

1. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.1 ศึกษาการดำเนินไปของโรคในหนู BALB/c หลังจากได้รับการฉีดเชื้อ *Leishmania siamensis* ด้วยวิธีต่างๆ

1.2 ศึกษาการปรากฏของเชื้อและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในหนู BALB/c ที่ได้รับการฉีดเชื้อ *Leishmania siamensis* ด้วยวิธีต่างๆ ในระยะการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง

1.3 ศึกษาระดับการตอบสนองทางซีรั่มวิทยาต่อการติดเชื้อ *Leishmania siamensis* ในหนู BALB/c ด้วยวิธีต่างๆ ในระยะการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 สัตว์ทดลอง

หนูสายพันธุ์ BALB/cMiac อายุ 6-8 สัปดาห์ เพศเมียปลอดเชื้อที่ก่อโรค (specific-pathogen free) จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 60 ตัว ได้รับการปรับเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่เป็นเวลา 3 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โดยได้รับการอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (รหัส EA-001/57(R)) หนูได้รับอาหารและน้ำอย่างเต็มที่ตามต้องการ (ad libitum) ซึ่งปราศจากเชื้อก่อโรคและใช้วัสดุรองกรงที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave ตลอดการทดลอง

2.2 เชื้อปรสิต

เชื้อ *L. siamensis* ที่ทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ณ ภาควิชาปรสิตวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ซึ่งเชื้อถูกแยกมาจากไขกระดูกผู้ป่วย และเพาะเลี้ยงเชื้อระยะ promastigote ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NNN หรือ Schneider's medium (Gibco BRL) เสริมด้วย fetal bovine serum 20% และ gentamicin 50 µg/µl penicillin/streptomycin ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นทำการกระตุ้นเชื้อระยะ procyclic ให้เข้าสู่ระยะ mid-log metacyclic promastigote โดยใช้ 3% (v/v) urine ทำการปั่นเหวี่ยงให้เชื้อตกตะกอนด้วยความเร็ว 200xg นาน 5 นาที แล้วล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกสองครั้งด้วย 1x phosphate buffered saline (1xPBS) และนับจำนวนเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการ resuspension ด้วย 1x PBS เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อ 5×10^6 ตัวในปริมาตร 200 µl

2.3 การฉีดเชื้อปรสิตเข้าสู่สัตว์ทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนหนูทดลองแต่ละกลุ่ม โดยหนูกลุ่มทดลอง (n=4/วันที่ทำการการุณยฆาต/เส้นทางการฉีด) ได้รับการฉีดเชื้อ *L. siamensis* ระยะ metacyclic promastigote จำนวน 5×10^6 ตัว/200 μ l เข้าเส้นทางการฉีดต่าง ๆ กัน ได้แก่ ทางหลอดเลือดดำ ทางใต้ผิวหนัง และทางช่องท้อง แล้วทำการการุณยฆาตด้วยอีเทอร์ ณ วันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ (นับวันที่ฉีดเชื้อเป็นวันที่ 0) สำหรับกลุ่มควบคุม (n=3/วันที่ทำการการุณยฆาต) ได้รับการฉีด PBS 200 μ l/ตัว/เส้นทางการฉีด

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนหนู BALB/c ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ถูกการุณยฆาตตามวันที่กำหนดในแต่ละเส้นทางการฉีดเชื้อ

วันหลังการฉีดเชื้อ เส้นทางการฉีดเชื้อ	7 วัน	14 วัน	28 วัน	112 วัน
กลุ่มควบคุม (1xPBS ทุกเส้นทางการฉีดเชื้อ)	3 ตัว	3 ตัว	3 ตัว	3 ตัว
ทางหลอดเลือด	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว
ทางใต้ผิวหนัง	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว
ทางช่องท้อง	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว

2.4 การเก็บเลือด

หนูได้ถูกเก็บเลือดจากปลายหางขณะมีชีวิตด้วยหลอด microhematocrit ที่เคลือบด้วยสารกันเลือดแข็งตัว heparin แล้วนำไปปั่นเพื่อตรวจค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น หลังจากถูกการุณยฆาตหนู ได้เก็บเลือดจากหัวใจทันทีโดยใส่เลือดในหลอดที่มี heparin แล้วนำหลอดไปปั่นแยกพลาสมาที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จึงแยกเก็บพลาสมาที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับการทดสอบทางซีรั่มวิทยาต่อไป

2.5 การตรวจทางมหากายวิภาควิทยา

หลังจากการุณยฆาตหนูในวันที่กำหนด ได้ทำการผ่าซากเก็บอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ม้าม และซังน้ำหนักรวณะดังกล่าวด้วยเครื่องซังน้ำหนักแบบดิจิตอล บันทึกน้ำหนักของตับและม้าม เพื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองและระหว่างเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง

2.6 การตรวจหาเชื้อระยะ amastigote ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.6.1 Impression smear จากตับและม้าม

ฝานชิ้นเนื้อตับและม้ามเพื่อทำ impression smear และ fix สไลด์ใน absolute methanol เป็นเวลา 5 นาที จึงนำไปย้อมด้วยสี 10% Giemsa เป็นเวลา 45 นาที แล้วตรวจหาการปรากฏของเชื้อระยะ amastigote ทุก smear/สไลด์ หากพบเชื้ออย่างน้อย 1 ตัวบน smear นั้นจะถือว่าให้ผลบวกและได้คำนวณหาร้อยละของจำนวน smear ที่พบเชื้อจากหนูแต่ละตัว แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มการทดลอง

2.6.2 Buffy coat smear

หลังจากวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นจากหลอด microhematocrit แล้ว ได้ตัดหลอดเหนือชั้น buffy coat และทำการป้าย buffy coat ลงบน slide แล้วทำการ fix และย้อมด้วยสี 10% Giemsa เป็นเวลา 45 นาทีจึงล้างออกด้วยน้ำประปา ตรวจหาการปรากฏของเชื้อระยะ amastigote ต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว 300 เซลล์/สไลด์/หนู ในทุกกลุ่มการทดลองด้วยกำลังขยายรวม 400 และ 1,000 เท่า

2.7 การตรวจหาเชื้อ *L. siamensis* จากตับและม้ามด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล

เนื้อเยื่อตับและม้าม ได้ผ่านการสกัด DNA ด้วยชุดสกัดเลือดและเนื้อเยื่อ (Qiagen, Germany) PCR primers ที่จำเพาะดังที่ได้กล่าวในงานวิจัยที่ตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ (Uliana et al, 1994; Marfurt et al, 2003; Schonian et al 2003) ได้ถูกนำมาใช้เพิ่มสาย DNA ในบริเวณ ITS1 ของ ssRNA สำหรับ positive control ได้ใช้ DNA ที่สกัดได้จากระยะ promastigote ของ *L. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง หลังจากที่ได้ PCR products จึงได้ทำ gel electrophoresis โดยมี PCR program ดังนี้

	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา (นาที)
Denaturation	94	5
Annealing/Elongation (25 รอบ)	94	1
	54	1
	72	1.30
Elongation	72	5
Temporary stage	10	infinity

2.8 การวิเคราะห์ผลทางจุลพยาธิวิทยา

หลังจากได้ผ่านเนื้อตับและม้ามเพื่อทำ impression smear แล้ว ตับ ม้าม และไตได้ถูก fix ใน 10% neutral phosphate-buffered formalin และผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อใน paraffin โดยตัดให้มีความหนา 4 μm และย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

2.8.1 ตับ

ทำการนับจำนวนชิ้นของเนื้อเยื่อตับทั้งหมดในสไลด์ โดยทำการสุ่ม 10 บริเวณในแต่ละชิ้นของตับที่กำลังขยายรวม 400 เท่า แล้วนับ granuloma ระยะเวลาต่างๆ จากนั้นนำมาหารเฉลี่ยจำนวน granuloma แต่ละระยะต่อจำนวนชิ้นตับ จะได้ค่าเฉลี่ยของจำนวน granuloma แต่ละระยะในหนูแต่ละตัว โดยแบ่งระยะ granuloma (ปรับจาก Tiwananthagorn et al., 2012; Murray, 2001; Engwerda et al., 2004) ดังนี้

2.8.1.1 No reaction

ไม่พบ granuloma ในเนื้อเยื่อตับ

2.8.1.2 Immature granuloma

พบการเรียงตัวของ Kupffer cell และเซลล์อักเสบชนิด mononuclear แบบไม่เป็นระเบียบ และมีจำนวนของเซลล์อักเสบที่ล้อมรอบน้อยกว่า 10 เซลล์ โดยอาจจะพบหรือไม่พบเชื้อในระยะ amastigote ใน Kupffer cell

2.8.1.3 Mature granuloma

พบการเรียงตัวของ Kupffer cell และเซลล์อักเสบชนิด mononuclear แบบเป็นระเบียบ และมีจำนวนของเซลล์อักเสบที่ล้อมรอบมากกว่า 10 เซลล์ โดยอาจจะพบหรือไม่พบเชื้อในระยะ amastigote ใน Kupffer cell และอาจพบหรือไม่พบ giant cell ใน granuloma

