), 797-802.

Huelsenbeck, J.P., & Ronquist, F.R. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics .17*, 754–755.

Jaijan, A., Posuya, W., & Saenbuaphan, N. (2012). Prevalence and risk factors of blood parasites in indigenous Thai chickens in Nan Province during November 2011 to August 2012. Nan Provincial Livestock Office. (in Thai)

Kaufmann, J., & Kennedy, T. J. (1996). Parasitic Infections of Domestic Animals: A Diagnostic Manual. *Parasitology Today*, *12*(12), 496.

Kettle, D.S. (1990). *Medical and Veterinary Entomology*. KU: CAP International UK.

Krimahakim, S., Ratanasethakul, C., & Klaynil, P. (1975). Pathological Study of Leucocytozoonosis in Chickens. *The Thai Journal of Veterinary Medicine. 5*, 746-760. (in Thai)

Loiseau, C., Melo, M., Lobato, E., Beadell, J. S., Fleischer, R. C., Reis, S., Doutrelant, C. & Covas, R. (2017). Insularity effects on the assemblage of the blood parasite community of the birds from the Gulf of Guinea. *Journal of Biogeography*. 44(*11*), 2607–2617.

Lotta, I. A., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., González, A. D., Mantilla, J. S., Moncada, L. I.,Adler, P.H., & Matta, N. E. (2016). *Leucocytozoon* diversity and possible vectors in the Neotropical highlands of Colombia. *Protist*, *167*(2), 185–204.

Mead, D. G., Maré, C. J., & Ramberg, F. B. (1999). Bite transmission of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) to laboratory mice by *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*, *36*(4), 410-413.

Morii, T., Shiihara, T., Lee, Y. C., Manuel, M. F., Nakamura, K., Iijima, T., & Hoji, K. (1981). Seroimmunological and parasitological surveys of *Leucocytozoon caulleryi* infection in chickens in several Asian countries. *Journal for Parasitology*. 11(*3*), 187–190.

Murdock, C. C., Adler, P. H., Frank, J., & Perkins, S. L. (2015). Molecular analyses on host-seeking black flies (Diptera: Simuliidae) reveal a diverse assemblage of *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemospororida) parasites in an alpine ecosystem. *Parasites & Vectors*, *8*(1), 343.

Nakamura, K., Prasitiratana, P., & Chompoochan, T. (1990). Prevalence and distribution of chicken *Leucocytozoon* in Thailand. In *Proceedings of 7th Congress of the Federation of Asian Veterinary Associations (FAVA), Chonburi (Thailand),* 4-7 Nov 1990, (pp.1-8)

Outlaw, D. C., & Ricklefs, R. E. (2014). Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): how to move forward in the molecular era. *Parasitology,* 141(*10*), 1223–1232.

Paperna, I., Soh, M. C. K., Yap, C. A. M., Sodhi, N. S., Lim, S. L. H., Prawiradilaga, D. M.,& Nagata, H. (2005). Blood parasite prevalence and abundance in the bird communities of several forested locations in Southeast Asia. *Ornithological Science.* 4(*2*), 129–138.

Pramual, P., Thaijarern, J., & Wongpakam, K. (2016). DNA barcoding of human-biting black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Acta Tropica*, *164*, 33-40.

Prasittirat, M., Intarachote, U., Vongpakorn, M., Chompoochan, T., Moekaew, K., & Sookruen, A. (1997). Treatment of Leucocytozoonosis in Native Chickens by Sulfadimethoxine and Mosquito Nets. In *Proceedings of the 39th Kasetsart University veterinary field*, 394-402. (in Thai)

Richards, F., Hopkins, D., & Cupp, E. (2000). Programmatic goals and approaches to onchocerciasis. *The Lancet*, *355*(9216), 1663-1664.

Rivera, J., & Currie, D. C. (2009). Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology Resources*, *9*, 224-236.

Sato, Y., Tamada, A., Mochizuki, Y., Nakamura, S., Okano, E., Yoshida, C., & Murata, K. (2009). Molecular detection of *Leucocytozoon lovati* from probable vectors, black flies (*Simuliudae*) collected in the alpine regions of Japan. *Parasitology Research*, *104*(2), 251.

Sehgal, R. N., Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., & Smith, T. B. (2006). Blood parasites of chickens in Uganda and Cameroon with molecular descriptions of *Leucocytozoon schoutedeni* and *Trypanosoma gallinarum*. *Journal of Parasitology*, 92(6), 1336–1343.

Singjam, S., & Ruksachat, N. (2011). Case report: Outbreak of Leucocytozoonosis in captive wild birds, Khao Kor Wildlife Captive Breeding Center, Veterinary Research and Development Center, Lower Northern Region News.

Springer W. T. (1997). Other blood and tissue protozoa. In: Calnek, B.W., Barnes H.J., Beard, H.J., McDougald, L.R. & Saif, Y. M. (Eds.) *Diseases of Poultry (10th edition)*. Iowa state University Press, U.S.A., pp 900-911

Stamatakis, A., Hoover, P., & Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic biology*, *57*(5), 758-771.

Summer, S. L. M. (1911). Note from Entomological Department of the London School of Tropical Medicine No. II. Description of a new species of *Simulium* from the Siamese hills. *Ann Mag Nat Hist*, *8*, 586-588

Synek, P., Munclinger, P., Albrecht, T., & Votýpka, J. (2013). Avian haemosporidians in haematophagous insects in the Czech Republic. *Parasitology Research*, *112*(2), 839-845.

Synek, P., Popelková, A., Koubínová, D., Stastný, K., Langrová, I., Votýpka, J., & Munclinger, P. (2016). Haemosporidian infections in the Tengmalm's Owl (*Aegolius funereus*) and potential insect vectors of their transmission. *Parasitology Research*, *115*(1), 291-298.

Takang, P., Pikulkaew, S., Awaiwanont, N., & Numee, S. (2017). Prevalence and risk factors of blood parasites infection in backyard chickens in Chiang Mai. *Chiang Mai Veterinary Journal*, *15*(3), 157–167. (in Thai).

Takaoka, H. (2017). Speciation, faunal affinities and geographical dispersal of black flies (Diptera: Simuliidae) in the Oriental Region. *Acta Tropica*, 166, 234–240.

Takaoka, H., & Choochote, W. (2004). A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Tropical Medicine and Health*, *32*(2), 189-197.

Takaoka, H., & Saito. K., (1996). A new species and new records of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *24*(3), 163-169.

Takaoka, H., & Suzuki. H., (1984). The blackflies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Medical Entomology and Zoology*, *35*(1), 7-45.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725-2729.

Tangkawanit, U., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., & Adler, P. H. (2009). Morphotaxonomy of the *Simulium (Simulium) tuberosum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zootaxa*, *2048*(1), 31-46.

