การพัฒนาวิธี Semi-Nested PCR เพื่อใช้ในการตรวจหา *Demodex folliculorum* และ *D. brevis*

Development of Semi-Nested PCR for Detecting *Demodex folliculorum* and *D. brevis*

ปวันรัตน์ ตรีขัน[†1], กัญญรัตน์ กรัยวิเชียร[‡2], อัจฉรา ภูมี[‡3], เผด็จ สิริยะเสถียร[‡§4]

[†] *หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 ประเทศไทย*
[1] pawanrat_1@hotmail.com

[‡] *ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 ประเทศไทย*
[2] iamteaw@yahoo.com
[3] amphumee@gmail.com

[§] *ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย กรุงเทพฯ 10330 ประเทศไทย*
[4] padet.s@chula.ac.th

บทคัดย่อ

ไร *Demodex* จัดเป็นปรสิตภายนอก อาศัยในรูขุมขน มีขนาดเล็ก ซึ่งสามารถพบไรนี้ได้สองสายพันธุ์ในมนุษย์ คือ *Demodex folliculorum* และ *D. brevis* ไรทั้งสองชนิดสามารถแยกกันโดยดูลักษณะภายนอกในระยะตัวเต็มวัย แต่ในระยะอื่นโดยเฉพาะ ไข่ ตัวอ่อนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ทำให้มีปัญหาในการศึกษาทางระบาดวิทยา งานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจหา และจำแนกสายพันธุ์ของไร *Demodex* ที่พบในมนุษย์ ซึ่งได้ทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 18SrRNA โดยที่ยีนตำแหน่งนี้นิยมใช้ในการศึกษาสายวิวัฒนาการในปรสิตจำพวกไร (Acari) เนื่องจากมีความหลายหลายทางพันธุกรรมสูง โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากผิวหนังและเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR ซึ่งจากผลการทดลองสามารถจำแนกไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์ได้และผลของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความแตกต่างกันโดย *D. folliculorum* ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 382 bp และ *D. brevis* ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 317 bp งานวิจัยนี้จะมีประโยชน์พื้นฐานในการพัฒนาศึกษาจำแนกสายพันธุ์ของไร *Demodex* ได้ถูกต้องแม่นยำและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Demodex* และเพื่อการศึกษาทางระบาดวิทยาต่อไปในอนาคต ซึ่งรายงานนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในการนำวิธีทางอณูชีววิทยามาใช้ในการศึกษาไร *Demodex* ที่พบในมนุษย์ในประเทศไทย

คำสำคัญ: *D. folliculorum*, *D. brevis*, เทคนิค Semi-Nested PCR, ยีน 18SrRNA

Abstract

Demodex are tiny ectoparasitic mites, live in sebaceous glands. There are only two species, *D. folliculorum* and *D. brevis* found in human. Identification between both species could be done based on the morphological appearance of the adult stage. However for other stages especially egg and nymph, they are indistinguishable, therefore it causes difficulty for epidemiology study. This present study proposed the using of molecular technique for detecting and differentiation between these two human *Demodex* species. Primers were designed based on 18SrRNA gene of human *Demodex* mites. The 18SrRNA gene is usually used for Acari arthropods evolution studies because of its high variability. Total DNA was extracted from skin samples and was used to amplify the human *Demodex* mite by using Semi-Nested PCR. The PCR was able to amplify the 18SrRNA gene from both human *Demodex* mite species with approximately 382 bp and 317 bp for *D. folliculorum* and *D. brevis*, respectively. The data obtained from the study provides fundamental data for accurate identification of the human *Demodex* species and determine the genetic variation of human *Demodex* and therefore for further epidemiological study in the future. In addition, this report is the first study using molecular techniques to investigate human *Demodex* in Thailand.

