

MOLECULAR INVESTIGATION OF KNOCKDOWN RESISTANCE MUTATION IN HEAD LICE (*PEDICALUS HUMANS CAPITIS*) FROM ELEMENTARY SCHOOL CHILDREN IN LOPBURI AND SING BURI PROVINCES, THAILAND

Siriluk CHAMSRI¹, Sakone SUNANTARAPORN², Narisa BROWNNELL² and Padet SIRIYASATIEN²

1 Medical Science program, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand

2 Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
babytaem@gmail.com (Corresponding Author)

ARTICLE HISTORY

Received: 7 April 2025

Revised: 21 April 2025

Published: 6 May 2025

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the *kdr* mutations in head louse (*Pediculus humanus capitis*). A total of 74 head lice samples were collected from primary school students in Lop Buri and Sing Buri provinces, Thailand, from grades 1 to 6. A total of 40 head samples (54.5%) were collected from Lop Buri, while 34 samples (45.95%) were obtained from Sing Buri. The present study has analyzed the mutation patterns of drug resistance genes in pyrethroids at the T917I codon using the PCR-RFLP technique. The results showed that head louse with a mutation at codon T917I in the voltage sensitive sodium channel (VSSC) gene had a mutation rate, which was 81.08%. Genotypic analysis showed that the most common pattern was homozygous resistant (R/R) (81.08%), followed by heterozygous resistant (R/S) at 10.81% and homozygous susceptible (S/S) at 8.11%. The mutation frequency was 0.86. In addition, the Hardy-Weinberg analysis showed that the head lice population in Lopburi province was out of equilibrium, while the population in Sing Buri province was in equilibrium. The results of this study indicate the need to improve head louse control methods in Thailand by reducing the use of pyrethroids and developing integrated control methods, such as the use of other insecticides from natural sources, as well as continuous monitoring for resistance gene mutations.

Keywords: *Pediculus humanus capitis*, *permetrin* resistance, PCR-RFLP

CITATION INFORMATION: Chamsri, S., Sunantaraporn, S., Brownnell, N., & Siriyasatien, P. (2025). Molecular Investigation of Knockdown Resistance Mutation in Head Lice (*Pedicalus humans capitis*) from Elementary School Children in Lopburi and Sing Buri Provinces, Thailand. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 3(5), 57

การศึกษาทางอนุชีววิทยาของยีนดื้อยาในเหาศีรษะ (*PEDICULUS HUMANUS CAPITIS*) ที่เก็บจากเด็กนักเรียนชั้นประถมศึกษาในพื้นที่จังหวัดลพบุรีและสิงห์บุรีของประเทศไทย

ศิริลักษณ์ แจ่มศรี¹, สกล สุนันทราภรณ์², นริศ บราวเนล² และ เฟดจ์ สิริยะเสถียร²

1 หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; babytaem@gmail.com (ผู้ประพันธ์
บรรณกิจ)

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนดื้อยาในเหาศีรษะ (*Pediculus humanus capitis*) ที่เก็บจากนักเรียนประถมศึกษาปีที่ 1 ถึงปีที่ 6 ในจังหวัดลพบุรีและสิงห์บุรีของประเทศไทย ได้ทำการเก็บตัวอย่างเหาศีรษะทั้งหมด 74 ตัวอย่าง จากจังหวัดลพบุรี 40 ตัวอย่าง (54.5%) และจังหวัดสิงห์บุรี 34 ตัวอย่าง (45.95%) ตรวจสอบรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม pyrethroids ที่ตำแหน่งโคดอน T917I โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ผลการศึกษาพบว่าเหาศีรษะมีอัตราการดื้อยาสูงถึง 81.08% โดยมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน T917I บนยีน *voltage-sensitive sodium channel* (VSSC) การวิเคราะห์ลักษณะจีโนไทป์ พบว่า มีรูปแบบ homozygous resistant (R/R) มากที่สุด (81.08%) รองลงมาคือ heterozygous resistant (R/S) 10.81% และ homozygous susceptible (S/S) 8.11% ความถี่ของการกลายพันธุ์โดยอยู่ที่ 0.86 นอกจากนี้การวิเคราะห์แบบ Hardy-Weinberg แสดงให้เห็นว่า ประชากรเหาในจังหวัดลพบุรี มีการเบี่ยงเบนจากสมดุล ในขณะที่ประชากรในจังหวัดสิงห์บุรีอยู่ในสมดุล ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการปรับปรุงวิธีการควบคุมเหาศีรษะในประเทศไทย โดยลดการใช้สารกลุ่ม pyrethroids และพัฒนาวิธีการควบคุมแบบผสมผสาน เช่น การใช้สารกำจัดแมลงกลุ่มอื่นๆ ที่มาจากธรรมชาติ รวมถึงการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของยีนดื้อยาอย่างต่อเนื่อง

คำสำคัญ: เหาศีรษะ, ยีนดื้อยา, เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ข้อมูลการอ้างอิง: ศิริลักษณ์ แจ่มศรี, สกล สุนันทราภรณ์, นริศ บราวเนล และ เฟดจ์ สิริยะเสถียร. (2568). การศึกษาทางอนุชีววิทยาของยีนดื้อยาในเหาศีรษะ (*Pediculus humanus capitis*) ที่เก็บจากเด็กนักเรียนชั้นประถมศึกษาในพื้นที่จังหวัดลพบุรีและสิงห์บุรีของประเทศไทย. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 3(5), 57