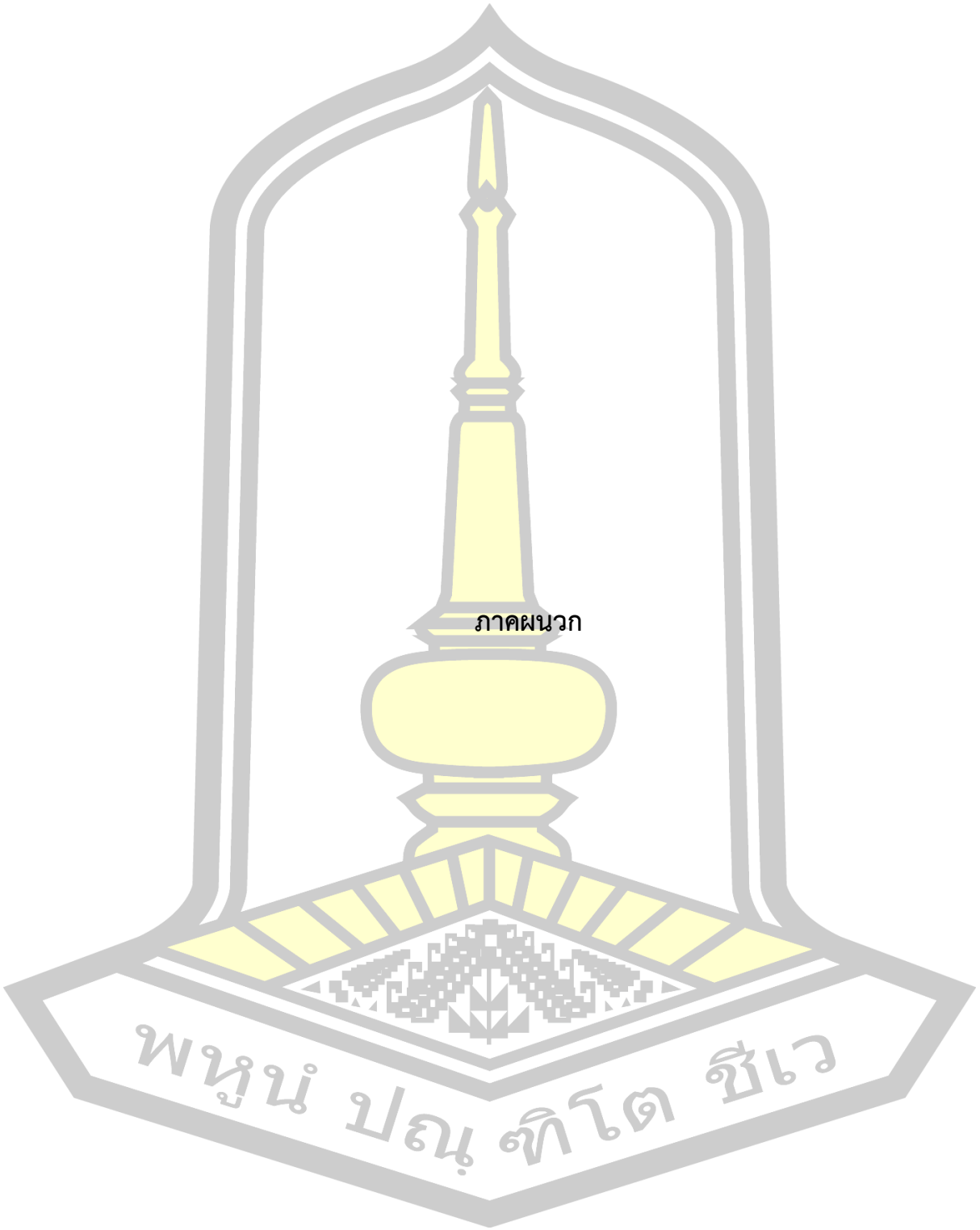
Valkiunas, G. (1999). *Leucocytozoon* (Protista, Haemosporida): proposed adoption of Berestneff, 1904 as the author and of Leukocytozoen danilewskyi Ziemann, 1898 as the type species. *Bulletin of Zoological Nomenclature*, *56*, 168-170.

Valkiunas, G. (2005). *Avian malaria parasites and other Haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 946.

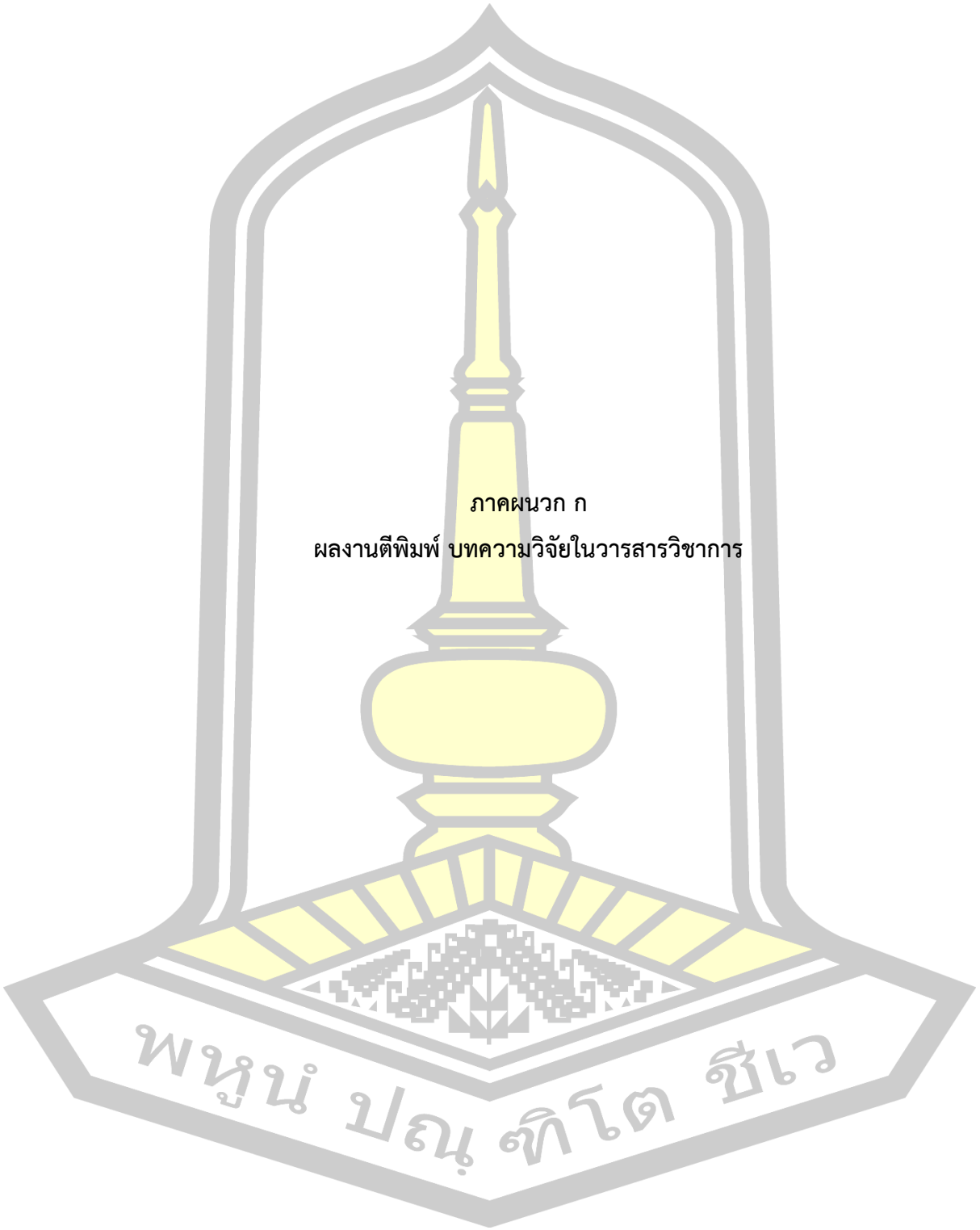
Valkiunas, G., Sehgal, R. N., Iezhova, T. A., & Hull, A. C. (2010). Identification of *Leucocytozoon toddi* group (Haemosporida: Leucocytozoidae), with remarks on the species taxonomy of leucocytozoids. *Journal of Parasitology*, *96*(1), 170-177.

Wongwatcharadamrong, W., Atsawamehta, P., & Yuadyong, R. (1980). Preliminary Report on *Leucocytozoon sabrazesi* in Blackyard Chickens of Southern Thailand. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 10. (in Thai)

Worasing, R., Kongkeaw, W., Tiptara, A., & Anant, S. (2000). Leucocytozoonosis with Avian Malaria in Layer Chicken and Treatment. *Epidemiological Surveillance Report* 10. (in Thai)



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ผลงานตีพิมพ์ บทความวิจัยในวารสารวิชาการ

Acta Tropica 190 (2019) 228–234

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Molecular detection of *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) in black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand

Waraporn Jumpato[a], Ubon Tangkawanit[b], Komgrit Wongpakam[c], Pairot Pramual[a,*]

[a] Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham, 44150, Thailand
[b] Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand
[c] Walai Rukhavej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham, 44150, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:
Leucocytozoon
Gomphostilbia
Simulium
Thailand

ABSTRACT

Information regarding vector-parasite association is necessary for fully understanding the epidemiology of vector borne diseases yet, this information is lacking in the case of Leucocytozoonosis in the Oriental region, despite a high incidence of the disease. In this study, we used a molecular approach based on mitochondrial cytochrome *b* (cyt *b*) sequence to detect the parasite, *Leucocytozoon*, in potential black fly (Simuliidae) vectors in Thailand. A total of 404 wild caught black flies representing six morphological species of two subgenera were examined.- *Gomphostilbia* (*Simulium asakoae* complex, *S. chumpornense*) and *Simulium* (*S. chamlongi*, *S. nodosum*, *S. nigrogilvum*). Forty-four black fly specimens from two species of the *Gomphostilbia* were positive for *Leucocytozoon*. Most (35) of these were found in a village where high numbers of domestic chicken were kept, consistent with the possibility that chickens are a host of *Leucocytozoon* species found in black flies. Sixteen haplotypes were identified among 44 cyt *b* sequences. Comparisons of the sequences with previous reports revealed that the 11 haplotypes obtained in this study were identical or very similar to unknown *Leucocytozoon* found in infected domestic chickens. Four haplotypes are genetically similar to *L. schoutedeni* and one haplotype is genetically very different from existing cyt *b* sequences in public database. Our results indicate that two black fly species of the subgenus *Gomphostilbia* in Thailand are possible vectors of *Leucocytozoon* transmitted among poultry and wild birds in the country.

