

Prevalence and Molecular Characterization of *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp. in Native Chickens in the Upper Northern Region of Thailand

Kittichai Unjit* Muncharee Tattiyapong Juntra Wattanamethanont Tipkanya Amornchaisuwan
Kingdow Mohkeaw Taweewat Deemagarn

Abstract

Background: *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp., parasites identified within the blood of chickens, are associated with potential disease transmission through insects. The impact of infections leads to significant economic losses within the poultry farming sector. This study aimed to investigate the prevalence and molecular biology characterization of *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp. in native chicken populations raised in the upper northern region of Thailand.

Method: A total of 400 blood samples from chickens were collected across four provinces as Chiang Mai, Chiang Rai, Phayao, and Nan. Blood samples were examined through both stained thin smear and multiplex PCR techniques. After obtaining positive results from multiplex PCR, nucleotide sequences were carried out on a randomly selected of 28 samples. A phylogenetic tree was constructed by analyzing the *cox3* gene from both *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp., with samples obtained from the GenBank database. The agreement between these two testing methods was assessed by Kappa statistic and analyzed the molecular biology of the nucleotide sequences and genetic relationships of the detected parasites.

Result: The findings of this study revealed an 88.8% prevalence of parasites in the blood of native chickens by multiplex PCR. The breakdown of parasite prevalence included *L. sabrazei* at 79%, *P. juxtanucleare* at 73%, *P. gallinaceum* at 6%, and *L. caulleryi* at 2%. The prevalence by province revealed rates of 97.5% in Nan, 92% in Chiang Mai, 85.7% in Chiang Rai, and 64% in Phayao. The agreement values of both methods were at a substantial level. When studying molecular biological characteristics among the organisms, it was found that *L. sabrazei* has higher genetic diversity than the other parasites.

Conclusion: *Plasmodium* and *Leucocytozoon* infections were found in the blood of native chickens in the upper northern region at high levels. Implementing strategic measures, such as promoting improved standards in poultry farming, offering guidance on correct farming and management practices, and controlling disease-carrying insects, is crucial to prevent and manage blood parasite infections in native chickens.

Keywords: Prevalence, Molecular Characterization, Plasmodium, Leucocytozoon, Native Chickens

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, 50/2 Phahonyothin Road, Lat Yao, Chatuchak, Bangkok, 10900

*Corresponding Author: Tel. 0 2579 8911 k_unjit@hotmail.com

Received: 28 May 2024

Revised: 20 June 2024

Accepted: 27 June 2024

ความชุก และลักษณะทางอนุชีววิทยาของเชื้อพลาสโมเดียมและลิวโคไซโตซูนในไก่พื้นเมือง ในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

กิตติชัย อุ่นจิต* มัญชรี ทัตติยพงศ์ จันทรา วัฒนเมธานนท์ ทิพย์กัญญา อมรชัยสุวรรณ
กิงดาว หมอแก้ว ทวีวัฒน์ ตีมะการ

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: เชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium* spp.) และลิวโคไซโตซูน (*Leucocytozoon* spp.) เป็นปรสิตที่พบในเลือดไก่ มีแมลงเป็นพาหะนำโรค ไก่ที่ติดเชื้อก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงเป็นอย่างมาก การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกและลักษณะทางอนุชีววิทยาของเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ในไก่พื้นเมืองในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

วิธีการ: เก็บตัวอย่างเลือดไก่ 400 ตัวอย่าง ในพื้นที่ 4 จังหวัดได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา และน่าน นำเลือดมาตรวจหาเชื้อปรสิตโดยวิธี stained thin smear และ multiplex PCR จากนั้นสุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วย multiplex PCR จำนวน 28 ตัวอย่าง มาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้าง phylogenetic tree โดยอาศัยยีน *cox3* ของเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ร่วมกับตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นวิเคราะห์หาค่าความชุก ลักษณะทางอนุชีววิทยา รวมถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อที่ตรวจพบ และวิเคราะห์หาค่าความสอดคล้องของการตรวจทั้งสองวิธีโดยสถิติ Kappa

ผลการศึกษา: ความชุกของปรสิตในเลือดไก่พื้นเมือง โดยวิธี multiplex PCR สูง 88.8% โดยความชุกของปรสิตแต่ละชนิดพบ *L. sabrazesi* 79% *P. juxtanucleare* 73% *P. gallinaceum* 6% และ *L. caulleryi* 2% ความชุกของปรสิตจากจังหวัดน่าน 97.5% เชียงใหม่ 92% เชียงราย 85.7% และพะเยา 64% ค่าความสอดคล้องของการตรวจทั้งสองวิธีอยู่ในระดับดี เมื่อศึกษาลักษณะทางอนุชีววิทยาของเชื้อ พบ *L. sabrazesi* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าเชื้อปรสิตชนิดอื่น

สรุป: การติดเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ในเลือดไก่พื้นเมืองในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนพบในระดับสูง ดังนั้นควรมีมาตรการในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อปรสิตในเลือดไก่พื้นเมือง โดยส่งเสริมการเลี้ยงให้ได้มาตรฐาน การให้ความรู้และคำแนะนำแก่เกษตรกรให้มีระบบการเลี้ยงและการจัดการที่ถูกต้อง รวมทั้งควบคุมแมลงพาหะเพื่อเป็นแนวทางในการลดอุบัติการณ์ของโรค

คำสำคัญ: ความชุก ลักษณะทางอนุชีววิทยา พลาสโมเดียม ลิวโคไซโตซูน ไก่พื้นเมือง

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ 50/2 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