บทนำ

เหาศีรษะ (*P. humanus capitis*) เป็นปรสิตจำเพาะที่อาศัยอยู่บนศีรษะของมนุษย์ มีวงจรชีวิตแบบไม่สมบูรณ์ มีทั้งหมด 3 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ (egg) ระยะตัวอ่อน (nymph) และระยะตัวเต็มวัย (adult) เหาสสามารถดูดเลือดได้ตั้งแต่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 หรือหลังจากการฟักตัวออกจากไข่ เหาศีรษะเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในหลายๆประเทศทั่วโลก โรคเหาสามารถติดต่อได้ง่ายจากการใกล้ชิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กวัยเรียน (ช่วงอายุ 3-11 ปี) สามารถพบได้ในทุกกลุ่มทางสังคม และเศรษฐกิจ มักเกิดในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย เนื่องจากลักษณะผมที่ยาว แม้ว่าโรคเหาจะไม่ได้ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรง แต่ส่งผลกระทบต่อให้เกิดความรำคาญและรบกวนการใช้ชีวิตประจำวันได้ โดยเกิดจากการพ่นน้ำลายของเหา น้ำลายเหาทำให้เกิดอาการคันและระคายเคืองที่บริเวณหนังศีรษะ ส่งผลให้เด็กที่เป็นโรคเหาเสียสมาธิในการเรียนหรือ รบกวนการนอน ส่วนในรายที่เป็นโรคเหาระดับรุนแรงจะมีอาการคันอย่างรุนแรงและเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมได้ โรคเหาทำให้เกิดการอายในการเข้าสังคม ไม่มั่นใจในตัวเอง และ นอกจากการติดเชื้อเหาจะก่อความรำคาญต่อผู้ป่วยโดยตรงแล้ว ในปัจจุบันยังพบว่าเหาอาจเป็นพาหะนำโรค typhus และ trench fever อีกด้วย สำหรับในประเทศไทย การติดเชื้อเหาศีรษะพบได้ทั่วไป พบมากในเด็กวัยเรียน โดยเฉพาะเด็กในโรงเรียนชนบทห่างไกล ในปัจจุบันจึงมีวิธีกำจัดเหาศีรษะหลากหลายวิธียากำจัดเหาโดยทั่วไปที่วางจำหน่าย มักเป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่มยาฆ่าแมลง ได้แก่ phenothrin, permethrin, malathion และ carbaryl เป็นต้น permethrin ได้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในหลายสิบปีจนถึงปัจจุบัน ซึ่งได้พบว่ามีสารรายงานการติดเชื้อเหาซ้ำ และมีการเกิดการดื้อต่อสาร permethrin เพิ่มขึ้น ในการเกิดการติดเชื้อซ้ำหลังการรักษายังคงเป็นปัญหาในประเทศไทย จากรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าอัตราการแพร่ระบาดของเชื้อเหาหลังการรักษาด้วยยาฆ่าเหา ในเด็กนักเรียนในกรุงเทพมหานคร อยู่ที่ประมาณ 60% จากนั้นเริ่มมีงานวิจัยที่สำรวจและศึกษาปริมาณการดื้อต่อสาร permethrin ในประเทศต่างๆ การดื้อของเหาแบบ knockdown resistance (*kdr*) การวิเคราะห์ระดับโมเลกุลเป็นหนึ่งในเทคนิคที่นิยมใช้มากที่สุดในการตรวจสอบการดื้อต่อยาในกลุ่ม pyrethroids ในแมลง โดยมีวัตถุประสงค์การวิจัยเพื่อ 1) ตรวจสอบยีนดื้อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มเพอร์เมทริน (permethrin) ของเหาศีรษะจากพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย 2) เพื่อระบุจีโนไทป์ของเหาในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ *homozygous susceptible* (SS), *heterozygous resistant* (RS), และ *homozygous resistant* (RR) ผ่านเทคนิค PCR-RFLP และการหาลำดับพันธุกรรม งานวิจัยนี้ทำการศึกษาเพื่อให้สามารถติดตาม *kdr* ในเหาศีรษะมนุษย์ได้ด้วยวิธี RFLP ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ทำให้เกิดความแม่นยำในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนดื้อยา (*kdr* mutation) ของเหาศีรษะ (*Pediculosis capitis*) และนำไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดเหาศีรษะต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม

เหา (*P. humanus*) เป็นแมลงขนาดเล็กไม่มีปีกและเป็นปรสิตภายนอกที่ต้องอาศัยอยู่บนร่างกายของโฮสต์ โดยเหาในมนุษย์แบ่งเป็น 3 ชนิดหลักๆ ตามบริเวณที่อยู่อาศัยบนร่างกายมนุษย์ คือ เหาศีรษะ (*P. humanus capitis*) อาศัยอยู่บนศีรษะและหนังศีรษะของมนุษย์ เהל้าตัว (*P. humanus corporis*) อาศัยอยู่ตามขนตามร่างกายหรือบนเสื้อผ้าที่สวมใส่ และโลน (pubic louse) จะพบอาศัยอยู่ตามขนที่อวัยวะสืบพันธุ์ (Raoult et al., 2008) เหาศีรษะ (*P. humanus capitis*) เป็นปรสิตจำเพาะที่อาศัยอยู่บนศีรษะของมนุษย์ตลอดวงจรชีวิต โดยวงจรชีวิตของเหาศีรษะเป็นแบบไม่สมบูรณ์ (incomplete metamorphosis) ในวงจรชีวิตประกอบด้วย 3 ระยะ คือ ระยะไข่ (egg หรือ nit) ตัวอ่อน (nymph) และตัวเต็มวัย (adult) เหาจะวางไข่ห่างจากหนังศีรษะประมาณ 1-1.5 เซนติเมตรห่างออกมาจากหนังศีรษะ หลังจากวางไข่ประมาณ 7 วัน ตัวอ่อนระยะ nymph จะฟักออกมาจากไข่และจะมีการลอกคราบทั้งหมด 3 ครั้ง โดยจะลอกคราบครั้งแรกภายใน 2 วันหลังจากฟักออกจากไข่ รวมแล้วใช้เวลาประมาณ 16-18 วัน แล้วจะเจริญเป็นตัวเต็มวัย เหาศีรษะมีอายุประมาณ 30 วัน หากเหาชนิดนี้อยู่นอกตัวมนุษย์จะมีชีวิตอยู่ได้เพียง 1-2 วัน (Di Campli et al., 2012) เหาเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้เล็กน้อย เพศเมียมีขนาดลำตัวยาวประมาณ 3.5-4.5 มิลลิเมตร ส่วนเพศผู้มีขนาดประมาณ 2.5-3.5 มิลลิเมตร เหาแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ส่วนหัวมีลักษณะเรียวยาว และแคบ กว่าส่วน

อก มีตาประกอบขนาดเล็กมาก 1 คู่ มีหนวดสั้นจำนวน 1 คู่ หนวดแต่ละเส้นมี 5 ปล้อง ปากของเหา เป็นแบบแทงดูด (piercing-sucking type) ส่วนนอกของเหาตัวเต็มวัย เชื่อมติดเป็นปล้องเดียวกัน มีรูหายใจ 1 คู่ อยู่ทางด้านหลัง เหามีขาที่สั้น ส่วนปลายขามีปล้องที่ดัดแปลงเป็นตะขอ ใช้ในการยึดเกาะให้ตัวเหาติดแน่นอยู่กับเส้นผมหรือขนของโฮสต์ ส่วนท้องของเหาตัวเต็มวัยมีความยาวประมาณ 3 ใน 5 ของความยาวร่างกายทั้งหมด ปลายสุดของส่วนท้องในเหาเพศผู้มีลักษณะแหลมและมี Aedeagus (penis) ที่เห็นได้ชัด 1 คู่ สำหรับเหาเพศเมีย ส่วนปลายสุดของท้องมีรอยเว้า และมีรูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์อยู่ตรงกลาง (Burkhart, 2007)

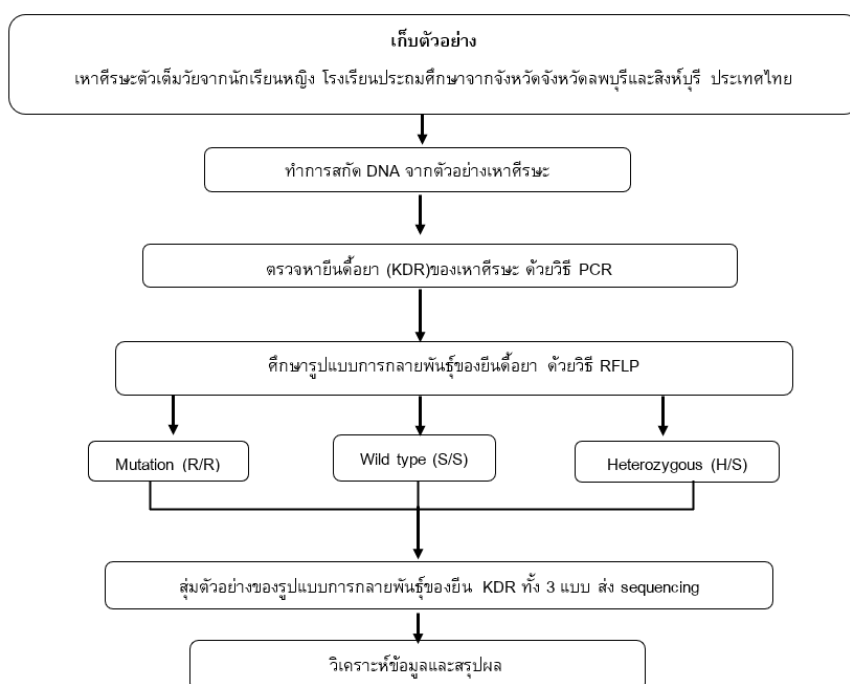
Permethrin เป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่ม pyrethroids มีฤทธิ์รบกวน กระบวนการเปิดและปิดของ sodium channel ทำให้การทำงานของเซลล์ประสาทของเหาค่อยๆ ช้าลงและเป็นอัมพาต ขึ้นกับปริมาณที่ได้รับ แม้ว่าสารเหล่านี้จะเป็นสารที่เกิดพิษได้ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารในกลุ่มยาฆ่าแมลง หรือการใช้ในปริมาณที่น้อยจะค่อนข้างปลอดภัยก็ตาม แต่ก็มีความเสี่ยงที่จะเกิดพิษต่อผู้ใช้ได้ ตลอดจนในปัจจุบันยังพบปัญหาการดื้อยาของเหาที่เพิ่มสูงขึ้น โดยมีกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ คือการเกิดการกำจัดพิษ (detoxification) ของแมลง ทำให้รบกวนการทำงานที่ตัวรับ เช่น acetylcholinesterase หรือ sodium channel ส่งผลให้เกิดความล้มเหลวในการรักษาโรคเหา (Durand et al., 2012)