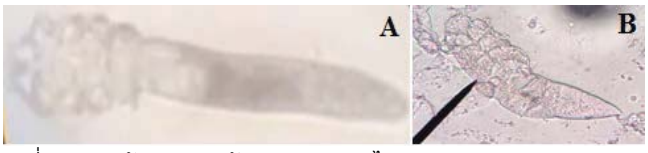
Keywords: *D. folliculorum*, *D. brevis*, Semi-Nested PCR, 18SrRNA gene

1. บทนำ

ไร *Demodex* เป็นปรสิตชนิดหนึ่ง จัดอยู่ใน Class: Arachnida, Order: Acarina, Family: Demodicidea ในปัจจุบันพบว่าไรชนิดนี้มีมากกว่า 140 สายพันธุ์ ซึ่งอาศัยอยู่กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้หลายชนิด เช่น แมว สุนัข หมู แพะ กวาง เป็นต้น ไร *Demodex* ที่มีความสำคัญและพบในมนุษย์ มี 2 สายพันธุ์ คือ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ซึ่งไร *Demodex* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีแหล่งที่อยู่อาศัยแตกต่างกัน โดย *D. folliculorum* จะอาศัยอยู่บริเวณรูขุมขน ลำตัวจะมีลักษณะยาว ขนาดประมาณ 0.3-0.4 มิลลิเมตร ดูดกินสารอาหารบริเวณรากขนเป็นอาหาร (sebum) ในขณะที่ *D. brevis* มีลักษณะรูปร่างเป็นกระสวยลักษณะอ้วนสั้น ความยาวประมาณ 0.2- 0.3 มิลลิเมตร [1] และอาศัยอยู่ในบริเวณต่อมไขมันที่เชื่อมต่อกับรูขุมขน หรือ Sebaceous glands (รูปที่ 1)

D. folliculorum และ *D. brevis* ก่อให้เกิดการระคายเคืองและอักเสบบริเวณที่ปรสิตเคลื่อนที่เรียกว่า โรค demodicosis โดยอาการของโรคนี้พบได้หลายรูปแบบที่ผิวหนัง เช่น ผื่นผิวหนังอักเสบร่วมกับรอยแดง

(Rocacea) ใบหน้าแดง (Erythema) ตุ่มแดงรอบรูขุมขน (Peri-follicular papules) ร่วมกับการมีขุยบริเวณใบหน้า ตำแหน่งที่พบบ่อยจะอยู่ที่บริเวณที่มีไขมันมาก เช่น ใบหน้า คาง แก้ม หน้าผาก บริเวณรอบๆจมูก เปลือกตา ใบหู และรูหูชั้นนอก [2] มีรายงานการสำรวจผิวหน้าในคนปกติพบว่ามีความชุกของ *Demodex* 35-100% โดยมีจำนวนตัวไรน้อยกว่า 5 ตัวต่อพื้นที่ผิวหนัง 1 ตารางเซนติเมตร แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า มีโทษหรือก่อให้เกิดปัญหากับผิวหนังหรือไม่ เนื่องจากตัวไรนี้สามารถพบได้ทั้งในสภาวะปกติหรือพบในคนที่เป็นโรคผิวหนังบางชนิดร่วมด้วย เมื่อมีอายุเพิ่มมากขึ้นจะพบตัวไรเพิ่มขึ้น [3-4] และพบว่าในคนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง อาจพบตัวไรเพิ่มมากขึ้นได้ [5] ไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์นี้จะก่อโรคแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของไร *Demodex* ซึ่งการแยกลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่าง *D. folliculorum* และ *D. brevis* นั้นค่อนข้างยาก เนื่องจากมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก จึงจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการจำแนกไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกัน ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และแยกสายพันธุ์ของไร *Demodex* โดยศึกษาทั้งยีนในนิวเคลียสและในไมโตคอนเดรีย ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลการศึกษาทางอณูชีววิทยา งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของไร *Demodex* ที่พบในผิวหนังของมนุษย์ที่ตำแหน่งยีน 18S ribosomal RNA (18SrRNA) ด้วยวิธี Semi-Nested PCR ซึ่งตำแหน่งยีน 18SrRNA ได้มีการศึกษาว่ามีประโยชน์ต่อการแยกสายวิวัฒนาการของพวกตระกูลไร รวมทั้งเหมาะสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ ใน super family Cheyletoidea [6-8] วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนาวิธีการวินิจฉัยในระดับโมเลกุลของเชื้อไร *Demodex* ที่พบในมนุษย์ รวมทั้งสามารถจำแนกสายพันธุ์ของไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์ได้โดยใช้เทคนิค Semi-Nested PCR



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไร *D. folliculorum* (A) และ *D. brevis* (B)

2. วิธีการศึกษาและวิธีการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่างไร *Demodex*