2.8.2 ม้าม

ทำการนับจำนวนชิ้นของเนื้อเยื่อตับทั้งหมดในสไลด์ โดยทำการสุ่ม 10 บริเวณในแต่ละชิ้น ทำการนับจำนวนรอยโรค lymphoid depletion และนำมาคิดเป็นร้อยละเมื่อเทียบกับ จำนวน lymphoid follicles ทั้งหมด

2.8.3 ไต

ทำการสุ่มกลอมเมอูลุสจำนวน 20 อัน แล้วนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดในแต่ละกลอมเมอูลุส (glomerulus) ยกเว้นเซลล์เม็ดเลือดแดง แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์/กลอมเมอูลุส/กลุ่มการทดลองในแต่ละวันที่กำหนด (Prianti et al., 2007)

2.9 การตรวจทางซีรัมวิทยา

นำพลาสมาที่แยกเก็บไว้ที่ -20°C มาตรวจการตอบสนองทางแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leishmania donovani* ด้วยวิธี direct agglutination test (DAT) (KIT Biomedical Research, Royal Tropical Institute, Netherlands) โดยปฏิบัติตามขั้นตอนของผู้ผลิต ขั้นตอนโดยสังเขป คือ ทำการเจือจางพลาสมาใน V-bottom 96-well microtiter plate ที่ dilution 1:100 (cut-off dilution) โดยใช้สารละลาย 0.2% β -mercaptoethanol ใน normal saline จากนั้นเติมสารละลาย promastigote 50 μl ผสมให้เข้ากันแล้วผนึกด้วย plate sealer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงอ่านผล

2.10 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

One-way ANOVA โปรแกรม IBM SPSS[®] versions 22 ได้ถูกใช้เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของน้ำหนักตัว ม้าม ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ร้อยละชิ้นเนื้อที่พบเชื้อ และจำนวน granuloma ของตับในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน และระหว่างวิธีการฉีดเชื้อที่แตกต่างกัน

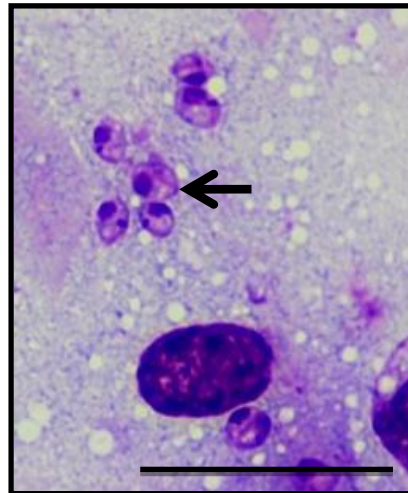
3. ผลการทดลอง

3.1 การตรวจพบการติดเชื้อ *L. siamensis* ในหนูทดลอง BALB/c

3.1.1 Impression smear

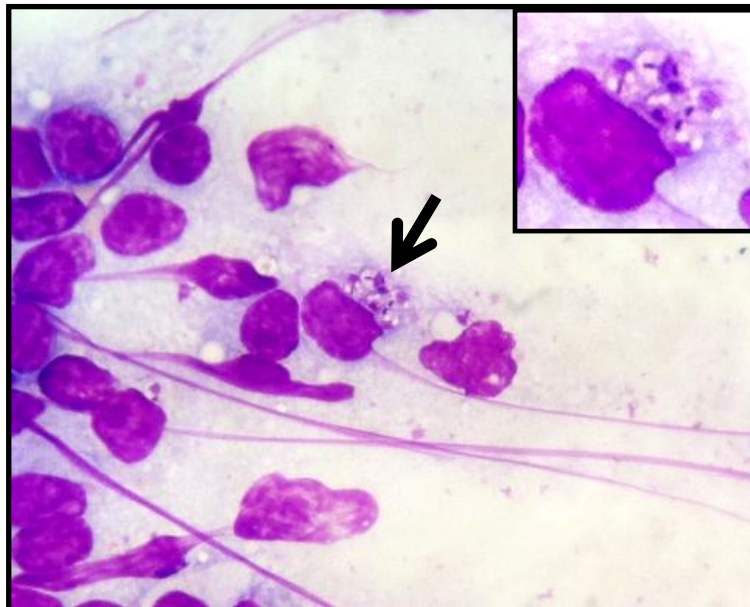
3.1.1.1 พบการปรากฏของเชื้อ *L. siamensis* ระยะ amastigote จาก impression smear ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายรวม 1,000 เท่าจากตับ (ภาพที่ 1ก) และม้าม (ภาพที่ 1ข)

ก.



25 μ m

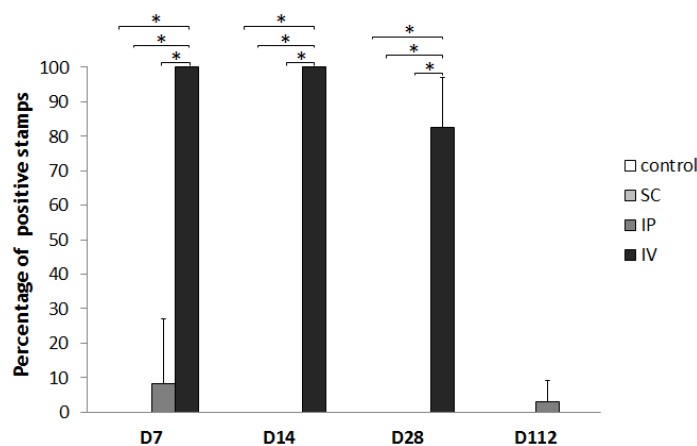
ข.



ภาพที่ 1 เชื้อ *L. siamensis* ระยะ amastigote จาก impression smear ที่ย้อมด้วยสี 10% Giemsa ก. ภาพนี้พบเชื้อนอกเซลล์ตับ ข. พบเชื้อภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาว monocyte ในม้าม (ภาพเล็กมุมบนขวา แสดงภาพขยายจากปลายลูกศร)

เชื้อ *L. siamensis* ระยะ amastigote ที่พบในตับ (ภาพที่ 1ก) และม้าม (ภาพที่ 1ข) มีขนาดประมาณ 1.5-3 x 2.5-6.5 μm รูปร่างรีและภายในย้อมติดสี basophilic ด้วยสี 10% Giemsa นิวเคลียสของเชื้อมีรูปร่างกลมรีและ kinetoplast มีรูปร่างเป็นแท่งขนาดเล็กอยู่ในแนวตั้งฉากกับนิวเคลียส

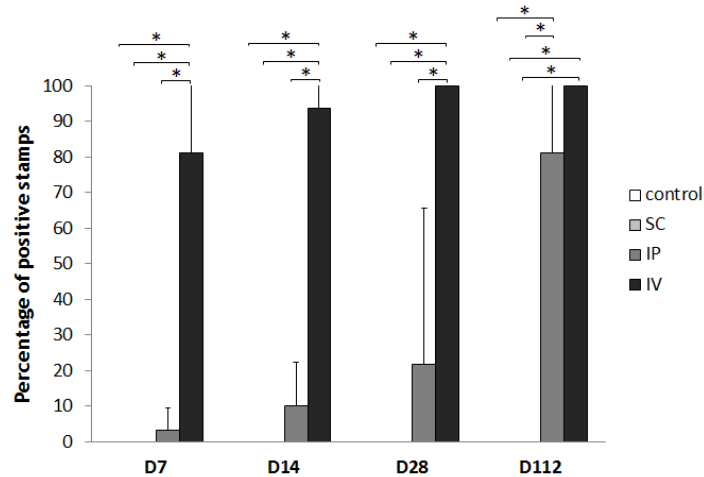
3.1.1.2 ผลการวิเคราะห์จำนวน impression smear ที่พบเชื้อ *L. siamensis* ระยะ amastigote จากตับของหนู BALB/c ที่ได้รับการฉีดเชื้อในเส้นทางต่างๆ ในวันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ



แผนภูมิที่ 1 แสดงร้อยละของจำนวน smear ที่พบเชื้อ *L. siamensis* ระยะ amastigote จาก impression smear ตับของหนู BALB/c ในวันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อในเส้นทางต่างๆ

ผลการตรวจหาเชื้อระยะ amastigote ของเชื้อ *L. siamensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี impression smear จากตับ (แผนภูมิที่ 1) พบว่าในวันที่ 7 14 และ 28 หลังการฉีดเชื้อเข้าหลอดเลือด มีจำนวนของ smear ที่ตรวจพบเชื้อมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบเชื้อในทุก smear (100%) ในวันที่ 7 และ 14 หลังการฉีดเชื้อ ต่อมาพบจำนวน smear ที่ตรวจพบเชื้อร้อยละ 82.5 ของจำนวน smear ทั้งหมดในวันที่ 28 และตรวจไม่พบเชื้อใน smear ใดเลยในวันที่ 112 หลังการฉีดเชื้อ ส่วนกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเข้าช่องท้องพบค่าเฉลี่ยจำนวน smear ที่มีเชื้อร้อยละ 8.3 และ 2.9 ของจำนวน smear ทั้งหมดตามลำดับ ในวันที่ 7 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ ($p > 0.05$)