PCR-RFLP คือ เทคนิควิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่ตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งลำดับเบสเฉพาะ ผลลัพธ์คือได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความยาวแตกต่างกันตามตำแหน่งของการกลายพันธุ์ เมื่อนำไปแยกบนเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะเห็นรูปแบบแถบที่แตกต่างกัน สามารถใช้เปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือการกลายพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจงได้ ต้นทุนต่ำและประหยัดเวลา เมื่อเทียบกับการ sequencing ทุกตัวอย่าง เหมาะกับการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก เหมาะกับงาน surveillance หรือสำรวจความชุก (Brownell et al., 2020) มีความแม่นยำและจำเพาะสูง สามารถตรวจจับการกลายพันธุ์แบบจุดได้อย่างชัดเจนนิยมใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์แบบจุด (point mutation) ในยีนสำคัญต่างๆ (Alsaady et al., 2023) จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่า ในปี 2010 ได้มีการสุ่มตัวอย่างเหาศีรษะจากประเทศไทย ซึ่งไม่พบการตรวจเจอยีนดื้อต่อยา permethrin มาก่อน จากนั้นในปี 2020 Brownell et al. ได้ทำการศึกษาตัวอย่างเหาศีรษะที่ได้เก็บจากเด็กชั้นประถมศึกษาจาก 6 ภูมิภาคของประเทศไทย พบว่า การศึกษานี้เก็บตัวอย่างเหาทั้งหมด 260 ตัวอย่าง จาก 15 จังหวัด ใน 6 ภูมิภาคของประเทศไทย โดยการใช้เทคนิค Restriction fragment length polymorphism และ sequencing เพื่อระบุการกลายพันธุ์ของ kdr T917I ผลการศึกษาพบแบบทางพันธุกรรมสามรูปแบบ ได้แก่ homozygous susceptible (SS), heterozygous genotype (RS) และ homozygous resistant (RR) จาก 260 ตัวอย่างจากการศึกษานี้ 156 (60.00%) เป็น SS, 58 (22.31%) เป็น RS และ 46 (17.69%) เป็น RR สรุปได้ว่าจากผลการศึกษาครั้งนี้ครั้งแรกที่ตรวจพบการดื้อยา permethrin ในเหาของมนุษย์จากประเทศไทย

สมมติฐานการวิจัย

- 1) เหาศีรษะจากพื้นที่จังหวัดลพบุรีและจังหวัดสิงห์บุรีของประเทศไทยพบยีนดื้อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มเพอร์เมทริน (permethrin)
- 2) สามารถระบุจีโนไทป์ของเหาในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ homozygous susceptible (S/S), heterozygous resistant (R/S), และ homozygous resistant (R/R) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติและตรวจสอบโดยคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย (COA no. 1511/2024) การศึกษานี้ได้รับการชี้แจงให้ผู้เข้าร่วมผู้ปกครองหรือผู้ดูแลรับทราบและได้รับความยินยอมอย่างเป็นทางการ

สกัดดีเอ็นเอเหาศีรษะ โดยใช้ชุดสกัด DNA extraction kit, Invisorb® spin tissue mini kit (STRATEC molecular GmbH, Berlin, Germany) ใส่ elution buffer ปริมาตร 40 µl เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ -20°C ก่อนนำดีเอ็นเอไปใช้ในการทำ PCR

การตรวจหายีนดื้อยาในตัวอย่าง DNA เหาศีรษะ ทำการเพิ่มจำนวนยีน knockdown resistance (kdr) ที่ตำแหน่ง T929I ด้วยวิธี PCR โดยมีส่วนประกอบของการทำ PCR ได้แก่ PCR buffer, dNTPs, MgCl₂, Taq DNA polymerase, DW, primer และ DNA template 3 µl โดย PCR condition สำหรับตรวจหายีนดื้อยา *kdr* ของเหาศีรษะมีดังนี้ ขั้นตอน Initial denaturation 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที, denaturation 95 องศาเซลเซียส เวลา 45 วินาที, Annealing 55 องศาเซลเซียส เวลา 45 วินาที, Extension 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ ในขั้นตอน denaturation จนถึง Extension และขั้นตอน Final extension 72 องศาเซลเซียส เวลา 7 นาที จากนั้นเมื่อครบเวลาจะทำการตรวจและวิเคราะห์ผลของ PCR product โดยใช้ 1.5% Agarose gel electrophoresis ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจะนำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วย Ethidium bromide โดย Ethidium bromide จะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างสาย DNA เมื่อนำไปส่องด้วยแสง Ultraviolet จะสามารถมองเห็นแถบของ DNA ได้ ซึ่งเราจะทราบขนาดของ DNA โดยการเปรียบเทียบกับ DNA marker ซึ่งจะมีขนาดประมาณ 332 bp