*ผู้รับผิดชอบบทความ: โทร. 0 2579 8911 k_unjit@hotmail.com

บทนำ

โรคติดเชื้อมาลาเรีย (Plasmodium spp.) และเชื้อลิวโคไซโตซูน (Leucocytozoon spp.) เป็นโรคที่มีแมลงเป็นพาหะนำโรค (vector borne disease) โดยเชื้อทั้ง 2 ชนิดเป็นเชื้อโปรโตซัวที่อยู่ใน order Haemospororida และต้องการโฮสต์ที่มีกระดูกสันหลัง เช่น สัตว์ปีก และโฮสต์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แมลงดูดเลือด โดยเชื้อ Plasmodium spp. มีเยื่อเป็นพาหะนำโรค ได้แก่ ยุงในสกุล Aedes spp. Culex spp. และ Anopheles spp. ส่วนเชื้อ Leucocytozoon spp. มีรีน (Culicoides spp.) เป็นพาหะที่สำคัญในการนำโรค โดยเชื้อที่มีรายงานพบในประเทศไทย ได้แก่ P. gallinaceum (Pattaradilokrat et al., 2015) P. juxtanucleare (Tattiyapong et al., 2016) L. caulleryi (Pohuang et al., 2021) และ L. sabrazesi (พัชรภรณ์ และคณะ, 2560) ซึ่งเชื้อเหล่านี้พบได้บ่อยและก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่ (มานพ, 2545) เนื่องจากเชื้อมีระยะที่อาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage) ทำให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงนำไปสู่ภาวะโลหิตจาง และระยะที่อยู่นอกเม็ดเลือดแดง (exoerythrocytic stage) จะเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อภายในเส้นเลือดฝอยของอวัยวะ เกิดการทำลายอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะในตับ (มานพ, 2545) ไก่อาจไม่แสดงอาการ หรือแสดงอาการ เช่น น้ำหนักลด ผอม มีไข้ ไม่มีแรง อูจาระร่วง ในกรณีติดเชื้อรุนแรงไก่จะมีอาการชัก หงอนซีด และตายได้ ไก่ที่ไม่แสดงอาการอาจเป็นตัวอมโรคไปสู่ไก่ตัวอื่นผ่านแมลงพาหะ การตรวจวินิจฉัยเพื่อหาเชื้อโปรโตซัวในเลือดทำได้โดยวิธี stained thin smear ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (Permin and Hanson, 1998) แต่ถ้าสัตว์ติดเชื้อในระยะแรก อาจตรวจหาเชื้อไม่พบเนื่องจากเชื้อมีปริมาณน้อย และการจำแนกเชื้อทั้ง 2 ชนิดออกจากกันทำได้ยาก การนำเทคนิคทางอณูชีววิทยา มาช่วยตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่ามาใช้เพื่อให้การตรวจมีความถูกต้องยิ่งขึ้น ในปัจจุบันมีการนำเทคนิค PCR (Bensch et al., 2000) Nested PCR (Hellgren et al., 2004) และ multiplex PCR (Xuan et al., 2021) มาช่วยในการตรวจวินิจฉัย ซึ่งนิยม

ใช้ยีน cytochrome b (cytb) ในการศึกษา (Clark et al., 2014) แต่จากการศึกษาของ Zhao et al. (2016) พบว่ายีน cytochrome c oxidase subunit III (cox3) มีความจำเพาะต่อ Leucocytozoon spp. มากกว่ายีน cytb การศึกษาของ Xuan et al. (2021) จึงได้พัฒนาวิธี multiplex PCR โดยออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อยีน cox3 ทำให้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ P. gallinaceum P. juxtanucleare L. sabrazesi และ L. caulleryi ได้ในปฏิกิริยาเดียว นอกจากนี้เทคนิคทางอณูชีววิทยายังมีส่วนช่วยในการศึกษาความหลากหลาย และหาความสัมพันธ์ของเชื้อ จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ศึกษามาเปรียบเทียบกับเชื้อในฐานข้อมูล GenBank ไก่พื้นเมืองมีการเลี้ยงแพร่หลายทั่วประเทศไทย เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนที่มีราคาถูกเลี้ยงง่าย ต้นทุนในการเลี้ยงต่ำ สามารถเลี้ยงเป็นรายได้เสริม หรือเพื่อการแข่งขัน เช่น ไก่ชน โดยพื้นที่ภาคเหนือตอนบนมีการเลี้ยงไก่พื้นเมืองมากกว่า 16 ล้านตัว จากเกษตรกรผู้เลี้ยงจำนวน 348,492 ราย (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์, 2566) ซึ่งมีจำนวนเกษตรกรรายย่อยที่เลี้ยงมากเป็นอันดับสองรองจากภาคตะวันออกเฉียกเหนือ แต่ปัญหาที่พบในการเลี้ยงไก่พื้นเมือง คือการเลี้ยงและการจัดการฟาร์มที่ยังไม่ดีพอ โดยเกษตรกรส่วนใหญ่ มีการเลี้ยงแบบระบบเปิด ปล่อยให้หากินเองตามธรรมชาติในบริเวณบ้าน และให้เศษอาหารที่เหลือจากครัวเรือน หรืออาจให้อาหารเสริมเป็นบางครั้ง โดยไก่จะจิกกินอาหารที่ปนเปื้อนจากพื้น อาจส่งผลให้ไก่พื้นเมืองมีโอกาสติดเชื้อปรสิตและเชื้ออื่น ๆ จากสิ่งแวดล้อมสูงขึ้น นอกจากนี้ข้อมูลความชุกและลักษณะทางอณูชีววิทยาของเชื้อ Plasmodium spp. และ Leucocytozoon spp. ในไก่พื้นเมืองที่เลี้ยงในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนระหว่างปี 2555 – 2565 มีจำกัด โดยพบเพียงการศึกษาทางอณูชีววิทยาของเชื้อ L. sabrazesi ในจังหวัดเชียงราย (Chawengkirttikul et al., 2021) เท่านั้น ซึ่งข้อมูลลักษณะทางอณูชีววิทยามีความสำคัญในเชิงระบาดวิทยา ทำให้ทราบความสัมพันธ์ของแหล่งที่มาของเชื้อ และชนิดของโฮสต์ รวมทั้งให้ผลถูกต้อง แม่นยำ ทำให้ทราบสถานะของโรคในพื้นที่ที่ตรงกับความเป็นจริง ซึ่งเป็นประโยชน์ในด้านการควบคุมและป้องกันโรค

เนื่องจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีพาหะในการนำโรคที่ต่างกัน รวมทั้งยาที่ใช้ในการรักษาต่างกัน วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ในไก่พื้นเมืองที่เลี้ยงในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน ศึกษาลักษณะทางอนุชีววิทยาของเชื้อที่ตรวจพบ และเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการตรวจหาเชื้อโดยวิธี stained thin smear และ multiplex PCR ซึ่งข้อมูลที่ได้ทำให้ทราบสภาวะโรคในพื้นที่ และนำข้อมูลมาช่วยในการวางแผน ควบคุม และป้องกันโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง และพื้นที่ศึกษา

ตัวอย่างเลือดไก่ที่ใช้ในการศึกษา คำนวณจากประชากรไก่พื้นเมืองทั้งหมดในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์, 2566) โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่น 95% ค่าความคลาดเคลื่อน 5% ระดับความชุกที่คาดว่าจะพบเชื้อ 50% ตามวิธีของ Yamane (1973) ทำการเก็บตัวอย่างเลือดไก่พื้นเมือง จำนวน 400 ตัวอย่าง จาก 4 จังหวัดที่มีประชากรไก่พื้นเมืองสูงสุดตามสัดส่วนประชากรไก่ในแต่ละจังหวัด ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ พะเยา และน่าน โดยเก็บตัวอย่างระหว่างเดือนมีนาคม ถึงเดือนเมษายน 2566 ซึ่งการศึกษาในตัวอย่างดังกล่าว ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (EA-004/66R)