1. Introduction

Leucocytozoon is a genus of haemosporidian blood parasite that infects many avian taxa (Valkiūnas, 2005; Lotta et al., 2016). There are at least 41 morphospecies of this genus described so far (Lotta et al., 2016) but recent molecular investigations suggested that there could be much more diversity (Valkiūnas et al., 2010; Freund et al., 2016; Galen et al., 2018). Two groups of insects have been reported as vectors of *Leucocytozoon*, black flies (Diptera, Simuliidae) and biting midges in the genus *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) (Valkiūnas, 2005; Forrester and Greiner, 2008).

In Thailand, infections of *Leucocytozoon* spp. in both domestic chickens and wild bird species have been reported in several areas with infection rates varying from 29% in captive wild birds to 74% in domestic chicken (Worasing et al., 2000; Singjam and Ruksachat, 2011; Jaijan et al., 2012; Takang et al., 2017). There are two *Leucocytozoon* morphological species reported in Thailand.- *Leucocytozoon sabrazesi* and *L. caulleryi* (Morii et al., 1981; Takang et al., 2017). However, thus far there is no report for the vectors species of these haemosporidian parasites in Thailand or in other tropical Asian countries.

According to the latest world list of the black flies, there are 96 morphological species of Simuliidae in Thailand (Adler and Crosskey, 2018). However, many species that have been described more recently (Takaoka et al., 2017a, a, b, c, d, e; Tangkawanit et al., 2018) were not included in the world black fly inventory and there are actually 108 species recorded in Thailand. These species are assigned into six subgenera of the genus *Simulium* including, *Asiosimulium* Takaoka and Choochote, *Daviesellum* Takaoka and Adler, *Gomphostilbia* Enderlein, *Montisimulium* Rubtsov, *Nevermannia* Enderlein and *Simulium* Latreille s. str. Among these subgenera, members of the subgenus *Asiosimulium* (five species), *Gomphostilbia* (34 species), *Montisimulium* (six species) and *Nevermannia* (11 species) are prime candidates as the vectors of *Leucocytozoon* because females possess bifid claws with a thumblike lobe adapted to grasp feather barbules and hence feeding on avian species (i.e. ornithophilic species) (Crosskey, 1990; Adler et al., 2004).

Recent study in black flies using molecular approaches have proved

* Corresponding author.
E-mail address: pairot.p@msu.ac.th (P. Pramual).

https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.024
Received 30 October 2018; Received in revised form 20 November 2018; Accepted 22 November 2018
Available online 22 November 2018
0001-706X/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Sampling locations, number of black fly specimens and number of positive for PCR of cyt *b* gene of *Leucocytozoon* in Thailand.

Black fly species	Location	Code	Latitude/ Longitude	Elevation (m)	Collection Date	No. of specimen	No. positive PCR (%)
S. asakoae complex	Wat Pa Song Khon, Phu Ruea District, Loei Province	LO1	17°21′38″N/ 101°23′50″E	681	22/03/2017	2	1 (50)
	Lert Phop Waterfall, Phu Ruea District, Loei Province	LO2	17°29′59″N/ 101°20′10″E	1,134	23/03/2017	3	0
	Song Khon Waterfall, Phu Ruea District, Loei Province	LO3	17°21′13″N/ 101°24′23″E	773	27/05/2017	25	1 (4)
	Ban Pang Bong 1, Doi Saket District, Chiang Mai Province	CM1	18°59′03″N/ 99°20′07″E	990	22/01/2018	10	0
	Ban Pang Bong 2, Doi Saket District, Chiang Mai Province	CM2	18°59′03″N/ 99°20′07″E	990	22/01/2018	70	35 (50)
	Road to Ban Pang Bong, Doi Saket District, Chiang Mai Province	CM3	18°59′20″N/ 99°20′23″E	1,050	22/01/2018	8	0
	Song Khwae District, Nan Province	NN	19°21′11″N/ 100°33′44″E	722	21/01/2018	3	0
	Rai Chanram Resort, Khao Kho District, Phetchabun Province	PB	16°39′44″N/ 101°01′26″E	920	24/03/2018	1	0
	Suan Hom Waterfall, Nong Hin District, Loei Province	LO4	17°02′49″N/ 101°45′42″E	671	31/03/2018	4	0
	Total for *S. asakoae* complex					126	37 (29.36)
	Attracted to human but not biting					45	2 (1.59)
	Swept from vegetation					11	0
	Captured while resting on vegetation					70	35 (27.78)
S. chamlongi	Ban Pang Bong 2, Doi Saket District, Chiang Mai Province	CM2	18°59′03″N/ 99°20′07″E	990	22/01/2018	17	0
	Road to Ban Pang Bong, Doi Saket District, Chiang Mai Province	CM3	18°59′03″N/ 99°20′07″E	990	22/01/2018	2	0
	Total for *S. chamlongi*					19	0
	Human biting					2	0
	Captured while resting on vegetation					17	0
S. chumpornense	Ban Kok Bok, Wang Saphung District, Loei Province	LO5	17°23′34″ N/ 101°34′17″ E	247	29/10/2016	5	0
					22/03/2017	12	2 (16.67)
					27/03/2017	1	0
					01/04/2018	10	1 (10)
	Ban Huai Lat, Phu Ruea District, Loei Province	LO6	17°27′01″ N/ 101°25′48″ E	747	22/03/2017	6	0
	Pla Ba Waterfall, Phu Ruea District, Loei Province	LO7	17°23′18″ N/ 101°22′10″ E	649	22/03/2017	2	2 (100)
	Ban Song Khon, Phu Ruea District, Loei Province	LO8	17°21′38″ N/ 101°23′50″ E	681	22/03/2017	9	0
	Phu Ruea 1, Phu Ruea District, Loei Province	LO9	17°30′10″N/ 101°20′59″E	1,214	23/03/2017	15	2 (13.33)
	Phu Ruea 2, Phu Ruea District, Loei Province	LO10	17°30′03″ N/ 101°20′16″E	1,151	23/03/2017	3	0
	Suan Hom Waterfall, Loei Province	LO4	17°02′49″N/ 101°45′42″E	671	14/10/2017	2	0
					21/03/2018	2	0
	Song Khon Waterfall, Phu Ruea District, Loei Province	LO3	17°21′13″N/ 101°24′23″E	773	24/03/2018	1	0
					31/03/2018	15	0
					01/04/2018	4	0
	Ban Mae Su Ya Mai, Mae Hong Son Province	MS1	18°38′44″N/ 97°56′24″E	410	31/03/2017	2	0
	Rai Chanram Resort, Khao Kho District, Phetchabun Province	PB	16°39′44″ N/ 101°01′26″ E	920	24/03/2018	2	0
	Ban Phu Ruea, Phu Ruea District, Loei Province	LO11	17°26′53″N/ 101°24′23″ E	624	01/04/2018	12	0
	Phu Ruea Highland Agricultural Experiment Station, Loei Province	LO12	17°17′53″N/ 101°24′37″ E	920	01/04/2018	2	0
	Total for *S. chumpornense*					105	7 (6.67)
	Attracted to human but not biting					89	5 (4.76)
	Swept from vegetation					16	2 (1.90)
S. doipuiense complex	Phu Soi Dao, Uttaradit Province	UD	17°44′12″N/ 100°59′18″E	1,589	27/10/2015	31[a]	0
S. nigrogilvum	Chong Yen, Kamphaeng Phet Province	KP	16°05′53″N/ 99°06′24″E	1,276	20/2/2014	4[a]	0
	Phu Soi Dao, Uttaradit Province	UD	17°44′12″N/ 100°59′18″E	1,589	27/10/2015	26[a]	0
	Ban Pang Bong, Doi Saket District, Chiang Mai Province	CM1	18°59′03″N/ 99°20′07″E	990	22/01/2018	30	0
	Total for *S. nigrogilvum*					60	0
S. nodosum	Ban Mae Su Ya Mai, Mae Hong Son Province	MS1	19°31′17″N/ 98°05′32″E	379	17/01/2015	13[a]	0
	Ban Pang Peak, Pang Mapha District, Mae Hong Son Province	MS2	19°26′12″N/ 98°29′17″E	849	17/01/2015	17[a]	0
	Mae Na Teng, Pai District, Mae Hong Son Province	MS3	19°25′13″N/ 98°24′13″E	548	17/01/2015	33[a]	0

(continued on next page)

Table 1 (*continued*)

Black fly species	Location	Code	Latitude/ Longitude	Elevation (m)	Collection Date	No. of specimen	No. positive PCR (%)
	Total for *S. nodosum*					63	0
Total						404	44 (10.89)

* Specimens obtained from Pramual et al. (2016) and all are human biting.