3.1.1.3 ผลการวิเคราะห์จำนวน impression smear ที่พบเชื้อ *L. siamensis* ระยะ amastigote จากม้ามของหนู BALB/c ที่ได้รับการฉีดเชื้อในเส้นทางต่างๆ ในวันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ



แผนภูมิที่ 2 แสดงร้อยละของจำนวน smear ที่พบเชื้อ *L. siamensis* ระยะ amastigote จาก impression smear ม้ามหนู BALB/c ในวันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อในเส้นทางต่างๆ

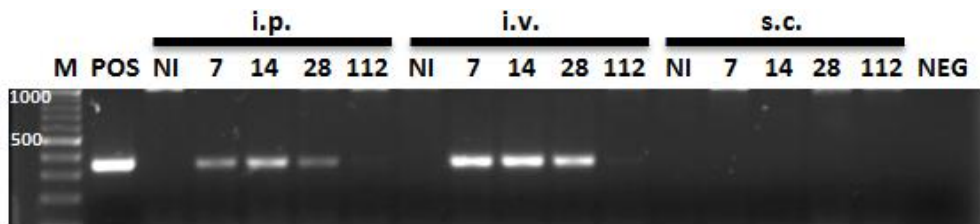
จากผลการตรวจนับจำนวน impression smear ของม้ามที่พบเชื้อ *L. siamensis* ระยะ amastigote ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แผนภูมิที่ 2) พบว่ากลุ่มที่ฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดดำในทุกๆระยะเวลาหลังการฉีดเชื้อ และกลุ่มที่ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องในวันที่ 112 หลังการฉีดเชื้อ มีจำนวน smear ที่ตรวจพบเชื้อ มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และทั้งสองกลุ่มมีแนวโน้มของการพบเชื้อใน smear เพิ่มขึ้นเป็นลำดับตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 112 หลังการฉีดเชื้อ และตรวจพบเชื้อในทุก smear จากกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดดำในวันที่ 28 และ 112

3.1.2 การตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธี buffy coat smear

ผลการตรวจ buffy coat smear ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายรวม 1,000 เท่า ไม่พบเชื้อ *L. siamensis* ในทุกช่องทางการฉีดเชื้อและทุกระยะเวลาหลังการฉีดเชื้อ

3.1.3 การตรวจพบ DNA ของ *L. siamensis* ด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล

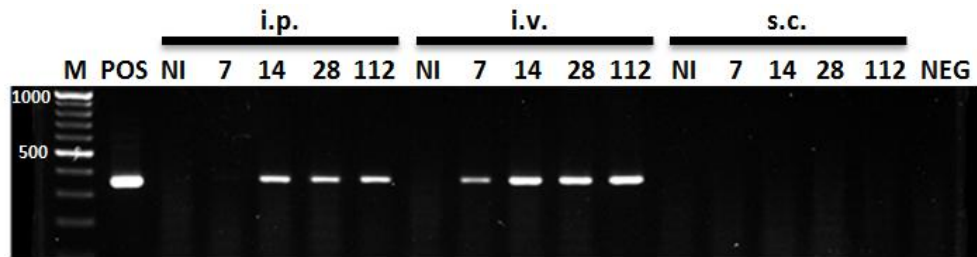
3.1.3.1 ดับ



ภาพที่ 2 การตรวจพบ DNA ของเชื้อ *L. siamensis* ด้วยวิธี PCR จากตับหนู BALB/c หนูกลุ่มทดลองได้รับการฉีดเชื้อระยะ metacyclic promastigote เข้าทางช่องท้อง หลอดเลือดดำ และใต้ผิวหนังในวันที่ 7 14 28 และ 112 ตามลำดับ (หมายเหตุ M คือ 100 bp DNA ladder POS คือ positive control NI คือ หนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ 7 14 28 112 คือ หนูที่ได้รับการฉีดเชื้อมาแล้ว 7 14 28 และ 112 วัน ตามลำดับ NEG คือ negative control i.p คือ กลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้อง i.v. คือ กลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดดำ และ s.c. คือ กลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเข้าทางใต้ผิวหนัง)

จากผลการตรวจหา DNA ของเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ ITS1 พบ DNA ของเชื้อ *L. siamensis* โดยมีขนาด amplicon 348 bp ในตับของหนู BALB/c ที่ได้รับการฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องในวันที่ 7 และ 14 หลังการฉีดเชื้อ และพบ DNA ของเชื้อโดยการฉีดเชื้อทางหลอดเลือดดำตั้งแต่วันที่ 7 14 และ 28 หลังการฉีดเชื้อ แต่ตรวจไม่พบ DNA ของเชื้อในตับหนูที่ได้รับการฉีดเชื้อเข้าทางใต้ผิวหนัง (ภาพที่ 2)

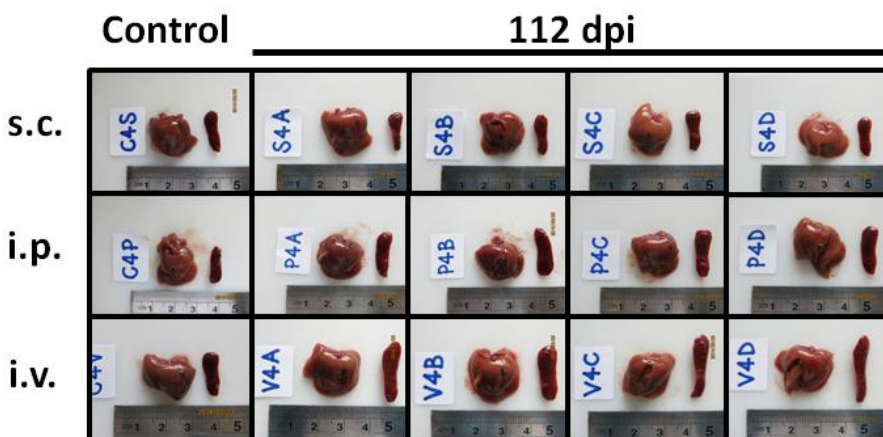
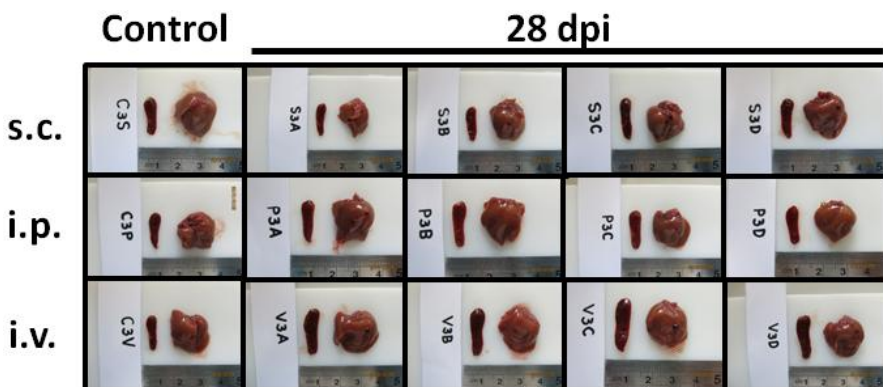
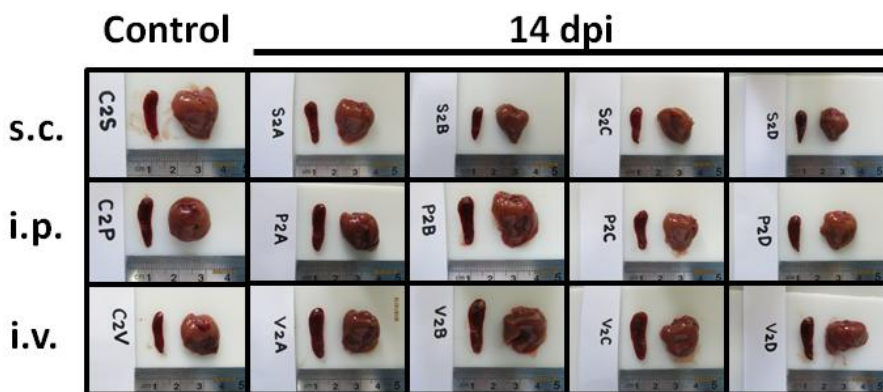
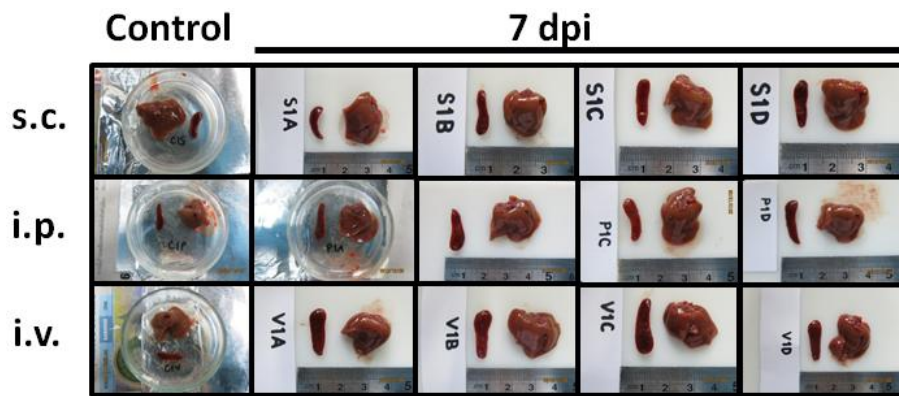
3.1.3.2 ม้าม



ภาพที่ 3 การตรวจพบ DNA ของเชื้อ *L. siamensis* ด้วยวิธี PCR จากตับหนู BALB/c หนูกลุ่มทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อระยะ metacyclic promastigote เข้าทางช่องท้อง หลอดเลือดดำ และใต้ผิวหนังในวันที่ 7 14 28 และ 112 ตามลำดับ (M คือ 100 bp DNA ladder POS คือ positive control NI คือ หนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ 7 14 28 112 คือ หนูที่ได้รับการฉีดเชื้อมาแล้ว 7 วัน 14 วัน 28 วัน และ 112 วัน ตามลำดับ NEG คือ negative control i.p คือ กลุ่มที่ได้รับเชื้อทางช่องท้อง i.v. คือ กลุ่มที่ได้รับเชื้อทางหลอดเลือดดำ และ s.c. คือ กลุ่มที่ได้รับเชื้อทางใต้ผิวหนัง)

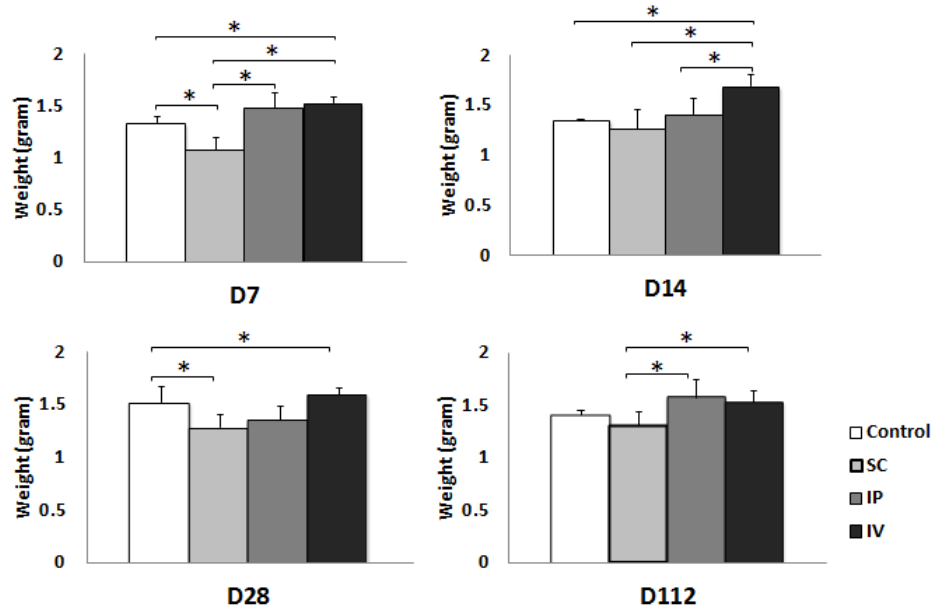
จากผลการตรวจหา DNA ของเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ ITS1 พบ DNA ของเชื้อ *L. siamensis* โดยมีขนาด amplicon 348 bp จากม้ามของหนู BALB/c ที่ได้รับการฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องในวันที่ 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ และพบ DNA ของเชื้อโดยการฉีดเชื้อทางหลอดเลือดดำตั้งแต่วันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ แต่ตรวจไม่พบ DNA ของเชื้อในตับหนูที่ได้รับการฉีดเชื้อเข้าทางใต้ผิวหนัง (ภาพที่ 3)

3.2 ลักษณะทางมหกายวิภาคของตับและม้าม



3.3 น้ำหนักอวัยวะภายใน

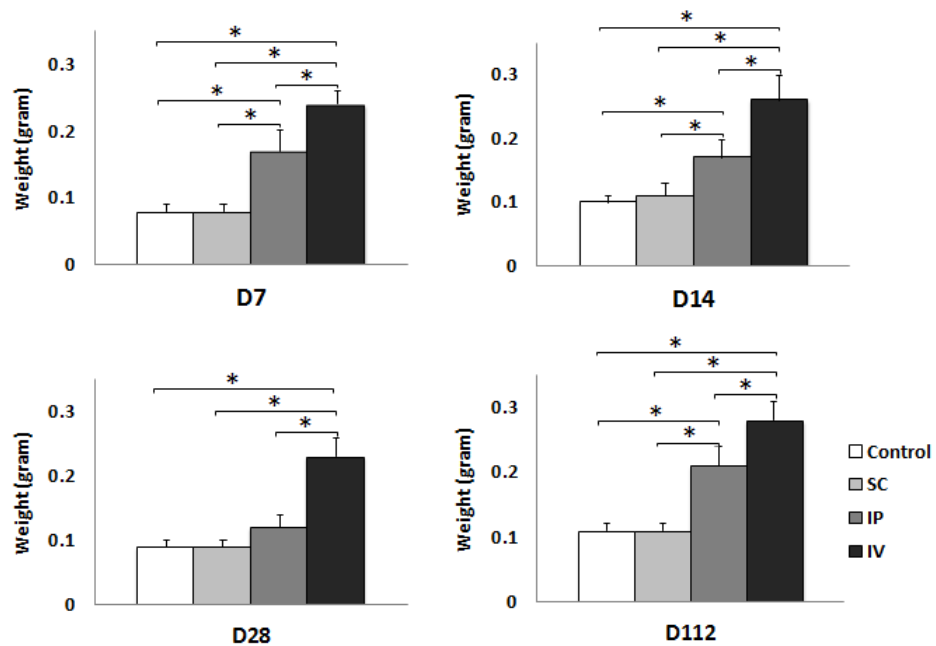
3.3.1 น้ำหนักตับ



แผนภูมิที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักตับ (กรัม) ของหนู BALB/c ในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. siamensis* ในเส้นทางต่างๆ โดยชั่งน้ำหนักตับในวันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ

จากการชั่งน้ำหนักของตับ (แผนภูมิที่ 3) พบว่ากลุ่มที่ฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตับสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในวันที่ 7 14 และ 28 หลังการฉีดเชื้อ

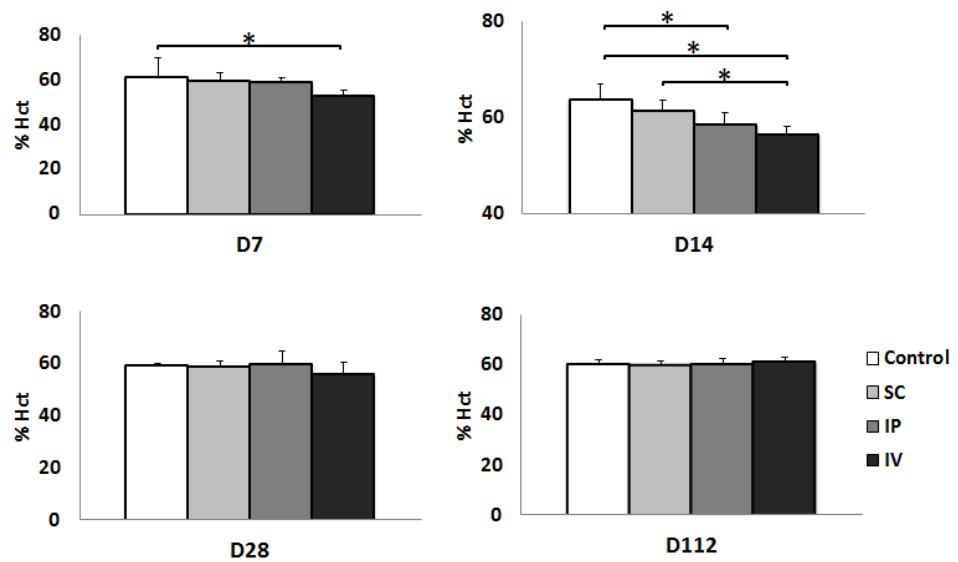
3.3.2 น้ำหนักม้าม



แผนภูมิที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักม้าม (กรัม) ของหนู BALB/c ในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. siamensis* ในเส้นทางต่างๆ โดยชั่งน้ำหนักม้ามในวันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ

ผลจากการชั่งน้ำหนักม้าม (แผนภูมิที่ 4) พบว่ากลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดในทุกๆเวลาหลังการฉีดเชื้อ และกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องในวันที่ 7 14 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักม้ามสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักม้ามระหว่างการฉีดเชื้อ 2 เส้นทางนี้ พบว่ากลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อทางหลอดเลือดมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักม้ามมากกว่ากลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อทางช่องท้องอย่างมีนัยสำคัญในทุกๆเวลาหลังการฉีดเชื้อ ($p < 0.05$)

3.4 ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น



แผนภูมิที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของหนู BALB/c ในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. siamensis* ในเส้นทางต่างๆ โดยทำการเก็บเลือดจากปลายหางและวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในวันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ

จากการตรวจค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (แผนภูมิที่ 5) พบว่ากลุ่มที่ฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดดำ มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในวันที่ 7 และ 14 วันหลังการฉีดเชื้อ ในขณะที่กลุ่มที่ฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้อง มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เฉพาะวันที่ 14 หลังการฉีดเชื้อ

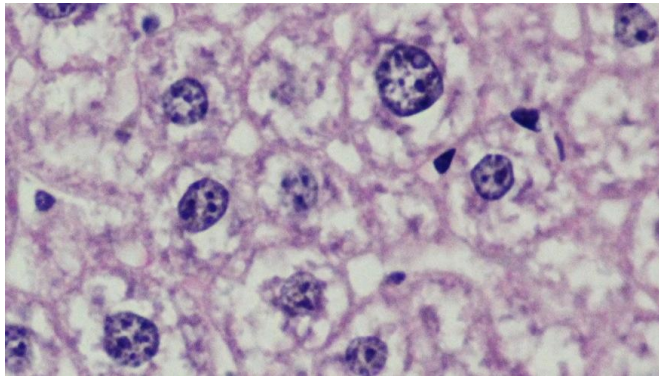
3.5 ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

3.5.1 ตับ

3.5.1.1 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของตับของหนู BALB/c กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ติดเชื้อ *L. siamensis*

3.5.1.1.1 No reaction

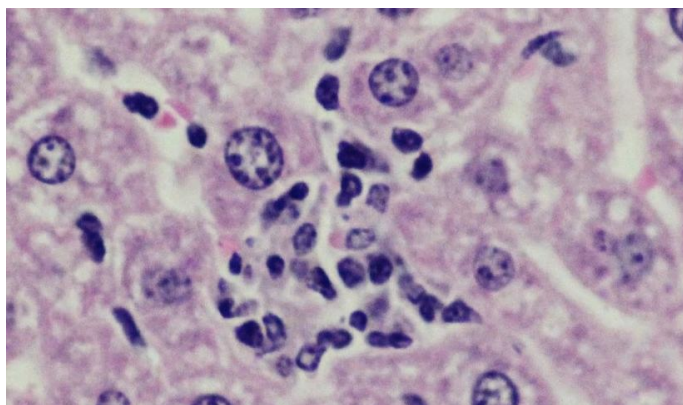
ไม่พบ granuloma ในเนื้อเยื่อตับ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ภาพจุลพยาธิวิทยาของตับที่กำลังขยายรวม 400 เท่า ไม่พบการปรากฏของ granuloma

3.5.1.1.2 Immature granuloma

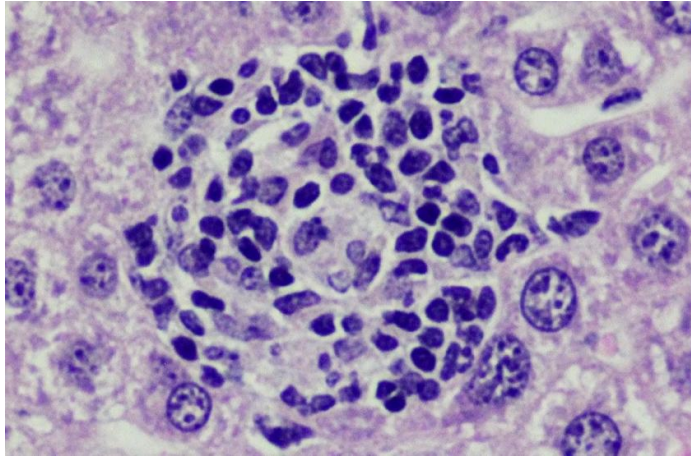
พบการเรียงตัวของ Kupffer cell และเซลล์อักเสบชนิด mononuclear แบบไม่เป็นระเบียบ และมีจำนวนของเซลล์อักเสบที่ล้อมรอบน้อยกว่า 10 เซลล์ โดยอาจจะพบหรือไม่พบเชื้อในระยะ amastigote ใน Kupffer cell (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ภาพจุลพยาธิวิทยาของตับที่กำลังขยายรวม 400 เท่า พบการปรากฏของ immature granuloma

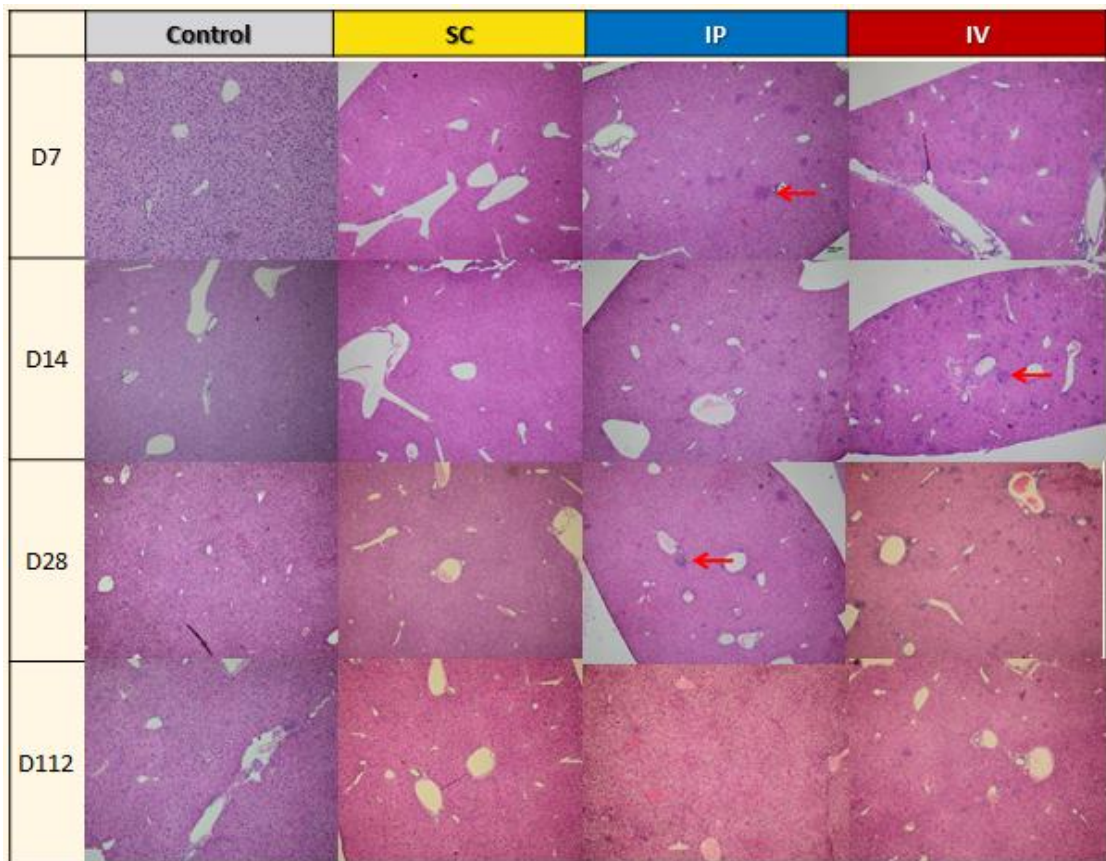
3.5.1.1.3 Mature granuloma

พบการเรียงตัวของ Kupffer cell และเซลล์อักเสบชนิด mononuclear แบบเป็นระเบียบ และมีจำนวนของเซลล์อักเสบที่ล้อมรอบมากกว่า 10 เซลล์ โดยอาจจะพบหรือไม่พบเชื้อในระยะ amastigote ใน Kupffer cell และอาจพบหรือไม่พบ giant cell ใน granuloma (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ภาพจุลพยาธิวิทยาของตับที่กำลังขยายรวม 400 เท่า พบการปรากฏของ mature granuloma

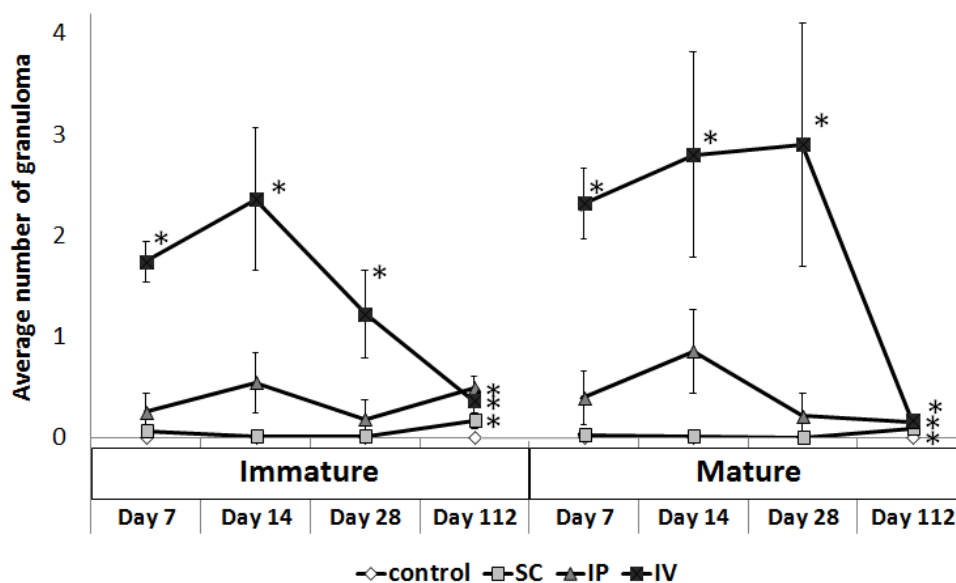
3.5.1.2 ภาพเปรียบเทียบผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของตับ



ภาพที่ 7 ภาพจุลพยาธิวิทยาของตับที่กำลังขยายรวม 40 เท่า ของหนู BALB/c ในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. siamensis* ในเส้นทางและระยะเวลาต่างๆ

กลุ่มที่ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องและหลอดเลือดในวันที่ 7 14 และ 28 มีจำนวน granuloma เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (ตัวอย่าง granuloma ดังแสดงที่ปลายลูกศรสีแดง) (ภาพที่ 7)

3.5.1.3 ผลการวิเคราะห์การตรวจพบ granuloma ในตับ

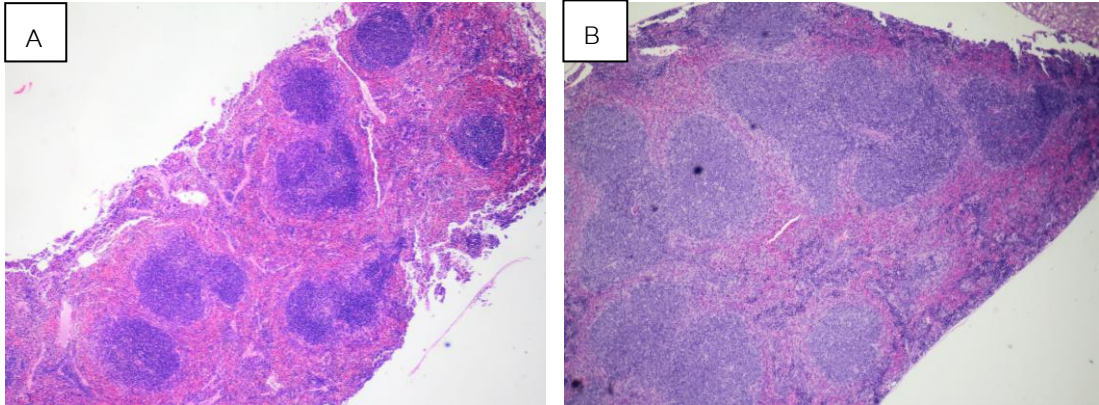


แผนภูมิที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวน granuloma แบบ immature granuloma และ mature granuloma ต่อ 1 section ตับของหนู BALB/c ในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. siamensis* ในเส้นทางต่างๆ ณ วันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ โดยนับที่กำลังขยายรวม 400 เท่า

จากค่าเฉลี่ยของจำนวน granuloma แบบ immature และ mature (แผนภูมิที่ 6) พบว่ากลุ่มที่ฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดมีค่าเฉลี่ยของจำนวน granuloma มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกๆระยะเวลาหลังการฉีดเชื้อ ($p < 0.05$) และมีค่ามากกว่ากลุ่มที่ฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 7 14 และ 28 หลังการฉีดเชื้อ ($p < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องดูเหมือนมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะวันที่ 112 หลังการฉีดเชื้อ ($p < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ฉีดเชื้อเข้าทางใต้ผิวหนังมีค่าเฉลี่ยของจำนวน granuloma อยู่ในระดับต่ำและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นวันที่ 112 หลังการฉีดเชื้อที่มีจำนวน granuloma มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

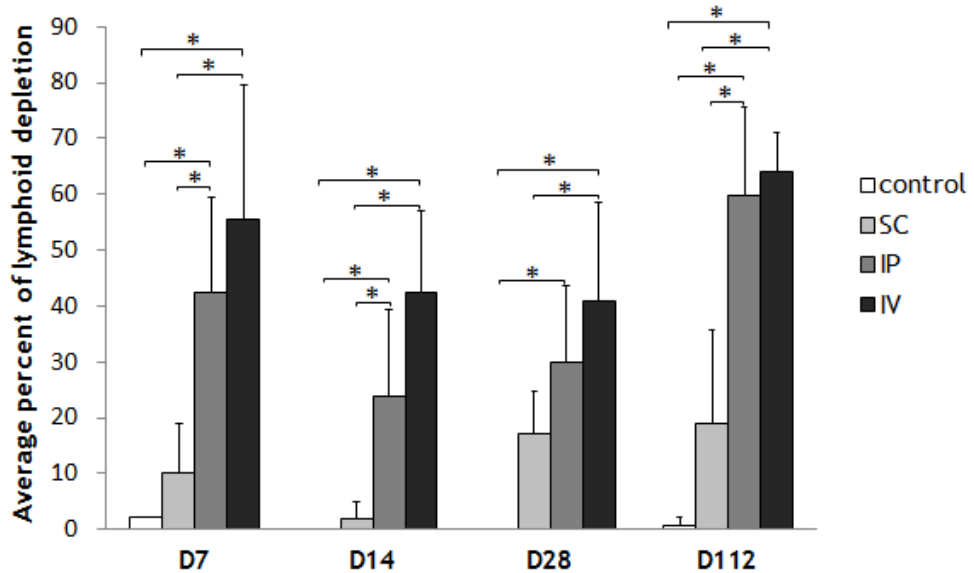
3.5.2 ม้าม

3.5.2.1 ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบ lymphoid depletion ในม้าม หนู BALB/c ที่ได้รับการฉีดเชื้อ



ภาพที่ 8 ภาพจุลพยาธิวิทยาของม้าม แสดง lymphoid follicle ปกติ (A) และ lymphoid depletion (B)

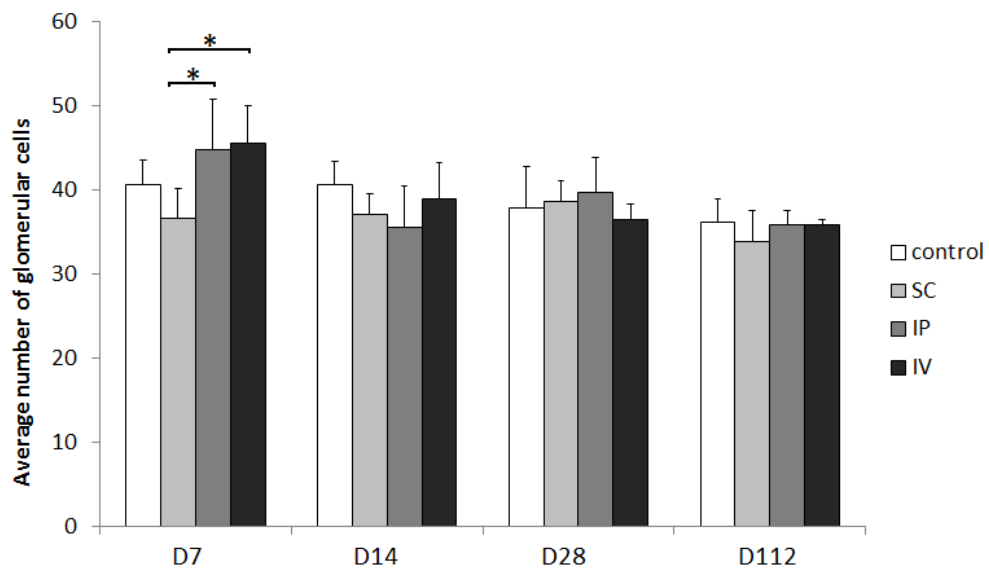
3.5.2.2 ผลการวิเคราะห์จำนวน lymphoid depletion ในม้าม



แผนภูมิที่ 7 แสดงร้อยละค่าเฉลี่ยของจำนวน lymphoid depletion ต่อจำนวน lymphoid follicle ทั้งหมดในม้ามของหนู BALB/c ในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. siamensis* ในเส้นทางต่างๆ วันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ

จากร้อยละค่าเฉลี่ยของรอยโรค lymphoid depletion ในม้าม (แผนภูมิที่ 7) พบว่าการเกิด lymphoid depletion ในม้ามของกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดและทางช่องท้องมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ในทุกระยะเวลาหลังการฉีดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่การฉีดเชื้อเข้าใต้ผิวหนังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$)