ทำการเก็บตัวอย่างไร *Demodex* โดยการใช้วิธี Skin scraping โดยนำขุยของผิวหนังบริเวณที่ขูดได้ มาวางบนสไลด์ทำการหยดสารละลาย 10% KOH (Patassium hydroxide) นำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ นำตัวอย่างที่พบ *Demodex* ไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด kit ของ ®Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitek, Germany)

2.2 การออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 18SrRNA

ขั้นตอนแรกทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไร *Demodex* สายพันธุ์ *D. folliculorum* และ *D. brevis* ซึ่งยีนที่สนใจในการศึกษาสิ่งมีชีวิตชนิดนี้ คือ ยีนในนิวเคลียส หรือ 18SrRNA จากฐานข้อมูลสากล (Genbank) (URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18SrRNA ของ *Demodex* แต่ละสายพันธุ์ เช่น *D. folliculorum* (accession no. GU377177, HQ728000, JN885464 และ JN885463) *D. brevis* (accession no. GU377178, HQ727999, JN885466 และ JN885465) และ *D. canis* (accession no. JN885469, HQ727998, JN885468 และ JN885467) และ มนุษย์ (Human) (accession no. AP000902 และ AL390066) เพื่อไม่ให้เกิดการจับกันของ DNA มนุษย์ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.81 ทำการ alignment เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด เลือกบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดโดยสามารถจับไร *Demodex* ได้ทั้งสองสายพันธุ์ เพื่อออกแบบ forward และ reverse primer ขนาดประมาณ 17-30 เบส และคำนวณค่า Tm (Melting temperature) ของไพร์เมอร์จากสูตร Tm=2(A+T)+4(G+C) ซึ่งไพร์เมอร์ที่ออกแบบควรมีค่า Tm ใกล้เคียงกัน จากนั้นเข้าโปรแกรมตรวจสอบลักษณะของไพร์เมอร์ (โปรแกรม Oligocal) ตรวจหาการเกิด Hairpin และ self-complementary

2.3 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยอาศัยเทคนิค Semi-nested PCR

การเพิ่มจำนวนของ DNA โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีน 18SrRNA (ตารางที่ 1) ซึ่งส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย double distilled water (ddH_2O) จำนวน 9.3 µl, 10x*Taq* buffer จำนวน 2.5 µl, 2mM dNTPs จำนวน 2.5 µl, 25 mM $MgCl_2$ จำนวน 2.5 µl, ไพร์เมอร์แต่ละข้างจำนวน 1 µl, และ 1 unit of *Taq* DNA polymerase จำนวน 0.2 µl (Fermentas, Pittsburgh, PA), DNA ตัวอย่าง จำนวน 5 µl ได้ปริมาตรสุดท้ายคือ 25 µl จากนั้นนำไปเข้าเครื่องปรับอุณหภูมิ (Thermal cycle) ภายใต้อุณหภูมิดังนี้ initial denaturation เวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 95 ^{o}C, 35 รอบของขั้นตอน denaturation เวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 95 ^{o}C ขั้น annealing เวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 54.7 ^{o}C, ขั้นตอน extension เวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}C และ ขั้น extension สุดท้ายเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 72^{o}C

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์

ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (5´ไป 3´)
Dm2 F	5´ TAA CAG GTG ACG GGG AAT C-3´
Dmm2 R	5´ TAG TGG TTG ACC CAA TAA CA-3´
DDm2 R	5´ AAC ACY CGG TAA AGA GC-3´

การตรวจสอบผลของผลิตภัณฑ์ PCR ใช้วิธี Gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% Agarose gel แถบของDNA จะถูกแยกผ่านกระแสไฟฟ้า

100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นทำการย้อม Agarose gel ด้วย 0.5 µg/ml Ethidium bromide แล้วนำไปส่องด้วยแสง Ultraviolet จะทำให้สามารถมองเห็นแถบของ DNA ได้ ซึ่งเราจะทราบขนาดของ DNA โดยการเปรียบเทียบกับ DNA marker ทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ได้ ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้คือ 317 bp และ 382 bp

2.4 การโคลนนิ่งยีนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Demodex* ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA [10-11]