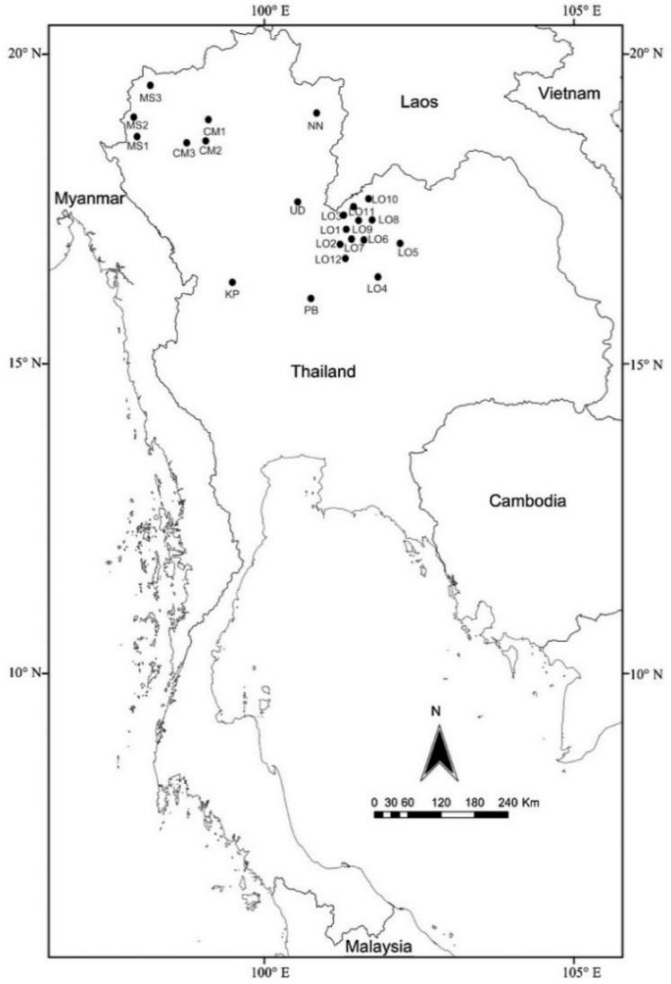


Fig. 1. Collection sites for wild adult black flies species in Thailand used in this study. Details of collection sites are given in Table 1.

to be very useful for detection of the *Leucocytozoon* in these dipteran vectors (Sato et al., 2009; Murdock et al., 2015; Lotta et al., 2016). In this study, we use a molecular method to detect and to evaluate genetic diversity of *Leucocytozoon* in wild caught black flies from Thailand. Our results, presented in this study, are the first report from tropical Asia for an association between *Leucocytozoon* and black fly species.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and identification

Adult black flies were collected from 28 locations in Thailand between February 2014 and March 2018 (Table 1 and Fig. 1.). Specimens were collected using three methods; (i) collected from human bait (ii) swept from vegetation and (iii) captured while resting on vegetation. The numbers of specimens collected by the different methods are shown in Table 1. Specimens were preserved in 80% ethanol and were kept at −20 °C until processed. Black fly species were morphologically identified using keys and descriptions of black flies in Thailand and nearby geographic regions (e.g., Takaoka and Suzuki,1984; Takaoka and Choochote, 2004; Tangkawanit et al., 2009).

2.2. DNA extraction, amplification and sequencing

Prior to processing for DNA extraction, adult fly specimens were carefully checked for host blood in the abdomens. No host blood was found in any specimen except for those collected while biting human bait. Genomic DNA was extracted from adult specimen using the GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia). All DNA samples of *S. nodosum* and *S. doipuiense* complex and some of *S. nigrogilvum* were obtained from a previous study (Pramual et al., 2016). The primers specific for *Leucocytozoon* were used to amplify an approximately 500 bp fragment of the mitochondrial cytochrome *b* (cyt *b*) gene (Hellgren et al., 2004). PCR reaction followed the method described in Hellgren et al. (2004) with some modifications. Amplification of the cyt *b* using the specific primers for *Leucocytozoon* requires use of nested PCR. The first PCR was performed in a total volume of 15 µl containing 1.5 µl of 10X PCR buffer, 0.36 µl $MgCl_2$ (50 mM), 0.75 µl of dNTP mixture (2.5 mM), 0.9 µl of each primer (10 µM) (HaemNFI and HaemNR3) (Hellgren et al., 2004), 0.066 µl of *Taq* DNA polymerase (TaKaRa, Ohtsu, Japan) (5 U/µl) and 1.5 µl of DNA template. Temperature profiles were as follows: 94 °C for 3 min followed by 20 cycles of 94 °C for 30 s, 53 °C for 30 s, and 72 °C for 45 s, with final extension at 72 °C for 10 min. The second PCR was carried out in a total volume of 50 µL containing 5 µl of 10X PCR buffer, 1 µl $MgCl_2$ (50 mM), 3 µl of dNTPs (2.5 mM), 2 µl of each primer (10 µM) (HaemFL and HaemR2L) (Hellgren et al., 2004)), 0.25 µl of *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) and 5 µl of the product from the first PCR reaction. The thermal profile of the PCR was identical to the initial PCR but performed for 36 cycles. PCR products were checked with a 1% agarose gel and purified using HiYield Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) following the manufacturer's instructions. DNA sequencing was performed at 1st BASE (Malaysia) DNA sequencing service, using the same primers as in the second round PCR.

2.3. Data analysis

The mitochondrial cyt *b* sequences of *Leucocytozoon* obtained in this study were deposited in the NCBI GenBank under accession numbers MK066336 – MK066379. Genetic diversity based on Kimura 2-parameter among cyt *b* sequences was calculated in MEGA 6 (Tamura et al., 2013). To examine phylogenetic relationships between *Leucocytozoon* cyt *b* sequences obtained in this study with those previously reported, the 10 closest sequences based on NCBI BLAST analysis and seven sequences of the *Leucocytozoon* species (*L. caulleryi* and *L. sabrazesi*) found in infected domestic chicken in Thailand were also included. Phylogenetic analyses were conducted based on neighbor-joining (NJ), maximum likelihood (ML) and Bayesian analysis (BA) methods. The NJ tree analysis was implemented in MEGA 6 (Tamura et al., 2013) based on Kimura 2-parameter (K2P) model. Branch support was calculated using the bootstrapping method with 1000 replicates. Maximum likelihood tree analysis was performed in the RAxML web server version (https://embnet.vital-it.ch/raxml-bb/) (Stamatakis et al., 2008). Bayesian analysis was performed with MrBayes 3.04b (Huelsenbeck and Ronquist, 2001), and was run for 2,000,000 generations with sampling sequences of 100 generations. For all phylogenetic analyses, sequences of *Haemoproteus* sp. (accession no. KT290922 – KT290924) were used as the outgroups.

3. Results

3.1. Molecular detection of Leucocytozoon in wild caught black flies

A total of 404 wild caught black flies were screened for *Leucocytozoon*. These black flies were morphologically identified into six species.- *S. asakoae* complex (n = 126), *S. chamlongi* (n = 19), *S. chumpornense* (n = 105), *S. doipuiense* complex (n = 31), *S. nigrogilvum* (n = 60) and *S. nodosum* (n = 63). Proportions of specimens collected with different methods for *S. asakoae* complex, *S. chumpornense* and *S. chamlongi* are shown in Table 1. All specimens of the *S. doipuiense* complex, *S. nodosum* and *S. nigrogilvum* were collected from human bait.