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดไก่พื้นเมือง จำนวน 400 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น จังหวัดเชียงราย 140 ตัวอย่าง จาก 14 ฟาร์ม เชียงใหม่ 100 ตัวอย่าง จาก 10 ฟาร์ม พะเยา 80 ตัวอย่าง จาก 8 ฟาร์ม และน่าน 80 ตัวอย่าง จาก 8 ฟาร์ม โดยเก็บเลือดจากเส้นเลือดบริเวณใต้ปีก (wing vein) ปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร ใส่หลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-8°C จนกว่าทำการทดสอบ

การตรวจด้วยวิธี stained thin smear

นำตัวอย่างเลือดไก่ มาทำการป้ายเลือดแบบบางลงบนสไลด์ (thin smear) ภายใน 24 ชั่วโมงหลังเก็บตัวอย่าง คงสภาพด้วย absolute methanol นาน 5 นาที จากนั้นย้อมเลือดป้ายสไลด์ด้วย 5% Giemsa นาน 40 นาที และมาตรวจหาเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 100 เท่า (100x) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อตามวิธีของ มานพ (2545)

การตรวจด้วยวิธี multiplex PCR

นำตัวอย่างเลือด มาสกัดสารพันธุกรรมชนิด DNA ด้วยชุดสกัด DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN, Germany) ตามขั้นตอนวิธีของบริษัทผู้ผลิต ตรวจหาสารพันธุกรรมที่บริเวณยีน *cox3* ของเชื้อด้วยวิธี multiplex PCR (Xuan et al., 2021) โดยใช้ส่วนผสมประกอบด้วย Primer (ตารางที่ 1), QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Germany) และ DNA 2 µL โดยปรับปริมาตรรวมให้ได้ 25 µL ตามขั้นตอนของผู้ผลิต นำสารละลายผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Applied Biosystems™ รุ่น Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA) ประกอบด้วย ขั้นตอน Initial denaturation ที่ 95°C นาน 15 นาที ตามด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 95°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 59°C นาน 90 วินาที extension ที่ 72°C นาน 90 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที จากนั้นนำ PCR product ไปวิเคราะห์ขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที ย้อม gel ด้วย Novel juice (Bio-Helix., Taiwan) แล้วนำไปวิเคราะห์ขนาดของ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องถ่ายภาพเอกสารพันธุกรรมรุ่น GelDoc Go Imaging System (Bio-Rad Laboratories., USA) โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 100 bp (New England Biolabs, USA) ดัง ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Primer sequences for specific detection and amplification of *P. gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *L. sabraezesi* and *L. caulleryi* and their PCR products size (bp)

Primer name	Sequence (5' to 3')	Concentration (μM)	PCR product size (bp)
<i>P. gallinaceum</i>			
PGCox3F	TGTAACAAATAAAGCTTCTGAAATTATTAATGAT	0.2	469
PGCox3R	CCTGGAGTTCTTCATCTAAATTGAA	0.2	
<i>P. juxtannucleare</i>			
PJCox3F	CTAAATGTAAATATTAGTAGCTTGAATGATC	0.2	666
PJCox3R	CAACAATACACGCTATGTTTTATTATGTA	0.2	
<i>L. caulleryi</i>			
LCCox3F	GCTTTGAACACGAATATAATTCGTCTAATA	0.15	1,040
LCCox3R	GCCTGGAGTTCTTAATCTTGATAGAT	0.15	
<i>L. sabraezesi</i>			
LSCox3F	CATATGAGAAACCAATAACAGATGGTATA	0.2	868
LSCox3R	ACGCCTGGAGTTTCATGTGA	0.2	

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

คัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี multiplex PCR จากแต่ละจังหวัดโดยเลือกตัวอย่างบวกจำนวนอย่างน้อย 2 ตัวอย่าง/ชนิดของเชื้อ/จังหวัด มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณยีน *cox3* ด้วยวิธี singleplex PCR โดยใช้ส่วนผสมประกอบด้วย Primer จำเพาะของเชื้อแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) ความเข้มข้น 0.3 μM, HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Germany) และ DNA 4 μL โดยปรับปริมาตรรวมให้ได้ 50 μL ตามขั้นตอนของผู้ผลิต และทำตามสภาวะของวิธี multiplex PCR ข้างต้น จากนั้นตัดแถบ DNA เป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 469, 666, 868 และ 1,040 bp จาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) นำมาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อที่ตรวจพบ โดยใช้ BigDye v3.1 Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) ด้วยเครื่อง Applied Biosystems 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) ตามขั้นตอนของผู้ผลิต

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999) และยืนยันชนิดของเชื้อโดยการตรวจสอบความเหมือน (% Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่

ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรมออนไลน์ Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple sequence alignment) ของยีน *cox3* จากตัวอย่างที่ศึกษาและจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW (Higgins et al., 1994) สร้างและวิเคราะห์แผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum Likelihood และทดสอบความเชื่อมั่นด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA X version 10.2 (Kumar et al., 2018)

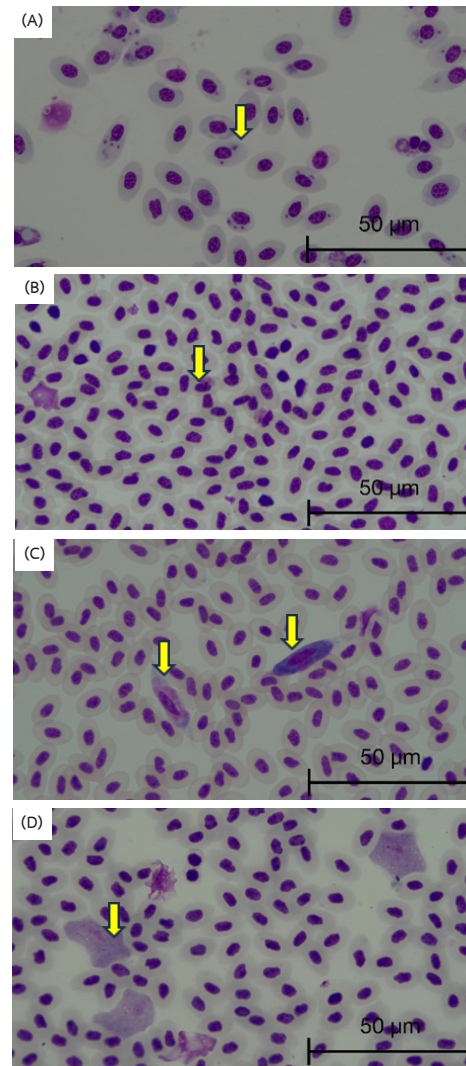
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความชุกแบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional study) ณ ช่วงเวลาที่ศึกษา วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา ตามชนิดของเชื้อที่พบ และเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการตรวจหาเชื้อโดยวิธี stained thin smear และ multiplex PCR ด้วยสถิติ Kappa (McHugh, 2012) โดยใช้โปรแกรม R version 4.2.3 (R Core Team, 2021) ชุดคำสั่ง “fmsb” โดยใช้เกณฑ์วัดตาม Weighted Kappa Index (Landis and Koch, 1977) มีค่าตัดสินดังนี้ <0.00 = แย่ (poor), 0.00-0.20 = น้อย (slight), 0.21-0.40 = พอใช้ (fair), 0.41-0.60 = ปานกลาง (moderate), 0.61-0.80 = ดี (substantial), 0.80-1.00 = ค่อนข้างสมบูรณ์ (almost perfect)