2.4.1 การโคลนนิ่งยีน 18S rRNA

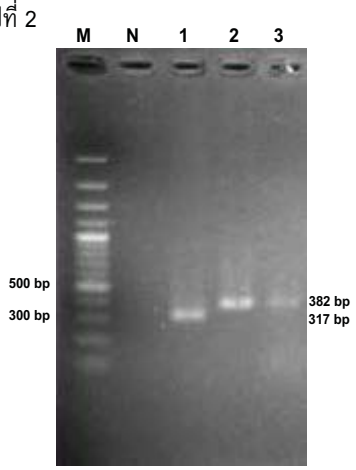
ทำการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 317 bp และ 382 bp โดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาณ 0.75 µl เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์(DNA ligation) โดยอาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase เป็นตัวทำปฏิกิริยาในการเชื่อมต่อ เพื่อให้เกิดเป็น DNA ลูกผสม(recombinant DNA) ซึ่งเริ่มต้นโดยการนำ DNA จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 317 bp และ 382 bp จำนวนปริมาณ 0.75 µl มาเชื่อมกับ DNA พาหะ(vector) ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ pGEM®-T Easy Vector System ของบริษัท Promega®, USA โดยทำตามขั้นตอนของบริษัท หลังจากได้ Recombinant DNA แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ การ Transformation เป็นการนำเข้าสู่ host cell ซึ่งในที่นี้จะใช้ *Escherichia coli* DH5α สภาพเหมาะสมที่พร้อมจะรับ recombinant DNA เข้าไปเพื่อเพิ่มจำนวน ให้มีปริมาณมาก ต่อมาทำการคัดเลือกชิ้นส่วนของ DNA ที่สนใจ โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar ที่มีส่วนผสมของยาแอมพิซิลิน 100 µg/ml, Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วทำการคัดเลือกโคโลนี ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม (blue/white screen) โดยคัดเลือกจากโคโลนีสีขาวที่เกิดขึ้นเนื่องจาก lac Z gene ได้รับชิ้นส่วน DNA เข้าไปแทรก จึงไม่สามารถผลิตเอนไซม์ ß–galactosidase ได้ ดังนั้นจึงไม่มีเอนไซม์ที่สามารถมาย่อย X-Gal ที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จึงเกิดเป็นโคโลนีสีขาวขึ้น ขั้นตอนต่อมาทำการตรวจสอบผลการโคลนด้วยเทคนิค colony PCR โดยทำการตรวจสอบโคโลนีที่เราสนใจว่ามีชิ้นส่วนของ DNA ที่สนใจแทรกอยู่หรือไม่ ในที่นี้จะใช้โคโลนีสีขาวที่ต้องการยืนยันเป็น DNA template ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR เช่นเดิม ทั้งนี้จะทำการ culture โคโลนีดังกล่าวที่มีชิ้นส่วนของยีนที่เราสนใจมาเลี้ยงในอาหาร LB broth ปริมาตร 5 ml ที่มีส่วนผสมของยาแอมพิซิลิน100 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ หลังจากนั้นนำไปทำการสกัดพลาสมิดDNA

2.4.2 การสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการสกัดพลาสมิดDNA ด้วยชุด kit ของบริษัท Invisorb® Spin Plasmid Mini Kit (Stratec Molecular GmbH, Berlin) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (nanodrop 1000 spectrophotometer; Thermo Scientific,USA) เพื่อวัดความเข้มข้นและคุณภาพของผลผลิตที่ได้ ซึ่งในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ได้รับการวิเคราะห์จากบริษัท GENEWIZ. Inc โดยมีบริษัท Prima Sciencetific CO.,LTD. เป็นตัวกลางในการจัดส่งตัวอย่าง เมื่อได้ข้อมูลแล้วทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม nucleotide blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าความเหมือนหรือความคล้ายคลึง จะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18SrRNA นำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไร *Demodex* จากฐานข้อมูลสากล (GenBank) ซึ่งจะแสดงผลออกมาในค่าของเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(percentage identities)

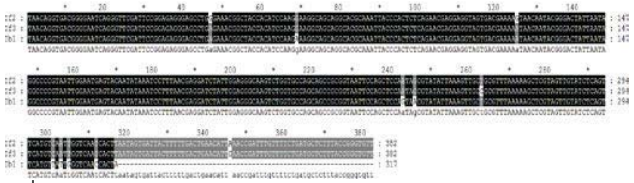
3. ผลการศึกษา

ไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์ มีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR แตกต่างกัน ซึ่ง *D. folliculorum* มีขนาด 382 bp ในขณะที่ *D. brevis* มีขนาด 317 bp ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ของไร *Demodex* ที่ตำแหน่งยีน 18SrRNA บน 1.5% Agarose gel ซึ่ง Lane M คือ DNA ขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, Lane N คือ Negative control โดยใช้น้ำ ddH_2O, Lane 1 คือ ตัวอย่างที่พบว่าเป็น *D. brevis*, Lane 2–3 คือ ตัวอย่างที่พบว่าเป็น D. *folliculorum*