Among 404 black fly specimens, 44 (10.89%) were positive for *Leucocytozoon*. Of these, 37 were detected in the *S. asakoae* complex that are included in the subgenus *Gomphostilbia*. Almost (35 of 37) all of the *S. asakoae* complex specimens infected with *Leucocytozoon* were captured while resting on vegetation in a village in Chiang Mai Province, northern Thailand. Additionally, two specimens of *S. asakoae* complex infected with *Leucocytozoon* were collected while attract to human from Loei Province, northeastern Thailand (Table 1). Seven specimens of *S. chumpornense*, also belonging to the subgenus *Gomphostilbia*, were found to be infected with *Leucocytozoon* (Table 1). Five specimens were collected while attract to humans and two were swept from vegetation (Table 1). None of the black fly species of the subgenus *Simulium* was positive for *Leucocytozoon*.

3.2. Genetic diversity of Leucocytozoon

Sixteen haplotypes were identified from 44 cyt *b* sequences of *Leucocytozoon*. Of these, 11 haplotypes were unique and five haplotypes were shared by at least two individuals (Table 2). A total of 11 haplotypes were identified among 37 sequences of *Leucocytozoon* found in the *S. asakoae* complex and five haplotypes were detected among seven *Leucocytozoon* sequences found in *S. chumpornense*. None of these haplotypes were shared between black fly species.

The neighbor-joining tree (Fig. 2) based on the 44 cyt *b* sequences of *Leucocytozoon* obtained from black flies in Thailand plus 10 closest sequences and seven of the *L. sabrazesi* and *L. caulleryi* that were found in infected chickens in Thailand revealed two major clades. Clade I could be further divided into four subclades (I-1– 4). Most of the specimens belonged to subclade I-1 that contained *Leucocytozoon* from both *S. asakoae* complex and *S. chumpornense*. The NCBI BLAST results revealed that cyt *b* sequences belonging to this subclade are genetically identical or very similar (99%) to *Leucocytozoon* sp. found in red jungle fowl (*Gallus gallus spadiceus*) from Malaysia and domestic chicken (*Gallus gallus*) from Thailand (Table 2) with only one exception (LEUCOTH 7) where the genetic similarity was low (96%). Subclade I-2 was comprised of the cyt *b* haplotypes of *Leucocytozoon* obtained from both *S. asakoae* complex and *S. chumpornense*. Based on the NCBI BLAST results, the haplotypes of this subclade are closest to *L. schoutendeni* with the sequence similarity range from 98 to 100%. Only one specimen of *Leucocytozoon* from the *S. asakoae* complex formed clade I-3 with *Leucocytozoon* sp. reported from the African yellow white-eye bird,

Table 2
Haplotype list and best NCBI BLAST hits sequences for *Leucocytozoon* haplotypes found in black flies from Thailand.

Haplotype (*n*)	Black fly species	Closest sequence in NCBI GenBank (% similarity)	Host / Country	NCBI GenBank Accession
LEUCOTH1 (1)	*S. chumpornense*	*Leucocytozoon schoutedeni* (98%)	*Gallus gallus spadiceus*/Malaysia	KT290936
		Leucocytozoon sp. (98%)	*Gallus gallus spadiceus* /Malaysia	KT290944
LEUCOTH2 (1)	*S. chumpornense*	*Leucocytozoon* sp. (99%)	*Gallus gallus* / Thailand	KX950741
LEUCOTH3 (3)	*S. chumpornense*	*Leucocytozoon* sp. (100%)	*Gallus gallus spadiceus*/Malaysia	KT290944
LEUCOTH4 (1)	*S. chumpornense*	*Leucocytozoon* sp. (99%)	*Gallus gallus spadiceus*/Malaysia	KT290940
LEUCOTH5 (1)	*S. chumpornense*	*Leucocytozoon schoutedeni* (98%)	*Gallus gallus*/Uganda	DQ676824
LEUCOTH6 (22)	*S. asakoae*	*Leucocytozoon* sp. (99%)	*Gallus gallus spadiceus*/Malaysia	KT290943
		Leucocytozoon sp. (99%)	*Gallus gallus* / Thailand	KX950737
LEUCOTH7 (1)	*S. asakoae*	*Leucocytozoon* sp. (96%)	*Gallus gallus* / Thailand	KX950741
LEUCOTH8 (3)		*Leucocytozoon* sp. (100%)	*Gallus gallus spadiceus*/Malaysia	KT290943
		Leucocytozoon sp. (99%)	*Gallus gallus* / Thailand	KX950737
LEUCOTH9 (1)	*S. asakoae*	*Leucocytozoon* sp. (99%)	*Gallus gallus spadiceus*/Malaysia	KT290943
		Leucocytozoon sp. (99%)	*Gallus gallus* / Thailand	KX950737
LEUCOTH10 (3)	*S. asakoae*	*Leucocytozoon* sp. (100%)	*Gallus gallus spadiceus*/Malaysia	KT290943
		Leucocytozoon sp. (99%)	*Gallus gallus* / Thailand	KX950737
LEUCOTH11 (1)	*S. asakoae*	*Leucocytozoon* sp. (99%)	*Gallus gallus spadiceus*/Malaysia	KT290943
LEUCOTH12 (1)	*S. asakoae*	*Leucocytozoon* sp. (99%)	*Gallus gallus spadiceus*/Malaysia	KT290943
LEUCOTH13 (1)	*S. asakoae*	*Leucocytozoon* sp. (99%)	*Zosterops senegalensis*/ Equatorial Guinea: Bioko Island	KT376976
LEUCOTH14 (2)	*S. asakoae*	*Leucocytozoon schoutedeni* (100%)	*Gallus gallus*/Uganda	DQ676824
LEUCOTH15 (1)	*S. asakoae*	*Leucocytozoon* sp. (99%)	*Gallus gallus spadiceus*/Malaysia	KT290943
LEUCOTH16 (1)	*S. asakoae*	*Leucocytozoon schoutedeni* (100%)	*Gallus gallus*/Uganda	DQ676823

n, number of sequences sharing the haplotype.

Zosterops senegalensis from Bioko Island of Equatorial Guinea, albeit with low genetic similarity (93%). Two sequences of *L. sabrazesi* formed clade I-4 and five sequences of *L. caulleryi* comprised clade II.

4. Discussion

Leucocytozoon has been detected at high frequency in domestic chickens in Thailand and from other tropical regions of Southeast Asia (Morii et al., 1981; Paperna et al., 2005). However, there is only a suspicion based on reports from other geographic regions that black flies and biting midges are potential vectors of this haemosporidian parasite. Our results have found that at least two ornithophilic black fly species (*S. asakoae* complex and *S. chumpornense*) were infected with *Leucocytozoon* and this is the first report from tropical Asia that black flies are potentially the vectors of *Leuocytozoon* in this region. Note that, for *S. asakoae* complex, we cannot rule out the possible involvement of other closely related species such as *S. udomi*, *S. myanmarense* and *S. monglaense* because females of these species are morphologically very similar (Saeung et al., 2017; Takaoka et al., 2017b). Further molecular investigation could help to clarify this.

The finding that only ornithophilic black fly species are potential vectors of *Leucocytozoon* is consistent with the typical trend that vectors of this heamosporidian parasite are restrict to black fly species possessing a bifid claw (Adler et al., 2004). Interestingly, the *S. asakoae* complex is not absolutely ornithophilic because this species is also known to bite mammals such as humans (Choochote et al., 2005). Although, we have not yet found any direct evidence that these black flies bite domestic chickens in Thailand, black fly biting of poultry has been reported in many other locations (El Bashir et al., 1976; Adler et al., 2004). In addition, many (30) *Leucocytozoon* cyt *b* sequences from black flies obtained in the present study are highly similar (> 99% similarity) to those reported from domestic chicken in Thailand.

Among 44 specimens that were positive for *Leucocytozoon*, 35 were from a single location in northern Thailand. Interestingly, these 35 black fly specimens were collected from a village. The high incidence of the *Leucocytozoon* in the village rather than in the forest also supports the above speculation that the *Leucocytozoon* detected in the black flies in Thailand are likely to be infecting domestic chickens. It is very common practice in rural areas of Thailand for villagers to keep domestic chickens in their backyard. It has been estimated that there are 100–120 million chickens of marketable size (approximately 1.0–1.5 kg) produced annually (Choprakarn and Wongpichet, 2008). Therefore, these domestic chickens could be the host for *Leucocytozoon*. Because the village (Pang Bong, Doisaket District, Chiangmai Province) from where we collected black fly specimens is situated in a mountainous areas where suitable habitats for immature black flies are plentiful, it was possible to find large numbers of both immature and adult black flies. Therefore, this area is suitable for both potential vectors (black flies) and parasites (*Leucocytozoon*).

