

การพัฒนาวิธี PCR-RFLP สำหรับตรวจหาและจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp.
และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. จากตัวอย่างเลือดไก่ในประเทศไทย

Development of PCR-RFLP method for detection and differentiation of
Plasmodium spp. and *Leucocytozoon* spp. from chicken blood samples in Thailand

ทวีวัฒน์ ดีมะการ^{1*} อาจง อ่อนหวาน² มัญชรี ทัตติยพงศ์¹ มณฑกานต์ จิระจันท์¹
สุภาวรรณ งามจิตต์เชื้อ³ กิ่งดาว หมอแก้ว¹

Taweewat Deemagarn^{1*} Ard-ong Onwan² Muncharee Tattiyapong¹ Montakan Jiratanh¹
Supawan Ngamjituea³ Kingdao Mohkaew¹

Abstract

Background: Blood protozoan infectious disease in chickens found in Thailand is mainly caused by *Plasmodium gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *Leucocytozoon caulleryi* and *L. sabrazesi*. The disease diagnosis can be performed by detection and species differentiation using microscopic examination of Giemsa-stained blood smear, which requires extensive skill and experience, especially, in cases of a low number of parasites and co-infection. Therefore, it is necessary to apply molecular method in the disease diagnosis such as polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method, which is an accurate method and can differentiate species in case of co-infection. The objective of this study was to develop a PCR-RFLP method to detect and differentiate *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp. found in chicken blood samples in Thailand.

Methods: A pair of PCR primers specific to the 4 species was designed based on cytochrome *b* gene. Analytical sensitivity and specificity of the primers were tested. Suitable restriction enzymes for species differentiation were selected. The PCR-RFLP was tested using the 4 species and 102 DNA samples extracted from chicken blood, previously diagnosed by microscopic examination as positive for *Plasmodium* spp. (n=50), *L. caulleryi* (n=3), *L. sabrazesi* (n=38) and co-infection of *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp. (n=11). Species of the DNA fragment band patterns were confirmed by nucleotide sequencing method.

Results: Analytical sensitivity of the designed primers for DNA detection of *P. gallinaceum* and *P. juxtannucleare* was 10^2 copies/ μ l, while the sensitivity for *L. caulleryi* and *L. sabrazesi* was 10^3 copies/ μ l. The primers were specific to the 4 species. When the PCR-RFLP method was tested by using restriction enzymes *ApoI* and *EcoRV*, 4 patterns of DNA fragment band could be differentiated according to the studied species. Results from testing the developed PCR-RFLP method by DNA samples from chicken blood, it was found that in case of single infection, results of differentiation were consistent with microscopic results. Moreover, *Plasmodium* spp. samples were further identified as *P. gallinaceum* (n=12) and *P. juxtannucleare* (n=38). In case of co-infection, only one sample showed

inconsistent result. The 4 DNA fragment band patterns were consistent with the nucleotide sequencing results.

Conclusions: The PCR-RFLP method developed in this study was able to detect and differentiate the 4 species accurately. The DNA fragment band patterns specific to each species were found. Therefore, this method is suitable for laboratory personnel who lack expertise and experience in microscopic differentiation of the protozoan. Moreover, it will be useful for appropriate drug selection. As a result, the disease can be effectively treated.

Keywords: Chicken, *Leucocytozoon* spp., PCR-RFLP, *Plasmodium* spp., Thailand

¹ National Institute of Animal Health, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900 Thailand

² Upper Northeastern Veterinary Research and Development Center, Muang, Khon Kaen 40260 Thailand

³ Nonthaburi Provincial Livestock Office, Bang Yai, Nonthaburi 11140 Thailand

* Corresponding author. Tel.: 02 579 8911; Fax: 02 579 8918; E-mail: taweewat.d@dld.go.th

¹ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน อำเภอมือง จังหวัดขอนแก่น 40260 ประเทศไทย

³ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดนนทบุรี อำเภอบางใหญ่ จังหวัดนนทบุรี 11140 ประเทศไทย

* ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 02-579-8911 โทรสาร 02-579-8918 อีเมล taweewat.d@dld.go.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคติดเชื้อโปรโตซัวในเลือดไก่ที่พบในประเทศไทยมีสาเหตุหลักจากเชื้อ *Plasmodium gallinaceum*, *P. juxtanucleare*, *Leucocytozoon caulleryi* และ *L. sabraezesi* การตรวจวินิจฉัยทำได้โดยตรวจหาและจำแนกสปีชีส์ของเชื้อจากเลือดป้ายสไลด์ย้อมสี Giemsa ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์สูง โดยเฉพาะในกรณีที่มีปริมาณน้อย รวมถึงการติดเชื้อมีร่วมกัน จึงมีการนำวิธีทางด้านอณูชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค เช่น วิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ และยังสามารถจำแนกสปีชีส์ในกรณีติดเชื้อมีร่วมกัน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี PCR-RFLP สำหรับตรวจหาและจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ที่พบในตัวอย่างเลือดไก่ในประเทศไทย

วิธีการ: ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ โดยอาศัยยีน cytochrome *b* ทดสอบความไวเชิงวิเคราะห์และความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ คัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมในการจำแนกเชื้อ และทดสอบวิธี PCR-RFLP ด้วยตัวอย่างเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ จากนั้นทดสอบวิธีด้วยตัวอย่าง DNA จากเลือดไก่ จำนวน 102 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลบวกจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อเชื้อ *Plasmodium* spp. (n=50), *L. caulleryi* (n=3), *L. sabraezesi* (n=38) และติดเชื้อมีร่วมกันระหว่าง *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. (n=11) ยืนยันสปีชีส์ของรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ที่พบด้วยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ผล: ความไวเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับตรวจหา DNA ของเชื้อ *P. gallinaceum* และ *P. juxtanucleare* เท่ากับ 10^2 copies/ μ l ส่วนเชื้อ *L. caulleryi* และ *L. sabraezesi* เท่ากับ 10^3 copies/ μ l โดยไพรเมอร์มีความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ต่อเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ และเมื่อทดสอบวิธี PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApoI* และ *EcoRV* สามารถจำแนกรูปแบบ