การวิเคราะห์รูปแบบการดื้อยาด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

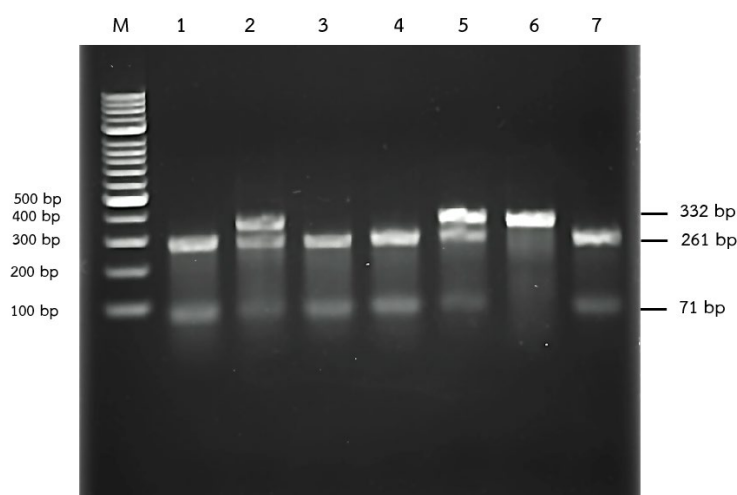
นำ PCR product ที่มีส่วนของยีนดื้อยา *kdr* ขนาด 332 bp มาตัดด้วย restriction enzyme ที่มีชื่อว่า SspI โดย enzyme ดังกล่าวนี้นี้จะมีตำแหน่งตัดที่เป็น AAT⁺ATT ซึ่งส่วนประกอบที่ใช้ในการทำมี 10X buffer G, SspI restriction enzyme, DW, PCR product โดยทำการ incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจะทำการ inactivated

enzyme ที่ได้จากทรานส์ฟอร์มาซัน (*kdr*) ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการศึกษารูปแบบการตัดด้วยวิธีการรันตัวอย่างบน 2% agarose gel electrophoresis ที่ 90 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย Ethidium bromide ตรวจสอบรูปแบบด้วยการส่องภายใต้แสง UV โดยจะพบว่าลักษณะที่เป็น mutation allele (R/R) จะมี 2 ขนาด คือ 71 และ 261 bp ส่วนลักษณะที่เป็น Heterozygous allele (R/S) จะมี 3 ขนาด คือ 71, 261 และ 332 bp และลักษณะที่เป็น wild type allele (S/S) จะมี 1 ขนาด คือ 332 bp ซึ่งไม่ถูกตัดด้วย *SspI* restriction enzyme

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ทำการส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะได้รับการวิเคราะห์ข้อมูลจากบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ โดยมีบริษัท เอ็นพี เคมีคอล ชีวพลายจำกัด เป็นตัวแทนในการจัดส่งตัวอย่าง นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมออนไลน์ nucleotide blast (BLASTN) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ตัดเอาเฉพาะส่วนของยีนที่เราต้องการแล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *kdr* ของเหาศัตรูจากฐานข้อมูลใน GenBank ทำการวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย มัชยฐาน ใช้เป็นสถิติในการจัดอันดับข้อมูล วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการตรวจหายีนดื้อยาด้วย % Sensitivity และ % Specificity วิเคราะห์ค่าความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor เวอร์ชัน 7.2.5 โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *kdr* ของเหาศัตรูจากฐานข้อมูลใน GenBank

ผลการวิจัย

จากการตรวจหายีนดื้อยาในตัวอย่าง DNA เหาศัตรู (*kdr*) และนำไปการวิเคราะห์รูปแบบการตัดด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) พบรูปแบบดังนี้ ลักษณะที่เป็น Mutation allele (R/R) จะมี 2 ขนาด คือ 71 และ 261 bp ส่วนลักษณะที่เป็น Wild type allele (S/S) จะมี 1 ขนาด คือ 332 bp และลักษณะที่เป็น Heterozygous allele (R/S) จะมี 3 ขนาด คือ 71, 261 และ 332 bp ดังภาพที่ 2



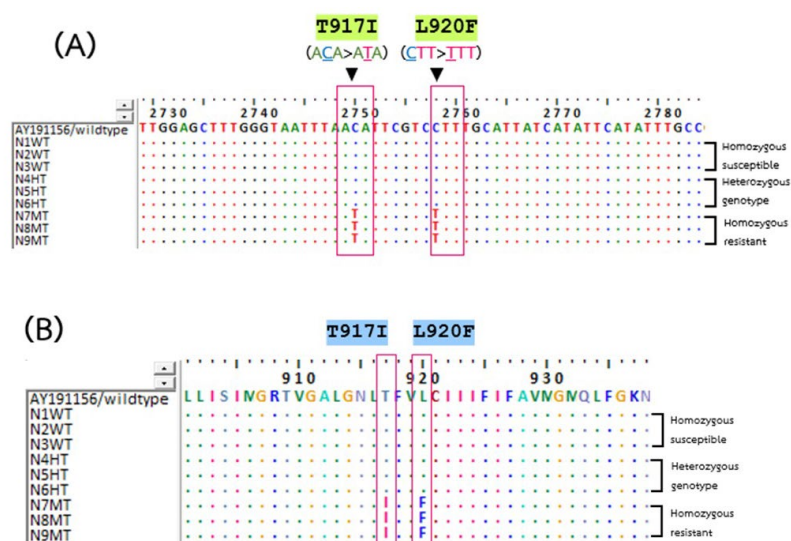
ภาพที่ 2 ผลของยีนดื้อยา *kdr* ที่ถูกตัดด้วย *SspI* restriction enzyme: ช่องที่ 1, 3, 4, 7 ได้ผลเป็น mutation allele (R/R) มี 2 ขนาด คือ 71 และ 261 bp; ช่องที่ 6 ได้ผลเป็น wild type allele (S/S) จะมี 1 ขนาด คือ 332 bp; ช่องที่ 2, 5 ได้ผลเป็น Heterozygous allele (R/S) จะมี 3 ขนาด คือ 71, 261 และ 332 bp

ผลการศึกษาดัชนีพันธุศาสตร์ทั้งหมด 74 ตัวอย่าง จากจังหวัดลพบุรี 40 ตัวอย่าง และจังหวัดสิงห์บุรี 34 ตัวอย่าง พบว่าลักษณะที่เป็น Wild type allele (S/S) พบ 6 ตัวอย่าง (8.11%) Heterozygous allele (R/S) พบ 8 ตัวอย่าง (10.81%) และ mutation allele (R/R) 60 ตัวอย่าง (81.08%) ความถี่ของยีนกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง T917I โดยรวมอยู่ที่ 0.86 จาก 2 จังหวัด คือ จังหวัดลพบุรี และสิงห์บุรี จากการวิเคราะห์แบบจำลอง Hardy-Weinberg (H-W) พบว่า จังหวัดลพบุรี มีการเบี่ยงเบนจากสมดุล Hardy-Weinberg ในขณะที่ จังหวัดสิงห์บุรี อยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg ค่า F_{is} ของจังหวัดลพบุรี มีค่ามากกว่า 0 แสดงถึงภาวะที่มีโฮโมไซโกตมากเกินไปกว่าที่คาดหวัง และจังหวัดสิงห์บุรี มีค่า F_{is} เท่ากับ 0 ดังที่แสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1

จังหวัด	จำนวน ตัวอย่าง	KDR				HW (χ^2)	F_{is}
		Mutation allele	Wild type allele	Heterozygous allele	Frequency		
		R/R (%)	S/S (%)	R/S (%)	of mutation		
ลพบุรี	40	26(65)	6(15)	8(20)	0.75	8.71	0.46
สิงห์บุรี	34	34(100)	0(0)	0(0)	1	0	0

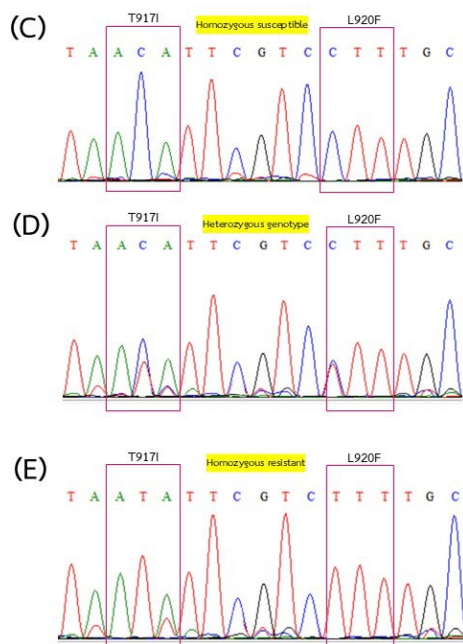
จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนได้ที่นำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดื้อยา *kdr* ของเห็บศัตรูจากฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor เวอร์ชัน 7.2.5 โดยเลือกขั้นตอน ClustalW *Pediculus humanus capitis* (accession no. AY191156) ซึ่งพบพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีการกลายพันธุ์สำคัญสองตำแหน่ง คือ T917I มีการเปลี่ยนแปลงจาก (C→T) ACA ไปเป็น ATA ซึ่งส่งผลให้กรดอะมิโน Threonine (T) เปลี่ยนเป็น Isoleucine (I) และ L920F มีการเปลี่ยนแปลงจาก (C→T) CTT เป็น ITT ทำให้กรดอะมิโน Leucine (L) เปลี่ยนเป็น Phenylalanine (F) โดยแถวด้านบนแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ดั้งเดิม (AY191156/wildtype) N1WT, N2WT, N3WT: เป็นตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous susceptible N4HT, N5HT, N6HT: เป็นตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous N7MT, N8MT, N9MT: เป็นตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous resistant แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (A) และลำดับกรดอะมิโน (B) ของเห็บศัตรูในจังหวัดลพบุรีและสิงห์บุรี