A total of 16 haplotypes were identified among 44 cyt *b* sequences obtained from two black fly species. Most of these (11) were found in the *S. asakoae* complex. Haplotypes seem to be species specific as none of them were shared between black fly species. However, phylogenetic analysis revealed no indication of lineage divergence between haplotypes from different black fly species as *Leucocytozoon* haplotypes from both black fly species were clustered together with a low level of genetic divergence. Previous reports in other geographic regions including North America (Murdock et al., 2015) and South America (Lotta et al., 2016) also found no species specificity between *Leucocytozoon* and black fly vectors.

Two species of the *Leucocytozoon* were reported in Thailand based on morphological characters.- *L. sabrazesi* and *L. caulleryi* (Morii et al., 1981; Takang et al., 2017). Both species were found infecting domestic chicken in Chiangmai Province, northern Thailand. There is no report on the cyt *b* sequences of these *Leucocytozoon* species from Thailand but we obtained sequences from Malaysia which were also from infected chicken. The cyt *b* sequences of these species are very different from our specimens and formed distinct clades in the NJ tree. The levels of genetic differentiation based on the K2P model between our sequences and *L. sabrazesi* and *L. caulleryi* are 13.28%–23.23% while within these species they are 0.89%–7.90%. Although there is no clear level for cyt *b* genetic differentiation between *Leucocytozoon* species (Outlaw and Ricklefs, 2014) the high degree of genetic differentiations plus results from phylogenetic analyses suggest that *Leucocytozoon* detected in black flies from Thailand is unlikely to be *L. sabrazesi* and *L. caulleryi*.

Based on the NCBI BLAST results of our *Leucocytozoon* cyt *b* sequences, two haplotypes were perfectly matched with *L. schoutedeni* from Uganda that was infecting domestic chicken (Sehgal et al., 2006). Two more haplotypes were also highly similar (98% sequence similarity) to *L. schoutedeni* specimens from Malaysia infecting red jungle fowl (*Gallus gallus spadiceus*) and from Uganda that infected domestic chicken. All of these sequences formed subclade (I-2) of clade I

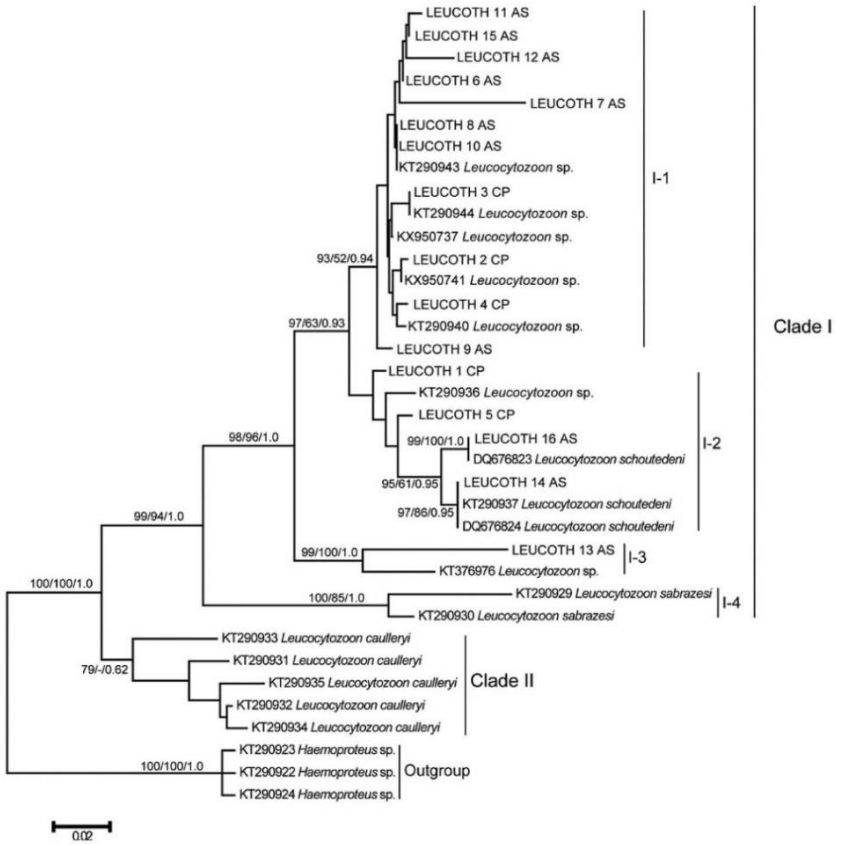


Fig. 2. Neighbor-joining tree of *of Leucocytozoon* cyt *b* sequences obtained from black flies species in Thailand (indicated as LEUCOTH) their best NCBI BLAST match and sequences of two species that were reported infected domestic chicken in Thailand (*Leucocytozoon caulleryi* and *L. sabrazesi*). Bootstrap values for neighbor-joining, maximum likelihood and posterior probability of Bayesian analysis are shown above or near the branches. AS, *Simulium asaokae* complex; CP, *S. chumpornense*.

according to the NJ analysis. Therefore, these *Leucocytozoon* sequences found in black flies, *S. asakoae* complex and *S. chumpornense* in Thailand could be *L. schoutedeni*. However, further evidence such as morphological characters of the *Leucocytozoon* are needed to support this hypothesis.

All remaining sequences (except one) were identical or very similar (99% similarity) to sequences of an unknown *Leucocytozoon* found infecting red jungle fowl from Malaysia and domestic chicken from Thailand. The one remaining sequence is very different from the others. Comparisons with sequences in the NCBI database revealed that its closest sequence (93% similarity) is an unknown *Leucocytozoon* infecting the African yellow white-eye bird (*Zosterops senegalensis*) from Bioko Island of Equatorial Guinea (Loiseau et al., 2017).

In conclusion, our results revealed that at least two ornithophilic black fly species, *S. asakoae* complex and *S. chumpornense* of the subgenus *Gomphostilbia* are potential vectors of *Leucocytozoon* in Thailand. Closely related cyt *b* sequences of *Leucocytozoon* sp. found in black flies and in domestic chickens along with the high incidence of these parasites in the village area where many domestic chickens are kept indicates that the *Leucocytozoon* could be the same species. However, more evidence is needed before firm conclusion can be made.

Acknowledgements

This research has been supported by Center of Excellence on Biodiversity (BDC), Office of Higher Education Commission (BDC-PG2-160008). We would like to thank Mr. Panya Jomkhamsing for laboratory assistance and Dr. Adrian Plant for valuable comments on an earlier version of the manuscript.

References

Adler, P.H., Crosskey, R., 2018. World Blackflies (Diptera: Simuliidae): A Comprehensive Revision of the Taxonomic and Geographical Inventory (2018). [Accessed 25 June 2015]. https://biomia.sites.clemson.edu/pdfs/blackflyinventory.pdf.

Adler, P.H., Currie, D.C., Wood, D.M., 2004. The Black Flies (Simuliidae) of North America. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Choochote, W., Takaoka, H., Fukuda, M., Otsuka, Y., Aoki, C., Eshima, N., 2005. Seasonal abundance and daily flying activity of black flies (Diptera Simuliidae) attracted to human baits in Doi Inthanon National Park, northern Thailand. Med. Entomol. Zool. 56, 335–348. https://doi.org/10.7601/mez.56.335.

Choprakarn, K., Wongpichet, K., 2008. Village chicken production systems in Thailand. In: Thieme, O., Pilling, D. (Eds.), Poultry in the 21st Century: Avian Influenza and Beyond, Proceedings of the International Poultry Conference, Held 5–7 November 2007, Bangkok, Thailand, pp. 569–582.

Crosskey, R.W., 1990. The Natural History of Blackflies. John Wiley & Sons, London.

El Bashir, S., El Jack, M.H., El Hadi, H.M., 1976. The diurnal activity of the chicken-biting black fly, *Simulium griseicolle* Becker (Diptera, Simuliidae) in northern Sudan. Bull. Entomol. Res. 66 (3), 48–487. https://doi.org/10.1017/S000748530000688X.