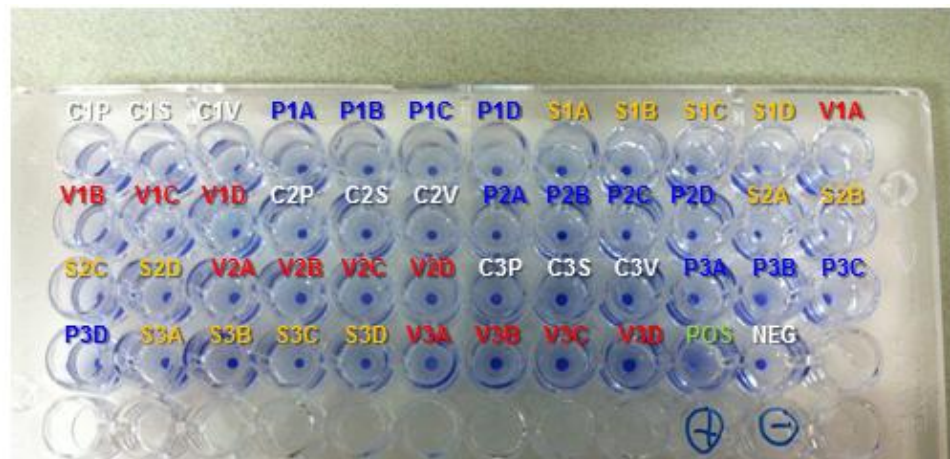
3.5.3 ไต



แผนภูมิที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่พบในกลอมเมอรูลัส ยกเว้นเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู BALB/c ในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. siamensis* ในเส้นทางต่างๆ วันที่ 7 14 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ

เมื่อเปรียบเทียบผลของค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่พบในกลอมเมอรูลัส (แผนภูมิที่ 8) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มการทดลองในทุกระยะเวลาหลังการฉีดเชื้อ ($p > 0.05$)

3.6 ผลการตรวจทางซีรั่มวิทยา

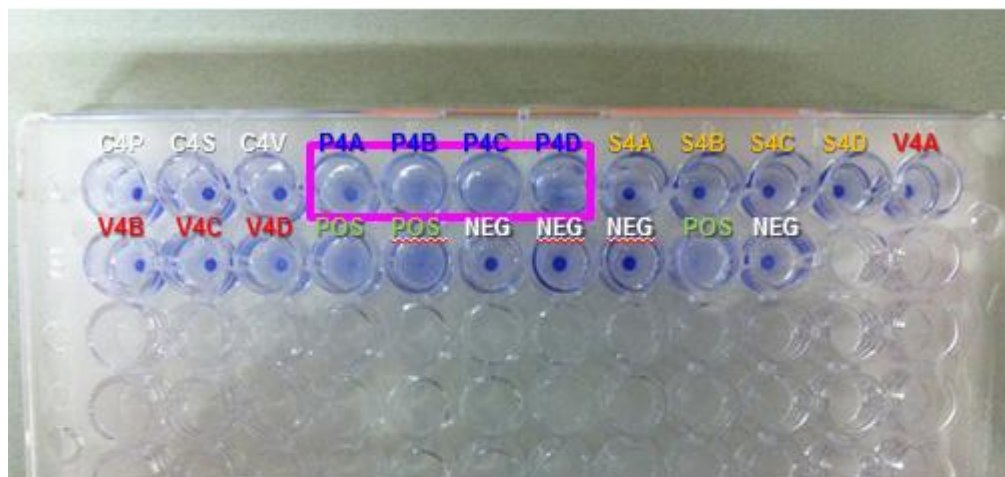


C1P, C1S, C1V = uninfected control (day 7) C2P, C2S, C2V = uninfected control (day 14) C3P, C3S, C3V = uninfected control (day 28)
P1A-P1D = i.p. 7 dpi P2A-P2D = i.p. 14 dpi P3A-P3D = i.p. 28 dpi
S1A-S1D = s.c. 7 dpi S2A-S2D = s.c. 14 dpi S3A-S3D = s.c. 28 dpi
V1A-V1D = i.v. 7 dpi V2A-V2D = i.v. 14 dpi V3A-V3D = i.v. 28 dpi

POS = positive control
NEG = negative control

ภาพที่ 9 การตอบสนองทางซีรั่มวิทยาของหนู BALB/c ต่อการติดเชื้อ *L. siamensis* ด้วยวิธี Direct Agglutination Test (DAT) โดยตรวจจาก plasma ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อระยะ metacyclic promastigote เข้าทางช่องท้อง หลอดเลือดดำ และใต้ผิวหนังในวันที่ 7 14 และ 28 หลังการฉีดเชื้อ

ผลการตรวจทางซีรั่มวิทยาด้วยวิธี Direct Agglutination Test (DAT) (ภาพที่ 9) พบว่าหนู BALB/c ทุกตัว (จำนวน 4 ตัว/กลุ่มทดลอง) ที่ได้รับการฉีดเชื้อทางช่องท้อง ทางใต้ผิวหนัง และทางหลอดเลือดดำไม่แสดงการตอบสนองทางซีรั่มวิทยาต่อเชื้อ *L. siamensis* ในวันที่ 7 14 และ 28 หลังการฉีดเชื้อ



C4P, C4S, C4V = uninfected control (day 112)
P4A-P4D = i.p. 112 dpi
S4A-S4D = s.c. 112 dpi
V4A-V4D = i.v. 112 dpi
POS = positive control
NEG = negative control

ภาพที่ 10 การตอบสนองทางซีรั่มวิทยาของหนู BALB/c ต่อการติดเชื้อ *L. siamensis* ด้วยวิธี Direct Agglutination Test (DAT) โดยกลุ่มทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อระยะ metacyclic promastigote เข้าทางช่องท้อง หลอดเลือดดำ และใต้ผิวหนังในวันที่ 112

จากผลการตรวจทางซีรั่มวิทยาด้วยวิธี Direct Agglutination Test (DAT) (ภาพที่ 10) ของหนู BALB/c ทุกตัว (จำนวน 4 ตัว/กลุ่มทดลอง) ที่ได้รับการฉีดเชื้อทางช่องท้องในวันที่ 112 หลังการฉีดเชื้อ มีการตอบสนองทางซีรั่มวิทยาต่อการติดเชื้อ *L. siamensis* (กรอบสี่ชมพู) ในขณะที่การฉีดเชื้อทางใต้ผิวหนังและทางหลอดเลือดดำไม่พบการตอบสนองทางซีรั่มวิทยาต่อเชื้อ *L. siamensis*

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาพบว่า *L. siamensis* สามารถก่อโรคในหนูทดลอง BALB/c โดยทำให้เกิดโรคแบบ visceral leishmaniasis โดยพบหลักฐานการติดเชื้อจากการพัฒนาของระยะ promastigote เป็น amastigote ในตับและม้ามด้วยวิธี impression smear ที่ย้อมสี Giemsa แล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับการตรวจพบ DNA ของ *L. siamensis* ในตับและม้าม นอกจากนี้ *L. siamensis* สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดรอยโรคในตับและม้ามของหนูทดลอง BALB/c โดยการฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดและทางช่องท้อง ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงได้พิสูจน์ว่าหนูทดลอง BALB/c สามารถใช้เป็นหนูทดลองต้นแบบสำหรับการศึกษาพยาธิวิทยาการก่อโรคของเชื้อ *L. siamensis* ในอวัยวะภายในได้ โดยที่การฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดทำให้เกิดรอยโรคได้ชัดเจนกว่าเส้นทางการฉีดเชื้ออื่นๆ

จากผลการศึกษาเพื่อประเมินการติดเชื้อปรสิตและพยาธิวิทยาในตับหนู BALB/c ที่ได้รับเชื้อเข้าทางหลอดเลือดโดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการปรากฏของเชื้อและ granuloma จำนวนมากในการติดเชื้อระยะเฉียบพลัน (วันที่ 7 และ 14 หลังการฉีดเชื้อ) แต่มีจำนวนลดลงในการติดเชื้อระยะเรื้อรัง (วันที่ 112 หลังการฉีดเชื้อ) ซึ่งสอดคล้องกับผลตรวจพบ DNA ของ *L. siamensis* จากตับ โดยพบ DNA ของเชื้อในตับตั้งแต่วันที่ 7 14 และ 28 หลังการฉีดเชื้อ และไม่พบ DNA ของเชื้อจากการฉีดเชื้อเข้าทางใต้ผิวหนัง ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยในหนูทดลอง BALB/c ที่พบว่าสามารถกำจัดเชื้อ *L. infantum* ภายในตับได้ (Nieto et al., 2011 และ Carrion et al., 2006) และสามารถกำจัดเชื้อ *L. donovani* ออกจากตับได้ภายใน 2 -3 เดือน และสามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้ (Murray et al., 1987) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าตับไม่มีภูมิคุ้มกันในการจัดการกับเชื้อในระยะแรก ส่งผลให้มีจำนวนเชื้อและความรุนแรงของพยาธิสภาพชัดเจน โดยมีเซลล์อักเสบเข้ามาสะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรก ตับจึงมีน้ำหนักที่มากขึ้นในระยะนี้ (Murray et al., 1987) แต่ในภายหลังมีการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกันแบบพึงพาเม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อ ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบ granuloma จึงสามารถลดความรุนแรงโรคและจำกัดปริมาณเชื้อไว้ได้ ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อปรสิตขึ้นอยู่กับระยะความสมบูรณ์ของ granuloma และจำนวนเชื้อที่ทำการฉีดเข้าหนูทดลอง