หลังจากนั้นได้นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 382 bp และ 317 bp ไปทำการตรวจสอบด้วยการโคลนนิ่งเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันดังรูปที่ 3 เมื่อนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์โดยเทียบกับฐานข้อมูลสากล (GenBank) พบว่า *D. brevis* มีค่า percentage identities 99% และสำหรับ *D. folliculorum* นั้นพบว่ามีค่า percentage identities 99% เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าไพร์เมอร์ที่ทำการออกแบบนี้มีความจำเพาะกับ DNA ของ *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์ คือ *D. folliculorum* และ *D. brevis* และจะทำการศึกษาเพื่อดูความหลากหลายทางพันธุกรรมของไร *Demodex* ต่อไปในอนาคตโดยทำการศึกษาจากอาสาสมัครคนไทยโดยใช้วิธีตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR เพื่อความถูกต้องและแม่นยำ



รูปที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *D. brevis* (Db1) และ *D. folliculorum* (Df2, Df3)

4. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าการใช้เทคนิค Semi-Nested PCR สามารถแยกความแตกต่างของไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ สรุปได้ว่าไพร์เมอร์ที่ออกแบบนี้มีความจำเพาะต่อไร *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์และข้อมูลดังกล่าวจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปศึกษาในระดับโมเลกุลของไร *Demodex* ได้และสามารถนำไปศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของไร *Demodex* ในประเทศไทยต่อไปได้ในอนาคต

5.ผลที่คาดว่าจะได้รับ

จากข้อมูลในการศึกษานี้สามารถนำประโยชน์ของการออกแบบไพร์-เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไร *Demodex* ที่พบในมนุษย์นี้ นำไปใช้ในการศึกษาในกรณีที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถระบุสายพันธุ์ที่แน่นอนหรือตัวอย่างมีลักษณะสัณฐานวิทยาไม่สมบูรณ์ ทำให้ไม่สามารถแยกโดยการดูผ่านกล้องจุลทรรศน์อย่างชัดเจนได้ รวมทั้งสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Demodex* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ. พญ. กัญญรัตน์ กรัยวิเชียร และ รศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ เจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการจัดอุปกรณ์ทางการวิจัย เพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

[1] Lacy N, Kavanagh K, Tseng SC. 2009. Under the lash: *Demodex* mites in human diseases. Biochem (Lond) 31(4): 2-6.

[2] Baima B, Sticherling M. 2002. Demodicidosis revisited. Acta Derm Venereol 82(1): 3-6.

[3] Andrews JR. 1982. The prevalence of hair follicle mites in

[4] Caucasian New Zealanders. N Z Med J 95(711): 451-3.

[5] Aylesworth R, Vance JC. 1982. *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* in cutaneous biopsies. J Am Acad Dermatol 7(5): 583-9.

[6] Damian D, Rogers M. 2003. *Demodex* infestation in a child with leukaemia: treatment with ivermectin and permethrin. Int J Dermatol 42(9): 724-6.

[7] Daberta M, Witalinskib W, Kazmierskic A, Olszanowski Z, Dabert J. 2010. Molecular phylogeny of acariform mites (Acari, Arachnida): strong conflict between phylogenetic signal and long-branch attraction artifacts. Mol Phylogenet Evol 56: 222–41.

[8] Murrell A, Dobson SJ, Walter DE, Campbell NJH, Shao R, Barker SC. 2005. Relationships among the three major lineages of the Acari (Arthropoda: Arachnida) inferred from small subunit rRNA: paraphyly of the Parasitiformes with respect to the Opilioacariformes and relative rates of nucleotide substitution. Invert Syst 19: 383-9.

[9] Zhao YE, Xu JR, Hu L, Wu LP, Wang ZH. 2012. Complete sequence analysis of 18S rDNA based on genomic DNA extraction from individual *Demodex* mites (Acari: Demodicidae). Exp Parasitol 131(1): 45–51.

[10] T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001, 5.40.

[11] S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief Bioinform, 2004, **5**(2): 150-63.