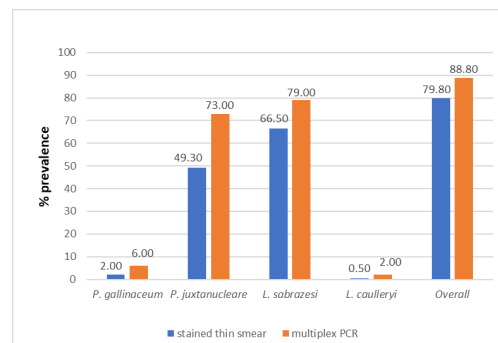
ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจโดยวิธี stained thin smear พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ดังแสดงตามรูปที่ 1 (A-D) ความชุกของการติดเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ในภาพรวมอยู่ในระดับสูง 79.8% (319/400) โดยพบความชุกของการติดเชื้อ *L. sabraezesi* 66.5% (266/400), *P. juxtannucleare* 49.3% (197/400),

P. gallinaceum 2% (8/400) และ *L. caulleryi* 0.5% (2/400) ตามลำดับ สอดคล้องกับการตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยวิธี multiplex PCR พบความชุกของการติดปรสิตในภาพรวมที่ 88.8% (355/400) โดยความชุกของการติดปรสิตแต่ละชนิดพบ *L. sabrazesi* 79% (316/400), *P. juxtannucleare* 73% (292/400), *P. gallinaceum* 6% (24/400) และ *L. caulleryi* 2% (8/400) ตามลำดับ (รูปที่ 2) จากข้อมูลพบว่าการตรวจโดยวิธี multiplex PCR ตรวจพบเชื้อสูงกว่าวิธี stained thin smear อาจเนื่องจากการตรวจโดยวิธี multiplex PCR เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ โดยใช้ปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อทำให้เพิ่มโอกาสการตรวจพบเชื้อสูงขึ้น ในขณะที่การตรวจโดยวิธี stained thin smear ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีทักษะ ความชำนาญและประสบการณ์ (Chawengkirttikul et al., 2021) โดยเฉพาะการติดเชื้อในระยะแรก อาจตรวจไม่พบเนื่องจากเชื้อมีปริมาณน้อยทำให้เกิดผลลบ (false negative) (Zhao et al., 2016) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า การตรวจหาเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์มีความไว (sensitivity) ต่ำกว่าการตรวจโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular technique) (Richard et al., 2002; Rantala et al., 2010; Doctor et al., 2016; Zhao et al., 2016) อย่างไรก็ตามวิธี stained thin smear ยังเป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปเนื่องจากเป็นวิธีมาตรฐาน ประหยัดและมีความน่าเชื่อถือ (Valkiunas et al., 2008) นอกจากนี้ยังสามารถบอกระยะของเชื้อได้ (Mbanefo and Kumar, 2020) ถึงแม้วิธีการตรวจทางอณูชีววิทยาจะมีความไวต่อการตรวจสูง แต่ก็มีค่าใช้จ่ายในการตรวจสูงเช่นกัน เนื่องจากจำเป็นต้องใช้เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์เฉพาะในการตรวจ ดังนั้นอาจพิจารณาการตรวจหาเชื้อทางอณูชีววิทยาเมื่อจำเป็น เช่น ต้องการตรวจยืนยันผลการตรวจโดย stained thin smear ในกรณีสงสัยผลการตรวจ การศึกษานี้พบ *L. caulleryi* อยู่ในระดับต่ำกว่าเชื้อชนิดอื่น อาจเนื่องจากเชื้อนี้ก่อความรุนแรงของโรคมากกว่าเชื้อชนิดอื่น โดยทำให้เกิดโรคเลือดออกอย่างรุนแรง (fatal hemorrhagic disease) ในไก่อายุน้อย (Nakamura, 2022) ทำให้พบเชื้อนี้น้อยกว่าเชื้อชนิดอื่น ซึ่งไ้มีความทนต่อการติดเชื้อมากกว่า



รูปที่ 1 The morphological characteristics of *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp. using the stained thin smear method: (A) Trophozoite stage of *P. gallinaceum*; (B) Gametocyte stage of *P. juxtannucleare*; (C) Elongate form of microgametocyte and macrogametocyte stage of *L. sabrazesi*; and (D) Microgametocyte stage of *L. caulleryi* (arrow) (100x)



รูปที่ 2 Comparison of %prevalence of *P. gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *L. sabrazesi* and *L. caulleryi* infection in native chickens in upper Northern Thailand during March to April 2023 tested between stained thin smear and multiplex PCR (n=400)

ตารางที่ 2 Prevalence of *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp. infection in native chickens in upper Northern Thailand during March to April 2023 based on multiplex PCR

Blood parasite infection (n=400)	Number of infections in each Province				Total (% Prevalence)
	Chiangmai	Chiangrai	Phayoa	Nan	
Single infection					
<i>P. gallinaceum</i>	0	0	0	0	0 (0)
<i>P. juxtanucleare</i>	8	12	9	2	32 (8)
<i>L. sabrazesi</i>	15	21	14	4	54 (13.5)
<i>L. caulleryi</i>	2	2	2	0	6 (1.5)
Double infection					
<i>P. gallinaceum</i> and <i>L. sabrazesi</i>	1	0	0	1	2 (0.5)
<i>P. juxtanucleare</i> and <i>L. sabrazesi</i>	61	74	36	66	237 (59.3)
<i>P. juxtanucleare</i> and <i>L. caulleryi</i>	0	1	1	0	2 (0.5)
Triple infection					
<i>P. gallinaceum</i> <i>P. juxtanucleare</i> and <i>L. sabrazesi</i>	5	10	2	5	22 (5.5)
Total of positive (%prevalence)	92(92.0)	121(85.7)	64(80)	78(97.5)	355(88.8)
Negative	8	20	16	2	45 (11.25)
Overall	100	140	80	80	400

ผลการศึกษาความชุกรายจังหวัดโดยวิธี multiplex PCR (ตารางที่ 2) พบว่าความชุกของการติดเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. อยู่ที่ 80-97.5% โดยพบการติดเชื้อสูงสุดที่จังหวัดน่าน และพบการติดเชื้อสูงสุดเป็นการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *P. juxtanucleare* และ *L. sabrazei* ในทุกจังหวัด ซึ่งมีความชุกในภาพรวม 59.3% นอกจากนี้ ยังพบติดเชื้อ 3 ชนิดร่วมกัน คือ *P. gallinaceum* *P. juxtanucleare* และ *L. sabrazei* ที่ระดับความชุก 5.5% ส่วนการติดเชื้อชนิดเดียวพบเชื้อ *L. sabrazei* สูงสุด แต่ไม่พบการติดเชื้อ *P. gallinaceum* เพียงชนิดเดียว การศึกษานี้พบความชุกของการติดเชื้อ *Leucocytozoon* spp. สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนในจังหวัดเชียงใหม่ (พัชรารณ และคณะ, 2560) น่าน (อ้อมฤทัย และคณะ, 2555) และเชียงราย (Chawengkirttikul et al., 2021) ที่พบอัตราการติดเชื้อ *L. sabrazei* ในระดับสูงและ *L. caulleryi* ในระดับต่ำ ส่วนความชุกของการติดเชื้อ *P. juxtanucleare* 73% และ *P. gallinaceum* 6% แตกต่างกับการศึกษาในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งตรวจไม่พบ *Plasmodium* spp. (พัชรารณ และคณะ, 2560) และจังหวัดน่านพบความชุกของ *Plasmodium* spp. ในระดับต่ำที่ 3.81% (อ้อมฤทัย และคณะ, 2555) แต่สอดคล้องกับการศึกษาทางภาคใต้ ในจังหวัดนครศรีธรรมราช และ

สุราษฎร์ธานี พบ *Plasmodium* spp. 64.91% (Boonchuay et al., 2023) ซึ่งเป็นการศึกษาในช่วงปี 2021-2022 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษานี้ ทั้งนี้มีหลายปัจจัยที่สัมพันธ์กับความชุกของการตรวจพบเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ในไก่ เช่น ปัจจัยจากตัวสัตว์ เชื้อปรสิต สิ่งแวดล้อม และการจัดการ (Ishtiaq et al., 2007) อีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญคือ ความชุกชุมของแมลงพาหะในบริเวณที่ทำการศึกษา เนื่องจากเชื่อดังกล่าวมีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะนำโรค มีรายงานว่าแนวโน้มของสายพันธุ์ปรสิตที่แตกต่างกันนั้นสัมพันธ์กับชนิดของแมลงพาหะในพื้นที่นั้น ๆ (Ishtiaq et al., 2007)

ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้องของการตรวจหาเชื้อทั้ง 4 ชนิด ในเลือดไก่พื้นเมือง โดยวิธี stained thin smear และ multiplex PCR (ตารางที่ 3) พบความสอดคล้องของการตรวจ *P. gallinaceum* (kappa=0.484) และ *P. juxtanucleare* (kappa=0.528) ในระดับปานกลาง (moderate) ความสอดคล้องของการตรวจ *L. sabrazei* (kappa=0.691) และการตรวจหาเชื้อปรสิตในเลือดในภาพรวม (kappa=0.666) ในระดับดี (substantial) แต่จากการตรวจหาความสอดคล้องของการตรวจหา *L. caulleryi* ไม่สามารถประเมินได้ เนื่องจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกมีจำนวนน้อยเกินไป จึงทำให้ไม่

ตารางที่ 3 Kappa statistical comparisons of detection results of *P. gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *L. sabrazesi*, *L. caulleryi* and overall test result between stained thin smear and multiplex PCR

Blood Parasite		multiplex PCR			Kappa* (Agreement)	95% CI
		Negative	Positive	Total		
<i>P. gallinaceum</i>	Negative	376	16	392	0.484 (Moderate)	0.237-0.732
	Positive	0	8	8		
	Total	376	24	400		
<i>P. juxtannucleare</i>	Negative	108	95	203	0.528 (Moderate)	0.445-0.611
	Positive	0	197	197		
	Total	108	292	400		
<i>L. sabrazesi</i>	Negative	84	50	134	0.691 (Substantial)	0.610-0.770
	Positive	0	266	266		
	Total	84	316	400		
<i>L. caulleryi</i>	Negative	392	6	398	0.395 (Fair)	-0.085-0.875
	Positive	0	2	2		
	Total	392	8	400		
Overall	Negative	45	36	81	0.666 (Substantial)	0.562-0.770
	Positive	0	319	319		
	Total	45	355	400		

*Weighted Kappa Index (Landis and Koch, 1977) <0.00 = poor, 0.00-0.20 = slight, 0.21-0.40 = fair, 0.41-0.60 = moderate, 0.61-0.80 = substantial, 0.80-1.00 = almost perfect

สามารถใช้สถิติในการวิเคราะห์ได้ (Taube, 2010) ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับการตรวจหาปรสิตในเลือดโกโดยวิธี stained thin smear และ multiplex PCR ของ Xuan et al. (2021) พบว่าผลการตรวจ *L. sabrazesi* ให้ผลความสอดคล้องในระดับดี (substantial) อาจเนื่องจากเชื้อ *L. sabrazesi* ในระยะ gametocyte มีลักษณะค่อนข้างจำเพาะทำให้ตรวจวินิจฉัยจำแนกง่ายกว่าเชื้อชนิดอื่น ในขณะที่การตรวจหา *P. gallinaceum* *P. juxtannucleare* และการตรวจหาเชื้อปรสิตในเลือดในภาพรวมให้ผลความสอดคล้องแตกต่างจากการศึกษาของ Xuan et al. (2021) ที่พบผลความสอดคล้องของการตรวจหาเชื้อปรสิตในเลือดทั้งสองวิธีอยู่ในระดับพอใช้ (fair) อาจเนื่องจากการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์จำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีทักษะและประสบการณ์ในการตรวจมาจำแนกชนิดของปรสิต ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญ (Chawengkirttikul et al., 2021) ทำให้ค่าความสอดคล้องของวิธีการตรวจแตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการ จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจหาปรสิตในเลือดมีความสำคัญต่อผลการศึกษา นอกจากนี้ควรพิจารณาข้อมูลอื่น ๆ ประกอบการตรวจหาเชื้อปรสิตในเลือด เช่น สังเกตจากอาการสัตว์ ดูภาวะโลหิตจางจากค่าเลือด ได้แก่ ค่าการอัดแน่นของเม็ดเลือดแดง (PCV) มาช่วยประกอบการวินิจฉัยในการตรวจหาเชื้อ

จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox3* และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่มีขนาด 469, 666, 868, และ 1,040 bp มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ (percent identities) ของเชื้อ *P. gallinaceum* (99.04-100%), *P. juxtannucleare* (99.52-100%), *L. sabrazesi* (98.56-100%), และ *L. caulleryi* (99.52-100%) ตามลำดับ ทั้งนี้ได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทั้ง 28 ตัวอย่าง ไปรายงานลงในฐานข้อมูลของ DNA Data Bank of Japan (DDBJ) และได้รับ accession number LC802762- LC802789 และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ศึกษา มาจัดเรียงและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple sequence alignment) แยกตามชนิดเชื้อโดยไม่รวมไพรเมอร์ด้วย โปรแกรม ClustalW พบว่าเชื้อ *P. gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *L. sabrazesi*, และ *L. caulleryi* มีค่าความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 99.5-100% (407 bp), 99.8-100% (603 bp), 95.9-100% (820 bp) และ 99.7-100% (983 bp) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *L. sabrazesi* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยตัวอย่างจากจังหวัดเชียงราย (LC802785/LS/

ChiangRai-116/Thailand/2023) และจากจังหวัดน่าน (LC802787/LS/Nan-48/Thailand/2023) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกับตัวอย่างอื่น 18 และ 12 ตำแหน่ง ตามลำดับ (รูปที่ 3) ต่างกับการศึกษาของ Chawengkirttikul et al. (2021) ที่พบความหลากหลายของ *L. sabrazesi* ดำในยีน *cytb* ส่วน *P. juxtannucleare* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 495 ของบริเวณที่ศึกษาพบว่าแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมีนิวคลีโอไทด์เป็น A และกลุ่มที่สองมีนิวคลีโอไทด์เป็น G

สำหรับความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่พบในการศึกษานี้กับเชื้อที่รายงานพบในประเทศต่างๆ พบว่ากลุ่มเชื้อ *P. gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *L. sabrazesi*, และ *L. caulleryi* มีค่าความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 98.8-100%, 99.5-100%, 98.5-100% และ 99.2-100% ตามลำดับ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทั้ง 4 ชนิดถูกจัดแยกกลุ่มอย่างชัดเจน (รูปที่ 4) และสอดคล้องกับผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยพบว่าเชื้อ *L. sabrazesi* (LC802782-LC802789) ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อที่เคยรายงานพบในประเทศไทย (MT987647) ส่วนเชื้อ *P. juxtannucleare* (LC802768-LC802775) กลุ่มที่มีนิวคลีโอไทด์เป็น A (LC802768, LC802770 และ LC802772) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อที่เคยรายงานพบในประเทศบราซิล (MG598392-3, MG598396) และประเทศญี่ปุ่น (AB250415) อาจเกิดจากการติดเชื้อจากนกอพยพที่มาจากประเทศดังกล่าว ส่วนกลุ่มที่สองมีนิวคลีโอไทด์เป็น G (LC802769, LC802771 และ LC802773-5) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อที่เคยรายงานพบในประเทศไทย (MT987648)

สรุป

ความชุกของการติดเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ในไก่พื้นเมืองในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน มีความชุกในระดับสูง ความสอดคล้องจากการ

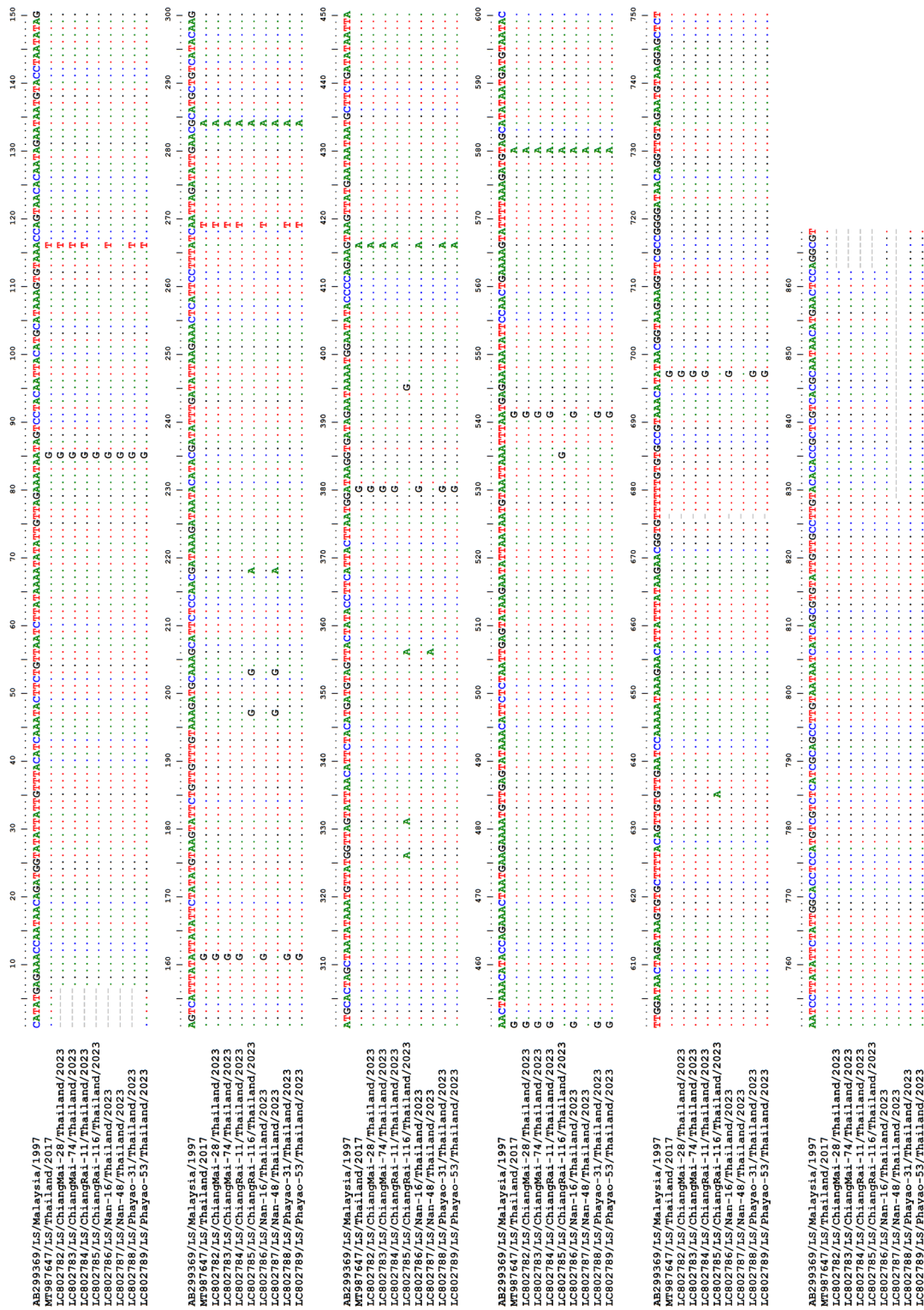
ตรวจหาเชื้อโดยวิธี stained thin smear และ multiplex PCR อยู่ในระดับดี (substantial) และลักษณะทางอนุชีววิทยาของเชื้อ *L. sabrazesi* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าเชื้อชนิดอื่น ๆ