จากผลการศึกษาหาเชื้อในม้ามทางกล้องจุลทรรศน์ พบว่าหนู BALB/c ที่ได้รับเชื้อเข้าทางหลอดเลือดมีเชื้อ *L. siamensis* มากกว่าร้อยละ 80 ของจำนวน smear ของชิ้นเนื้อม้ามในระหว่างที่มีการติดเชื้อระยะเฉียบพลัน (วันที่ 7 และ 14 หลังการฉีดเชื้อ) และพบเชื้อในทุก

smear (ร้อยละ 100 ของ smear ม้ามทั้งหมด) ในช่วงที่มีการติดเชื้อระยะเรื้อรัง (วันที่ 28 และ 112 หลังการฉีดเชื้อ) สอดคล้องกับการตรวจพบ DNA ด้วยวิธี PCR ซึ่งพบเชื้อในทุกระยะเวลาของการศึกษา ส่วนผลการตรวจหาเชื้อจากหนูที่ได้รับการฉีดเชื้อทางช่องท้อง พบเชื้อในทุกระยะเวลาหลังการฉีดเชื้อโดยตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งพบจำนวนของ smear ที่มีเชื้อสูงขึ้นเป็นลำดับ (จากร้อยละ 3.1 ในวันที่ 7 ร้อยละ 10 ในวันที่ 14 ร้อยละ 21.9 ในวันที่ 28 จนถึงร้อยละ 81.3 ของจำนวน smear ทั้งหมด ในวันที่ 112) แต่การตรวจด้วยวิธี PCR พบเชื้อในทุกระยะเวลาของการทดลองยกเว้นวันที่ 7 หลังการฉีดเชื้อ ส่วนการฉีดเชื้อเข้าทางใต้ผิวหนัง ตรวจไม่พบเชื้อในม้ามจากทั้งทางกล้องจุลทรรศน์และด้วยวิธี PCR สำหรับรอยโรค lymphoid depletion ผลการทดลองพบว่า มีจำนวนมากตลอดทุกระยะเวลาที่ศึกษา สอดคล้องกับผลการศึกษาที่มีรายงานว่า หนูทดลอง BALB/c ไม่สามารถกำจัดเชื้อ *L. infantum* ออกจากม้ามได้ และสามารถพบเชื้อ *L. infantum* ได้ในม้ามของหนูทดลอง BALB/c ในการติดเชื้อระยะเรื้อรัง (Nieto et al., 2011 และ Carrion et al., 2006) อีกทั้งมีรายงานว่าภูมิคุ้มกันของม้ามหนู BALB/c ไม่สามารถตอบสนองต่อการติดเชื้อ *L. donovani* ได้ (Murray et al., 1987) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า ม้ามแม้จะเป็นแหล่งผลิตเม็ดเลือดขาวเอง แต่ระบบภูมิคุ้มกันไม่ตอบสนองต่อการอักเสบที่ม้าม อาจเกิดจากภาวะล้มเหลวของการกระตุ้นการต่อต้านเชื้อ *Leishmania* โดยเซลล์ macrophage ที่เก็บกินเชื้อ ไม่สามารถสร้าง chemoattractants ที่จะนำ effector cell เข้ามาในบริเวณใกล้เคียง ม้ามจึงไม่สามารถพัฒนา granuloma หรือการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อในตัวเองได้ และไม่สามารถกำจัดเชื้อ *Leishmania* ที่ตัวเองเก็บกินได้ จึงมักพบการปรากฏของเชื้อระยะ amastigote และรอยโรคแบบเรื้อรังตลอดชีวิต (Nieto et al., 2011 และ Carrion et al., 2006)

ผลการศึกษาในไต ไม่พบจำนวนเซลล์ใน glomerulus เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทุกระยะเวลาการทดลอง ดังนั้น *L. siamensis* อาจไม่สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่ชัดเจนใน glomerulus ของหนูทดลอง BALB/c ซึ่งพบว่าแตกต่างจากผลการศึกษาการทดลองฉีดเชื้อ *L. chagasi* ระยะ amastigote ในหนูทดลอง BALB/c ซึ่งมีจำนวนเซลล์ใน glomerulus เพิ่มขึ้น (proliferative glomerulonephritis) (Prianti et al., 2007)

การตรวจไม่พบเชื้อระยะ amastigote ของ *L. siamensis* จาก buffy coat smear ที่ย้อมสี Giemsa แล้วตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้น อาจมีสาเหตุที่เป็นไปได้จากระยะเวลาที่ศึกษาเริ่มที่ 7 วัน และระดับของการมีเชื้อในกระแสเลือดอาจลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้แล้ว เทคนิคนี้จึงเหมาะสำหรับการใช้ตรวจคัดกรองเบื้องต้นเท่านั้น การใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล

เช่น PCR เพิ่มเติมจะสามารถเพิ่มความไวและมีความจำเพาะในการตรวจหา DNA ของเชื้อเพื่อพิสูจน์ยืนยันได้

ผลการเปรียบเทียบค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น พบว่ากลุ่มที่ฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดมีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำลงในการติดเชื้อระยะเฉียบพลัน (วันที่ 7 และ 14 หลังฉีดเชื้อ) ในขณะที่การฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องพบค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 14 หลังการฉีดเชื้อเท่านั้น ซึ่งพบว่าสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่าหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อ *L. donovani* แสดงภาวะโลหิตจาง โดยมีสาเหตุจากการตายของเซลล์ตั้งต้นของเม็ดเลือดแดง (erythroblast apoptosis) (Lafuse et al., 2013) และสอดคล้องกับรายงานพบผู้ป่วยติดเชื้อ *L. siamensis* อย่างน้อย 5 รายงาน จากผู้ป่วยทั้งหมด 6 คน ที่มีภาวะโลหิตจางร่วมด้วย (Suanratay et al., 2014) ซึ่งสาเหตุน่าจะเกิดจากการติดเชื้อเข้าไขกระดูก (bone marrow leishmaniasis) ส่งผลให้เซลล์ฮิสติโอไซต์ (histiocyte) เก็บกินเซลล์ตั้งต้นของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด (hemophagocytosis) เพิ่มมากขึ้น (Wiwanitkit et al., 2011)

การศึกษานี้พบการตอบสนองทางซีรัมวิทยาต่อการติดเชื้อ *L. siamensis* ในหนู BALB/c จากการฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องหนูในวันที่ 112 หลังการฉีดเชื้อเท่านั้น ในขณะที่การฉีดเชื้อทางใต้ผิวหนังและทางหลอดเลือดดำไม่พบการตอบสนองทางซีรัมวิทยาต่อเชื้อ *L. siamensis* จากการศึกษาการติดเชื้อ *Leishmania* สปีชีส์อื่นพบว่าหลายปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ได้แก่ สปีชีส์ของเชื้อ จำนวนของเชื้อ เส้นทางการติดเชื้อ ระยะเวลาที่ติดเชื้อ และความแตกต่างทางพันธุกรรมของโฮสต์ ซึ่งในโมเดลการติดเชื้อ *Leishmania* ในหนู พบว่ามีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างการแสดงออกทางพยาธิคลินิกและธรรมชาติของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำที่จำเพาะต่อแอนติเจน (Day, 2007) การติดเชื้อเพียงครั้งเดียวในการทดลองนี้ อาจใช้เวลาในการที่ร่างกายต้องได้รับการกระตุ้นจากการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อและมีการติดเชื้อซ้ำจากเชื้อที่มีการแพร่กระจายไปตามอวัยวะต่างๆ เพื่อกระตุ้น humoral immune response ที่เพียงพอ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทดลองวัคซีนที่ผลิตจาก Lipophosphoglycan 3 (LPG3) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเชื้อ *L. infantum* เข้าหนู BALB/c แล้วมีการฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนซ้ำอีก 2 ครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ พบว่าหนูสามารถผลิต immunoglobulin G ตอบสนองต่อการฉีด LPG3 ได้ภายใน 3 สัปดาห์หลังการกระตุ้นครั้งสุดท้าย (Pirdel et al., 2014)

จากการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าหนู BALB/c สามารถถูกทำให้ติดเชื้อ *L. siamensis* ได้จากการทดลองฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดและทางช่องท้อง ซึ่งการฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดจะเหนี่ยวนำให้เกิดรอยโรคในตับ ม้ามได้ไวและชัดเจนกว่าการฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้อง ประกอบกับส่งผลให้ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญในระยะเฉียบพลันหลังการฉีดเชื้อ และพบเชื้อในตับและม้ามโดยมีจำนวนมากว่าการฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้อง หนู BALB/c จึงมีความเหมาะสมในการเป็นหนูทดลองต้นแบบสำหรับการศึกษากลไกการเกิดโรค การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันวิทยา หรือการทดลองยารักษาหรือวัคซีนสำหรับโรคแบบ visceral leishmaniasis ที่เกิดจากเชื้ออุบัติใหม่ *L. siamensis* ได้ต่อไป