Forrester, D.J., Greiner, E.C., 2008. Leucocytozoonosis. In: Atkinson, C.T., Thomas, N.J., Hunter, D.B. (Eds.), Parasitic Diseases of Wild Birds. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp. 54–107.

Freund, D., Wheeler, S.S., Townsend, A.K., Boyce, W.M., Ernest, H.B., Cicero, C., Sehgal, R.N., 2016. Genetic sequence data reveals widespread sharing of *Leucocytozoon* lineages in corvids. Parasitol. Res. 115 (9), 3557–3565. https://doi.org/10.1007/s00436-016-5121-3.

Galen, S.C., Nunes, R., Sweet, P.R., Perkins, S.L., 2018. Integrating coalescent species delimitation with analysis of host specificity reveals extensive cryptic diversity despite minimal mitochondrial divergence in the malaria parasite genus *Leucocytozoon*. BMC Evol. Biol. 18 (1), 128. https://doi.org/10.1186/s12862-018-1242-x.

Hellgren, O., Waldenström, J., Bensch, S., 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. Parasitology 90, 797–802. https://doi.org/10.1645/GE-184R1.

Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F.R., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17, 754–755. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754.

Jaijan, A., Posuya, W., Saenbuaphan, N., 2012. Prevalence and Risk Factors of Blood Parasites in Indigenous Thai Chickens in Nan Province During November 2011 to August 2012. Nan Provincial Livestock Office. (in Thai).

Loiseau, C., Melo, M., Lobato, E., Beadell, J.S., Fleischer, R.C., Reis, S., Doutrelant, C., Covas, R., 2017. Insularity effects on the assemblage of the blood parasite community of the birds from the Gulf of Guinea. J. Biogeogr. 44 (11), 2607–2617. https://doi.org/10.1111/jbi.13060.

Lotta, I.A., Pacheco, M.A., Escalante, A.A., González, A.D., Mantilla, J.S., Moncada, L.I., Adler, P.H., Matta, N.E., 2016. *Leucocytozoon* diversity and possible vectors in the Neotropical highlands of Colombia. Protist 167 (2), 185–204. https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.02.002.

Morii, T., Shiihara, T., Lee, Y.C., Manuel, M.F., Nakamura, K., Iijima, T., Hoji, K., 1981. Seroimmunological and parasitological surveys of *Leucocytozoon caulleryi* infection in chickens in several Asian countries. Int. J. Parasitol. 11 (3), 187–190. https://doi.org/10.1016/0020-7519(81)90047-3.

Murdock, C.C., Adler, P.H., Frank, J., Perkins, S.L., 2015. Molecular analyses on host-seeking black flies (Diptera: Simuliidae) reveal a diverse assemblage of Leucocytozoon (Apicomplexa: Haemospororida) parasites in an alpine ecosystem. Parasit. Vectors 8 (1), 343. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0952-9.

Outlaw, D.C., Ricklefs, R.E., 2014. Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): how to move forward in the molecular era. Parasitology 141 (10), 1223–1232. https://doi.org/10.1017/S0031182014000560.

Paperna, I., Soh, M.C.K., Yap, C.A.M., Sodhi, N.S., Lim, S.L.H., Prawiradilaga, D.M., Nagata, H., 2005. Blood parasite prevalence and abundance in the bird communities of several forested locations in Southeast Asia. Ornithol. Sci. 4 (2), 129–138. https://doi.org/10.2326/osj.4.129.

Pramual, P., Thaijarern, J., Wongpakam, K., 2016. DNA barcoding of human-biting black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. Acta Trop. 164, 33–40. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.08.016.

Saeung, A., Srisuka, W., Low, V.L., Maleewong, W., Takaoka, H., 2017. Descriptions of the female and larva of *Simulium* (*Gomphostilbia*) *udomi*(Diptera: Simuliidae) from Thailand, and its transfer to the*Simulium asakoae* species-group. Acta Trop. 172, 14–19. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.014.

Sato, Y., Tamada, A., Mochizuki, Y., Nakamura, S., Okano, E., Yoshida, C., Murata, K., 2009. Molecular detection of *Leucocytozoon lovati* from probable vectors, black flies (Simuliudae) collected in the alpine regions of Japan. Parasitol. Res. 104 (2), 251. https://doi.org/10.1007/s00436-008-1183-1.

Sehgal, R.N., Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., Smith, T.B., 2006. Blood parasites of chickens in Uganda and Cameroon with molecular descriptions of *Leucocytozoon schoutedeni* and *Trypanosoma gallinarum*. J. Parasitol. 92 (6), 1336–1343. https://doi.org/10.1645/GE-927R.1.

Singjam, S., Ruksachat, N., 2011. Case Report: Outbreak of Leucocytozoonosis in Captive Wild Birds, Khao Kor Wildlife Captive Breeding Center, Veterinary Research and Development Center, Lower Northern Region News. (accessed 14 October 2018. http://region6.dld.go.th/webnew/pdf/academic/4/7.pdf.

Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J., 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. Syst. Biol. 57 (5), 758–771. https://doi.org/10.1080/10635150802429642.

Takaoka, H., Choochote, W., 2004. A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. Trop. Med. Health 32, 189–197. https://doi.org/10.2149/tmh.32.189.

Takaoka, H., Srisuka, W., Low, V.L., Saeung, A., 2018a. Morphological and molecular analyses of *Simulium rufibasis* (Diptera: Simuliidae) in Thailand. J. Med. Entomol. https://doi.org/10.1093/jme/tjy180.

Takaoka, H., Srisuka, W., Low, V.L., Sacung, A., 2018b. A new species of the Simulium (*Simulium*) *striatum* species group (Diptera: Simuliidae) from Thailand, and its differentiation from two related species based on a fast-evolving nuclear gene. J. Med. Entomol. 55 (3), 561–568. https://doi.org/10.1093/jme/tjx241.

Takaoka, H., Srisuka, W., Low, V.L., Saeung, A., 2018c. Five new species of the Simulium *decuplum* subgroup of the *Simulium* (*Gomphostilbia*) *batoense* species-group (Diptera: Simuliidae) from Thailand and their phylogenetic relationships. Acta Trop. 182, 271–284. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.03.019.

Takaoka, H., Srisuka, W., Low, V.L., Saeung, A., 2018d. A new species and a new record of the *Simulium* (*Gomphostilbia*) *gombakense* species-group (Diptera: Simuliidae) from Thailand. Acta Trop. 185, 156–166. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.05.011.

Takaoka, H., Srisuka, W., Low, V.L., Maleewong, W., Saeung, A., 2017b. Two new species of *Simulium* (*Gomphostilbia*) (Diptera: Simuliidae) from Myanmar, and their phylogenetic relationships with related species in the *S. asakoae* species-group. Acta Trop. 176, 39–50. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.024.

Takaoka, H., Srisuka, W., Saeung, A., 2018e. A new species of *Simulium* (*Asiosimulium*) (Diptera: Simuliidae) from Thailand. J. Med. Entomol. 55 (3), 569–574. https://doi.org/10.1093/jme/tjx242.

Takaoka, H., Srisuka, W., Saeung, A., 2017a. A new black fly species of Simulium (*Gomphostilbia*) (Diptera: Simuliidae) from Thailand. J. Med. Entomol. 54 (6), 1552–1559. https://doi.org/10.1093/jme/tjx147.

Tangkawanit, U., Wongpakam, K., Pramual, P., 2018. A new black fly (Diptera: Simuliidae) species of the subgenus *Asiosimulium*Takaoka Choochote from Thailand. Zootaxa 4388 (1), 111–122. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4388.1.8.

Takaoka, H., Suzuki, H., 1984. The black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. Jpn. J. Sanit. Zool. 35, 7–45. https://doi.org/10.7601/mez.35.7.

Takang, P., Pikulkaew, S., Awaiwanont, N., Numee, S., 2017. Prevalence and risk factors of blood parasites infection in backyard chickens in Chiang Mai. Chiang Mai Vet. J. 15 (3), 157–167 (in Thai).