ข้อเสนอแนะ

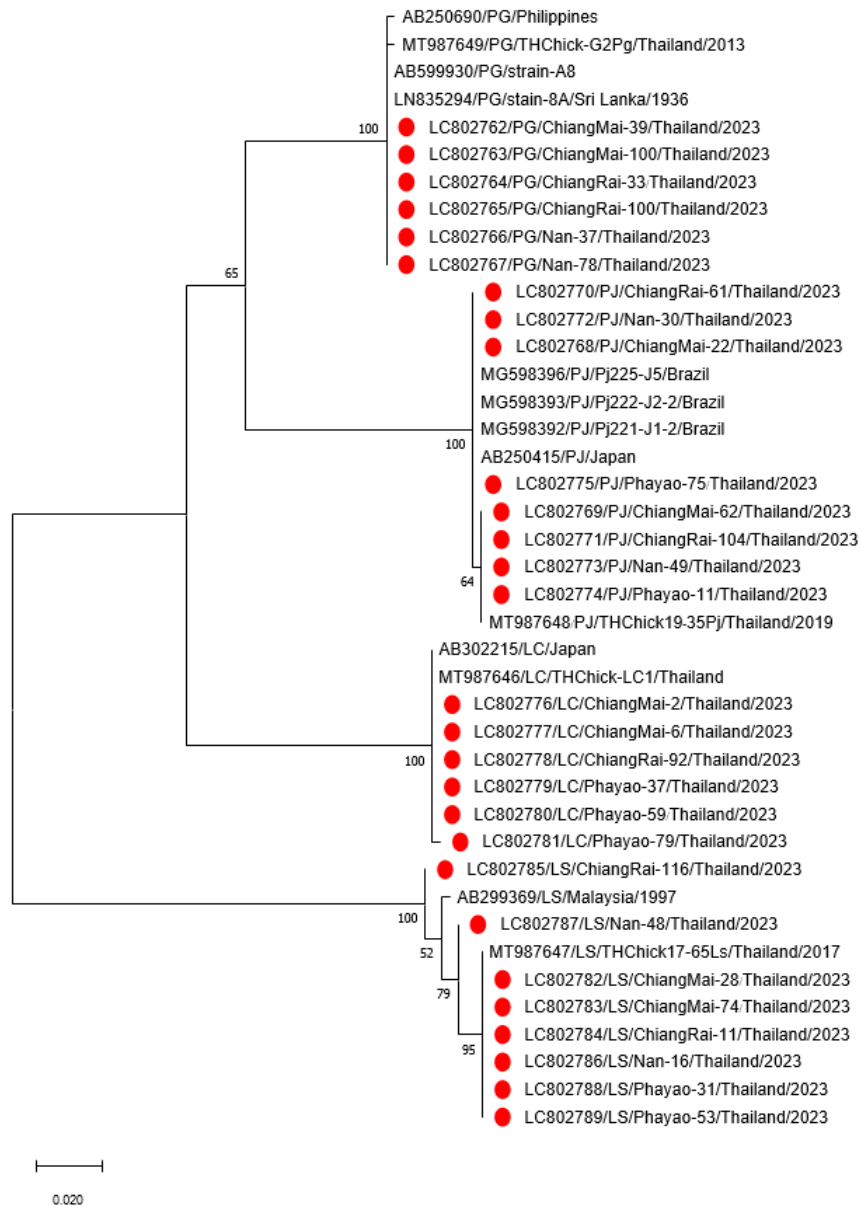
ควรมีการศึกษาชนิดและความชุกชุมของแมลงพาหะในฟาร์มสัตว์ปีก เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประเมินความเสี่ยงของการติดเชื้อปรสิตในเลือดสัตว์ปีกในแต่ละพื้นที่ และควรมีการจัดการฟาร์มที่ดี มีการเลี้ยงสัตว์ให้ถูกสุขลักษณะ รวมทั้งการควบคุมแมลงพาหะในบริเวณฟาร์มอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของปรสิตในเลือดสัตว์ปีกภายในฟาร์ม การควบคุมแมลงพาหะเป็นการตัดวงจรการแพร่เชื้อ และลดการแพร่กระจายของเชื้อไปสู่สัตว์ปีกอื่นที่เลี้ยงในบริเวณใกล้เคียง นอกจากนี้ควรศึกษาลักษณะทางอนุชีววิทยาของเชื้อพลาสโมเดียมและลิวโคไซโตซูนในไก่พื้นเมืองในจังหวัดอื่น ๆ เพิ่มเติม และควรมีการศึกษายีนบริเวณอื่น เช่น *cytb*, *cox1* และ *cox3* รวมถึงการศึกษาหลายยีนร่วมกัน (Noorong et al., 2022) เพื่อดูความหลากหลายของเชื้อในแต่ละยีนซึ่งมีประโยชน์ในด้านการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย น่าน และพะเยา ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง เจ้าหน้าที่กลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ช่วยตรวจตัวอย่าง และขอขอบคุณ สพ.ญ.ดร.อรพรรณ อาจคำภา สำนักงานปศุสัตว์เขต 4 ที่ช่วยให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ



รูปที่ 3 Multiple nucleotide sequence alignments illustrate the variable positions of *cox3* gene from 8 samples of *L. sabrozesi* (LC802782-LC802789) and those retrieved from the NCBI GenBank database.



รูปที่ 4 Phylogenetic tree illustrates the evolutionary relationships among *cox3* gene sequences of *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp. from this study (●) compared with isolates from the GenBank database using the Maximum Likelihood method, Tamura 3-parameter model, and confidence testing using the bootstrap method for 1,000 times using the MEGA X version 10.2.6 program (Kumar et al., 2018).

เอกสารอ้างอิง

- พัชรภรณ์ ทาแกง สุรัชย์ พิภูแก้ว ญัฐกานต์ อัยวานนท์ และสุรรัตน์ หนูมี. 2560. ความชุกและปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อปรสิตในเลือดไก่หลังบ้านในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร. 15(3): 157-167.
- มานพ ม่วงใหญ่. 2545. พลาสมาเดียม ลิโวไซโตซูน และเฮโมโปรเตียส: วิทยาลัยสัตวศาสตร์และสัตวแพทย์. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ: 160-178.
- ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศ และการสื่อสาร กรมปศุสัตว์. 2566. “ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และปศุสัตว์ รายเดือน ปี 2566” [Online]. Available: https://ict.dld.go.th/webnew/images/stories/stat_web/yearly/2566/country/6-chick.pdf [4 มกราคม 2566].
- อ้อมฤทัยใจจันทร์ วีรวัฒน์ โพธิ์สุยะ และรัฐัญ แสนบัวผัน. 2555. ความชุกและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อปรสิตในเลือดไก่พื้นเมืองจังหวัดน่าน ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2554 - สิงหาคม พ.ศ. 2555. สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดน่าน. 1-10.
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Ostman, O., Hansson, B., Westerdahl, H., Pinheiro, R.T. 2000. Host specificity in avian blood parasites: A study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc Biol Sci.* Aug 7; 267(1452): 1583-9. doi: 10.1098/rspb.2000.1181. PMID: 11007335; PMCID: PMC1690711.
- Boonchuay, K., Thomrongsuwanakij, T., Chagas, C. R. F. and Pornpanom, P. 2023. Prevalence and Diversity of Blood Parasites (*Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Trypanosoma*) in Backyard Chickens (*Gallus gallus domesticus*) Raised in Southern Thailand. *Animals*. 13(17): 2798.
- Chawengkirttikul, R., Junsiri, W., Watthanadirek, A., Poolsawat, N., Minsakorn, S., Srionrod, N., and Anuracpreeda, P. 2021. Molecular detection and genetic diversity of *Leucocytozoon sabraezesi* in chickens in Thailand. *Sci Rep*. 11 (1): 16686.
- Clark, N. J., Clegg, S. M., and Lima, M. R. 2014. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: *Haemosporida*): New insights from molecular data. *International journal for parasitology*, 44(5), 329-338.
- Doctor, S. M., Liu, Y., Whitesell, A., Thwai, K. L., Taylor, S. M., Janko, M., Emch, M., Kashamuka, M., Muwonga, J., Tshefu, A. and Meshnick, S. R. 2016. Malaria surveillance in the Democratic Republic of the Congo: Comparison of microscopy, PCR, and rapid diagnostic test. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 85(1): 16-8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.004.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hellgren, O., Waldenström, J. and Bensch, S. 2004. A New PCR Assay for Simultaneous Studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from Avian Blood. *The Journal of Parasitology*. 90(4): 797-802.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22: 4673-4680.
- Ishtiaq, F., Gering, E., Rappole, J. H., Rahmani, A. R., Jhala, Y. V., Dove, C. J., Milensky, C., Olson, S. L., Peirce, M. A. and Fleischer, R. C. 2007. Prevalence and diversity of avian hematozoan parasites in Asia: A regional survey. *J Wildl Dis*. 43(3): 382-398.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 35(6): 1547-1549.
- Landis, J. R. and Koch, G. G. 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 33(1): 159-174.
- Mbanefo, A. and Kumar, N. 2020. Evaluation of Malaria Diagnostic Methods as a Key for Successful Control and Elimination Programs. *Trop Med Infect Dis*. 5(2):102.
- McHugh, M. L. 2012. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb)*. 22(3): 276-282.
- Nakamura, K. 2022. *Leucocytozoon caulleryi* Infection in Chickens: Etiology, Pathology, and Diagnosis. *JARQ*. 56 (2): 121-127.

- Nooroong, P., Watthanadirek, A., Minsakorn, S., Poolsawat, N., Junsiri, W., Srionrod, N., Sangchuai, S., Chawengkirttikul, R. and Anuracpreeda P. 2022. Molecular genetic diversity and bioinformatic analysis of *Leucocytozoon sabrazesi* based on the mitochondrial genes *cytb*, *coxI* and *coxIII* and co-infection of *Plasmodium* spp. *Parasite*. 29: 22. doi: 10.1051/parasite/2022022.
- Pattaradilokrat, S., Tiyananee, W., Simpalipan, P., Kaewthamasorn, M., Saiwichai, T., Li, J. and Harnyuttanakorn, P. 2015. Molecular detection of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* in Thailand. *Vet Parasitol*. 210 (1-2): 1-9.
- Pohuang, T., Jittimane, S. and Junnu, S. 2021. Pathology and molecular characterization of *Leucocytozoon caulleryi* from backyard chickens in Khon Kaen Province, Thailand. *Vet World*. 14 (10): 2634-2639.
- Permin, A. and Hansen, J. W. 1998. Epidemiology, Diagnosis and Control of Poultry Parasites. *FAO Animal Health Manuals 4*. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Rome. Italy. p. 160.
- R Core Team. 2021. "R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria." [Online]. Available: <https://www.R-project.org/>. [October 4, 2023]
- Rantala, A. M., Taylor, S. M., Trotman, P. A., Luntamo, M., Mbewe, B., Maleta, K., Kulmala, T., Ashorn, P. and Meshnick, S. R. 2010. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malaria Journal*. 9(1): 269.
- Richard, F. A., Sehgal, R. N., Jones, H. I. and Smith, T. B. 2002. A comparative analysis of PCR Based detection methods for avian malaria. *J Parasitol*. 88(4): 819-822.
- Tattiyapong, M., Deemagarn, T., Mohkeaw, K., Ngamjiteu, S. and Jiratanh, M. 2016. Molecular characterization of *Plasmodium juxtanucleare* in Burmese red junglefowls (*Gallus gallus spadiceus*) in Thailand. *J Protozool Res*. 26: 1-10.
- Taube, A. 2010. Kappa - A Critical Review. Department of Statistic, Uppsala University, 70p.
- Valkiunas, G., Iezhova, T. A., Krizanauskiene, A., Palinauskas, V., Sehgal, R. N. and Bensch, S. 2008. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *J Parasitol*. 94(6): 1395-1401.
- Xuan, M. N. T., Kaewlamun, W., Saiwichai, T., Thanee, S., Poofery, J., Tiawsirisup, S., Channumsin, M. and Kaewthamasorn, M. 2021. Development and application of a novel multiplex PCR assay for the differentiation of four haemosporidian parasites in the chicken *Gallus gallus domesticus*. *Vet. Parasitol*. 293 (109431).
- Yamane, T. 1973. Statistics: An Introductory Analysis. 3rd Edition. Harper and Row. New York, USA.
- Zhao, W., Pang, Q., Xu, R., Liu, J., Liu, S., Li, J. and Su, X. Z. 2016. Monitoring the Prevalence of *Leucocytozoon sabrazesi* in Southern China and Testing Tricyclic Compounds against Gametocytes. *PloS one*. 11(8): 1-16.