ของแถบชิ้นส่วน DNA ได้ 4 รูปแบบตามสปีชีส์ที่ศึกษา ผลการทดสอบวิธี PCR-RFLP ที่พัฒนาขึ้นด้วยตัวอย่าง DNA จากเลือดไก่ พบว่าในกรณีติดเชื้อสปีชีส์เดียวสามารถจำแนกเชื้อได้ผลสอดคล้องกับวิธีกล้องจุลทรรศน์ และสามารถจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. ได้เป็น *P. gallinaceum* (n=12) และ *P. juxtanucleare* (n=38) ส่วนกรณีติดเชื้อมีเพียง 1 ตัวอย่าง ที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน สำหรับรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ทั้ง 4 รูปแบบ ให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สรุป: วิธี PCR-RFLP ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้สามารถตรวจหาและจำแนกเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยพบรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ที่เฉพาะของเชื้อแต่ละสปีชีส์ วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับผู้ปฏิบัติงานที่ขาดความชำนาญและประสบการณ์ ในการจำแนกเชื้อด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการเลือกใช้ยาที่เหมาะสม ส่งผลให้สามารถรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ไก่ *Leucocytozoon* spp. PCR-RFLP *Plasmodium* spp. ประเทศไทย

บทนำ

โรคติดเชื้อโปรโตซัวในเลือดไก่ที่พบในประเทศไทยมีสาเหตุหลักจากเชื้อในจีส *Plasmodium* และ *Leucocytozoon* ซึ่งเชื้อ *Plasmodium* spp. ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียในไก่ (avian malaria) โดยสปีชีส์ที่มีรายงานพบในประเทศไทย ได้แก่ *P. gallinaceum* (Pattaradilokrat et al., 2015) และ *P. juxtanucleare* (Tattiyapong et al., 2016) มียุงรำคาญ (*Culex* spp.) ยุงลาย (*Aedes* spp.) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะนำโรค ส่วนเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ก่อให้เกิดโรคโลหิตจางไขกระดูกในไก่ (avian leucocytozoonosis) โดยสปีชีส์ที่มีรายงานพบในประเทศไทย ได้แก่ *L. caulleryi* (Pohuang et al., 2021) และ *L. sabraezesi* (พัชรภรณ์ และคณะ, 2560) มีริ้น (*Culicoides* spp.) เป็นพาหะนำโรค โรคติดเชื้อมีทั้ง

มีอาการคล้ายคลึงกัน เช่น โลหิตจางรุนแรง หงอนและ เหนียงซีดมาก มุมนีสีเขียว และไขลต (พรเพ็ญ, 2549) อย่างไรก็ตามยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อ เหล่านี้แตกต่างกัน โดยยา chloroquine และยา doxycycline เป็นยารักษาโรคติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ที่ได้ผลดี (ปิยนุช และคณะ, 2542) นอกจากนี้ ยา chloroquine ยังมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *P. juxtanucleare* ในไก่ (Silveira *et al.*, 2009) ส่วนยารักษาโรคติดเชื้อ *L. caulleryi* ในไก่ที่ได้ผลดี คือ ยา sulfadimethoxine (มนัสนันท์ และคณะ, 2544) ในขณะที่โรคติดเชื้อ *L. sabrazesi* ในไก่ยังไม่มีรายงาน ยารักษาที่ได้ผลดี มีเพียงการศึกษาของ Zhao *et al.* (2016) ซึ่งพบว่ายา primaquine สามารถกำจัดเชื้อ *L. sabrazesi* ระยะอาศัยเพศที่เจริญเติบโตเต็มวัย (mature gametocyte) ได้ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคที่สามารถตรวจหาและจำแนกเชื้อได้อย่างถูกต้องแม่นยำ จะเป็นประโยชน์ต่อการเลือกให้ยาในการรักษาที่เหมาะสม ส่งผลให้การรักษาและควบคุมโรคมีประสิทธิภาพ

วิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย ในไก่และโรคลิโคโซโตซูโนซิสในไก่ คือ การตรวจหาเชื้อ ในเลือดป้ายสไลด์ที่ย้อมด้วยสี Giemsa ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ (Chagas *et al.*, 2020) ซึ่งระยะอาศัย เพศ (gametocyte) เป็นระยะที่สามารถบ่งบอกสปีชีส์ ของเชื้อได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามในระยะที่เชื้อเข้าสู่ เม็ดเลือดแดง (trophozoite) รูปร่างของเชื้อเหล่านี้ มีลักษณะคล้ายกันมาก หรือในกรณีที่ติดเชื้อแบบเรื้อรัง เชื้อระยะ gametocyte ในเลือดอาจมีปริมาณน้อยและ เริ่มเสื่อมสลาย (มานพ, 2545) หากผู้ปฏิบัติงานมีความ ขำนาญและประสบการณ์น้อย อาจตรวจวินิจฉัยผิดพลาด จึงได้มีการนำวิธีทางด้านอณูชีวโมเลกุลมาใช้ร่วมในการ ตรวจหาและจำแนกเชื้อ เช่น วิธี polymerase chain reaction (PCR) (Hellgren *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตาม วิธี PCR ไม่สามารถจำแนกเชื้อในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมกันได้ ต้องนำ PCR product มาผ่านกระบวนการโคลนนิ่ง และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA (Kistler *et al.*, 2013) ซึ่งมีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลาหลายวัน และมีค่าใช้จ่ายสูง ทำให้ต้องนำวิธีอื่นที่สะดวก รวดเร็วและประหยัด

มาใช้แทนวิธีดังกล่าว ได้แก่ วิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง (Beadell and Fleischer, 2005) อีกทั้งยังสามารถ จำแนกชนิดของเชื้อในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมกัน หลายชนิดได้ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการโคลนนิ่งและ ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Kistler *et al.*, 2013) วิธี PCR-RFLP จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาและจำแนก เชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ในเลือดสัตว์ปีก (Cosgrove *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2009; Krams *et al.*, 2012) โดยมีรายงานการ ศึกษาการใช้ยีน cytochrome *b* (*cyt b*) ในการออกแบบ โพรเมอร์สำหรับวิธี PCR-RFLP มากที่สุด (Kistler *et al.*, 2013; Clark *et al.*, 2014) เนื่องจากเป็นยีนที่อยู่ใน บริเวณอนุรักษ์ (conserved region) จึงเหมาะสำหรับ ใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อ (Hellgren *et al.*, 2004) การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี PCR-RFLP โดยอาศัยยีน *cyt b* สำหรับตรวจหาและจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ที่พบ ในตัวอย่างเลือดไก่ในประเทศไทย เพื่อช่วยให้การตรวจ วินิจฉัยและจำแนกเชื้อ *P. gallinaceum*, *P. juxtanucleare*, *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* มีประสิทธิภาพสูง อันจะ เป็นประโยชน์ต่อการชันสูตร การรักษา และการควบคุมโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างสารพันธุกรรม (DNA)