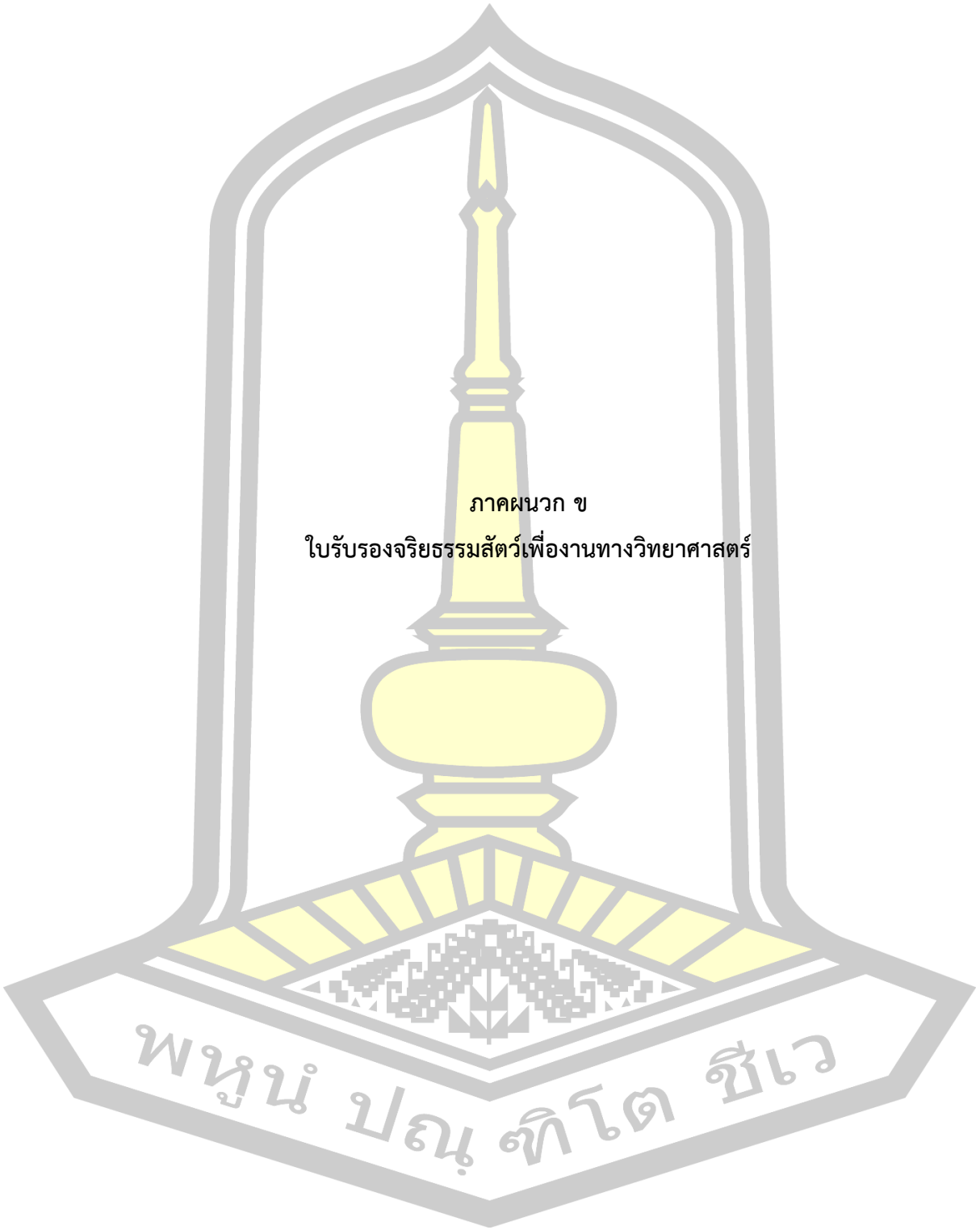
Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197.

Tangkawanit, U., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., Adler, P.H., 2009. Morphotaxonomy of the*Simulium* (*Simulium*) *tuberosum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. Zootaxa 2048, 31–46. https://doi.org/10.5281/zenodo.186496.

Valkiūnas, G., 2005. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. CRC, Boca Raton.

Valkiūnas, G., Sehgal, R.N., Iezhova, T.A., Hull, A.C., 2010. Identification of *Leucocytozoon toddi* group (Haemosporida: Leucocytozoidae), with remarks on the species taxonomy of leucocytozoids. J. Parasitol. 96 (1), 170–177. https://doi.org/10.1645/GE-2109.1.

Worasing, R., Kongkeaw, W., Tiptara, A., Anant, S., 2000. Leucocytozoonosis with avian malaria in layer chicken and treatment. Epidemiological Serveillance Report 10. (in Thai).



ภาคผนวก ข

ใบรับรองจริยธรรมสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการกำกับและส่งเสริมการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (คกส. มมส)

Institutional Animal Care and Use Committee, Mahasarakham University (IACUC-MSU), Thailand

ใบรับรองการอนุมัติ

(Certificate of Approval)

เลขที่การรับรอง : 005/ 2562

Approval number : 005/ 2019

ชื่อโครงการวิจัย : ความหลากหลายและความชุกของ *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) ในแมลงริ้นดำ (Diptera: Simuliidae) จากประเทศไทย

Research Title : Diversity and prevalence of *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) in black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand

ผู้วิจัยหลัก : นางสาววราภรณ์ จำปาโท

Principal Investigator : Ms.Waraporn Jumpato

คณะ/หน่วยงาน : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Affiliation : Faculty of Science, Mahasarakham University

สถานที่ดำเนินการวิจัย : จังหวัดมหาสารคาม

Research Site : Mahasarakham Province

วันที่รับรอง : 20 กุมภาพันธ์ 2562 **วันหมดอายุ :** 20 กุมภาพันธ์ 2563

Date of Approval : 20 February 2019 **Date of Expiration :** 20 February 2020

โครงการวิจัยนี้ได้รับการพิจารณาและอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับและส่งเสริมการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (คกส. มมส.) ให้ดำเนินการศึกษาวิจัยเรื่องข้างต้นได้บนพื้นฐานของโครงการวิจัยที่คณะกรรมการฯ ได้รับการพิจารณา คณะผู้วิจัยต้องปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์และพระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งข้อกฎหมายต่างๆ ที่เกี่ยวข้องอย่างเคร่งครัด หากมีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในโครงการวิจัย ผู้วิจัยหลักจักต้องแจ้งต่อคณะกรรมการฯ ทันที และต้องยื่นขอรับการพิจารณาโครงการวิจัยใหม่

This research project has been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Mahasarakham University (IACUC-MSU). The IACUC-MSU approval is limited to the project as approved. All researchers who associated with this research project must act strictly in accordance with the ethical principles, guidelines and act of parliament for the use of animals in scientific works, including all relevant policies and laws. Any subsequent changes to the consent form, the principal investigator must notify the IAUAC-MSU immediately and re-submit the research application to the IACUC-MSU.

.....

(ศาสตราจารย์สัมพันธ์ ฤทธิเดช)

(Prof. Sampan Rittidech)

ประธานคณะกรรมการกำกับและส่งเสริมการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

(The Institutional Animal Care and Use Committee's Chairman)

นักวิจัยทุกท่านที่ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ต้องปฏิบัติดังต่อไปนี้

1. ดำเนินการวิจัยตามที่ระบุไว้ในโครงการวิจัยอย่างเคร่งครัด
2. นักวิจัยต้องใช้สัตว์ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยตระหนักถึงคุณค่าของชีวิตและศีลธรรมตามหลักศาสนา
3. หากมีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในโครงการวิจัย นักวิจัยจักต้องแจ้งต่อคณะกรรมการฯ ทันที และต้องยื่นขอรับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ใหม่
4. หากการวิจัยไม่สามารถดำเนินการเสร็จสิ้นภายในกำหนด ผู้วิจัยต้องยื่นขอต่ออายุฯ อย่างน้อย 1 เดือน (ทั้งนี้ต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในโครงการวิจัย)

****

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางาสาววราภรณ์ จำปาโท
วันเกิด	วันที่ 22 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2536
สถานที่เกิด	จังหวัดร้อยเอ็ด
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 67 หมู่ 1 ตำบลกาบิน อำเภอกุดข้าวปุ้น จังหวัดอุบลราชธานี 34270
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	นิสิต
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย อำเภอกันทรวิชัย 44150
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2551 มัยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนนารีนุกูล จังหวัดอุบลราชธานี
	พ.ศ. 2554 มัยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเบญจะมะมหาราช จังหวัดอุบลราชธานี
	พ.ศ.2558 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม
	พ.ศ.2562 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว