รายงานการวิจัย

การตรวจวินิจฉัยเชื้อลิวโคไซโตซูนในเลือดไก่ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

Molecular Detection of Leucocytozoon in Chicken Blood

คณะผู้วิจัย

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร	Nijjareeya Sirisriro
สุภาพร หนูชู	Supaporn Noochoo
ยอดยศ ศรีตังนันท์	Yodyot Sritrangnun

คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากจากมหาวิทยาเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบวิจัยทุนรายได้ประจำปี พ.ศ. 2563

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “การตรวจวินิจฉัยเชื้อลิวโคไซโตซูนในเลือดไก่ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล” ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2563 ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564 เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อก่อให้เกิดเทคนิคตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อที่สามารถตรวจได้รวดเร็วและแม่นยำ มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ให้บริการแก่เจ้าของสัตว์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสัตวแพทย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดการวิจัย ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีสมตามความตั้งใจ

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร

สิงหาคม 2564

การตรวจวินิจฉัยเชื้อลิวโคไซโตซูนในเลือดไก่ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร[1], สุภาพร หนูชู[1], และ ยอดยศ ศรีตังนันท์[2]

บทคัดย่อ

โรคลิวโคไซโตซูโนซีสเป็นโรคปรสิตในเลือดที่สำคัญของไก่ นกและสัตว์ปีกชนิดต่างๆ ซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อโปรโตซัวลิวโคไซโตซูน สัตว์ที่ติดปรสิตจะมีร่างกายอ่อนแอ มีไข้ โลหิตจาง โดยอาการที่แสดงออกขึ้นกับระดับของปรสิตที่มีในกระแสเลือด โปรโตซัวทั้งสองชนิดนี้ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจและเป็นปัญหาสำคัญในการจัดการฟาร์ม งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยการติดปรสิตโดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด ผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่า *Leucocytozoon caulleryi* apicoplast gene และ *Leucocytozoon sabrazesi* mitochondrion cytochrome b สามารถใช้เป็นเป้าหมายใน PCR โดยยีนเป้าหมายทั้งสองสามารถให้ผลการตรวจที่มีความจำเพาะและสามารถจำแนกชนิดของปรสิตได้ และมีความไวในการตรวจที่ระดับ 0.1 pg/µl ของดีเอ็นเอเป้าหมาย

คำสำคัญ: โรคลิวโคไซโตซูโนซีส ลิวโคไซโตซูน การตรวจวินิจฉัย

[1] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

[2] คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Molecular Detection of Leucocytozoon in Chicken Blood

Nijjareeya Sirisriro[1], Supaporn Noochoo[1], and Yodyot Sritrangnun[1]

Abstract

Avian leucocytozoonosis in poultry caused *Leucocytozoon caulleryi* and *Leucocytozoon sabrazesi* infection, is characterized by weakness, fever, anemia depending on parasitemia. The infection caused economic loss and farm management problems. The objective of this project was focused on the development of species-specific detections of Avian leucocytozoonosis by PCR. The results revealed that PCR targeting *Leucocytozoon caulleryi* apicoplast gene and *Leucocytozoon sabrazesi* mitochondrion cytochrome b provided high specificity against two different species and no cross detection to other blood parasites. For sensitivity test, the results showed PCR of both targets can detect the target at 0.1 pg/µl

Keywords: Avian leucocytozoonosis, *Leucocytozoon caulleryi, Leucocytozoon sabrazesi*, detection

[1]Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Srivijaya

[2]Faculty of Arts and Sciences, Kasetsart University

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย	ช
บทนำ	1
1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
2. ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	7
วิธีการดำเนินการวิจัย	9
ผลการวิจัย และอภิปรายผล	12
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	24
บรรณานุกรม	26

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพร์เมอร์ที่ออกแบบสำหรับทดสอบเทคนิค PCR	17

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	วงจรชีวิตของโปรโตซัว Leucocytozoon spp ในไก่และแมลงพาหะนำโรค	3
2	รูปร่างและลักษณะของ Leucocytozoon ระยะ gametocyte ในเม็ดเลือดแดงไก่	7
3	แมลงที่เป็นพาหะนำเชื้อ *Leucocytozoon* spp	8
4	รอยโรคที่พบในไก่ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Leucocytozoon* spp	8
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Leucocytozoon caulleryi* apocytochrome b	13
6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Leucocytozoon caulleryi* apicoplast DNA	14
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Leucocytozoon sabrazesi* mitochondrion cytochrome b	16
8	การทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิค PCR ต่อ *L. caulleryi* apocytochrome b gene	17
9	การทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิค PCR ต่อ L. *caulleryi* apicoplast gene	18
10	การทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิค PCR ต่อ *L. sabrazesi* cytochrome b gene	18
11	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *L. caulleryi* apicoplast gene	19
12	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *L. caulleryi* apicoplast gene	19
13	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *L. caulleryi* apicoplast gene	20
14	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *L. caulleryi* apicoplast gene	20
15	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *L. caulleryi* apicoplast gene	21

16	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *ต่อ L. sabrazesi* cytochrome b gene	21
17	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *ต่อ L. sabrazesi* cytochrome b gene	22
18	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *ต่อ L. sabrazesi* cytochrome b gene	22
19	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *ต่อ L. sabrazesi* cytochrome b gene	23
20	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *ต่อ L. sabrazesi* cytochrome b gene	23

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

µl	=	Microliter
µM	=	Micromolar
BLAST	=	Basic Local Alignment Search Tool
bp	=	Base pair
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
kDa	=	Kilodalton
M	=	Molar
$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimolar
NTL	=	Non-template control
ng	=	nanogram
NS	=	Non-structural protein
nt	=	Nucleotide
OD	=	Optical density
RNA	=	Ribonucleic acid
SDS	=	Sodium Dodecyl Sulfate

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคลิวโคไซโตซูโนซีส (Leucocytozoonosis) เป็นโรคพยาธิในเลือดที่สำคัญของไก่ ซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อโปรโตซัวลิวโคไซโตซูน (*Leucocytozoon* spp.) ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อโปรโตซัวชนิด *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* ไก่ที่ป่วยด้วยโรคชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง หรือไม่แสดงอาการใดๆ ถ้าแสดงอาการมักเป็นแบบเฉียบพลันคือ หงอนและเหนียงซีด ซึม หายใจเร็ว ท้องเสีย ขี้เขียว บางตัวอาจมีอาเจียนออกมาเป็นฟองเลือดเนื่องจากหลอดเลือดที่ปอดแตก อาจมีอาการทางประสาทหรือเสียการทรงตัว โรคลิวโคไซโตซูโนซีสมีริ้นในสกุล *Culicoides* และ *Simulium* spp. เป็นพาหะนำโรค การติดเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่และไก่พื้นเมืองไทยได้

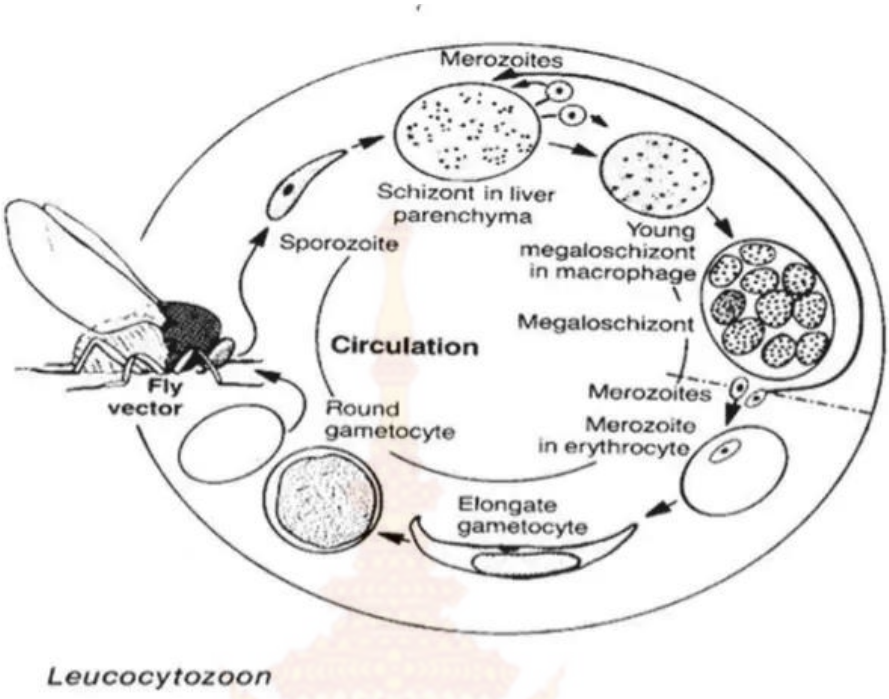
ในปัจจุบันการวินิจฉัยการติดเชื้อโปรโตซัว Leucocytozoon ยังคงอาศัยวิธีการย้อมสีแผ่นฟิลม์เลือดบาง (Thin blood smear) และการตรวจหาเชื้อในเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการใช้วิธีนี้จะมีความไวต่ำ (Low sensitivity) ใช้เวลานาน (Time consuming) และต้องอาศัยประสบการณ์ความชำนาญของผู้ตรวจวินิจฉัย (Well-trained personal) เป็นหลัก รวมถึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการตรวจซ้ำ เพื่อความแม่นยำในการวินิจฉัยโรค โดยเฉพาะในรายที่มีเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ หรือมีอาการแต่ตรวจไม่พบเชื้อ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย ต่อมาจึงได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาร่วมใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อโปรโตซัว วิธีเหล่านี้จะให้ผลการวินิจฉัยที่แม่นยำ (accuracy) มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) สูงกว่าวิธีมาตรฐาน ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อโปรโตซัวลิวโคไซโตซูนในไก่แบบรวดเร็วด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล และนอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังจะได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมาใหม่กับตัวอย่างเลือดทางคลินิก เพื่อบ่งชี้ประสิทธิภาพของวิธีการที่จะได้พัฒนาขึ้นมาใหม่ว่าเหมาะสมที่จะสามารถนำไปใช้เป็นวิธีทางเลือกใหม่ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อโปรโตซัวลิวโคไซโตซูนได้หรือไม่

2. ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคลิวโคไซโตซูโนซีส เป็นโรคปรสิตในเลือดที่สำคัญของไก่ ซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อโปรโตซัวลิวโคไซโตซูน ในประเทศไทยพบการแพร่ระบาดสองชนิดคือ *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* เป็นสาเหตุทำให้ไก่ป่วยและตายในที่สุด การติดเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่ปศุสัตว์ไทย วิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้คือ วิธีการย้อมสีแผ่นฟิลม์เลือดบางหรือวิธี Thin blood smear ซึ่งวิธีนี้จะมีความไวในการวินิจฉัยต่ำ และต้องอาศัยประสบการณ์ของผู้ตรวจเป็นหลัก ต่อมาจึงได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาร่วมใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อโปรโตซัวเช่น วิธี Polymerase chain reaction (PCR) และวิธี Real-time PCR เป็นต้น วิธีเหล่านี้จะให้ผลการวินิจฉัยที่แม่นยำ (accuracy) มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) สูงกว่าวิธีมาตรฐาน และนอกจากนี้ยังสามารถจำแนกเชื้อโปรโตซัวชนิด *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* ออกจากกันได้

2.1 ลักษณะสำคัญ ชีพจักร และการก่อโรคของ *Leucocytozoon* spp.

Leucocytozoon เป็นโปรโตซัวในเลือดจัดอยู่ใน Phylum Apicomplexa Order Haemosporida Family Leucocytozoidae เชื้อใน family นี้มีมากกว่าปัจจุบันมีทั้งหมด 100 species ส่วนใหญ่จะพบในสัตว์ปีก นกสวยงามและนกป่าในหลายประเทศทั่วโลก (Freund D.et al., 2016, Kakogawa M, et al., 2019, Mirzaei F, et al., 2020, Win SY, et al., 2020) ในประเทศไทยส่วนใหญ่มีรายงานพบแต่ในไก่ไข่เลี้ยงแบบอุตสาหกรรมและไก่พื้นเมือง ส่วนข้อมูลในนกยังมีน้อย ชนิดของเชื้อที่สำคัญที่มีรายงานพบทั่วโลกมี 4 ชนิด ได้แก่ *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* พบในไก่เลี้ยง ซึ่งทั้งสองชนิดสามารถพบได้ในประเทศไทย *L. simondi* พบในเป็ดห่าน และ *L. smithi* พบในไก่งวง เชื้อส่วนใหญ่ถูกนำโดย *Simulium* spp. (ริ้นดำ, black fly) และ *Culicoides* spp. (Jumpato W, et al., 2019, Chawengkirttikul R, et al., 2021) โปรโตซัวในระยะที่เจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (gametocyte) ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงเป็นระยะที่แพร่กระจายเชื้อผ่านทางแมลงที่เป็นพาหะ รวมทั้งเป็นระยะที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของโปรโตซัว *Leucocytozoon* spp ในไก่และแมลงพาหะนำโรค (ที่มา www.ndvsu.org)

ชีพจักร

การเจริญของ *Leucocytozoon* spp ต้องการโฮสต์ 2 ชนิด คือแมลงพาหะและสัตว์มีกระดูกสันหลัง ระยะการเจริญแบ่งเป็น

1) การเจริญในแมลงพาหะนำโรค เริ่มจากการที่เม็ดเลือดแดงของไก่และสัตว์ปีกอื่นๆ ที่มีโปรโตซัวในระยะ gamont (gametocyte) ถูกกินโดยพาหะ ได้แก่ *Simulium* spp. และ *Culicoides* spp. ส่วนใหญ่ *Leucocytozoon* spp. มีพาหะเป็น *Simulium* spp. ยกเว้น *L. caulleryi* พาหะ คือ *Culicoides* spp. เช่น *C. arakawae*, *C. circumscriptus* และ *C. odibilis* เป็นต้น ระยะ gamont ที่ได้จากการดูดกินเลือดจะเข้าสู่ ทางเดินอาหารส่วน midgut ของพาหะ โดยสภาพแวดล้อมและระดับ O_2 และ CO_2 ใน midgut จะเป็นตัวกระตุ้นให้เชื้อออกจากเซลล์เม็ดเลือด จากนั้น microgametocyte จะเจริญแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์เคลื่อนที่ได้ที่มี flagellum 1 เส้น จำนวน 8 เซลล์ เพื่อทำการผสมกับ macrogametocyte ที่เจริญต่อจากระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงไก่ เมื่อผสมกันแล้วจะได้ zygote ที่จะไชเข้าสู่ชั้น basal lamina ของ midgut เพื่อแบ่งตัวเพิ่ม

จำนวนเซลล์สร้างเป็น sporozoite อยู่ภายใน oocyst ระยะการเจริญนี้เรียกว่า sporogony เมื่อ oocyst แตกออก sporozoite ที่อยู่ภายในจะถูกปล่อยออกมาเข้าสู่ช่องว่างลำตัว เชื้อจะเคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำลายเพื่อเจริญและรอเวลาที่แมลงพาหะกัดดูดเลือดไก่พร้อมปล่อยเชื้อเข้าสู่บาดแผลต่อไป เวลาที่ใช้สร้าง sporozoite จะนานประมาณ 6 – 7 วัน (Valki**ū**nas G and Iezhova TA, 2017)

2) การเจริญในไก่ เมื่อไก่หรือสัตว์ปีกได้รับ sporozoite ที่แมลงพาหะปล่อยเข้าทางบาดแผล จากนั้น sporozoite จะเข้าสู่กระแสเลือดและไปยังอวัยวะภายในต่าง ๆ เพื่อเจริญในระยะ merogny (schizogony) โดย sporozoite จะเข้าไปเจริญในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ของอวัยวะต่างๆ เพื่อสร้าง primery meront (primary schizont) โดยเฉพาะในม้าม ต่อมน้ำเหลือง ตับ เป็นต้น ภายในมี merozoite ที่มีขนาด 1 ไมครอนประมาณ 1,000 เซลล์ภายใน meront ที่มีขนาดตั้งแต่ 20 – 40 ไมครอน การเจริญในระยะ primary merogony นี้จะให้เวลา 4 – 5 วันหลังติดเชื้อ

เมื่อผนัง primary meront แตกออกจะเป็นการปลดปล่อย merozoite เข้าสู่กระแสเลือดอีกครั้ง merozoite จะเข้าไปเจริญใน hepatic parenchymal cell หรือ vascular endothelial cell และกลายเป็น secondary meront (secondary schizont) และ megaloschizont (megalomeront) การเจริญของ primary meront, secondary meront และ megaloschizont ที่เมื่อเจริญเต็มที่แล้วแตกออก จะเป็นการทำลายเยื่อบุผนังหลอดเลือดและเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ของโฮสต์ ทำให้เกิดพยาธิสภาพ (Steele EJ and Noblet GP, 2001, Valki**ū**nas G and Iezhova TA, 2017, Elbestawy AR, et al., 2021)

เมื่อ megaloschizont เจริญเต็มที่ จะแตกออกพร้อมปล่อย merozoite ที่เจริญอยู่ใน megaloschizont ออกสู่กระแสเลือด และเข้าสู่เม็ดเลือดแดงเจริญไปเป็น gametocyte ต่อไป และเป็นระยะที่ถ่ายทอดไปยังแมลงพาหะ gametocyte (gamont) ที่เจริญอยู่ภายในเม็ดเลือดแดง จะมีการพัฒนารูปร่างของเซลล์เป็นไปตามลักษณะจำเพาะของแต่ species สามารถใช้เป็นหลักในการจำแนกชนิดของเชื้อที่ตรวจพบในกระแสเลือด (Elbestawy AR, et al., 2021)

L. caulleryi ระยะ gametocyte ที่เจริญเต็มที่จะมีรูปร่างกลม (round gamont) อยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง โดยเชื้อจะเบียดนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงจนมีลักษณะเป็นแถบแบนติดสีเข้มเป็นขอบรอบนอกล้อมตัวเชื้อแต่ยังอยู่ในเม็ดเลือดแดง gametocyte แบ่งเป็น 2 ชนิด จะแยกออกจากกันได้ค่อนข้างยาก macrogametocyte หรือ macrogamont มีไซโตพลาสซึมติด

สีน้ำเงินเข้มและนิวเคลียสติดสีชมพู ส่วน microgametocyte หรือ microgamont จะมีรูปร่างลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกับ macrogamont แต่ไซโตพลาสซึมจะติดสีจางกว่าและนิวเคลียสจะกระจายตัวไม่อัดแน่นเท่า macrogametocyte

L. sabrazesi ระยะ gametocyte พบได้ในเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว โดยมีรูปร่าง 2 แบบ คือ elongate form และ round form ในแบบ elongate form เป็นลักษณะของเชื้อที่พบได้บ่อย เซลล์เชื้อจะเบียดนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง ไปอยู่ด้านข้าง เป็นแถบยาวไปตามขอบของตัวเชื้อ ส่วนไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดจะยาวออกไปทั้ง 2 ข้างมีลักษณะคล้ายเขาสัตว์ (horn) ในแบบ round form ตัวเชื้อมีรูปร่างกลม เซลล์เชื้อจะเบียดนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไปอยู่ด้านข้าง แต่ไซโตพลาสซึมไม่ยาวไปทางด้านข้าง ไม่มี horn elongate form การติดสีของไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสของ macrogametocyte และ microgametocyte จะคล้ายกับ *L. caulleryi*

ความก่อโรคในไก่

Leucocytozoonosis คือโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Leucocytozoon* spp ในไก่หรือสัตว์ปีกที่ได้รับเชื้อจากการถูกแมลงที่เป็นพาหะกัดดูดเลือด การเจริญของเชื้อในระยะ merogony ทำให้เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในอวัยวะต่างๆ และเซลล์ตับ ม้ามและเนื้อเยื่อน้ำเหลืองเสียหาย เกิดเซลล์ตาย จากการผ่าซากจะพบจุดเลือดออก (petechial hemorrhages) กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อ เมื่อนำมาศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าในตำแหน่งที่มีจุดเลือดออกมักจะเป็นตำแหน่งที่พบการเจริญของ meronts และ megaloschizonts และอาจพบการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย สำหรับอาการโดยทั่วไปที่พบได้ในไก่ ได้แก่ ขนหยอง ซีด เบื่ออาหาร นอนนิ่งๆ ไม่ค่อยขยับตัว ในไก่ไข่เยื่อตาขาวและหงอนจะมีสีซีด ไข่ลด ไข่มีขนาดเล็ก ส่วนไก่พื้นเมืองมักจะไม่แสดงอาการ และสามารถเป็นตัวกักโรคที่สำคัญได้ (Steele EJ and Noblet GP, 2001, Lee HR, et al., 2016, Himmel T, et al., 2019)