ตัวอย่าง DNA สำหรับการพัฒนาวิธี PCR-RFLP

ตัวอย่างควบคุมบวกเป็น DNA ของเชื้อ *P. gallinaceum* (LC506179), เชื้อ *P. juxtanucleare* (KU248841), เชื้อ *L. sabrazesi* (LC506045) จากกลุ่ม ปรสิตรวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และเชื้อ *L. caulleryi* (LC505517) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการ สัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ซึ่งได้ ยืนยันสปีชีส์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการตรวจหาลำดับ นิวคลีโอไทด์แล้ว สำหรับตัวอย่าง DNA ของเชื้อปรสิตร ชนิดอื่นที่พบในเลือดไก่ ได้แก่ เชื้อ *Microfilaria* และเชื้อ *Trypanosoma* spp. และตัวอย่าง DNA ของเลือดไก่ที่

ปราศจากเชื้อปรสิต เป็นตัวอย่างจากกลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โดยเก็บตัวอย่าง DNA ทั้งหมดที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ ส่วนตัวอย่าง ควบคุมลบเป็น DNase/RNase-free distilled water (Invitrogen, USA)

ตัวอย่าง DNA สำหรับการทดสอบ

ตัวอย่าง DNA จากเลือดไก่ที่ตรวจพบเชื้อโปรโตซัว ในเลือดป้ายสไลด์ย้อมสี Giemsa ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยกลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่าง เดือนเมษายน พ.ศ. 2557 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560 จำนวน 102 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่พบเชื้อ *Plasmodium* spp. จำนวน 50 ตัวอย่าง เชื้อ *L. caulleryi* จำนวน 3 ตัวอย่าง เชื้อ *L. sabrazesi* จำนวน 38 ตัวอย่าง และติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. จำนวน 11 ตัวอย่าง โดยทำการสกัด DNA จากเลือดไก่ด้วยชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured cell) (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต และเก็บตัวอย่าง DNA ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ ในขั้นตอนต่อไป

การออกแบบไพรเมอร์

เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cyt b* ของเชื้อ *P. gallinaceum* (AB250690), *P. juxtannucleare* (AB250415), *L. caulleryi* (AB302215) และ *L. sabrazesi* (AB299369) จากฐานข้อมูลของ GenBank (NCBI, 2018) มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์เปรียบเทียบกัน ด้วยคำสั่ง ClustalW Multiple alignment (Thompson *et al.*, 1994) ในโปรแกรม BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999) ทำการออกแบบไพรเมอร์สาย forward (PLF) โดยดัดแปลงจากการศึกษาของ Hellgren *et al.* (2004) และออกแบบไพรเมอร์สาย reverse (PLR) จากบริเวณอนุรักษ์ แล้วตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ ต่อเชื้อที่ศึกษา ค่า melting temperature (T_m) ของไพรเมอร์ และขนาดของ PCR product ด้วยโปรแกรมออนไลน์ Primer-BLAST ในเว็บไซต์ <https://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Ye *et al.*, 2012)

วิธี Polymerase chain reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อทุกตัวอย่าง โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 μ l ประกอบด้วยสารละลาย 2X GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) 12.5 μ l, ไพรเมอร์ PLF และ PLR ความเข้มข้น 10 μ M อย่างละ 0.25 μ l, DNase/RNase-free distilled water (Invitrogen, USA) 9 μ l และ DNA template 3 μ l นำสารละลายผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยี่ห้อ Applied Biosystems™ รุ่น Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยใช้สภาวะอุณหภูมิ ดังนี้ initial denaturation ที่ 95°C นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 95°C นาน 30 วินาที, annealing ที่ 47°C นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 45 รอบ และ final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที จากนั้นแบ่ง PCR product 5 μ l ไปวิเคราะห์ขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที ย้อม gel ด้วย ethidium bromide แล้วนำ gel ไปวิเคราะห์ขนาดของ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องถ่ายภาพแถบสารพันธุกรรมยี่ห้อ WEALTEC รุ่น Dolphin-DOC (Wealtec Corp., USA) โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 100 bp (Invitrogen, USA) นำ PCR product ที่เหลือไปใช้ในการจำแนกเชื้อด้วยวิธี RFLP ต่อไป

การสร้างพลาสมิดและการโคลนนิ่ง

เพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *cyt b* ของตัวอย่าง ควบคุมบวกของเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ ตามขั้นตอนของวิธี PCR ข้างต้น โดยปรับปริมาตรส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เป็น 50 μ l จากนั้นตัดแถบ DNA เป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 802 bp จาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำ DNA เป้าหมายที่บริสุทธิ์แล้ว มาทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิดของชุดน้ำยา pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega Corporation, USA) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต แล้วทำพลาสมิดที่มี DNA เป้าหมายให้บริสุทธิ์ด้วยชุด

น้ำยา Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ยืนยันผลการทำโคลนนิ่งด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวัดความเข้มข้นของพลาสมิดที่มี DNA เป้าหมายที่บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA) ร่วมกับเครื่อง Qubit™ fluorometer (Invitrogen, USA) จากนั้นเก็บพลาสมิดที่มี DNA เป้าหมายที่บริสุทธิ์ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบความไวเชิงวิเคราะห์และความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์

ทดสอบความไวเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ โดยเจือจางพลาสมิดที่มี DNA เป้าหมายของเชื้อควบคุมบวกแต่ละสปีชีส์ในหน่วย copies/μl (Ke *et al.*, 2006) แบบ 10-fold serial dilution ด้วย Tris buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) แล้วนำมาทดสอบตามวิธี PCR ข้างต้นที่ความเข้มข้นเริ่มต้นตั้งแต่ 10^7 จนถึง 10^{-1} copies/μl เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อแต่ละสปีชีส์ได้

ทดสอบความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ โดยนำตัวอย่าง DNA ควบคุมบวกทั้ง 4 สปีชีส์ ตัวอย่าง DNA ของเชื้อปรสิตชนิดอื่น ๆ ที่พบในเลือดไก่ ได้แก่ *Microfilaria* และ *Trypanosoma* spp. และตัวอย่าง DNA ของเลือดไก่ที่ปราศจากเชื้อปรสิต มาทดสอบตามวิธี PCR ข้างต้น

การคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ

คัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้โปรแกรมออนไลน์ NEBcutter V2.0 ในเว็บไซต์ <https://nc2.neb.com/NEBcutter2/> (Vincze *et al.*, 2003) ทำการจำลองการตัด PCR product ของตัวอย่างควบคุมบวกทั้ง 4 สปีชีส์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ที่สามารถใช้ร่วมกันในการตัด PCR product แล้วได้จำนวนและขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่แตกต่างกัน เพื่อให้ได้รูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA (DNA fragment band pattern) ของเชื้อแต่ละสปีชีส์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

การเตรียมตัวอย่างควบคุมบวกเพื่อหารูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA

นำตัวอย่าง DNA ของตัวอย่างควบคุมบวกมาทดสอบด้วยวิธี PCR ข้างต้น จากนั้นวัดความเข้มข้นของ PCR product ที่ได้ด้วยชุดน้ำยา Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA) ร่วมกับเครื่อง Qubit™ fluorometer (Invitrogen, USA) แล้วนำ PCR product ไปทดสอบด้วยวิธี RFLP โดยกรณีติดเชื้อสปีชีส์เดียว ใช้ PCR product ปริมาณ 500 ng และปรับปริมาตรของปฏิกิริยา RFLP ด้วย DNase/RNase-free distilled water จนครบ 25 μl สำหรับกรณีติดเชื้อร่วม ทำการผสม PCR product ของตัวอย่างควบคุม 2 สปีชีส์ สปีชีส์ละ 500 ng โดยผสม PCR product ของ *P. gallinaceum* และ *P. juxtannucleare*, *P. gallinaceum* และ *L. caulleryi*, *P. gallinaceum* และ *L. sabrazesi*, *P. juxtannucleare* และ *L. caulleryi*, *P. juxtannucleare* และ *L. sabrazesi*, *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* ให้เข้ากัน ก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธี RFLP โดยปรับปริมาตรของปฏิกิริยาด้วย DNase/RNase-free distilled water จนครบ 25 μl

วิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

ตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกได้ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา RFLP ปริมาตร 25 μl ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ 10X Buffer 3.1 ปริมาตร 2.5 μl, เอนไซม์ *ApoI* (10 units/μl) และ *EcoRV* (20 units/μl) อย่างละ 0.5 μl, DNase/RNase-free distilled water 11.5 μl และ PCR product 10 μl บ่มที่ 37°C นาน 15 นาที แล้วบ่มต่อที่ 50°C นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80°C นาน 20 นาที ตรวจสอบ PCR product ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์แล้วด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 4% agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 50 นาที จากนั้นย้อม gel ด้วย ethidium bromide แล้วนำไปวิเคราะห์รูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องถ่ายภาพแถบสารพันธุกรรมยี่ห้อ WEALTEC รุ่น Dolphin-DOC (Wealtec Corp., USA) โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 50 bp (New England Biolabs, USA)

การทดสอบตัวอย่างด้วยวิธี PCR-RFLP

นำตัวอย่าง DNA สำหรับการทดสอบ จำนวน 102 ตัวอย่าง มาตรวจหาและจำแนกสปีชีส์ตามวิธี PCR และ RFLP ข้างต้น จากนั้นสุ่มตัวอย่างที่พบรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA เหมือนกัน รูปแบบละ 2 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการเลือกตัวอย่างแบบสะดวก (convenience sampling) เพื่อนำไปตรวจยืนยันสปีชีส์ของเชื้อด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ตามขั้นตอนของวิธี PCR ข้างต้น โดยปรับปริมาตรส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เป็น 50 µl จากนั้นตัดแถบ DNA เป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 802 bp จาก agarose gel เพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยา GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำ DNA เป้าหมายที่บริสุทธิ์มาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ชุดน้ำยา BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ร่วมกับเครื่องตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยี่ห้อ Applied Biosystems™ รุ่น ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999) และยืนยันสปีชีส์ของเชื้อโดยการตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรมออนไลน์ Nucleotide BLAST ในเว็บไซต์ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (NCBI, 2021)

ผลและวิจารณ์

ผลการออกแบบและทดสอบไพรเมอร์

เมื่อใช้โปรแกรมออนไลน์ Primer-BLAST ตรวจสอบไพรเมอร์ที่ได้ดัดแปลงและออกแบบใหม่ พบว่าไพรเมอร์ทั้งสองเส้นมีความจำเพาะต่อเชื้อที่ศึกษาและมีค่า T_m ใกล้เคียงกัน โดยคาดว่าขนาด PCR product ของเชื้อที่ศึกษา มีขนาด 802 bp (ตารางที่ 1) ซึ่งมากกว่า

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ด้วยโปรแกรมออนไลน์ Primer-BLAST

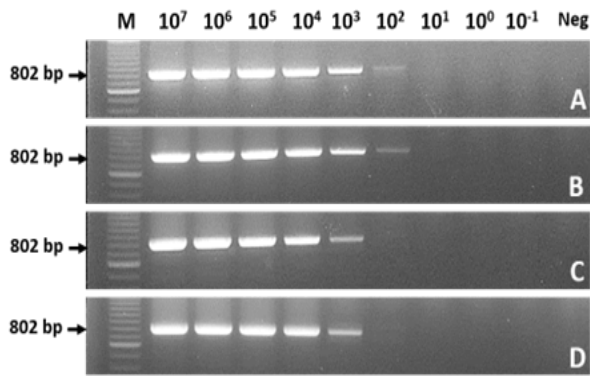
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	T_m (°C)	ขนาด PCR product (bp)
PLF	CAACATATATTAAGAGAATTATGGAG	52	802
PLR	GGTTTATATGTTTCATTCTATGCTT	53	

PCR product จากการศึกษาคือของ Hellgren *et al.* (2004) ที่มีขนาด 530 bp ทำให้สามารถเลือกตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนสาย PCR product ได้มากขึ้น

เมื่อทำการทดสอบตัวอย่าง DNA ควบคุมบวกของเชื้อที่ทำการศึกษาคือด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ PLF และ PLR ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ในช่วง 45-53°C พบว่าสามารถตรวจหา DNA ของเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ได้ โดยปรากฏเป็นแถบ DNA ชัดเจนมากที่สุดที่อุณหภูมิ 47°C จึงเลือกเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับปฏิกิริยา PCR และพบแถบ PCR product ขนาดประมาณ 802 bp ซึ่งสอดคล้องกับขนาด PCR product ที่ตรวจสอบด้วยโปรแกรมออนไลน์ Primer-BLAST จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ดัดแปลงจากการศึกษาของ Hellgren *et al.* (2004) และไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ สามารถตรวจหาเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ได้

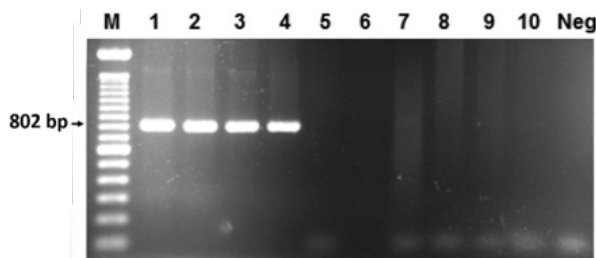
ผลการทดสอบความไวเชิงวิเคราะห์และความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์

จากการทดสอบความไวเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ PLF และ PLR โดยการหาความเข้มข้นต่ำสุดของพลาสมิด ซึ่งมี DNA เป้าหมายของเชื้อควบคุมบวกแต่ละสปีชีส์ที่วิธี PCR สามารถตรวจพบได้ พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจพบแถบ PCR product ขนาดประมาณ 802 bp ของเชื้อ *P. gallinaceum* และ *P. juxtannucleare* เท่ากับ 10^2 copies/µl ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจพบแถบ PCR product ขนาดประมาณ 802 bp ของเชื้อ *L. caulleryi* และ *L. sabraezesi* เท่ากับ 10^3 copies/µl (รูปที่ 1) แสดงว่าไพรเมอร์ PLF และ PLR ที่ออกแบบมีความสามารถในการตรวจหา DNA ของเชื้อ *P. gallinaceum* และ *P. juxtannucleare* ได้ดีกว่าเชื้อ *L. caulleryi* และ *L. sabraezesi*



รูปที่ 1 แสดงความไวเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ในการทดสอบ DNA ของเชื้อ *P. gallinaceum* (A), *P. juxtannucleare* (B), *L. caulleryi* (C) และ *L. sabrazesi* (D) ด้วยวิธี PCR ที่ความเข้มข้นของพลาสมิด DNA ตั้งแต่ 10^7 จนถึง 10^{-1} copies/ μ l ตามลำดับ โดย lane M คือ DNA marker ขนาด 100 bp (Invitrogen, USA) และ lane Neg คือ ตัวอย่างควบคุมลบ

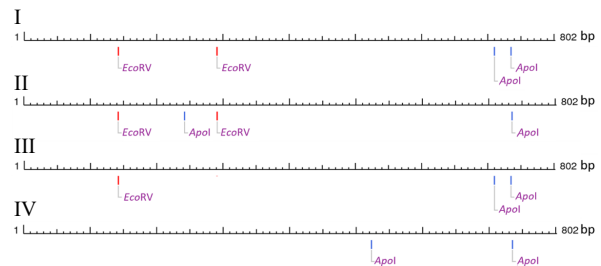
สำหรับการทดสอบความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ PLF และ PLR พบว่าตัวอย่าง DNA ควบคุมบวกของเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ ให้ผลบวกโดยพบแถบ PCR product ขนาดประมาณ 802 bp ในขณะที่ตัวอย่าง DNA จากเชื้อ *Microfilaria* และเชื้อ *Trypanosoma* spp. รวมถึงตัวอย่าง DNA ของเลือดไก่ที่ปราศจากเชื้อปรสิต ให้ผลลบ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ในการทดสอบตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *P. gallinaceum* (lane 1), *P. juxtannucleare* (lane 2), *L. caulleryi* (lane 3), *L. sabrazesi* (lane 4), *Microfilaria* (lane 5 และ 6), *Trypanosoma* spp. (lane 7 และ 8) และตัวอย่าง DNA ของเลือดไก่ที่ปราศจากเชื้อปรสิต (lane 9 และ 10) โดย lane M คือ DNA marker ขนาด 100 bp (Invitrogen, USA) และ lane Neg คือ ตัวอย่างควบคุมลบ

ผลการคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการจำลองการตัด PCR product ของตัวอย่างควบคุมบวกทั้ง 4 สปีชีส์ที่มีความยาว 802 bp ด้วยโปรแกรมออนไลน์ NEBcutter V2.0 พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมคือ เอนไซม์ *ApoI* และ *EcoRV* (รูปที่ 3) โดยเอนไซม์



รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApoI* และ *EcoRV* บนสายนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ของเชื้อ *P. gallinaceum* (I), *P. juxtannucleare* (II), *L. caulleryi* (III) และ *L. sabrazesi* (IV) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมออนไลน์ NEBcutter V2.0

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนและขนาดของแถบชิ้นส่วน DNA ของเชื้อที่ศึกษา ซึ่งได้จากการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApoI* และ *EcoRV* โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ NEBcutter V2.0 และเทคนิค gel electrophoresis

เชื้อ	แถบชิ้นส่วน DNA				รูปแบบ
	NEBcutter		Gel electrophoresis		
	จำนวน (แถบ)	ขนาด (bp)	จำนวน (แถบ)	ขนาด (bp)	
<i>P. gallinaceum</i>	5	419, 149, 143, 66, 25	3	419, 149+143 ^a , 66	I
<i>P. juxtannucleare</i>	5	444, 143, 100, 66, 49	4	444, 143, 100, 66+49 ^b	II
<i>L. caulleryi</i>	4	568, 143, 66, 25	3	568, 143, 66	III
<i>L. sabrazesi</i>	3	524, 212, 66	3	524, 212, 66	IV

^a = แถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 149 bp ซิดกับแถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 143 bp

^b = แถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 66 bp ซิดกับแถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 49 bp

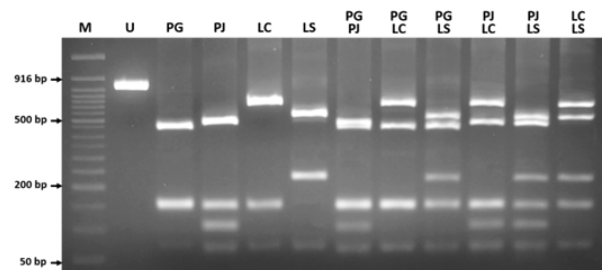
ApoI มีตำแหน่งตัดจำเพาะ 2 ตำแหน่งบนสายนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ของเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ ซึ่งเชื้อ *P. gallinaceum* และ *L. caulleryi* มีตำแหน่งตัดจำเพาะที่เหมือนกัน ส่วนเอนไซม์ *EcoRV* มีตำแหน่งตัดจำเพาะ 2 ตำแหน่งบนสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. gallinaceum* และ *P. juxtannucleare* และมีตำแหน่งตัดจำเพาะ 1 ตำแหน่งบนสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *L. caulleryi* แต่ไม่พบตำแหน่งตัดจำเพาะบนสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *L. sabrazesi* นอกจากนี้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดยังใช้ Buffer 3.1 ซึ่งเป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา RFLP เหมือนกัน ทำให้สามารถใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันในการตัด PCR product ช่วยลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน โดยผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมออนไลน์พบว่าเชื้อที่ศึกษามีรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA จำนวน 4 รูปแบบแตกต่างกัน คือ รูปแบบ I-IV (ตารางที่ 2) ทำให้สามารถจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Cosgrove et al. (2006) และ Kistler et al. (2013)

ที่นำไพรเมอร์ซึ่งออกแบบโดย Hellgren *et al.* (2004) มาใช้ในการพัฒนาวิธี PCR-RFLP สำหรับจำแนกเชื้อในระดับจีโนส โดย Cosgrove *et al.* (2006) ใช้เอนไซม์ *NcoI* และ *EcoRV* ในการจำแนกระหว่างเชื้อจีโนส *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ที่พบในเลือดนก blue tits (*Cyanistes caeruleus*) ส่วน Kistler *et al.* (2013) ใช้เอนไซม์ *EcoRV* ในการจำแนกระหว่างเชื้อจีโนส *Plasmodium* spp. และ *Haemoproteus* spp. ที่พบในเลือดนกป่า

สำหรับผลการใช้เอนไซม์ *ApoI* และ *EcoRV* ทดสอบตัวอย่าง DNA ควบคุมบวกของเชื้อที่ศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP และวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค gel electrophoresis (ตารางที่ 2 และรูปที่ 4) พบว่าจำนวนแถบชิ้นส่วน DNA ของเชื้อที่ปรากฏบน agarose gel มีจำนวนน้อยกว่าจำนวนแถบชิ้นส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมออนไลน์ NEBcutter V2.0 ซึ่งเกิดจาก 2 สาเหตุ คือ แถบชิ้นส่วน DNA มีขนาดเล็กและแถบชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาดใกล้เคียงกันอยู่ติดกันโดยสาเหตุแรก พบในกรณีของเชื้อ *P. gallinaceum* และ *L. caulleryi* เมื่อตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ *ApoI* และ *EcoRV* แล้วได้แถบชิ้นส่วน DNA ขนาดเล็กประมาณ 25 bp ทำให้แถบชิ้นส่วน DNA ปรากฏบน agarose gel คล้ายแถบ primer-dimer และจางมากจนไม่สามารถสังเกตเห็นได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Beadell and Fleischer (2005) ที่จำแนกเชื้อจีโนส *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ด้วยเอนไซม์ *XmnI* และ *XbaI* แล้วได้แถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 39 bp ซึ่งมีขนาดเล็กและจางมากเช่นเดียวกัน ส่วนสาเหตุที่สอง พบในกรณีของเชื้อ *P. gallinaceum* โดยแถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 149 bp อยู่ติดกับแถบขนาด 143 bp และในกรณีของเชื้อ *P. juxtanucleare* โดยแถบขนาด 66 bp อยู่ติดกับแถบขนาด 49 bp ทำให้แถบชิ้นส่วน DNA ปรากฏบน agarose gel เหมือนเป็นแถบเดียวกันซึ่งปรากฏเป็นแถบสีเข้มและมีความกว้างกว่าแถบของชิ้นส่วน DNA ที่เป็นแถบชิ้นเดียว จากผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าวิธี PCR-RFLP ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อทั้งในกรณีติดเชื้อสปีชีส์เดียวและกรณีติดเชื้อร่วม

ถึงแม้ว่าผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ของการศึกษานี้ไม่สามารถสังเกตเห็นแถบชิ้นส่วน DNA ขนาดเล็ก และพบว่ามีแถบชิ้นส่วน DNA อยู่ติดกัน แต่แถบชิ้นส่วน DNA อื่นที่ปรากฏบน agarose gel ของเชื้อแต่ละสปีชีส์มีจำนวนและขนาดแตกต่างกัน ทำให้ยังคงสามารถจำแนกเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ได้

นอกจากนี้เมื่อทำการจำลองการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อ 2 สปีชีส์โดยการผสมตัวอย่าง DNA ควบคุมบวก แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี PCR-RFLP พบว่ารูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อร่วมกันแบบต่าง ๆ มีลักษณะเฉพาะ (รูปที่ 4) ทำให้สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อในตัวอย่างเลือดไก่ที่มีการติดเชื้อร่วมกันได้ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการโคลนนิ่งและการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นการลดขั้นตอนระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการทดสอบ สอดคล้องกับการศึกษาของ Kistler *et al.* (2013) ซึ่งรายงานว่าวิธี PCR-RFLP สามารถจำแนกเชื้อในกรณีการติดเชื้อร่วมกันในระดับจีโนสระหว่างเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Haemoproteus* spp. ได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการโคลนนิ่งและการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 4 รูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ที่เกิดจากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApoI* และ *EcoRV* ตัด PCR product ของเชื้อ ในกรณีการติดเชื้อสปีชีส์เดียวของเชื้อ *P. gallinaceum* (PG), *P. juxtanucleare* (PJ), *L. caulleryi* (LC) และ *L. sabrazesi* (LS) และในกรณีการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ PG กับ PJ, PG กับ LC, PG กับ LS, PJ กับ LC, PJ กับ LS และ LC กับ LS ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบกับ DNA marker ขนาด 50 bp (New England Biolabs, USA) (M) และ PCR product ของเชื้อ *P. gallinaceum* ขนาด 802 bp ซึ่งไม่ได้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (U)

ผลการทดสอบตัวอย่างด้วยวิธี PCR-RFLP

เมื่อทดสอบตัวอย่าง DNA จากเลือดไก่ จำนวน 102 ตัวอย่าง ด้วยวิธี PCR-RFLP สามารถจำแนกตัวอย่างได้ในระดับสปีชีส์ (ตารางที่ 3) โดยกรณีตัวอย่างติดเชื้อ

สปิชีส์เดียว พบรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA จำนวน 4 รูปแบบ โดยแบ่งเป็น รูปแบบ I (12 ตัวอย่าง), รูปแบบ II (38 ตัวอย่าง), รูปแบบ III (3 ตัวอย่าง) และรูปแบบ IV (38 ตัวอย่าง) ซึ่งเป็นรูปแบบที่ตรงกับรูปแบบของตัวอย่างควบคุมบวกของเชื้อ *P. gallinaceum*, *P. juxtanucleare*, *L. caulleryi* และ *L. sabralesi* ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 4 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าวิธี PCR-RFLP ให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ไม่ได้จำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. ในระดับสปิชีส์ เนื่องจากเชื้อ *P. gallinaceum* และ *P. juxtanucleare* มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก ต่างกันที่เชื้อ *P. juxtanucleare* มักจะอยู่ติดกับนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไก่ และขนาดของ gametocyte มักจะเล็กกว่านิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไก่ แต่ปริมาณ gametocyte ของเชื้อ *P. juxtanucleare* ในเลือดมีน้อย (Valkiunas, 2004) จึงทำให้ยากต่อการจำแนกกระหว่างเชื้อ 2 สปิชีส์นี้ นอกจากนี้การติดเชื้อทั้ง 2 สปิชีส์ สามารถใช้ยา chloroquine ในการรักษาเหมือนกัน (ปิยนุช และคณะ, 2542; Silveira et al., 2009) จึงรายงานผลการจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. เพียงระดับจิ้นจากการตรวจด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์

สำหรับตัวอย่างที่พบการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Plasmodium* spp. กับ *Leucocytozoon* spp. ด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 11 ตัวอย่าง พบว่าวิธี PCR-RFLP สามารถตรวจหาและจำแนกเชื้อได้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 10 ตัวอย่าง มีเพียง 1 ตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องโดยเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *L. sabralesi* จากการตรวจด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ แต่พบว่าให้ผลบวกต่อเชื้อ *P. juxtanucleare* เพียงเชื้อเดียวเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR-RFLP และยืนยันสปิชีส์เชื้อด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA แล้ว ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณเชื้อ *L. sabralesi* ในตัวอย่างเลือดต่ำกว่าปริมาณเชื้อต่ำสุดที่วิธี PCR-RFLP สามารถตรวจหาได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด 10^3 copies/ μ l

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ระหว่างวิธีการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิธี PCR-RFLP

เชื้อที่ตรวจพบ	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ	
	กล้องจุลทรรศน์	PCR-RFLP
กรณีติดเชื้อสปิชีส์เดียว		
<i>Plasmodium</i> spp.	50	—*
<i>P. gallinaceum</i>	— [†]	12
<i>P. juxtanucleare</i>	— [†]	39
<i>L. caulleryi</i>	3	3
<i>L. sabralesi</i>	38	38
กรณีติดเชื้อร่วม		
<i>Plasmodium</i> spp. และ <i>Leucocytozoon</i> spp.	11	—*
<i>P. gallinaceum</i> และ <i>L. sabralesi</i>	— [†]	2
<i>P. juxtanucleare</i> และ <i>L. caulleryi</i>	— [†]	1
<i>P. juxtanucleare</i> และ <i>L. sabralesi</i>	— [†]	7
รวม	102	102

[†] = ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่ได้ระบุสปิชีส์ ของเชื้อ

* = ผลการตรวจด้วยวิธี PCR-RFLP ระบุเชื้อในระดับสปิชีส์ จึงไม่แสดงผลในระดับจิ้น

ผลการตรวจยืนยันสปิชีส์ของเชื้อด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA

เมื่อสุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อวิธี PCR-RFLP และมีรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA เหมือนรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ของตัวอย่างควบคุมบวกของเชื้อทั้ง 4 รูปแบบ รูปแบบละ 2 ตัวอย่าง รวมจำนวน 8 ตัวอย่าง มาตรวจยืนยันสปิชีส์ด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 752 bp (ไม่รวมไพรเมอร์) ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ Nucleotide BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง DNA ทั้ง 8 ตัวอย่าง เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแต่ละสปิชีส์ในฐานข้อมูล โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) อยู่ในช่วง 95.35-100% (ตารางที่ 4) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการตรวจยืนยันสปิชีส์สอดคล้องกับรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ของเชื้อแต่ละสปิชีส์ ทั้งนี้ได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทั้ง 8 ตัวอย่าง ไปรายงานลงในฐานข้อมูลของ DNA Data Bank of Japan (DDBJ, 2022) และได้รับ accession number LC713395-LC713402

ตารางที่ 4 ผลการยืนยันสปีชีส์จากรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ของตัวอย่างทดสอบ โดยการตรวจสอบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรมออนไลน์ Nucleotide BLAST

ตัวอย่างที่	รูปแบบ	สปีชีส์ (GenBank accession no.)	% Identity	Accession no.
1	I	<i>P. gallinaceum</i> (AB250690)	100%	LC713395
2	I	<i>P. gallinaceum</i> (AB250690)	100%	LC713396
3	II	<i>P. juxtannucleare</i> (AB250415)	100%	LC713397
4	II	<i>P. juxtannucleare</i> (MG598396)	100%	LC713398
5	III	<i>L. caulleryi</i> (LC505517)	100%	LC713399
6	III	<i>L. caulleryi</i> (LC505517)	95.35%	LC713400
7	IV	<i>L. sabraezesi</i> (LC506045)	100%	LC713401
8	IV	<i>L. sabraezesi</i> (LC506045)	99.73%	LC713402

วิธี PCR ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้สามารถตรวจหาเชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ได้ และเมื่อนำวิธี PCR มาใช้ร่วมกับวิธี RFLP ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อ ทำให้สามารถจำแนกเชื้อได้ถึง 4 สปีชีส์ ทั้งในกรณีติดเชื้อสปีชีส์เดียวและกรณีติดเชื้อร่วม ซึ่งรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น การศึกษาของ Beadell and Fleischer (2005), Cosgrove *et al.* (2006) และ Krams *et al.* (2012) เป็นการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อดังกล่าวในระดับจีโนมเท่านั้น การศึกษานี้จึงเป็นการพัฒนาวิธี PCR-RFLP เพื่อจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ที่มีรายงานพบในไก่ในประเทศไทยในระดับสปีชีส์เป็นครั้งแรก ซึ่งสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปตรวจหาและจำแนกเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเลือกใช้ยาที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้พบว่าวิธี PCR-RFLP ที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยยีน *cyt b* และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApoI* และ *EcoRV* สามารถตรวจหาและจำแนกเชื้อ *P. gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *L. caulleryi* และ *L. sabraezesi* ที่พบในตัวอย่างเลือดไก่ในประเทศไทยได้อย่างถูกต้อง

แม่นยำ โดยมีรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA จำนวน 4 รูปแบบ ซึ่งเป็นรูปแบบที่เฉพาะของเชื้อแต่ละสปีชีส์ อีกทั้งวิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ประหยัดและเหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการที่ขาดแคลนผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญและประสบการณ์ในการจำแนกเชื้อด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ และไม่มีเครื่องตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้การศึกษาดังกล่าวยังเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธี PCR-RFLP โดยอาจเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาและจำแนกสปีชีส์อื่นที่มีรายงานพบในไก่ เช่น เชื้อ *P. relictum* และ *L. schoutedeni* เป็นต้น เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการเกิดโรค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *L. caulleryi* (LC505517) และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการดำเนินการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

- ปิยนุช ประสิทธิ์รัตน์ ชัยศิริ มหันชัยสกุล ทศนีย์ ชมภูจันทร์ กิ่งดาว หมอแก้ว และอนุชา สุขรัตน์. 2542. ผลของการใช้ยาคลอโรควินและดอกซีไซคลินรักษาโรคมาลาเรียในไก่เนื้อ. *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 สาขาสัตวศาสตร์ สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. ระหว่างวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. หน้า 445-452.
- พรเพ็ญ พัฒนโสภณ. 2549. โรคสัตว์ปีก. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 114 หน้า.
- พัชรภรณ์ ทาแกง สุรัชย์ พิกุลแก้ว ณัฐกานต์ อัยวานนท์ และสุรรัตน์ หนูมี. 2560. ความชุกและปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อปรสิตในเลือดไก่หลังบ้าน ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่. *เชียงใหม่สัตวแพทยสาร*. 15 (3): 157-167.
- มนัสนันท์ ประสิทธิ์รัตน์ มนทกานต์ วงศ์ภากร ทศนีย์ ชมภูจันทร์ อุดมศรี อินทรโชติ กิ่งดาว หมอแก้ว และอนุชา สุขรัตน์. 2544. การรักษาโรคโลหิตโคไซโตซูนในไก่พื้นเมืองด้วยยาซัลฟาไดเมทท็อกซิน และการใช้มิง. *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตวศาสตร์ สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. ระหว่างวันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 2544. หน้า 387-393.

- มานพ ม่วงใหญ่. 2545. พลาสโมเดียม ลิวโคซัยโตซูน และเฮโมโปรเตียส. ใน: วิทยาลัยสัตวศาสตร์สัตวทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. หน้า 160-178.
- Beadell, J.S. and Fleischer, R.C. 2005. A restriction enzyme-based assay to distinguish between avian hemosporidians. *J. Parasitol.* 91 (3): 683-685.
- Chagas, C.R.F., Binkienė, R., Ilgūnas, M., Iezhova, T. and Valkiūnas, G. 2020. The buffy coat method: a tool for detection of blood parasites without staining procedures. *Parasit. Vectors.* 13 (1): 104.
- 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. *Int. J. Parasitol.* 44 (5): 329-338.
- Cosgrove, C.L., Day, K.P. and Sheldon, B.C. 2006. Coamplification of *Leucocytozoon* by PCR diagnostic tests for avian malaria: a cautionary note. *J. Parasitol.* 92 (6): 1362-1365.
- DNA Data Bank of Japan (DDBJ). 2022. "DDBJ Nucleotide Sequence Submission System." [Online]. Available: <https://www.ddbj.nig.ac.jp/ddbj/web-submission-e.html>. Accessed June 5, 2022.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 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. *J. Parasitol.* 90 (4): 797-802.
- Ke, G.M., Cheng, H.L., Ke, L.Y., Ji, W.T., Chulu, J.L.C., Liao, M.H., Chang, T.J. and Liu, H.J. 2006. Development of a quantitative Light cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. *J. Virol. Methods.* 133 (1): 6-13.
- Kistler, W.M., Hernandez, S.M., Gibbs, S.E., Ballard, J.R., Arnold, S.L., Johnson, T. and Yabsley, M.J. 2013. Evaluation of a restriction fragment length enzyme assay for differentiation of *Haemoproteus* and *Plasmodium* across a standard region of the mitochondrial genome. *J. Parasitol.* 99 (6): 1133-1136.
- Krams, I., Suraka, V., Čirule, D., Hukkanen, M., Tummeleht, L., Mierauskas, P., Rytönen, S., Rantala, M.J., Vrublevska, J., Orell, M. and Krama, T. 2012. A comparison of microscopy and PCR diagnostics for low intensity infections of haemosporidian parasites in the Siberian tit *Poecile cinctus*. *Ann. Zool. Fennici.* 49: 331-340.
- Martinez J., Martinez-DE LA Puente, J., Herrero, J., Del Cerro, S., Lobato, E., Rivero-DE Aguilar, J., Vásquez, R.A. and Merino, S. 2009. A restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: on the inefficiency of general primers for detection of mixed infections. *Parasitology.* 136 (7): 713-722.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2018. "GenBank." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Accessed January 31, 2018.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2021. "Basic Local Alignment Search Tool." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Accessed May 1, 2021.
- Pattaradilokrat, S., Tiyananee, W., Simpailpan, 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., Jittimanee, 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.
- Silveira, P., Vashist, U., Cabral, A., Amaral, K.B., Soares, G.L.G. and Dagosto, M. 2009. Effect of rutin and chloroquine on White Leghorn chickens infected with *Plasmodium (Bennettinia) juxtanucleare*. *Trop Anim. Health Prod.* 41 (7): 1319-1323.
- 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.
- 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 (22): 4673-4680.
- Valkiunas, G. 2004. Family Plasmodiidae. In: Avian malaria parasites and other haemosporidia. Valkiunas, G. (Ed), CRC Press. Florida, USA. pp. 589-730.
- Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31 (13): 3688-3691.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T.L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13: 134.

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): e0161869.