จากผล Chromatograms แสดงลักษณะจีโนไทป์ที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4C) Homozygous Susceptible ตำแหน่ง T917I ลำดับเบสที่ตำแหน่งนี้เป็น ACA (Threonine, T) ซึ่งตรงกับ wild type และไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง L920F ลำดับ

เบสที่ตำแหน่งนี้เป็น CTT (Leucine, L) ซึ่งยังคงเหมือนกับ wild type โดยลักษณะของกราฟมีเพียงพีคเดียวในแต่ละตำแหน่งและไม่มีการซ้อนกันของพีค ซึ่งแสดงได้ว่าเป็น homozygous susceptible (ภาพที่ 4D) Heterozygous genotype ตำแหน่ง T917I มีลำดับเบสทั้ง ACA (wildtype) และ ATA (mutant) ซึ่งบ่งบอกถึงการกลายพันธุ์บางส่วน (heterozygous) ตำแหน่ง L920F มีลำดับเบสทั้ง CTT (wildtype) และ TTT (mutant) เช่นกัน โดยลักษณะของกราฟคือ มีพีคสองสีซ้อนกันในแต่ละตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ (หนึ่งพีคสำหรับ wildtype และอีกพีคสำหรับ mutant ซึ่งแสดงได้ว่าเป็น heterozygous genotype (E) Homozygous Resistant ตำแหน่ง T917I ลำดับเบสที่ตำแหน่งนี้เปลี่ยนเป็น ATA (Isoleucine, I) ตำแหน่ง L920F ลำดับเบสเปลี่ยนเป็น TTT (Phenylalanine, F) โดยลักษณะของกราฟ มีเพียงพีคเดียวในแต่ละตำแหน่งที่แสดงได้ว่าเป็น homozygous resistant ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ผล Chromatograms ที่ตำแหน่ง T917I และ L920F บนยีน voltage-sensitive sodium channel (VSSC)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจหาชนิดยีนในเหาที่เก็บจากนักเรียนประถมศึกษาในจังหวัดลพบุรีและสิงห์บุรี ตัวอย่างเหาที่ระดมทั้งหมด 74 ตัวอย่าง จากจังหวัดลพบุรี 40 ตัวอย่าง และจังหวัดสิงห์บุรี 34 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยมีการกลายพันธุ์สำคัญที่ตำแหน่ง T917I และ L920F ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการดื้อยาที่เพิ่มขึ้นในหลายพื้นที่ทั่วโลก จากการศึกษา พบรูปแบบของยีนดื้อยาที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ ผลการศึกษาที่พบยีนดื้อยาในรูปแบบ homozygous resistant (R/R) สูงถึง 81.08% นี้สอดคล้องกับการศึกษาในหลายประเทศทั่วโลกที่พบการดื้อยาต่อสารกลุ่ม pyrethroids ในระดับสูง โดย Mohammadi et al. (2021) ได้รายงานความชุกของการดื้อยา permethrin ในเหาที่ระดมทั่วโลกสูงถึง 76.9% นอกจากนี้ Yoon et al. (2014) พบว่า ความชุกของการดื้อยาในอเมริกาเหนือเพิ่มขึ้นจาก 84.4% ในปี 1999-2009 เป็น 99.6% ในปี 2007-2009 การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง T917I และ L920F ที่พบในการศึกษานี้เป็นการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในเหาที่ดื้อต่อสารกลุ่ม pyrethroids จากงานวิจัย Brownell et al. (2020) พบการกลายพันธุ์ T917I ในเหาที่ระดมจากประเทศไทย 40% โดย Larkin et al. (2020) พบถึง 93.9% ในฮอนดูรัส การกลายพันธุ์เหล่านี้ส่งผลให้ voltage-sensitive sodium channel (VSSC) มีความไวลดลงต่อการจับกับสาร pyrethroids ทำให้เกิดการดื้อยาแบบ knockdown resistance (kdr)

การพบยีนดื้อยาในระดับสูงมากนี้สอดคล้องกับรายงานการลดลงของประสิทธิภาพทางคลินิกของยาในกลุ่ม pyrethroids โดย Yoon et al. (2014) มีรายงานว่า ประสิทธิภาพของ permethrin ในการรักษาเหาศีรษะลดลงจาก 97% เหลือเพียง 15% ในบางพื้นที่ นอกจากนี้ การศึกษาในประเทศไทยโดย Brownell et al. (2024) พบว่าอัตราการรักษาหายด้วย permethrin 1% ลดลงเหลือเพียง 50% ในเด็กนักเรียนที่มีเหาศีรษะ