ในกรณีของไก่ที่ติดเชื้อเรื้อรัง (chronic infection) *Leucocytozoon* spp. ไม่ก่อโรครุนแรง มีระดับเชื้อในกระแสเลือด (parasitemia) ค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ในไก่หรือนกที่ตรวจไม่พบเชื้ออาจจะสามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้ในภายหลัง เนื่องจากการเจริญของเชื้อในระยะ merogony จะปล่อย merozoite จาก megaloschizont การตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดจะให้ผลไม่แน่นอนทั้งจำนวนเชื้อและระยะเวลา นอกเหนือจากการเจริญของเชื้อแล้ว ความสมบูรณ์ของ

ร่างกายสัตว์ และระดับของภูมิคุ้มกันในร่างกายก็เป็นปัจจัยสำคัญที่จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเชื้อในกระแสเลือด ในไก่อายุน้อย หรือไก่ที่อ่อนแอ สามารถแสดงอาการของโรคได้รุนแรงกว่าไก่ที่มีอายุมากกว่า (Lee HR, et al., 2016, Himmel T, et al., 2019)

2.2 การตรวจวินิจฉัย

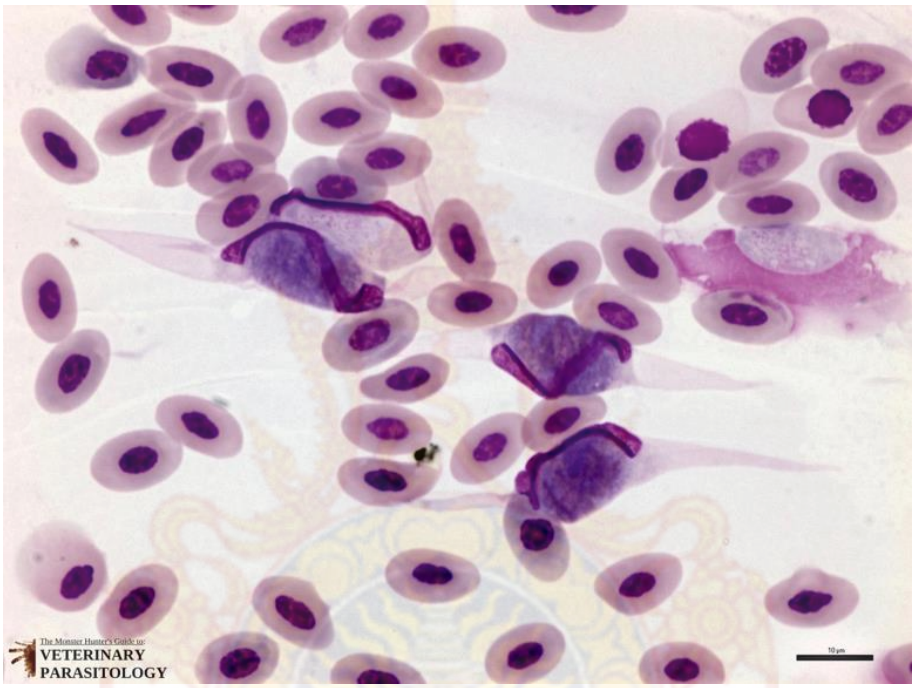
การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ Leucocytozoon ในกระแสเลือด ตรวจได้ด้วยเทคนิคแผ่นฟิล์มเลือดบาง (thin blood smear) และย้อมด้วยสี Giemsa ก่อนนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อหา microgametocyte และ macrogametocyte ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามการตรวจหาเชื้อด้วยแผ่นฟิล์มเลือดบางยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ ได้แก่

1. ความชำนาญของผู้ตรวจหาเชื้อในเม็ดเลือด มีความไวต่ำ (Low sensitivity) ใช้เวลานาน (Time consuming)
2. ความหลากหลายของลักษณะเชื้อที่มีความแตกต่างกันไปตามระยะการเจริญและ species ของเชื้อ
3. คุณภาพของตัวอย่างเลือดที่นำมาศึกษา ตัวอย่างเลือดที่เก็บมาจากฟาร์ม หรือการทำงานภาคสนาม มักจะมีปัญหาในการเก็บรักษาคุณภาพเลือด
4. มีความจำเป็นที่จะต้องทำการตรวจซ้ำ เพื่อความแม่นยำในการวินิจฉัยโรค โดยเฉพาะในรายที่มีเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ หรือมีอาการแต่ตรวจไม่พบเชื้อ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย

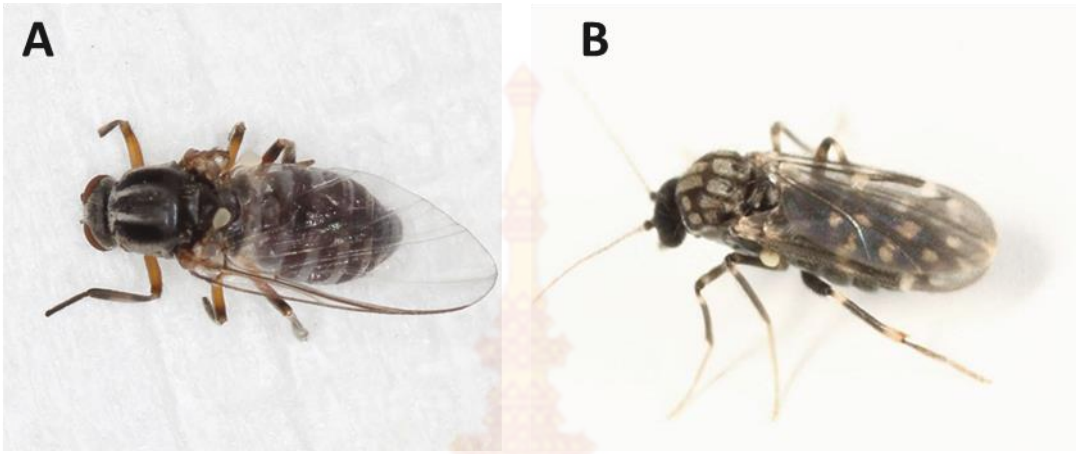
ต่อมาจึงได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาร่วมใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อโปรโตซัวเช่น PCR (Ortego J and Cordero PJ, 2009, Nourani L, et al., 2018, Kakogawa M, et al., 2019, Chawengkirttikul R, et al., 2021), nested-PCR (Szöllsi E, et al., 2008), realtime PCR (Bell JA, et al., 2015, Smith MM et al., 2015), one-step multiplex PCR assay (Ciloglu A, et al., 2019) chromogenic in situ hybridization ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ (Himmel T, et al.,2019) วิธีเหล่านี้จะให้ผลการวินิจฉัยที่แม่นยำ (accuracy) มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) สูงกว่าการตรวจหาเชื้อจากแผ่นฟิล์มเลือดบาง และนอกจากนี้ยังสามารถจำแนกเชื้อโปรโตซัวชนิด *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* ออกจากกันได้

3. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย/ โครงการวิจัย

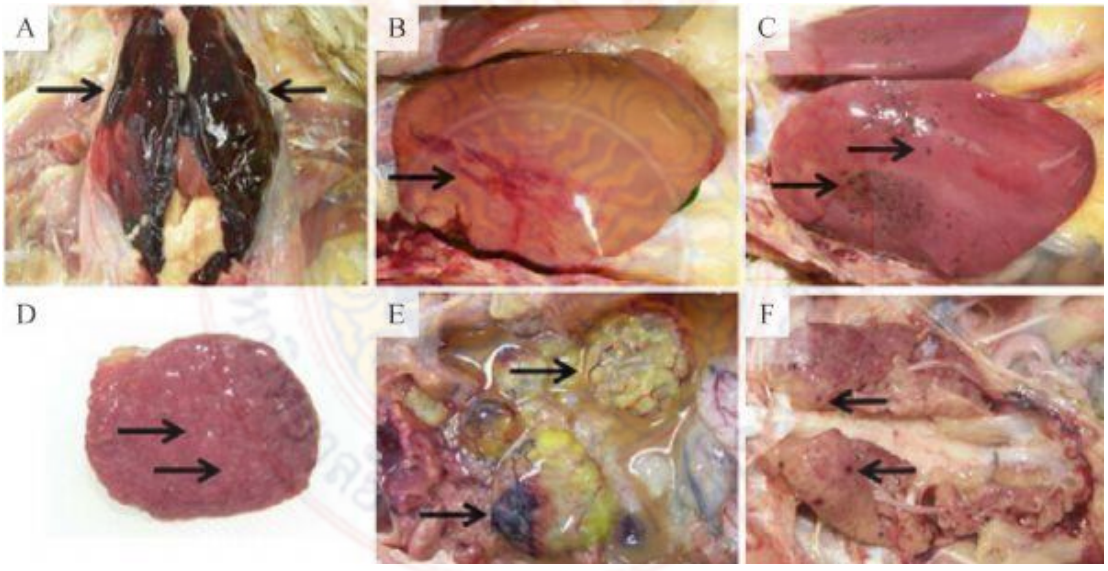
เพื่อพัฒนาการตรวจเป็นการพัฒนาเทคนิคสำหรับตรวจเชื้อในตัวอย่างทางคลินิก



รูปที่ 2 รูปร่างและลักษณะของ *Leucocytozoon* ระยะ gametocyte ในเม็ดเลือดแดงไก่ จากแผ่นฟิล์มเลือดบางย้อมด้วย Giemsa stain, 1,000x magnification, 10 μm scale bar (© Lance Wheeler, 2018) Owner of Specimen: Texas A&M College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pathobiology)



รูปที่ 3 แมลงที่เป็นพาหะนำเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ในไก่ A) *Simulium* spp B) *Culicoides* spp (ที่มา www.ndvsu.org)



รูปที่ 4 รอยโรคที่พบในไก่ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Leucocytozoon* spp (Lee et al., 2016)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเลือดไก่

การสำรวจเริ่มเดือนตุลาคม 2562 ถึงกันยายน 2563 โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดของไก่จำนวน 320 ตัว ไม่พิจารณาสายพันธุ์ กำหนดอายุไม่เกิน 40 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำที่ปีกบน (wing vein) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มเบอร์ 23 ยาว 1 นิ้ว และหลอดฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร เก็บเลือดใส่ในหลอดเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA)

2. การสกัดสารพันธุกรรม

เลือดปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Kit (ThermoFisher, USA) ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจะปฏิบัติตามคู่มือของบริษัท หลังจากสกัดแล้วจะทำการวัดปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้จะทำการเก็บรักษาที่ -20^{O}C จนกว่าจะนำมาใช้

3 การตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิคแผ่นฟิล์มเลือดบาง (Thin blood smear)

ตัวอย่างที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการจะถูกนำไปตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค Thin blood smear โดยใช้เลือด 10 ไมโครลิตร ป้ายบนกระจกสไลด์ ทำซ้ำ 3 แผ่น แล้วย้อมสี Giemsa stain จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40x และ 100x เพื่อตรวจหาเชื้อโปรโตซัวในเลือด (Meixell BW et al., 2016)

3. เทคนิค PCR

3.1 การออกแบบไพร์เมอร์สำหรับ PCR (PCR primer)

ในการออกแบบไพร์เมอร์ (forward และ backward primer) จะใช้โปรแกรม PrimerBlast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) โดยมีเป้าหมายคือยีน *Leucocytozoon caulleryi* mitochondrial apocytochrome b (NCBI Reference Sequence: NC_015304.1), *Leucocytozoon caulleryi* apicoplast DNA (NCBI Reference Sequence: NC_022667.1)

และ *Leucocytozoon sabrazesi* mitochondrion, cytochrome b (NCBI Reference Sequence: NC_009336.1) ในการออกแบบจะคัดเลือกไพร์เมอร์ 2 – 3 คู่มาใช้สำหรับทดสอบและประเมินกับกลุ่มควบคุมบวก จากนั้นเลือก 1 – 2 คู่เพื่อใช้ทดสอบกับตัวอย่างจริงต่อไป

3.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR

การทำ PCR จะใช้ชุดเอนไซม์และบัฟเฟอร์ TopTaq Master Mix Kit (Qiagen, USA) ซึ่งมีส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 µl ประกอบด้วย

Component	Volume/reaction	Final concentration
10x TopTaq PCR Buffer*	5 µl	1X
dNTP mix (10 mM of each)	1 µl	200 µM of each dNTP
Primer A	Variable	0.1–0.5 µM
Primer B	Variable	0.1–0.5 µM
TopTaq DNA Polymerase	0.25 µl	1.25 units/reaction
DNA Template DNA	Variable	50 ng/ reaction
RNase-free water Template	Add to 50 µl	

ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะมีรอบการทำงานดังนี้

Initial denaturation 3 min 94^{O}C

3 step cycling : 35 cycles

Denaturation 30 sec 94^{O}C

Annealing 30 sec 60^{O}C

Extension 1 min 72^{O}C

Final extention 10 min 72^{O}C

ในการอ่านผล PCR จะนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไปทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคการแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) ที่ 1% agarose gel ใน Tris-Boric acid-EDTA buffer (TBE) ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตด้วยการ

ย้อม SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, USA) และส่องดูด้วยแสงสีฟ้า (Blue-light transilluminator)

3.3 การทดสอบหาสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค PCR

ปฏิกิริยาจะถูกทดสอบที่แตกต่างกัน 5 อุณหภูมิ คือ 57 °C, 60 °C, และ 63 °C และตรวจวัดการเกิดผลผลิตด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

3.4 การทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิค PCR

ในการทดสอบความสามารถของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาว่าสามารถตรวจหา *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำเพียงใด

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การพัฒนาเทคนิค PCR ที่มีความจำเพาะต่อ *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi*

คณะผู้วิจัยได้ทำการออกแบบ คัดเลือกและหาความไวเชิงวิเคราะห์ของไพร์เมอร์สำหรับเทคนิค PCR ใหม่แทนการเลือกใช้ชุดไพร์เมอร์ที่ได้ตีพิมพ์แล้ว (Ortego J and Cordero PJ, 2009, Nourani L, et al., 2018, Kakogawa M, et al., 2019, Chawengkirttikul R, et al., 2021) เนื่องจาก 1) ชุดไพร์เมอร์ไม่ได้มีเป้าหมายที่ยีน *L. caulleryi* apocytochrome b และ apicoplast gene และ *L. sabrazesi* cytochrome b 2) สภาวะของปฏิกิริยาและเอนไซม์ที่ใช้มีความแตกต่างกัน และ 3) ลำดับของนิวคลีไทด์ของ ตรวจหา *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* สายพันธุ์ในประเทศไทยมีความแตกต่างจากที่เคยรายงานในประเทศต่าง ๆ ทำให้ความจำเพาะแตกต่างจากที่ได้รายงานไป ดังนั้นเพื่อให้ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิคมีความเป็นจริงตามลักษณะของเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย ทางคณะผู้วิจัยได้ออกแบบไพร์เมอร์ใหม่สำหรับยีน *L. caulleryi* apocytochrome b และ apicoplast gene และ *L. sabrazesi* cytochrome b จำนวนยีนละ 5 คู่ และได้ทำการทดสอบเพื่อคัดเลือกไพร์เมอร์ที่ได้ให้ผลมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด โดยไพร์เมอร์ที่ออกแบบมาใหม่มีเป้าหมายตามที่ได้แสดงใน ตารางที่ 1

2. การทดสอบไพร์เมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจการติด *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi*

ปฏิกิริยาจะถูกทดสอบที่ Annealing temperature แตกต่างกัน 3 อุณหภูมิ คือ 57 °C, 60 °C, และ 63 °C โดยจะทำปฏิกิริยา 35 รอบ เอนไซม์ที่ใช้คือ TopTaq Master Mix Kit (Qiagen, USA) พบว่าอุณหภูมิที่แตกต่างกันทั้ง 3 อุณหภูมิให้ผลการเกิดผลผลิตพีซีอาร์ไม่แตกต่างกัน น้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตเป็นไปตามที่คำนวน และลำดับนิวคลีโอไทด์มีความถูกต้องเมื่อเทียบกับ DNA ต้นแบบ จากการทดสอบเทคนิค PCR สำหรับ *L. caulleryi* apicoplast gene จะใช้ annealing temperature ที่อุณหภูมิ 60 °C และใช้ไพร์เมอร์ LCA_F1161 5’-AGAGGTTGAAAGCAATG GGCTC-3’ และ LCA_R1508 5’-GAATTTGACGAGAATTGAACTCG CA-3' ส่วน *L. caulleryi* apocytochrome b จะใช้ annealing temperature ที่อุณหภูมิ 57 °C และใช้ไพร์เมอร์ LCM_F5504 5-TGCAATTCCAGTTGATAGATACGCT-3’ และ LCM_R5908 5’-

CGCAGCCTTATAATGTTTGC TTGGG-3’ สำหรับ *L. sabrazesi* cytochrome b จะใช้ annealing temperature ที่อุณหภูมิ 60 ℃ และใช้ไพร์เมอร์ LSM_F5426 5’-TCTTAGCCCAAAGC TTGTTTGGAA-3’ และ LSM_R5862 5’-TGCTTGAGAGCTGTAATCATAGTGT-3’

3. การทดสอบความจำเพาะ (specificity test) ของเทคนิค PCR

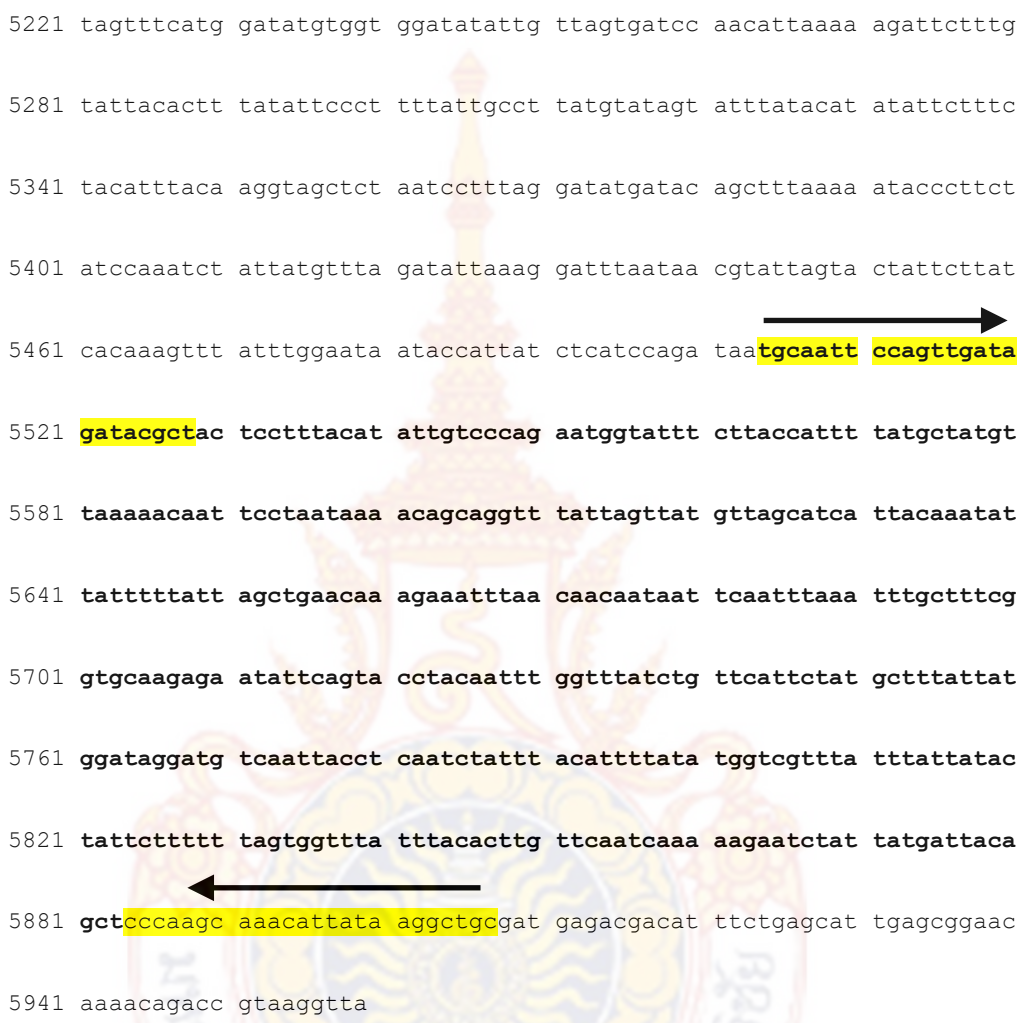
การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ทำโดยการทดสอบกับตัวอย่าง DNA จากเลือดของไก่ที่มีการตรวจพบเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่มีการระบาดในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ได้แก่ microfilaria ผลการทดสอบพบว่าไพร์เมอร์และสภาวะของ PCR ที่ใช้ให้ผลบวกเฉพาะ *ตรวจหา L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* เท่านั้น

4. การทดสอบความไว (sensitivity test) ของเทคนิค PCR

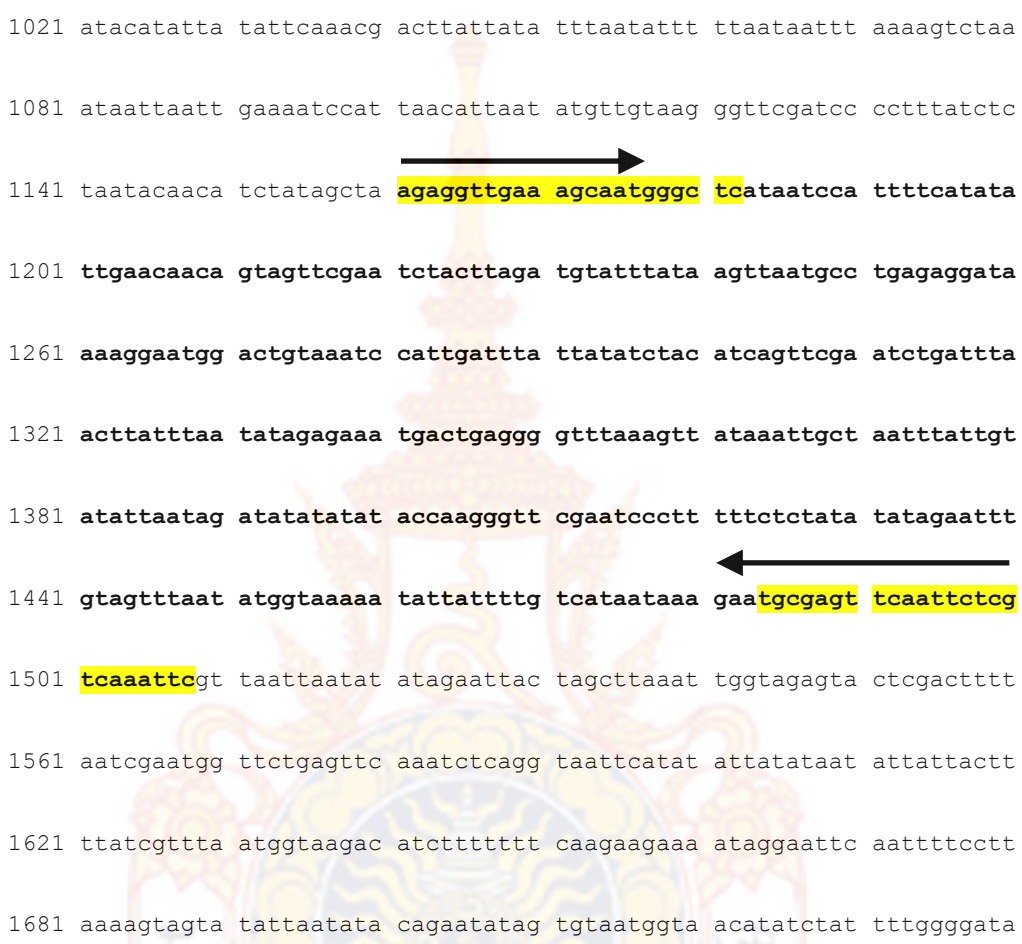
การทดสอบความไวของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ทำโดยการทดสอบกับตัวอย่าง DNA มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จากนั้นทำ 10-fold serial dilution ให้ได้ความเข้มข้น 100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl และ 0.1 pg/µl นำ DNA แต่ละความเข้มข้นมาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการทำ PCR เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สภาวะและไพร์เมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยีนเป้าหมายได้ ผลจากการทดสอบพบว่าค่าความไวสูงสุดของเทคนิค PCR อยู่ที่ 0.1 pg/µl ทั้ง *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi*

5. การทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิก (Evaluation of the assay)

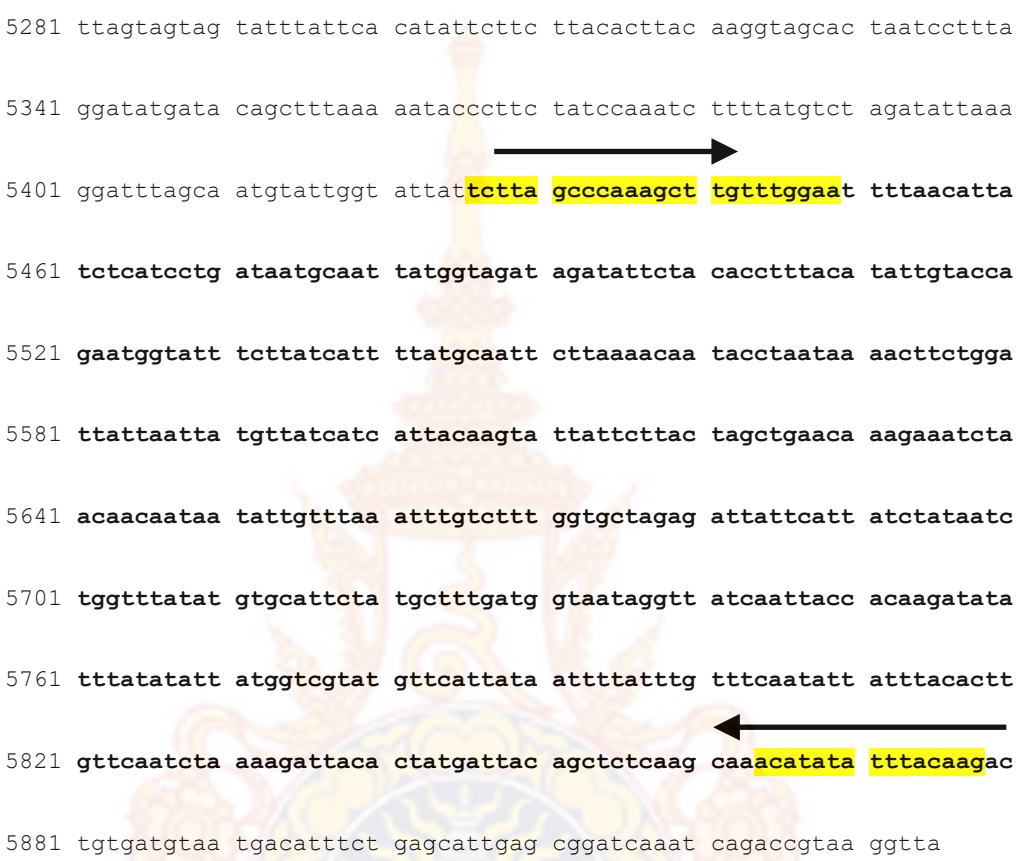
การทดสอบความน่าเชื่อถือของเทคนิค PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในโครงการนี้เพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อ *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* ในโค ทำได้โดยการทดสอบกับตัวอย่างเลือดของโคที่ทำการเจาะตรวจเลือด และตรวจไม่พบปรสิตในเลือดด้วยเทคนิคแผ่นฟิล์มเลือดบางจำนวน 320 ตัวอย่าง พบว่ามี 23 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ ตรวจหา *L. caulleryi* และ และ 24 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ *L. sabrazesi*



รูปที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Leucocytozoon caulleryi* apocytochrome b NCBI Reference Sequence: NC_015304.1 ลูกศรแสดงทิศทางและตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่ใช้ และมีความยาวของ pcr product ที่ 404 bp



รูปที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Leucocytozoon caulleryi* apicoplast DNA NCBI Reference Sequence: NC_022667.1 ลูกศรแสดงทิศทางและตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่ใช้และมีความยาวของ pcr product ที่ 453 bp



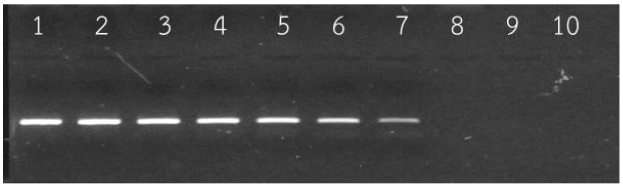
รูปที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Leucocytozoon sabrazesi* mitochondrion cytochrome b NCBI Reference Sequence: NC_009336.1 ลูกศรแสดงทิศทางและตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR และมีความยาวของ pcr product ที่ 309 bp

ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์ที่ออกแบบสำหรับทดสอบเทคนิค PCR

Primer	Sequence	Length (bp)	Tm (^{O}C)	GC (%)	Product Size (bp)
LCA_F1161	AGAGGTTGAAAGCAATGGGCTC	22	60.11	55.0	
LCA_R1508	GAATTTGACGAGAATTGAACTCGCA	25	60.97	55.00	453
LCM_F5504	TGCAATTCCAGTTGATAGATACGCT	25	60.32	55.00	
LCM_R5908	CGCAGCCTTATAATGTTTGCTTGGG	25	58.74	52.63	404
LSM_F5426	TCTTAGCCCAAAGCTTGTTTGGAA	24	62.9	60.0	
LSM_R5862	TGCTTGAGAGCTGTAATCATAGTGT	25	63.1	50.0	436

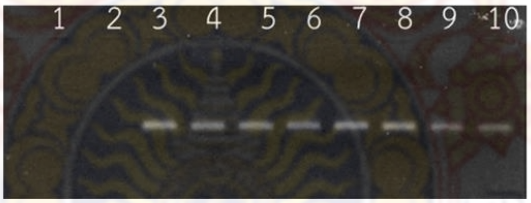
1. *L. caulleryi* control DNA 100 ng/µl
2. *L. caulleryi* control DNA 10 ng/µl
3. *L. caulleryi* control DNA 1 ng/µl
4. *L. caulleryi* control DNA 100 pg/µl
5. *L. caulleryi* control DNA 10 pg/µl
6. *L. caulleryi* control DNA 1 pg/µl
7. *L. caulleryi* control DNA 0.1 pg/µl
8. *L. caulleryi* control DNA 0.01 pg/µl
9. Microfilaria control DNA
10. non template control

รูปที่ 8 การทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิค PCR ต่อ *L. caulleryi* apocytochrome b gene



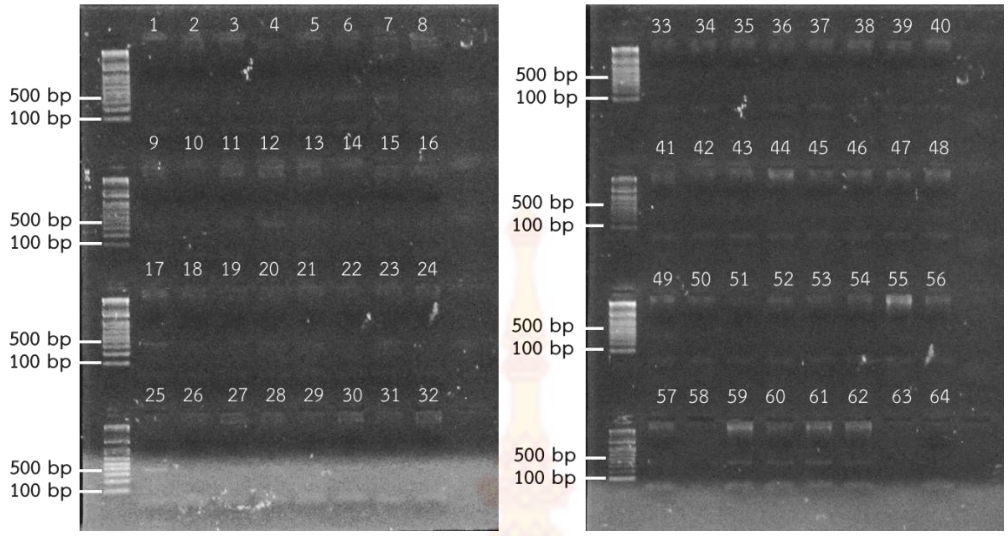
1. *L. caulleryi* control DNA 100 ng/µl
2. *L. caulleryi* control DNA 10 ng/µl
3. *L. caulleryi* control DNA 1 ng/µl
4. *L. caulleryi* control DNA 100 pg/µl
5. *L. caulleryi* control DNA 10 pg/µl
6. *L. caulleryi* control DNA 1 pg/µl
7. *L. caulleryi* control DNA 0.1 pg/µl
8. *L. caulleryi* control DNA 0.01 pg/µl
9. Microfilaria control DNA
10. non template control

รูปที่ 9 การทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิค PCR ต่อ *L. caulleryi* apicoplast gene

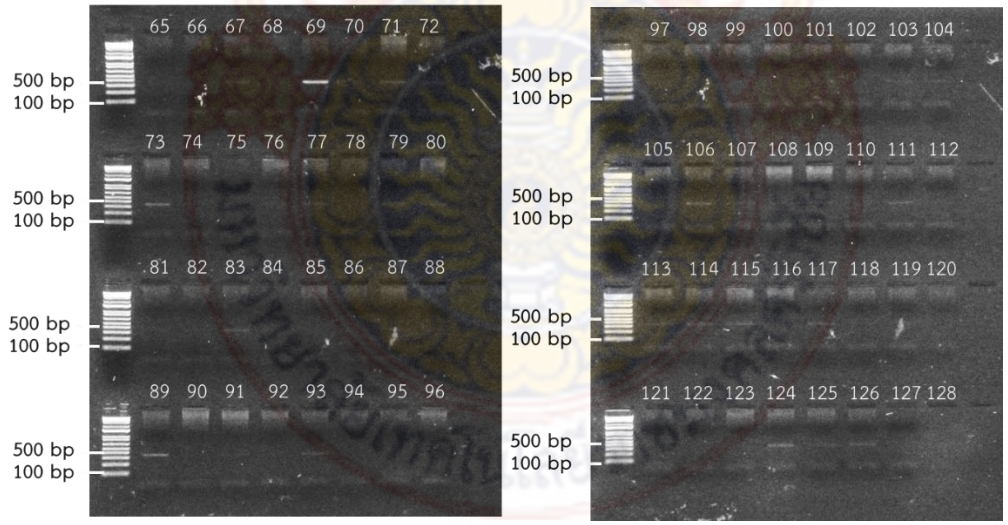


1. non template control
2. Microfilaria control DNA
3. *L. sabrazesi* control DNA 100 ng/µl
4. *L. sabrazesi* control DNA 10 ng/µl
5. *L. sabrazesi* control DNA 1 ng/µl
6. *L. sabrazesi* control DNA 100 pg/µl
7. *L. sabrazesi* control DNA 10 pg/µl
8. *L. sabrazesi* control DNA 1 pg/µl
9. *L. sabrazesi* control DNA 0.1 pg/µl
10. *L. sabrazesi* control DNA 0.01 pg/µl

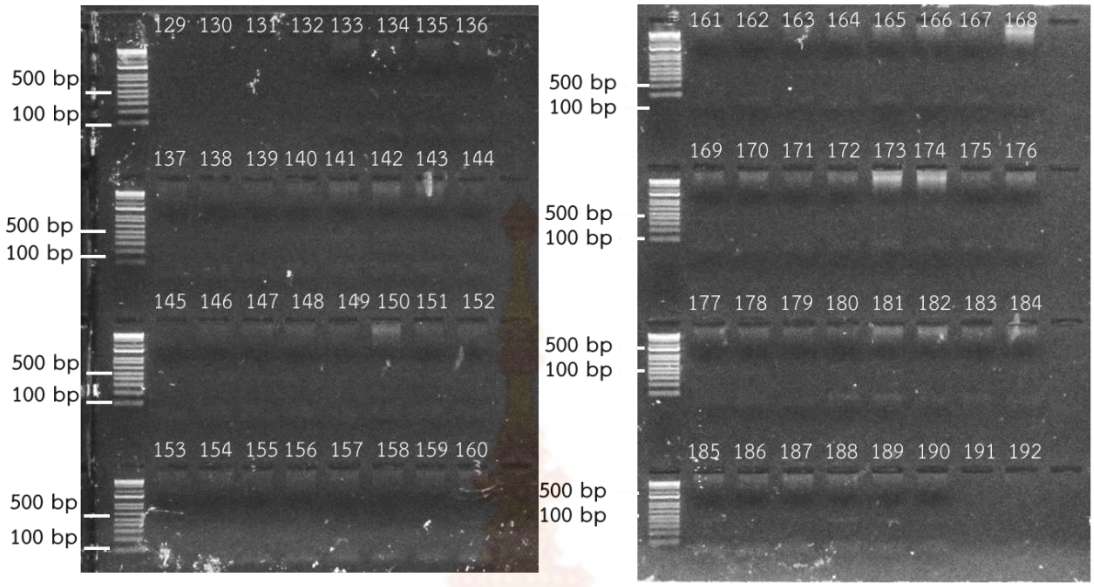
รูปที่ 10 การทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิค PCR ต่อ *L. sabrazesi* cytochrome b gene



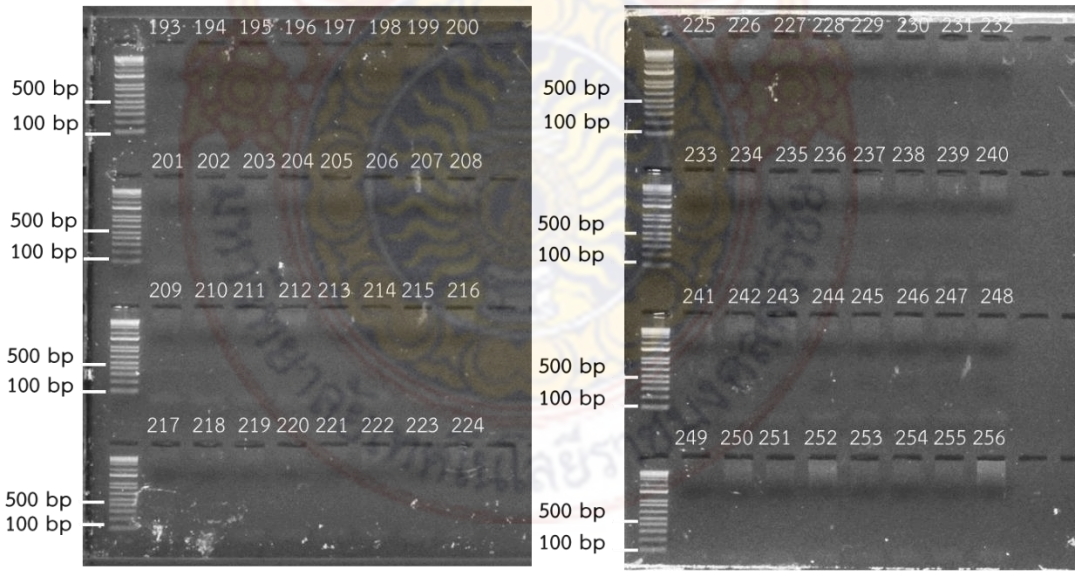
รูปที่ 11 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *L. caulleryi* apicoplast gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ



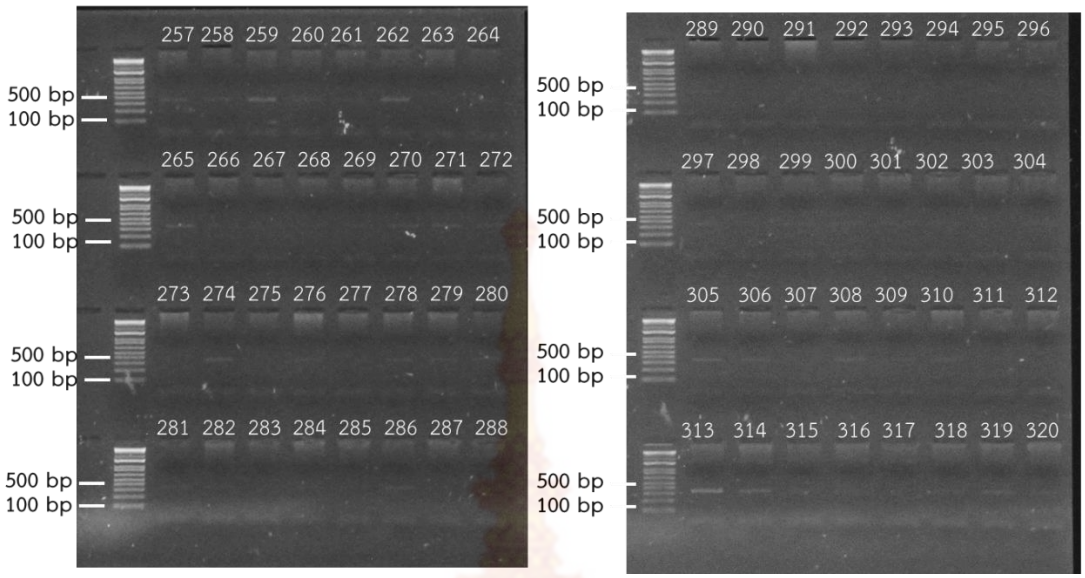
รูปที่ 12 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *L. caulleryi* apicoplast gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ



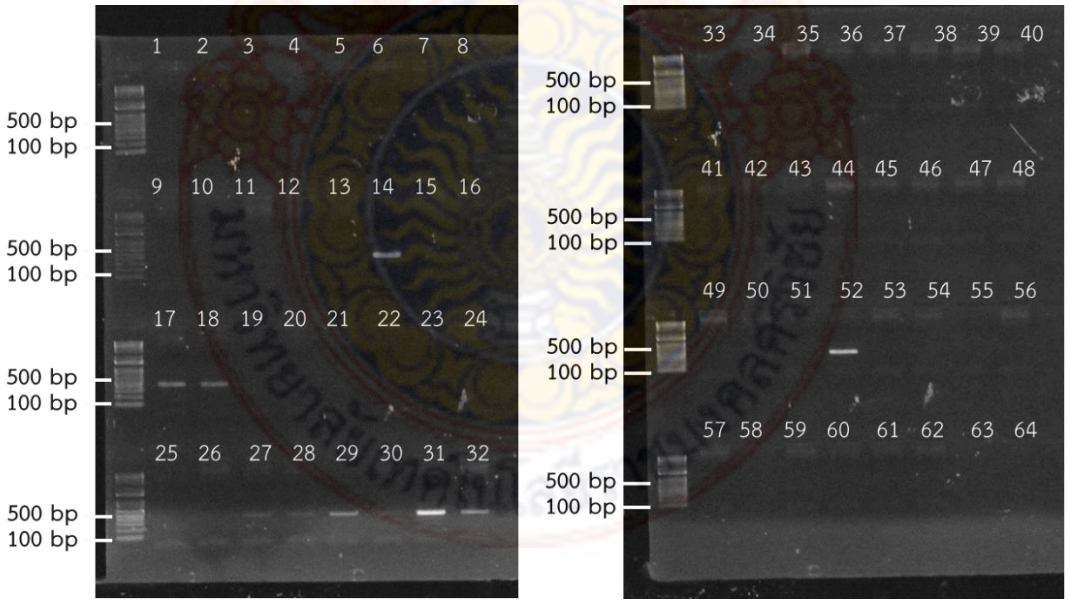
รูปที่ 13 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *L. caulleryi* apicoplast gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ



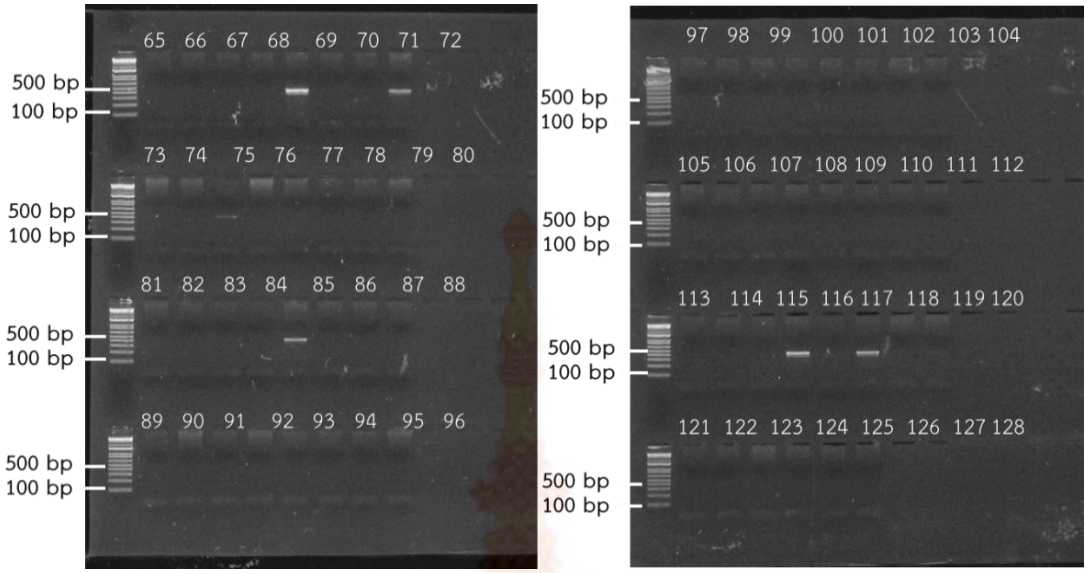
รูปที่ 14 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *L. caulleryi* apicoplast gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ



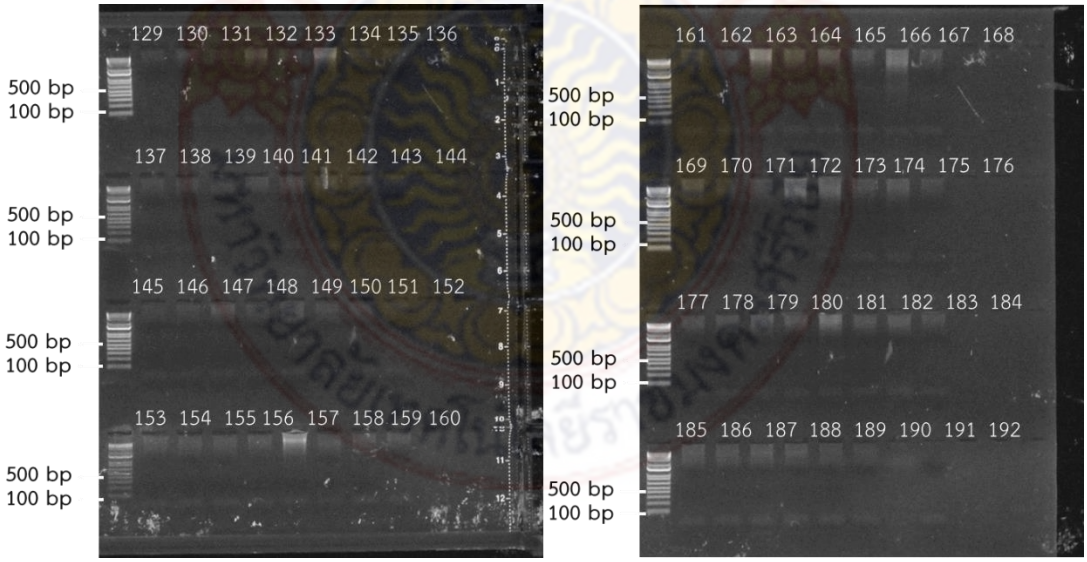
รูปที่ 15 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *L. caulleryi* apicoplast gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ



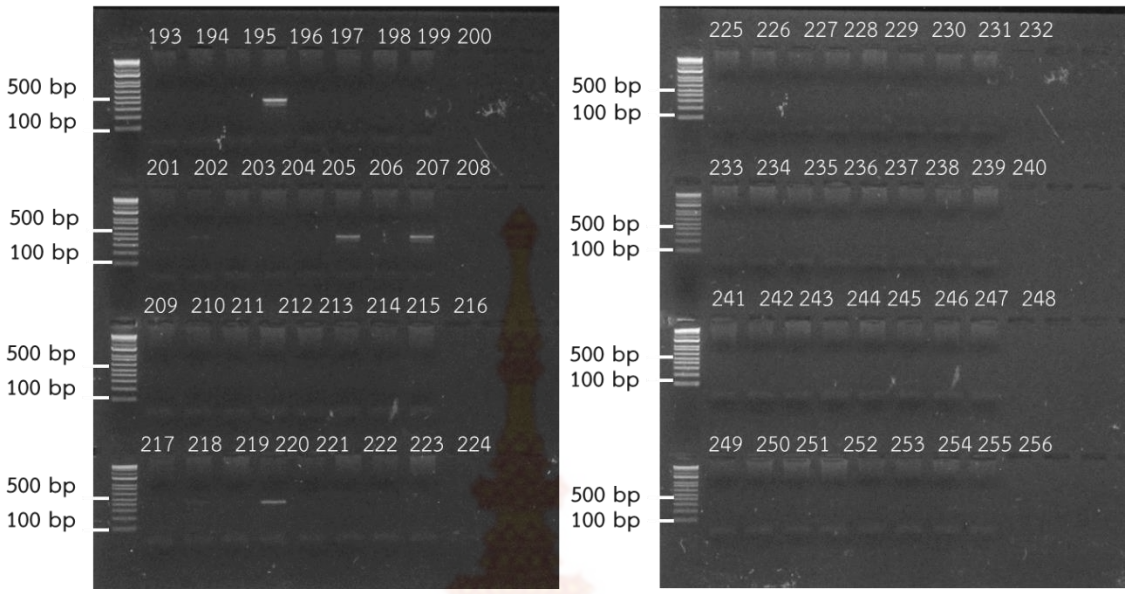
รูปที่ 16 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *ต่อ L. sabrazesi* cytochrome b gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ



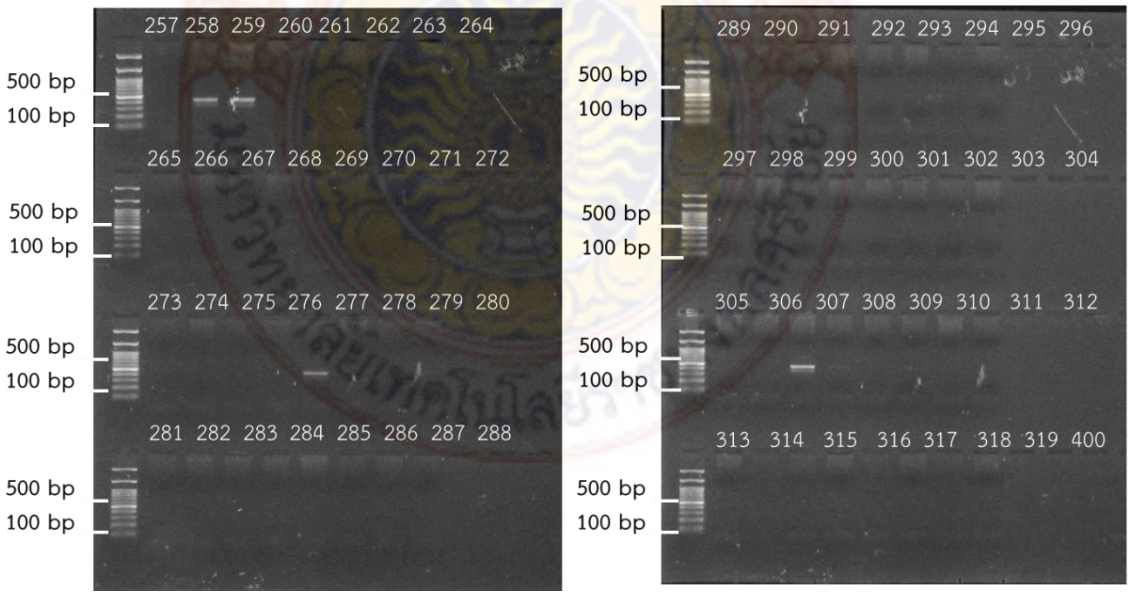
รูปที่ 17 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ ต่อ *L. sabrazesi* cytochrome b gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ



รูปที่ 18 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ ต่อ *L. sabrazesi* cytochrome b gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ



รูปที่ 19 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ ต่อ *L. sabrazesi* cytochrome b gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ



รูปที่ 20 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ ต่อ *L. sabrazesi* cytochrome b gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยการติดปรสิตในเม็ดเลือดแดงชนิด *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* ในไก่ให้มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ปรสิตในประเทศไทยและสามารถใช้จำแนกชนิดของปรสิตได้ เนื่องด้วยปรสิตทั้งสองชนิดมีความใกล้เคียงกันมากด้วยรูปร่างลักษณะจึงทำให้การวินิจฉัยด้วยเทคนิคแผ่นฟิล์มเลือดจำแนกชนิดได้ยาก นอกจากนี้ปรสิตทั้งสองชนิดมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมาก การวินิจฉัยด้วย PCR โดยเลือกใช้ RNA gene เป็นเป้าหมายอาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการจำแนกชนิดปรสิตได้ คณะผู้วิจัยได้เลือก *L. caulleryi* apocytochrome b และ apicoplast gene และ *L. sabrazesi* cytochrome b มาใช้เป็นยีนเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจและจำแนกชนิด เพราะปรสิตทั้งสองมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของสองยีนนี้แตกต่างกัน เมื่อนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจวินิจฉัยจะทำให้การตรวจมีความจำเพาะ สามารถตรวจการติดปรสิตและจำแนกชนิดได้แม่นยำ นอกจากนี้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนทั้งสองยังสามารถนำไปใช้ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมได้ด้วย จากผลการทดสอบในเบื้องต้นของยีนทั้งสองสามารถนำไปใช้เป็นเป้าหมายในการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่นๆ เพื่อนำมาใช้ตรวจการติดปรสิตต่อไปได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามเทคนิคการตรวจวินิจฉัยที่ได้พัฒนาขึ้นมาสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาจาก genomic DNA ของปรสิตได้ แต่ไม่สามารถนำไปตรวจหาจาก cDNA หรือ RNA ของปรสิตได้

1. ไพร์เมอร์และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจการติดปรสิต มีดังนี้

PCR : ทำ 35 รอบ โดยกำหนดสภาวะ Initial denaturation 3 min 94^{O}C, Denaturation 30 sec 94 ^{O}C, Annealing 30 sec 61 ^{O}C, Extension 1 min 72 ^{O}C, Final extention 10 min ^{O}C ไพร์เมอร์ *L. caulleryi* apicoplast gene จะใช้ annealing temperature ที่อุณหภูมิ 60 ℃ และใช้ไพร์เมอร์ LCA_F1161 5’-AGAGGTTGAAAGCAATG GGCTC-3’ และ LCA_R1508 5’-GAATTTGACGAGAATTGAACTCG CA-3' ส่วน *L. caulleryi* apocytochrome b จะใช้ annealing temperature ที่อุณหภูมิ 57 ℃ และใช้ไพร์เมอร์ LCM_F5504 5-TGCAATTCCAGTTGATAGATACGCT-3’ และ LCM_R5908 5’-CGCAGCCTTATAATGTTTGC TTGGG-3’ สำหรับ *L. sabrazesi* cytochrome b จะใช้ annealing temperature ที่อุณหภูมิ

60 °C และใช้ไพร์เมอร์ LSM_F5426 5’-TCTTAGCCCAAAGC TTGTTTGGAA-3’ และ LSM_R5862 5’-TGCTTGAGAGCTGTAATCATAGTGT-3’

จากผลการทดสอบพบว่า *L. caulleryi* apocytochrome b ที่ใช้ annealing temperature ที่อุณหภูมิ 57 °C และใช้ไพร์เมอร์ LCM_F5504 และ LCM_R5908 ให้ผลการทดสอบได้ไม่ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับไพร์เมอร์ *L. caulleryi* apicoplast gene ที่ใช้ LCA_F1161 และ LCA_R1508

2. ความจำเพาะของการตรวจการติดปรสิต

การตรวจการติดปรสิตด้วยเทคนิค PCR โดยมี *L. caulleryi* apocytochrome b และ apicoplast gene และ *L. sabrazesi* cytochrome b เป็นยีนเป้าหมายมีความจำเพาะต่อการตรวจค่อนข้างสูง เนื่องจากให้ผลลบต่อการทดสอบด้วยเชื้ออื่น ๆ ที่มีการระบาดอยู่ในไก่ในพื้นที่เดียวกันคือ microfilaria

3. ความไวของการตรวจการติดเชื้อ

โดยทั่วไปค่าความไวในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายของเทคนิค PCR จะมีค่าประมาณ 0.1-100 ng/µl หรือ 10^2-10^6 copy/µl ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ ความสามารถในการจับกับเป้าหมายของไพร์เมอร์ ความยาวของผลผลิต PCR คุณภาพของ DNA เป็นต้น ในการพัฒนาเทคนิค PCR ตรวจการติด ชนิด *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* ในไก่ ได้ค่าความไวของเทคนิคที่ 0.1 pg/µl นับว่าเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง สามารถนำไปใช้ให้บริการแก่เกษตรกรเจ้าของสัตว์ได้

บรรณานุกรม

Bell JA, Weckstein JD, Fecchio A, Tkach VV. A new real-time PCR protocol for detection of avian haemosporidians. Parasit Vectors. 2015 Jul 19;8:383.

Ciloglu A, Ellis VA, Bernotienė R, Valkiūnas G, Bensch S. A new one-step multiplex PCR assay for simultaneous detection and identification of avian haemosporidian parasites.
Parasitol Res. 2019 Jan;118(1):191-201.

Elbestawy AR, Ellakany HF, Abd El-Hamid HS, Gado AR, Geneedy AM, Noreldin AE, Menshawy S, El-Neweshy M, El-Shall NA, Salaheldin AH. Leucocytozoon caulleryi in Broiler Chicken Flocks: Clinical, Hematologic, Histopathologic, and Molecular Detection. Avian Dis. 2021 Sep;65(3):407-413

Freund D, Wheeler SS, Townsend AK, Boyce WM, Ernest HB, Cicero C, Sehgal RN. Genetic sequence data reveals widespread sharing of Leucocytozoon lineages in corvids. Parasitol Res. 2016 Sep;115(9):3557-65.

Fu S, Qu G, Guo S, Ma L, Zhang N, Zhang S, Gao S, Shen Z. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. Appl Biochem Biotechnol. 2011;163(7):845-50.

Lee HR, Koo BS, Jeon EO, Han MS, Min KCh, Lee SB, Bae Y, Mo IP. Pathology and molecular characterization of recent Leucocytozoon caulleryi cases in layer flocks. J Biomed Res. 2016 Nov;30(6):517-524.

Meixell BW, Arnold TW, Lindberg MS, Smith MM, Runstadler JA, Ramey AM. Detection, prevalence, and transmission of avian hematozoa in waterfowl at the Arctic/sub-Arctic interface: co-infections, viral interactions, and sources of variation. Parasit Vectors. 2016 Jul 7;9(1):390.

Mirzaei F, Siyadatpanah A, Norouzi R, Pournasir S, Nissapatorn V, Pereira ML. Blood Parasites in Domestic Birds in Central Iran. Vet Sci. 2020 Sep 4;7(3):126.

Ortego J, Cordero PJ. PCR-based detection and genotyping of haematozoa (Protozoa) parasitizing eagle owls, Bubo bubo. Parasitol Res. 2009 Jan;104(2):467-70.

Schumm YR, Wecker C, Marek C, Wassmuth M, Bentele A, Willems H, Reiner G, Quillfeldt P. Blood parasites in Passeriformes in central Germany: prevalence and lineage diversity of Haemosporida (Haemoproteus, Plasmodium and Leucocytozoon) in six common songbirds. PeerJ. 2019 Jan 31;6:e6259.

Smith MM, Schmutz J, Apelgren C, Ramey AM. A real-time, quantitative PCR protocol for assessing the relative parasitemia of Leucocytozoon in waterfowl. J Microbiol Methods. 2015 Apr;111:72-7.

Steele EJ, Noblet GP. Gametogenesis, fertilization and ookinete differentiation of Leucocytozoon smithi. J Eukaryot Microbiol. 2001 Jan-Feb;48(1):118-25.

Szöllsi E, Hellgren O, Hasselquist D. A cautionary note on the use of nested PCR for parasite screening--an example from avian blood parasites. J Parasitol. 2008 Apr;94(2):562-4.

Valkiūnas G, Iezhova TA. Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidian parasites. Malar J. 2017 Mar 3;16(1):101.

Zhao W, Pang Q, Xu R, Liu J, Liu S, Li J, Su XZ. Monitoring the Prevalence of Leucocytozoon sabrazesi in Southern China and Testing Tricyclic Compounds against Gametocytes. PLoS One. 2016 Aug 29;11(8):e0161869.