จากผลการศึกษาและหลักฐานจากงานวิจัยอื่นๆ แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการพิจารณาทางเลือกอื่น นอกเหนือจากยาในกลุ่ม pyrethroids ในการควบคุมเหาศีรษะ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีรายงานการดื้อยาสูง Durand et al. (2014) แนะนำให้ใช้วิธีการรักษาทางเลือกอื่นแทนการใช้ยาในกลุ่ม pyrethroids ในฝรั่งเศส เนื่องจากพบอัตราการดื้อยาทางพันธุกรรมสูง ในขณะที่ Lebowohl et al. (2007) แนะนำให้ใช้ยากำจัดเหาที่ไม่มีฤทธิ์ฆ่าไข่ของเหาร่วมกับการรักษาซ้ำ 2-3 ครั้ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเหา การพัฒนาผลิตภัณฑ์กำจัดเหาชนิดใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่างจากสารกลุ่ม pyrethroids จึงเป็นสิ่งจำเป็น รวมถึงการใช้วิธีกำจัดเหาทางกายภาพร่วมด้วย เช่น การหวีเหาด้วยหวีซี่ถี่ (หวีเสนียด) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเหาศีรษะที่มีการดื้อยา

ข้อเสนอแนะที่ได้รับจากการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาพบการดื้อต่อเพอร์เมทรินในเหาโดยใช้วิธีอณูชีววิทยาโดยสามารถใช้ PCR-RFLP เพื่อประเมินการมีอยู่ของการกลายพันธุ์ *kdr* ในเหาได้ การกลายพันธุ์ *kdr* ของเหาในไทยแสดงให้เห็นจีโนไทป์ที่แตกต่างกันสามรูปแบบ เพื่อให้เข้าใจสถานการณ์การดื้อต่อเพอร์เมทรินในเด็กนักเรียนระดับประถมศึกษาในประเทศไทยได้ดียิ่งขึ้น การศึกษาเพิ่มเติมควรเน้นที่ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของการดื้อต่อเพอร์เมทรินในเหาศีรษะ

เอกสารอ้างอิง

- Alsaady, I. M., Altwaim, S., Gattan, H. S., Alghanmi, M., Zawawi, A., Ahmedah, H., ... & Azhar, E. I. (2023). Prevalence of permethrin-resistant *kdr* mutation in head lice (*Pediculus humanus capitis*) from elementary school students in Jeddah, Saudi Arabia. *PeerJ*, 11, e16273.
- Brownell, N., Sunantaraporn, S., Phadungsaksawasdi, K., Seatamanoch, N., Kongdachaler, S., Phumee, A., & Siriyasatien, P. (2020). Presence of the knockdown resistance (*kdr*) mutations in the head lice (*Pediculus humanus capitis*) collected from primary school children of Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(12), e0008955.
- Brownell, N., Sunantaraporn, S., Seatamanoch, N., Kumtornrut, C., & Siriyasatien, P. (2024). The association between knockdown resistance and treatment outcome of 1% permethrin lotion in head lice infestations in Nonthaburi province, Thailand. *Archives of Dermatological Research*, 316(10), 684.
- Burkhart, C. N., & Burkhart, C. G. (2007). Fomite transmission in head lice. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 56(6), 1044-1047.
- Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., Delli Pizzi, P., Di Giulio, M., Grande, R., Nostro, A., & Cellini, L. (2012). Activity of tea tree oil and nerolidol alone or in combination against *Pediculus capitis* (head lice) and its eggs. *Parasitology research*, 111, 1985-1992.
- Durand, R., Bouvresse, S., Berdjane, Z., Izri, A., Chosidow, O., & Clark, J. M. (2012). Insecticide resistance in head lice: clinical, parasitological and genetic aspects. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(4), 338-344.
- Durand, R., Bouvresse, S., Andrianantoanirina, V., Berdjane, Z., Chosidow, O., & Izri, A. (2014). High frequency of mutations associated with head lice pyrethroid resistance in schoolchildren from Bobigny, France. *Journal of medical entomology*, 48(1), 73-75.

- Larkin, K., Rodriguez, C. A., Jamani, S., Fronza, G., Roca-Acevedo, G., Sanchez, A., & Toloza, A. C. (2020). First evidence of the mutations associated with pyrethroid resistance in head lice (Phthiraptera: Pediculidae) from Honduras. *Parasites & vectors*, 13, 1-7.
- Lebwohl, M., Clark, L., & Levitt, J. (2007). Therapy for head lice based on life cycle, resistance, and safety considerations. *Pediatrics*, 119(5), 965-974.
- Mohammadi, J., Azizi, K., Alipour, H., Kalantari, M., Bagheri, M., Shahriari-Namadi, M., ... & Moemenbellah-Fard, M. D. (2021). Frequency of pyrethroid resistance in human head louse treatment: systematic review and meta-analysis. *Parasite*, 28, 86.
- Nolt, D., Moore, S., Yan, A. C., Melnick, L., & Committee on Infectious Diseases, Committee on Practice and Ambulatory Medicine, Section on Dermatology. (2022). Head lice. *Pediatrics*, 150(4), e2022059282.
- Raoult, D., Reed, D. L., Dittmar, K., Kirchman, J. J., Rolain, J. M., Guillen, S., & Light, J. E. (2008). Molecular identification of lice from pre-Columbian mummies. *The Journal of infectious diseases*, 197(4), 535-543.
- Yoon, K. S., Previte, D. J., Hodgdon, H. E., Poole, B. C., Ho Kwon, D., Abo El-Ghar, G. E., ... & Clark, J. M. (2014). Knockdown resistance allele frequencies in North American head louse (Anoplura: Pediculidae) populations. *Journal of Medical Entomology*, 51(2), 450-457.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2025 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).